

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Anđelka Bugarin

**HLA RIZIČNI GENOTIPOVI ZA
DIJABETES TIP 1 U OBOLJELIH U
ISTOČNOJ HRVATSKOJ**

Diplomski rad

Osijek, 2015.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Anđelka Bugarin

HLA RIZIČNI GENOTIPOVI ZA DIJABETES TIPA 1 U OBOLJELIH U ISTOČNOJ HRVATSKOJ

Diplomski rad

Osijek, 2015.

Rad je ostvaren u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva

Mentor rada: prof.dr.sc. Ljubica Glavaš-Obrovac, dipl.inž.

Rad ima 33 lista, 8 tablica i 6 slika

Zahvala

Zahvaljujem mentoru, prof.dr.sc. Ljubici Glavaš-Obrovac, dipl.inž. na nesebičnoj i stručnoj pomoći, korisnim savjetima i usmjeravanjima tijekom studiranja i izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem mojim kolegicama: u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva na pomoći i dijeljenju iskustava.

Velika hvala mom suprugu i djeci na potpori, strpljenju i razumijevanju tijekom cijelog studiranja.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Dijabetes tip 1 (T1DM)	1
1.1.1. Definicija i klasifikacija T1DM-a	1
1.1.2. Patogeneza T1DM-a	1
1.1.3. Epidemiologija T1DM-a	2
1.1.4. Genetika T1DM-a	3
1.1.5. Komplikacije T1DM-a	4
1.2. HLA sustav	6
1.2.1. Definicija, osobitosti i nomenklatura HLA sustava	6
1.2.2. Molekule HLA razreda I	8
1.2.3. Molekule HLA razreda II	9
1.2.4. Uloga u imunološkoj reakciji	9
2. Cilj istraživanja	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Uzorci (materijal)	12
3.2. Metode	12
3.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi	12
3.2.2. Tipizacija lokusa HLA -A,-B,-DQA1,- DQB1, -DRB1 metodom PCR SSP.....	13
3.2.3. Elektroforeza – očitavanje rezultata	15
3.3. Statistička obrada podataka	16
4. Rezultati	17
4.1. Raspodjela alela na lokusu HLA-A	17
4.2. Raspodjela alela na lokusu HLA-B	18

4.3. Raspodjela alela na lokusu HLA-DQB1	19
4.4. Raspodjela alela na lokusu HLA-DRB1	19
4.5. Raspodjela alela na lokusu HLA-DQA1.....	20
4.6. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1	21
5. Rasprava	24
6. Zaključak	27
7. Sažetak	28
8. Summary	29
9. Literatura	30
10. Životopis	33

POPIS KRATICA

ADA	American Diabetes Association
AF	alelna frekvencija
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DCCT	Diabetes Control and Complication Trial
DKA	dijabetička ketoacidoza
GADA	Glutamic acid decarboxylase autoantibodies
HF	haplotipna frekvencija
HLA	Human Leucocyte Antigens
IAA	Insulin autoantibodies
ICA	Islet cell antibodies
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus
IL2RA	alfa receptor za interleukin 2
MHC	Major Histocompatibility Complex
OR	odds ratio
PCR-SSP	polymerase chain reaction- sequence-specific primer
PTPN22	protein tyrosinephosphatase non-receptor type 22
ROS	reactive oxygen species
T1DGC	Type 1 diabetes Genetics Consortium
T1DM	dijabetes tip 1
TCR	T cell receptor
VNTR	variable number of tandem repeat

Uvod

1.1. Dijabetes tip 1 (T1DM)

1.1.1. Definicija i klasifikacija T1DM-a

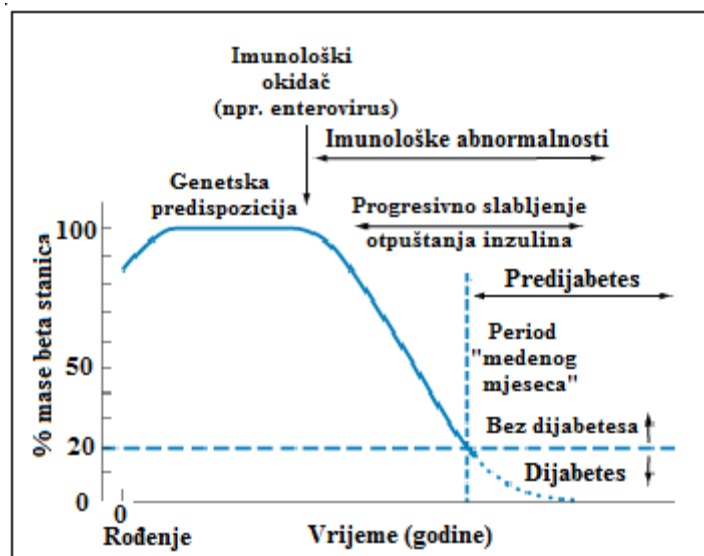
Dijabetes tip 1 (T1DM) oblik je šećerne bolesti koji karakterizira razaranje β -stanica Langerhansovih otočića u gušterači, što rezultira insuficijencijom i potpunim izostankom lučenja inzulina. Prema klasifikaciji *American Diabetes Association* i *World Health Organisation*, T1DM se dijeli na učestaliji tip (1A) u kojemu je autoimunski poremećaj uzrok razaranja β -stanica Langerhansovih otočića u gušterači, i na rjeđi tip (1B) kod kojega je uzrok razaranja β -stanica idiopatski. Od ukupnoga broja pacijenata s dijabetesom u svijetu, 5-10% odnosi se na oboljele od T1DM-a (1). Češće se pojavljuje u dječjoj i mladenačkoj dobi, ali je dokazano da se može pojaviti u bilo kojoj životnoj dobi. Zbog toga se naziv mladenački (eng. *juvenile*) sve rjeđe upotrebljava, a također se ne preporučuje niti naziv o inzulinu ovisan dijabetes, IDDM (eng. *insulin dependent diabetes mellitus*), zbog etiološke klasifikacije dijabetesa.

Dijagnoza T1DM-a postavlja se na temelju vrijednosti glukoze izmjerenih natašte (gladovanje više od 8 sati) $\geq 7,0$ mmol/L sa ili bez simptoma T1DM-a (polidipsija, poliurija i polifagija uz gubitak tjelesne mase). Drugi je kriterij slučajna vrijednost glukoze $\geq 11,1$ mmol/L uz prisustvo simptoma T1DM-a. Za potvrdu dijagnoze kriteriji moraju biti pozitivni u dva neovisna mjerenja (2).

1.1.2. Patogeneza T1DM-a

Razaranje β -stanica Langerhansovih otočića gušterače uzrokovano je međudjelovanjem imunskih, vanjskih i genetskih čimbenika. Smatra se da u genetski predisponiranih osoba čimbenici okoliša mogu biti okidač koji pokreće autoimunosno razaranje β -stanica Langerhansovih otočića. Najčešće spominjani okolišni čimbenici su infekcije virusima (*coxsackie B4*, *rubella*), razni aditivi (nitrozamini) i toksini u prehrani, kao što su proteini kravljega mlijeka koji u genetski predisponirane djece izazivaju stvaranje protutijela protiv β -stanica Langerhansovih otočića gušterače (3). Autoimunosni proces, posredovan T-limfocitima, traje od nekoliko tjedana do nekoliko godina, i u tom se razdoblju kod oko 64% osoba mogu dokazati autoprotutijela na antigen citoplazme stanica

Langerhansovih otočića (enl. *islet cell antibodies*, ICA), protutijela na membransku bjelančevinu β -stanica (eng. *glutamic acid decarboxylase autoantibodies*, GADA) ili protutijela na endogeni inzulin (eng. *insulin autoantibodies*, IAA) (4, 5). U vrijeme predijabetesa, koje se još naziva i „medeni mjesec“, β -stanice luče inzulin dovoljan za reguliranje metabolizma ugljikohidrata. Simptomi T1DM-a pojavljuju se kad je u autoimunom procesu uništeno 80-90% mase β -stanica Langerhansovih otočića (6) (Slika 1.).



Slika 1. Patogeneza T1DM-a (Prilagođeno prema: *Medical Management of Type 1 Diabetes*, 3.izd., JS Skyler (ed) Alexandria, VA; ADA 1998.)

Zbog nedostatka inzulina raste hiperglikemija i organizam pokreće alternativne mehanizme izvora energije: pojačava lipolizu i potrošnju proteina, što rezultira akumuliranjem ketonskih tijela i stvaranjem ketoacidoze koja je česta početna manifestacija T1DM-a.

Hiperglikemija inducira i stvaranje suviška reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *reactive oxygen species*, ROS) koji izazivaju oksidativni stres. Pojačano stvaranje ROS-a oštećuje β -stanice Langerhansovih otočića i tako utječe na stvaranje T1DM-a, a ako oksidativni stres perzistira, uslijed loše regulirane glikemije, tada sudjeluje u nastanku kroničnih komplikacija T1DM-a (7, 8).

1.1.3. Epidemiologija T1DM-a

Incidencija T1DM-a pokazuje značajne geografske, dobne i kalendarske varijacije. U svijetu su provedene mnoge epidemiološke studije, međutim većina se odnosi na razvijenije zemlje svijeta. Podatci iz tih studija pokazuju incidenciju T1DM-a za dob 0-14 godina od 0,1/100000 u Kini ili Venezueli do 49/100000 u Finskoj, gdje je zabilježena najveća incidencija na svijetu. U posljednjem desetljeću uočen je porast incidencije kod djece do 5 godina starosti od 3%. U literaturi se navodi i povećana incidencija T1DM-a u jesen i zimi.

U Europi se incidencija kreće od 1/100000 u Ukrajini do spomenute Finske. Općenito skandinavske zemlje imaju najvišu incidenciju, dok se ona prema jugu i istoku smanjuje, s izuzetkom visoke incidencije na Sardiniji 37/100000 (9).

U Americi je prosječna incidencija 20/100000, međutim komparirajući pripadnike bijele rase s afroameričkom i hispanoameričkom populacijom, uočeno je da pripadnici bijele rase imaju 1,5 puta veću incidenciju (2).

Hrvatska, prema geografskom položaju u okviru Europe, prati trend i ima incidenciju u dobnoj skupini 0-14 godina 8,87/100000, i to 8,47/100000 za djevojčice i 9,26/100000 za dječake, a također se uočava godišnji porast incidencije od čak 9% (9).

1.1.4. Genetika T1DM-a

Genetska predodređenost za T1DM predmetom je intenzivnoga proučavanja već gotovo četiri desetljeća. T1DM pojavljuje se kod 0,4% opće populacije. Rizik od obolijevanja za djecu čija majka ima dijabetes, povećava se za 6%, odnosno za čak oko 12% ako je otac bolestan. Rizik za braću je 6%, što je čak 15 puta više nego u općoj populaciji (10, 11). Genetski utjecaj na nastanak bolesti najbolje se uočava na dugogodišnjim promatranju i uspoređivanju jednojajčanih i dvojajčanih blizanaca. Ukoliko jedan od jednojajčanih blizanaca razvije T1DM poslije svoje 25. godine života, rizik od obolijevanja za drugoga je 6%, što je jednako riziku za dvojajčane blizance ili braću koja nisu blizanci. Međutim, ukoliko jedan od jednojajčanih blizanaca razvije T1DM prije šeste godine života, rizik za drugoga iznosi i više od 60% (10).

Prve studije opisale su genetsku povezanost T1DM-a i antigena HLA (eng. *Human Leucocyte Antigen*) regije. S rizikom za nastanak T1DM-a povezuje se i desetak drugih

lokusa. Da bi se identificirali svi genetski lokusi koji pridonose riziku za T1DM, osmišljena je međunarodna studija nazvana *Type 1 diabetes Genetics Consortium* (T1DGC) s 14 000 prikupljenih uzoraka (12).

Oko 50% nasljedne sklonosti za T1DM nalazi se u genima HLA regije koja se nalazi na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.3). Heterodimer DQA1*03:01-DQB1*03:02 koji se nalazi u *cis* položaju u haplotipu s DRB1*04 smatra se visoko predisponirajućom molekulom. U literaturi se ovaj haplotip spominje kao DR4. Heterodimer DQA1*05:01-DQB1*02:01, naslijeđen u *cis* položaju u haplotipu s DRB1*03 (haplotip DR3), također ima pozitivnu povezanost s nastankom T1DM-a. S povećanim rizikom za T1DM u bjelačkoj populaciji povezane su specifične genotipske kombinacije: npr. nositelji oba haplotipa, heterozigoti DR3/DR4 imaju veći rizik za nastanak T1DM-a nego homozigoti za bilo koji od tih haplotipova. Negativna povezanost ili zaštitno djelovanje pripisuje se haplotipu DRB1*1501-DQA1*01:02-DQB1*06:02 (haplotip DR2) (10, 11, 12, 13).

Promotorskoj regiji gena za inzulin (INS) na kromosomu 11p15.5 pripisuje se oko 10% ukupno zabilježene genetske sklonosti. Aleli u ovoj regiji podijeljeni su u tri razreda, a međusobno se razlikuju po broju ponavljanja parova baza (*variable number of tandem repeats* VNTR). Aleli razreda I imaju oko 23-63, razreda II oko 80 i razreda III oko 140-210 ponavljanja istih parova baza. Uočena je veća učestalost alela razreda I u osoba s T1DM-om te se oni smatraju predisponirajućim alelom, dok se aleli razreda III smatraju zaštitnima (14).

U literaturi je opisano još nekoliko lokusa koji imaju ograničen individualni utjecaj na genetsku predispoziciju za T1DM:

- *Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4* CTLA-4 gen smješten na kromosomu 2q33, eksprimiran na površini aktiviranoga T-limfocita i odgovoran za utišavanje imunosnoga odgovora;
- PTPN22 gen koji se nalazi na kromosomu 1p13, kodira tirozin fosfatazu-22, protein važan u negativnoj regulaciji imunosnoga odgovora;
- IL2RA/CD25 alfa receptor za interleukin 2 kodiran na kromosomu 10p15 (10, 11, 12, 14).

1.1.5. Komplikacije T1DM-a

Dijabetes tip 1 često je popraćen komplikacijama koje mogu biti akutne i kronične. Dijabetička ketoacidoza (DKA) i hipoglikemija najznačajnije su akutne komplikacije T1DM-a i njegova liječenja. Za nastanak kroničnih komplikacija T1DM-a odgovorna je hiperglikemija koja izaziva oštećenje krvožilnoga sustava.

DKA nastaje kao posljedica apsolutnoga ili relativnoga nedostatka inzulina kod osoba s novootkrivenim T1DM-om ili kod osoba koje su prestale unositi endokrini inzulin. Nedostatak inzulina prati lučenje hormona djelovanja suprotnoga inzulinu (glukagon, kortizol, katekolamini, hormon rasta), što zajedno rezultira pojačanom lipolizom, glikogenolizom i glukoneogenezom. Uz hiperglikemiju, u krvi se posljedično nakupljaju aceton, acetocetna kiselina i betahidroksimaslačna kiselina, što dovodi do životno ugrožavajućega poremećaja acidobaznoga statusa, ketoacidoze i kome (pH arterijske krvi < 7,25). Stopa smrtnosti iznosi oko 7% (6).

Hipoglikemija je najčešća akutna komplikacija T1DM-a i posljedica je liječenja inzulinom. Hipoglikemijom se smatra stanje u kojemu je razina glukoze u venskoj krvi ispod 2,8 mmol/L. Prema DCCT-u (eng. *Diabetes Control and Complication Trial*), bolesnici na intenziviranoj inzulinskoj terapiji dožive i do 10 puta tjedno simptomatske hipoglikemije, a najmanje jedanput godišnje tešku hipoglikemiju. Oko 2-4% smrti bolesnika s T1DM-om pripisuje se posljedicama hipoglikemije (4).

Kronične komplikacije dijele se na vaskularne i nevaskularne. Vaskularne mogu biti mikrovaskularne (retinopatija i nefropatija) i makrovaskularne kronične komplikacije (koronarna arterijska bolest, periferna vaskularna bolest i cerebrovaskularna bolest). Neuropatija je nevaskularna kronična komplikacija T1DM-a. Koliko će oštećenje krvožilnoga sustava nastati, ovisi o visini i trajanju hiperglikemije, arterijske hipertenziji, genetskoj predisponiranosti i okolišnim čimbenicima. Mehanizmi koji dovode do oštećenja, još uvijek nisu potpuno razjašnjeni. Najnovija istraživanja pokazuju da je hiperprodukcija superoksidnog aniona, u mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona, poveznica mehanizama kojima nastaju oštećenja koja vode ka kroničnim komplikacijama (4, 6, 8).

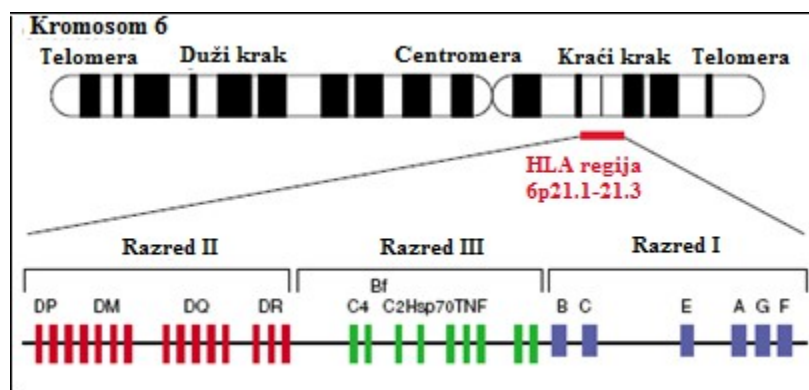
Razina glikoliziranoga hemoglobina (HbA1c) odražava razinu glikemije i zbog toga dobro korelira s nastankom kroničnih komplikacija. Po preporukama iz 2008. godine, T1DM dobro je reguliran ako zadovoljava kriterij za HbA1c < 6,5%. Mnoge studije pokazuju da održavanje glikemije u granicama normalnih vrijednosti može odgoditi, čak i spriječiti razvoj mikrovaskularnih komplikacija T1DM-a. Rezultati upućuju da smanjenje HbA1c za samo 1%

smanjuje rizik razvoja mikrovaskularnih komplikacija: retinopatije 47%, nefropatije 54%, mikroalbuminurije za 39% te neuropatije za čak 60% (2, 6).

1.2. HLA sustav

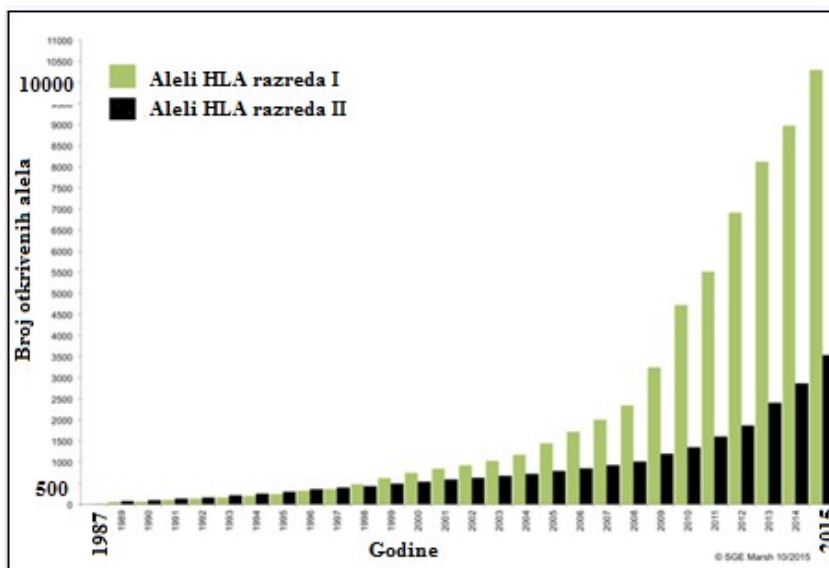
1.2.1. Definicija, osobitosti i nomenklatura HLA sustava

Glavni sustav gena tkivne snošljivosti (eng. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) u čovjeka je prvo otkriven na membranama leukocita, pa je po tome i nazvan sustav HLA, od eng. *Human Leucocyte Antigens*. Regija HLA nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.3), s više od 220 gena, obuhvaća oko 4×10^6 parova baza DNA i čini oko 1% ljudskoga genoma (13). HLA sustav podijeljen je u tri razreda. Regija HLA razreda I, koju čine lokusi HLA A, B i C, smještena je telomerično, regija HLA razreda II, s lokusima HLA DQ, DR, DP, najbliža je centromeri, a regija HLA razreda III smještena je između prvih dviju regija (Slika 2.).



Slika 2. Shema organizacije HLA regije (prilagođeno prema: <http://www.preimplantationgeneticdiagnosis.it/the-hla-complex.htm>)

HLA sustav je najpolimorfniji sustav u čovjeka. Broj otkrivenih alela svakim je danom sve veći zahvaljujući brojnim populacijskim istraživanjima i najnovijim tehnološkim dostignućima (Slika 3.). U bazi IMGT/HLA (verzija 3.22.0/13. listopad 2015.) ima više od 13800 otkrivenih alela HLA. Najpolimorfniji u razredu I je HLA-B lokus s 4077 otkrivenih alela, a HLA-DRB1 je najpolimorfniji lokus razreda II s 1825 otkrivenih alela (15).

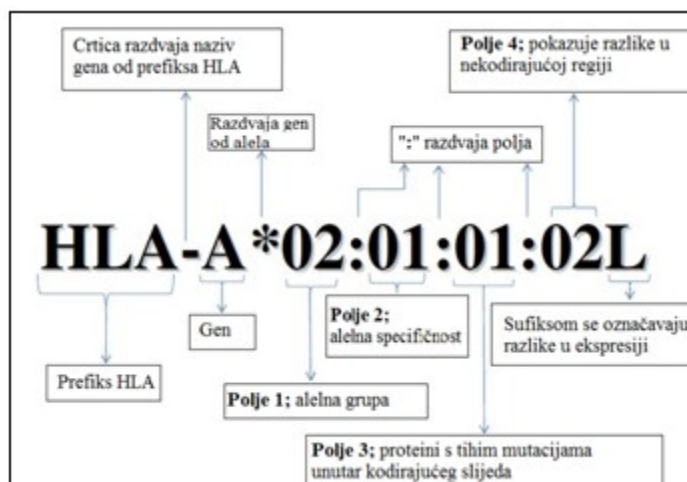


Slika 3. Broj alela imenovanih od 1987. do 9./2015. (prilagođeno prema: http://hla.alleles.org/inc/images/graph_hires.png)

Ekstremni polimorfizam HLA kodirajućih lokusa stvara izazov u održavanju usklađene nomenklature među laboratorijima i studijama. Stručnjaci za HLA pri SZO-u (*WHO Nomenclature Committee*) 2010. godine donijeli su najnoviju nomenklaturu za HLA sustav (Slika 4.). Za većinu lokusa, prvo polje označava serološki ekvivalent alela. Protein kodiran genom, rjeđe nego sam gen, vjerojatni je uzrok predispozicije, odnosno zaštite od bolesti, i upravo zbog toga većina studija povezanosti s bolestima koriste HLA alele označene s prva dva polja zbog smanjenja nejasnoća i olakšavanja statističkih analiza.

Neravnoteža udruživanja alela HLA (eng. *linkage disequilibrium*, LD) još je jedna osobitost HLA sustava. Na osnovi broja poznatih alela može se izračunati vjerojatnost pojavljivanja dvaju ili više alela u haplotipu. Međutim, istraživanja su pokazala da je broj haplotipova znatno manji od teoretski mogućih kombinacija.

Geni HLA lokusa u cis položaju na kromosomu 6 čine haplotip i nasljeđuju se u bloku, po jedan haplotip od svakoga roditelja. Oba su haplotipa fenotipski izražena i čine genotip HLA (16, 17).



Slika 4. Nomenklatura HLA sustava (prilagođeno prema: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>)

Uočena je povezanost određenih HLA alela ili haplotipova s bolestima koje nastaju zbog neprimjerenoga imunoreagiranja. Moguće je izračunati i procijeniti relativni rizik od obolijevanja za osobu koja nosi određeni alel ili haplotip, u usporedbi s osobama koje nemaju taj alel ili haplotip. Ta spoznaja ima veliku dijagnostičku i prognostičku vrijednost. Povezanošću HLA sustava i T1DM-a bavi se i ovaj rad.

1.2.2. Molekule HLA razreda I

Molekula HLA razreda I sastoji se od dvaju polipeptidnih lanaca: teški ili α -lanac, kodiran genima HLA razreda I (45 kD), i laki ili β -lanac, kodiran genima s kromosoma 15 (12 kD). Teški α -lanac može se podijeliti u tri dijela: citoplazmatski dio koji je C terminalni kraj polipeptidnoga lanca, onaj koji sidri molekulu HLA u membrani, transmembranski dio sastavljen od hidrofobnih aminokiselina i dio izvan stanice, podijeljen ponovno u tri domene (α_1 , α_2 , α_3). Domena α_3 , koja sliči imunoglobulinu, konzervativni je dio molekule i sadrži vezno mjesto za CD8 molekulu na citotoksičnim limfocitima T. Domene α_1 i α_2 dijelovi su teškoga lanca izvan stanice koji tvore pukotinu u koju se smješta unutarstanični peptid-antigen prerađen na dužinu od 8 do 11 aminokiselina. Laki (β_2 -mikroglobulin) lanac također sličan imunoglobulinu, isti je u svih molekula HLA razreda I, nalazi se izvan stanice i za teški lanac vezan je nekovalentnim vezama. Polimorfizam molekule HLA razreda I vezan je uz raznolikost slijeda aminokiselina u domenama α_1 i α_2 .

Molekule HLA razreda I prisutne su na gotovo svim stanicama s jezgrom i predočuju u pukotinama unutarstanične antigene (npr. tumorske ili virusne peptide) citotoksičnim

limfocitima T (CD8+). Citotoksični limfociti T pak moraju prepoznati i ubiti svaku tjelesnu stanicu koja u sklopu vlastitog HLA I predočava tuđi antigen (13, 16, 17).

1.2.3. Molekule HLA razreda II

Molekula HLA razreda II također je građena od dvaju polipeptidnih lanaca, α -lanca (33-48kD) i β -lanca (26-29 kD). α -lanac kodiran je A genima HLA razreda II, a β -lanac kodiran je B genima HLA razreda II. Oba lanca imaju transmembranski, citoplazmatski i dio koji strši izvan stanice: $\alpha 1$ i $\alpha 2$; $\beta 1$ i $\beta 2$ domene. Citoplazmatski i transmembranski dio molekule HLA razreda II imaju sličnu građu i funkciju kao molekule HLA razreda I. Domene $\alpha 2$ i $\beta 2$ disulfidnim vezama tvore petlju koja sliči konstantnom dijelu imunoglobulina koji je i kod HLA II evolucijski konzerviran. Te su domene važne za jako nekovalentno povezivanje α i β lanaca, a u domeni $\beta 2$ nalazi se i vezno mjesto za koreceptorsku molekulu CD4 na pomagačkom limfocitu T.

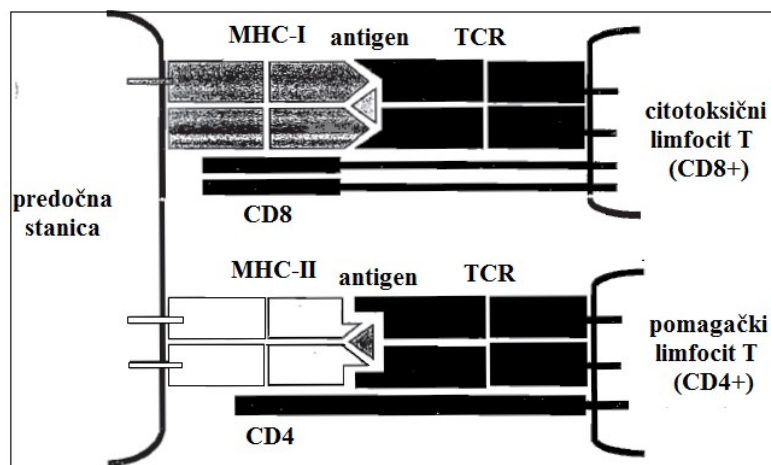
Domene $\alpha 1$ i $\beta 1$ zajedno tvore dio koji veže antigen-peptid. Pukotina koju tvore $\alpha 1$ i $\beta 1$ domene otvorena je, pa odsječak peptida veličine 10-30 aminokiselina može stršati izvan nje. Polimorfizmu molekula HLA razreda II pridonosi raznolikost u slijedu aminokiselina u β -lancu.

Molekule HLA razreda II izražene su na limfocitima B, makrofagima, dendritičnim stanicama, aktiviranim limfocitima T i endotelnim stanicama crijeva. One predočuju izvanstanične antigene (npr. bakterijske peptide) pomagačkom limfocitu T (CD4+) koji dalje usmjerava imunološki odgovor prema limfocitima B i produkciji odgovarajućih protutijela (13, 16, 17).

1.2.4. Uloga u imunološkoj reakciji

Glavna uloga HLA sustava u imunološkoj reakciji razlikovanje je vlastitih od stranih antigena i usmjeravanje imunološke reakcije u smjeru uništenja stranoga antigena. Najvažnije značajke imunoreagiranja su:

1. suspregnutost - limfociti T će prepoznati i reagirati samo na antigene prezentirane u sklopu HLA molekule koju su sreli u timusu;
2. tolerancija - limfociti T će prepoznati, ali neće reagirati na vlastite HLA molekule koje su sreli u timusu.



Slika 5. Shema "tri molekularnog kompleksa" (Ref. 17)

Brojne molekule na površini stanice, kao CD4, CD8, CD28, B7, CTLA-4, uključene su u sklapanje imunološkoga odgovora, međutim "tri molekularni kompleks" određuje specifičnost imunološkoga odgovora, a oblikovan je T-staničnim receptorom (eng. *T cell receptor*; TCR) vezanim na kompleks HLA molekula/peptid-antigen (12) (Slika 5.).

Molekule HLA razreda I imaju ulogu biljega stanice koja je zaražena unutarstaničnim antigenom (virusima). Strani antigen, predodčen u sklopu vlastitog HLA I, prepoznaje TCR citotoksičnog limfocita T i zadaća mu je ubiti vlastitu stanicu zaraženu unutarstaničnim antigenom.

Molekule HLA razreda II imaju ulogu biljega stanice limfnoga tkiva koja izlaže prerađeni strani izvanstanični antigen (bakterije, toksine), kojega prepoznaje TCR pomagačkog limfocita T te dalje aktivira i usmjerava imunološku reakciju prema B-limfocitima (13, 16, 17).

2. Cilj istraživanja

Istraživanje sam provela na uzorku od 81 pacijenta oboljelog od T1DM-a koji su upućeni na Odjel za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva, Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, na testiranje genetičke sklonosti T1DM-u. Aleli lokusa HLA-A određeni su za 80 pacijenata, aleli lokusa HLA-B, -DRB1 i -DQB1 za 81 pacijenta, dok su aleli lokusa HLA-DQA1 određeni za 40 pacijenata. Alel HLA-DQB1*02 tipiziran je visokom rezolucijom za 26 od ukupno 52 pacijenta nositelja spomenutoga alela.

Ciljevi istraživanja bili su sljedeći:

1. Istražiti raspodjelu alela na lokusu HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1, -DQA1 u uzorku pacijenata oboljelih od T1DM-a;
2. Istražiti povezanost alelnih i haplotipnih varijanti gena HLA sustava s nastankom T1DM-a u oboljelih na području istočne Hrvatske i usporediti dobivene rezultate s objavljenim literaturnim podacima.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorci (materijal)

U ovom su radu korišteni uzorci venske krvi pacijenata (5 ml krvi s EDTA kao antikoagulantom), analizirani u rutinskom radu Odjela za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva u razdoblju od siječnja 2010. do lipnja 2015. Za istraživanje su korišteni uzorci 81 pacijenta s potvrđenim T1DM-om, svi popraćeni liječničkom uputnicom, a pri dolasku u laboratorij dobili su jedinstvenu oznaku, pa identitet pacijenata neće biti otkriven.

Za kontrolnu skupinu korišteni su ranije objavljeni rezultati tipizacije HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 i -DQB1 (19) zdravih nesrodnih osoba.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi

Prvi je korak izolacija genomske DNA iz pune krvi pomoću komercijalnoga seta *High Pure PCR Template Preparation Kit* prema uputama proizvođača *Roche Diagnostics* (Mannheim, Njemačka) (20).

Princip je metode da enzim proteinaza K, uz pomoć pufera za razgradnju, razara proteine u staničnoj membrani te tako omogućava izlazak DNA iz jezgre. DNA se veže na sloj staklene mrežice u kolonici seta za izolaciju.

U sterilnu mikroeprijetu otpipetirano je 200 μ L uzorka krvi, 200 μ L pufera za razgradnju i 40 μ L vodene otopine proteinaze K. Nakon miješanja, uzorci su inkubirani 10 min na 72°C. Nakon inkubacije, dodano je 100 μ L izopropanola, a potom je ukupni sadržaj izolacijske smjese prenesen u prethodno označene kolonice sa staklenom mrežicom. Nakon centrifugiranja u trajanju od 1 min pri brzini 8000 x g, DNA ostaje vezana na staklenoj mrežici koju prenosimo na novu kolekcijску kolonicu. DNA se jednom ispiri s 500 μ L pufera za uklanjanje inhibitora i dva puta s po 500 μ L pufera za ispiranje, a poslije svakoga koraka centrifugira se 1 min pri brzini 8000 x g. Nakon posljednjega centrifugiranja, ostatak pufera s mrežice dodatno se uklanja kratkim centrifugiranjem (13000 x g/10s). DNA je eluirana dodatkom 200 μ L, prethodno zagrijanoga (70°C) elucijskog pufera na mrežicu i posljednjim centrifugiranjem (1 min, 8000 x g) prenesena u obilježenu mikroeprijetu za čuvanje uzoraka. Mikroeprijeta s DNA obilježena je jedinstvenom oznakom pridruženom konkretnom uzorku i uskladištena na -20°C do analize.

3.2.2. Tipizacija lokusa HLA-A, -B, -DQA1, -DQB1, -DRB1 metodom PCR-SSP

Princip lančane reakcije polimeraze (PCR) je umnožavanje fragmenta DNA u izvanstaničnim uvjetima pomoću specifičnoga enzima DNA polimeraze koja omogućuje sintezu DNA i uz prisutnost specifično sintetiziranih početnica za ciljni fragment koji se želi umnožiti.

Uzorci su tipizirani komercijalnim setom *Olerup SSP HLA Typing kits* niske, odnosno visoke rezolucije prema uputama proizvođača *Olerup SSP AB* (Stockholm, Švedska) (21). PCR-SSP set za tipizaciju lokusa HLA-A sastoji se od 24 reakcije, HLA-B od 48 reakcija, za tipizaciju lokusa HLA-DQB1 i -DRB1 korišten je set *HLA-DQDR Combi Tray* koji se sastoji od 32 reakcije, HLA-DQA1 od 32 reakcije i HLA DQB1*02 od 12 reakcija. Za 81 pacijenta napravljena je tipizacija lokusa HLA-A, -B, -DRB1 i -DQB1, dok su za podskupinu od 40 pacijenata, uz spomenute alele, određeni i aleli lokusa HLA-DQA1 te alel HLA DQB1*02 s visokom rezolucijom za pacijente nositelje spomenutoga alela.

U svakoj reakciji PCR-SSP seta za tipizaciju ispituje se prisutnost jednoga ili skupine alela, i u svakoj od njih prisutne su:

1. Par početnica koje su napravljene tako da imaju 3' krajeve koji su komplementarni samo jednom alelu ili skupini alela. Početnice su identične postraničnim sekvencama ciljnoga fragmenta DNA, veličine su 15-25 pb. Metoda PCR-SSP se i temelji upravo na činjenici da će se potpuno komplementarna početnica učinkovitije iskoristiti u PCR reakciji nego početnica s jednim ili više nesparenih nukleotida na 3' kraju (*sequence-specific primer*) (22).
2. Kontrolni par početnica za provjeru učinkovitosti reakcije. Umnožavanje toga para početnica potvrđuje da je eventualni izostanak specifičnoga umnožavanja rezultat nepostojanja toga specifičnog alela u uzorku DNA, a ne loše napravljene PCR reakcije. Neuspjelom PCR reakcijom pak smatra se izostanak umnožavanja kontrolnih fragmenata, uz izostanak specifičnoga umnožavanja.
3. Smjesa deoksiribonukleida od kojih će nastati nova umnožena molekula DNA (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
4. Pufer u kojemu se odvija reakcija (pH 8,3), sastoji se od odgovarajuće koncentracije KCl, TrisHCl i MgCl₂.
5. DNA polimeraza (Taq), termostabilan enzim iz bakterije *Thermus aquaticus*, aktivan na temperaturi od oko 90° C.
6. Genomska DNA koncentracije 30 µg/mL.

Tablica 1. Volumeni sastojaka za izvođenje tipizacije PCR-SSP metodom

PCR-SSP Olerup set	dH ₂ O	PCR pufer	Taq DNA polimeraza	DNA
HLA A	132,8 µL	81 µL	2,2 µL	54 µL
HLA B	265,7 µL	162 µL	4,3 µL	108 µL
HLA DQDR/ DQA1	177,1 µL	108 µL	2,9 µL	72 µL
HLA DQB1*02	68,9 µL	42 µL	1,1 µL	28 µL

Postupak tipizacije lokusa HLA-A, -B, -DQB1, -DRB1, -DQA1 i -DQB1*02 izvodi se prema uputama proizvođača (21).

U sterilnu mikroeprevetu otpipetiran je PCR pufer, destilirana voda i Taq DNA polimeraza prema priloženoj tablici (Tablica 1.). Smjesa je promiješana i otpipetirana po 10 µL u negativnu kontrolu svakoga tipizacijskog seta, osim seta za tipizaciju lokusa HLA-DQB1*02 (nema negativnu kontrolu). Nakon toga, u reakcijsku smjesu dodana je genomska DNA. Smjesa je dobro promiješana i otpipetirano je po 10 µL u svaku reakcijsku tubicu, osim u negativnu kontrolu. Reakcijske tubice prekrivene su pripremljenom folijom i stavljene u PCR uređaj na odgovarajući program. U uređaju se odvija PCR reakcija koja se sastoji od tridesetak ciklusa i gdje se ciljni fragment eksponencijalno umnožava.

Svaki ciklus PCR reakcije ima tri koraka:

1. Prvo se događa denaturacija, gdje se na temperaturi od 94°C do 96°C kidaju vodikove veze među komplementarnim lancima kalupa DNA te svaki od tih lanaca postaje kalup za vezanje početnica.
2. Vezanje početnica (engl. *annealing*) drugi je korak, a odvija se na temperaturi od 54°C do 56°C, tako da se početnice komplementarno vežu na kalup DNA.
3. Sinteza novoga lanca fragmenta DNA odvija se na temperaturi od 72°C. Pri toj temperaturi enzim Taq DNA polimeraza od prisutnih nukleotida sintetizira ciljni fragment DNA koji postaje kalupom u sljedećem ciklusu (23).

3.2.3. Elektroforeza - očitavanje rezultata

Očitavanje rezultata, odnosno vizualizacija umnoženoga produkta PCR-SSP metode, izvodi se agaroznom gel elektroforezom. Agarozna gel elektroforeza metoda je pri kojoj se pod utjecajem istosmjernje struje, kroz polimernu strukturu agaroze, razdvajaju fragmenti

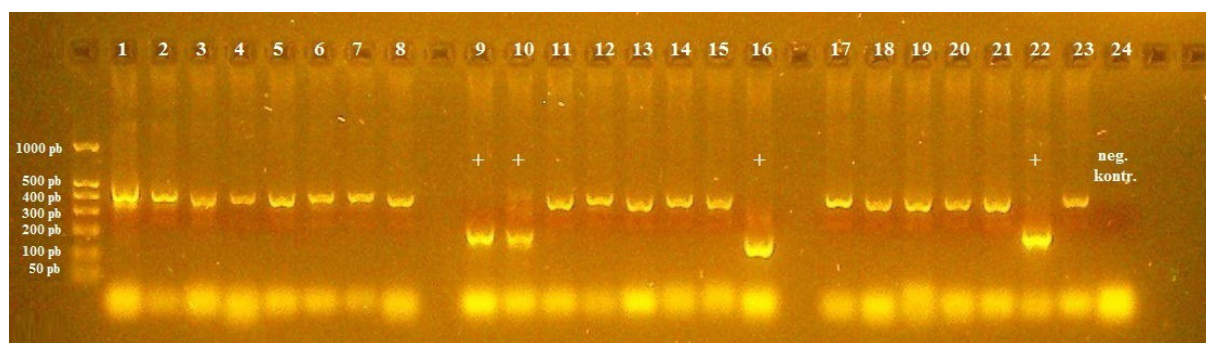
DNA. Učinkovitost i brzina razdvajanja ovise o veličini i konformaciji umnoženoga fragmenta, koncentraciji agaroze, naponu struje i puferu u kojemu se sve odvija. Pri neutralnoj pH pufera, fragmenti DNA koji su negativno nabijeni, putuju prema pozitivno nabijenoj elektrodi, anodi, i to tako da fragmenti manje dužine putuju brže od dužih fragmenata.

Postupak za pripremu 2% agaroznoga gela:

izvagana 2,64 grama agaroze stavljena su u tikvicu i pomiješana sa 132 mL pufera 1xTAE. Tikvica je pokrivena satnim staklom te je smjesa zagrijavana do vrenja i potpunoga otapanja agaroze (4 min) u mikrovalnoj pećnici, zatim ohlađena pod mlazom vode do približno 60°C. U ohlađenu, još tekuću agarozu dodano je 80 µL boje *Olerup SSP GelRed*. U pripravljeni kalup s postavljenim češljevima (koji oblikuju jažice) izlivena je agarozna. Polimerizacija agaroznoga gela traje 20-30 min, nakon čega su izvađeni češljevi, a gel uronjen u kadu za elektroforezu napunjenu puferom 1xTAE. Sadržaj reakcijskih smjesa, nakon PCR-a, pipetiran je redom u jažice gela. Kako bismo mogli odrediti veličinu umnoženoga fragmenta, u prvu jažicu svakoga reda stavljen je molekularni marker *Olerup SSP DNA Size Marker* s fragmentima poznatih veličina (50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 pb). Elektroforeza je vođena pod uvjetima: 200 V; 17 min.

Vizualizacija umnoženih fragmenata DNA ostvarena je pomoću boje *Olerup SSP GelRed*, gdje pod UV svjetlom razdvojeni fragmenti u obliku vrpce narančasto fluoresciraju.

Svaki je gel fotografiran, a svaka je fotografija obilježena, analizirana u programu Helmerg-Score i arhivirana (Slika 6.).



Slika 6. Slika gel elektroforeze s označenim pozitivnim reakcijama

3.3. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja prikazani su u tablicama: veličina uzorka (N-pacijent / kontrola), učestalost alela / haplotipa (n) i frekvencija alela / haplotipa (%).

Učestalost pojedinog HLA alela / haplotipa je određena direktnim brojanjem. Rezultati istraživanja analizirani su *Fisher exact* testom pomoću statističkog programa GraphPad (<http://graphpad.com/quickcalcs/contingency2/>). Statistički značajna razlika između alelne frekvencije pojedinog alela pacijenata i kontrola smatrana je ona kod koje je P vrijednost bila manja od 0,01 ($P < 0,01$).

4. Rezultati

4.1. Raspodjela alela na lokusu HLA-A

U analiziranom uzorku od 80 pacijenata oboljelih od T1DM-a, na lokusu HLA-A metodom molekularne tipizacije utvrđeno je 13 različitih alela (Tablica 2.). Alel HLA-A*02 je najučestaliji alel u obje skupine, s alelnom frekvencijom od 30% u skupini pacijenata i 31,2% u kontrolnoj skupini. Uočene razlike učestalosti spomenutoga alela, kao ni ostalih alela lokusa HLA-A, između pacijenata i kontrolne skupine nisu statistički značajne.

Tablica 2. Raspodjela alela na lokusu HLA-A u pacijenata s T1DM-om i kontrolnoj skupini

HLA-A* alel	Pacijenti (N=80)		Kontrole (N=210)		P vrijednost
	n	AF (%)	n	AF (%)	
*01	24	15	51	12,2	0,4060
*02	48	30	113	26,9	0,4688
*03	14	8,75	59	14	0,0937
*11	12	7,5	23	5,5	0,4347
*23	1	0,62	17	4	0,0323
*24	15	9,38	43	10,2	0,8772
*25	6	3,75	14	3,3	0,8015
*26	10	6,25	27	6,4	1,000
*29	4	2,5	3	0,7	0,0001
*30	0	0	2	0,5	1,000
*31	2	1,25	3	0,7	0,6196
*32	11	6,88	14	3,3	0,0690
*33	6	3,75	10	2,4	0,3977
*68	7	4,38	27	6,4	0,4312

N=broj pacijenata / kontroa; n=broj uočenih alela; AF (%)=alelna frekvencija

4.2. Raspodjela alela na lokusu HLA-B

U Tablici 3. prikazana je raspodjela alela na lokusu HLA-B u 81 testiranog pacijenta s T1DM-om i kontrolnoj skupini. Molekularnom tipizacijom je utvrđeno 20 različitih alela. Alel

HLA-B*08 je najučestaliji alel u skupini pacijenata s AF=19,14%, za razliku od AF=7,78% u kontrolnoj skupini. Statistički značajna razlika je i u alelnoj frekvenciji za alel HLA-B*07, gdje je AF=7,09% u kontrolnoj skupini, a u skupini pacijenata je AF=1,85%. Razlike u učestalosti ostalih alela lokusa HLA-B kod pacijenata i kontrola nisu statistički značajne.

Tablica 3. Raspodjela alela na HLA-B lokusu u pacijenata s T1DM-om i kontrolnoj skupini

HLA-B* alel	Pacijenti (N=81)		Kontrole (N=210)		P vrijednost
	n	AF (%)	n	AF (%)	
*07	3	1,85	40	9,5	0,0007
*08	31	19,14	27	6,4	<0,0001
*13	9	5,56	11	2,6	0,1236
*14	8	4,94	13	3,1	0,3218
*15	5	3,09	12	2,9	1,000
*18	17	10,49	35	8,3	0,4199
*27	6	3,70	21	5,0	0,6611
*35	18	11,11	58	13,8	0,4140
*37	0	0	4	1,0	0,5802
*38	4	2,47	19	4,5	0,3443
*39	5	3,09	10	2,4	0,5739
*40	7	4,32	16	3,8	0,8132
41	0	0	5	1,2	0,3291
*44	15	9,26	39	9,3	1,000
*45	2	1,23	3	0,7	0,6214
*49 (21)	2	1,23	11	2,6	0,5313
*50 (21)	2	1,23	0	0	0,0771
*51 (5)	21	12,96	60	14,3	0,7895
*55 (22)	2	1,23	8	1,9	0,7339
*56 (22)	2	1,23	0	0	0,0771
*57 (17)	1	0,62	20	4,8	0,0126
*58 (17)	2	1,23	0	0	0,0771

N=broj pacijenata / kontrola; n=broj uočenih alela; AF (%)= alelna frekvencija

4.3. Raspodjela alela na lokusu HLA-DQB1

U Tablici 4. prikazana je raspodjela HLA-DQB1 alela u uzorku od 81 pacijenta oboljeloga od T1DM-a. Molekularnom tipizacijom utvrđeno je 8 različitih alela. Razlika u učestalosti HLA-DQB1*03 (DQ8) alela; 31,86% kod pacijenata u usporedbi s 4,8% u kontrolnoj skupini pokazala se statistički značajnom. Alel HLA-DQB1*02 (DQ2), ima učestalost od 32,10% u ispitivanom uzorku pacijenata, a učestalost istoga alela u kontrolnoj skupini je 15,7%, što je statistički značajna razlika. Alel HLA-DQB1*03 (DQ7) značajno je učestaliji u kontrolnoj skupini (AF=22,1%) nego u skupini pacijenata (AF=8,64%). Uočava se

i statistički značajna razlika za alel HLA-DQB1*06 čija je AF u kontrolnoj skupini 22,4%, u odnosu na AF kod pacijenata: 6,79%.

Tablica 4. Raspodjela alela lokusa HLA-DQB1 u pacijenata s T1DM-om i kontrolnoj skupini

HLA-DQB1* alel		Pacijenti (N=81)		Kontrole (N=210)		P vrijednost
molekularno	serološki	n	AF (%)	n	AF (%)	
*02	DQ2	26	16,05	66	15,7	<0,0001
*02:01		22	13,58			
*02:02		4	2,47			
*03:01	DQ7	14	8,64	93	22,1	0,0001
*03:02	DQ8	50	31,86	20	4,8	<0,0001
*04	DQ4	1	0,62	15	3,6	0,0513
*05	DQ1	34	20,99	120	28,5	0,0745
*06		11	6,79	94	22,4	<0,0001

N=broj pacijenata/kontrola; n=broj uočenih alela; AF%=alelna frekvencija

4.4. Raspodjela alela na lokusu HLA-DRB1

U analiziranom uzorku od 81 pacijenta oboljeloga od T1DM-a na lokusu HLA-DRB1 molekularnom je tipizacijom utvrđeno 11 različitih alela (Tablica 5.). Aleli HLA-DRB1*04 i HLA-DRB1*03 najučestaliji su aleli u skupini pacijenata s alelnom frekvencijom 31,48% i 27,16%, koja je značajno različita od alelne frkvencije istih alela u kontrolnoj skupini (9,7% i 8,3%). Uočava se i statistički značajna razlika u alelnoj frekvenciji za alele HLA-DRB1*11 i HLA-DRB1*15. Naime, ovi aleli su učestaliji u kontrolnoj skupini (15,5% i 11%), nego u skupini pacijenata (5,56% i 1,85%) oboljelih od T1DM-a.

Tablica 5. Raspodjela alela HLA-DRB1* lokusa u pacijenata s T1DM-om i kontrolnoj skupini

HLA-DRB1* alel		Pacijenti (N=81)		Kontrole (N=210)		P
molekularn	serološki	n	AF(%)	n	AF (%)	
*01	DR1	18	11,11	50	11,9	0,8858
*03	DR3	44	27,16	35	8,3	<0,0001
*04	DR4	51	31,48	41	9,7	<0,0001
*07	DR7	8	4,94	33	7,8	0,2786
*08	DR8	4	2,47	16	3,9	0,6123
*10	DR10	1	0,62	4	1	1,000
*11	DR5	9	5,56	65	15,5	0,0008
*12		0		6	1,4	0,1935
*13	DR6	9	5,56	55	13,0	0,0008

*14		1	0,62	17	4,0	0,0319
*15	DR2	3	1,85	46	11	0,0002
*16		14	8,64	52	12,4	0,2437

N=broj pacijenata/kontrola; n=broj uočenih alela; AF%=alelna frekvencija

4.5. Raspodjela alela na lokusu HLA-DQA1

Lokus HLA-DQA1 tipiziran je na uzorku od 40 pacijenata oboljelih od T1DM-a. Tipizacijom visoke rezolucije uočeno je 8 različitih alela. Alel HLA-DQA1*03:01 najučestaliji je alel u skupini pacijenata. Njegova alelna frekvencija (37,50%) statistički je značajno veća ($p < 0,0001$) od alelne frekvencije istog alela u kontrolnoj skupini (10%). Uočava se i veća učestalost alela HLA-DQA1*01:02 u kontrolnoj skupini (AF=29%) od učestalosti istoga alela kod pacijenata (AF=7,5%) (Tablica 6.).

Tablica 6. Raspodjela alela lokusa HLA-DQA1 u pacijenata s T1DM-om i kontrolnoj skupini

HLA-DQA1* aleli	Pacijenti (N=40)		Kontrole (N=210)		P vrijednost
	n	AF (%)	n	AF (%)	
*01:01	9	11,25	66	15,7	0,3930
*01:02	6	7,50	122	29	<0,0001
*01:03	3	3,75	25	6,2	0,5982
*02:01	3	3,75	33	7,9	0,2426
*03:01	30	37,50	42	10	<0,0001
*03:03	2	2,50	0	0	0,0253
*04:01	0	0	16	3,8	0,0879
*05:01	21	26,25	115	27,6	0,8916
*05:05	6	7,50	0	0	<0,0001
*06:01	0	0	1	0,2	1,000

N=broj pacijenata/kontrola; n=broj uočenih alela; AF%=alelna frekvencija

Tablica 7. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1 kod pacijenata s T1DM-om

haplotip HLA-DRB1*-DQA1*-DQB1*	Pacijenti (N=40)	
	n	HF (%)
DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8)	30	37,5
DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01	21	26,25
DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05	9	11,25
DRB1*11-DQA1*05:01-DQB1*03 (DQ7)	6	7,5
DRB1*13-DQA1*01:02-DQB1*06	6	7,5
DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02	3	3,75
DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05	3	3,75
DRB1*04-DQA1*03:03-DQB1*03 (DQ7)	2	2,5

N=broj pacijenata; n=broj uočenih haplotipova; HF%=haplotipna frekvencija

4.6. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1

Tablica 7. prikazuje raspodjelu haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1 kod 40 pacijenata s T1DM-om kojima su tipizirani svi lokusi koji čine ovaj haplotip. Uočeno je 8 različitih haplotipova. Najučestaliji haplotip je HLA-DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 s haplotipnom frekvencijom 37,5%. Sljedeći po učestalosti je haplotip HLA-DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 s haplotipnom frekvencijom 26,25%. Haplotip HLA-DRB1*04-DQA1*03:03-DQB1*03:01 u skupini pacijenata ima najnižu uočenu učestalost, HF=2,5%.

Tablica 8. Kombinacije haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1 kod pacijenata s T1DM

Kombinacija haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1 (N=40)	n (%)
DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 / DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01	1 (12,5)
DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 / DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8)	13 (32,5)
DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05 / DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01	3 (7,5)
DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 / DRB1*13-DQA1*01:02/3-DQB1*06	1 (2,5)
DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 / DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05	2 (5)
DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) / DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8)	4 (10)
DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05 / DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8)	3 (7,5)

DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) / DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02	2 (5)
DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) / DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03 (DQ7)	1 (2,5)
DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03(DQ8) / DRB1*13-DQA1*01:02/3-DQB1*06	2 (5)
DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) / DRB1*16-DQA1*01:02-DQB1*05	1 (2,5)
DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03 (DQ7) / DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03 (DQ7)	1 (2,5)
DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05 / DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03 (DQ7)	1 (2,5)
DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02 / DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03 (DQ7)	1 (2,5)
DRB1*11-DQA1*05:05-DQB1*03 (DQ7) / DRB1*13-DQA1*01:02/3-DQB1*06	1 (2,5)
DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05 / DRB1*13-DQA1*01:02/3-DQB1*06	1 (2,5)
DRB1*13-DQA1*01:02/3-DQB1*06 / DRB1*04-DQA1*03:03-DQB1*03 (DQ7)	1 (2,5)
DRB1*01-DQA1*01:01-DQB1*05 / DRB1*04-DQA1*03:03-DQB1*03 (DQ7)	1 (2,5)

N=broj pacijenata; n (%)=broj kombinacija haplotipova

Analizirajući kombinacije haplotipova HLA-DRB1-DQA1-DQB1 (Tablica 8.) kod svih 40 pacijenata oboljelih od T1DM-a, uočeno je 18 različitih kombinacija. 13/40 pacijenata nositelji su kombinacije haplotipova DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 / DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8), što je ukupno 32,5%. Sljedeća po učestalosti kombinacija haplotipova prisutna je kod 4/40 pacijenata (10%): DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) / DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8). Ostale kombinacije uglavnom su prisutne u jednoga ili dva pacijenta.

5. Rasprava

U ovom su istraživanju analizirani rezultati molekularne tipizacije skupine pacijenata oboljelih od T1DM-a na području istočne Hrvatske s ciljem uočavanja rizičnih genotipova za T1DM. Rezultati istraživanja uspoređeni su s kontrolnom skupinom ranije tipiziranih zdravih, nesrodnih osoba. Također je bio cilj i sve zajedno usporediti s dosad objavljenim spoznajama o povezanosti HLA genotipova s T1DM-om.

Analizirajući alele lokusa HLA-A i uspoređujući ih između pacijenata i kontrolne skupine, opaža se da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojedinoga alela ni u jednoj skupini. U ranijim studijama povezanosti HLA sustava s T1DM-om, uočeno je da pacijenti nositelji HLA-A*24 alela imaju manju ili nikakvu funkciju β -stanica Langerhansovih otočića i kod njih T1DM počinje bitno ranije u usporedbi s onima koji nemaju spomenuti alel (12).

Promatrajući raspodjelu alela na lokusu HLA-B, može se uočiti da je alel HLA-B*08 najučestaliji alel u skupini pacijenata s AF=19,14% u usporedbi s AF=6,4% u kontrolnoj skupini. Najranije studije povezanosti HLA sustava s T1DM-om izvijestile su o većoj učestalosti HLA-B8 kod pacijenata s T1DM-om. Statistički značajna razlika u alelnoj frekvenciji, u korist kontrolne skupine, je za alel HLA-B*07. Objavljeni rezultati studije T1DGC (24) spominju alel HLA-B*07:02 sa mogućom zaštitnom ulogom. Aleli HLA-B*39 i B*44, također se dovode u vezu s T1DM-om, međutim ističe se potreba tipiziranja visokom rezolucijom: npr. HLA-B*39:06 je predisponirajući, B*44:02 je neutralan, a B*44:03 je zaštitni alel za T1DM (10, 12, 24).

Općenito povezanost T1DM-a s alelima HLA razreda I pripisuje se neravnoteži udruživanja alela razreda I s predisponirajućim alelima na lokusima HLA razreda II (12, 24, 25).

Analizirajući HLA-DQB1 alele, uočava se razlika u učestalosti HLA-DQB1*03 (DQ8) alela; 31,86% kod pacijenata u usporedbi s 4,8% u kontrolnoj skupini. Nasuprot tomu, alel HLA-DQB1*03 (DQ7) je učestaliji u kontrolnoj skupini; alelna frekvencija je 22,1% u odnosu na 8,64% u skupini pacijenata. Naime, alel HLA-DQB1*03:02 se spominje u literaturi kao visoko predisponirajući alel, za razliku od HLA-DQB1*03:01 kojemu se pripisuje zaštitna uloga. Razlika među spomenutim alelima je u tome što alel DQB1*03:02 na poziciji 57 kodira alanin (Ala-57), dok alel DQB1*03:01 kodira asparaginsku kiselinu (Asp-57). Predložen je model po kojemu aspartat na poziciji 57 kod DQB1 alela ima zaštitnu ulogu, za razliku od aminokiselina alanina, serina ili valina koje se povezuju s neutralnim ili

predisponirajućim DQB1 alelima. Međutim, također je dokazano da je povezanost s T1DM-om određena specifičnom kombinacijom alela u haplotipovima više nego alelnom varijantom za pojedine lokuse. Tako haplotipovi DRB1*04:05-DQB1*04:01 i DRB1*04:05-DQB1*04:02 koji na poziciji 57 u alelu DQB1 kodiraju asparaginsku kiselinu, a česti su u Aziji, pokazuju pozitivnu povezanost s T1DM-om (12, 26, 27).

Alel HLA-DQB1*02 (DQ2) ima učestalost od 32,10% u ispitivanom uzorku pacijenata, a učestalost istoga alela u kontrolnoj skupini je 15,7%. Ovakav odnos učestalosti alela HLA-DQB1*02 može se pojasniti činjenicom da se heterodimeru DQA1*05:01-DQB1*02:01 koji je naslijeđen u *cis* položaju u haplotipu s DRB1*03 (DR3) pripisuje visok rizik za T1DM (10, 11, 12, 14, 26).

Uočava se i razlika u učestalosti alela HLA-DQB1*06 u korist kontrolne skupine gdje je AF=22,4% u odnosu na AF kod pacijenata koja iznosi 6,79%. Prisutnost ovoga alela dovodi se u vezu s T1DM-om, i to tako da mu je pripisana negativna povezanost, odnosno zaštitna uloga čak i u prisutnosti ICA, protutijela na antigen citoplazme stanica Langerhansovih otočića (10, 13,14). Alel HLA-DQB1*06 dio je najčešće spominjanoga haplotipa s jakim zaštitnom ulogom za T1DM u bjelačkoj populaciji: HLA-DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02 sa omjerom izgleda (engl. *odds ratio*), OR=0,03 (26).

Polimorfizam na lokusu HLA-DRB1 također utječe na rizik od T1DM-a. Analiza HLA-DRB1 alela pokazala je da je HLA-DRB1*04 najučestaliji alel u skupini pacijenata s AF=31,48% u usporedbi s kontrolnom skupinom gdje je njegova učestalost 9,7%. Odavno se ovaj alel povezuje s dijabetesom, ali se navodi potreba tipizacije visokom rezolucijom zbog toga što se, ovisno o alelnoj specifičnosti i haplotipnoj vezi s heterodimerom DQA1-DQB1, njegova povezanost u različitim populacijama kreće od pozitivne: HLA-DRB1*04:05 gdje je OR=11,37 ili DRB1*04:01 gdje je OR=8,4 do negativne, tj. zaštitne: HLA-DRB1*04:03 gdje je OR=0,27 (10, 12, 26).

Učestalost alela HLA-DRB1*03 u skupini pacijenata je 27,16% u usporedbi s kontrolnom skupinom gdje je učestalost 8,3%. Alel HLA-DRB1*03 je prisutan u haplotipu HLA-DRB1*03:01-DQA1*05:02-DQB1*02:01 kojemu se pripisuje najjača pozitivna povezanost s T1DM-om.

Razlika u alelnoj frekvenciji u korist kontrolne skupine uočena je za alel HLA-DRB1*15 AF=11 % u usporedbi s AF=1,85 % među pacijentima, što se također može objasniti neravnotežom udruživanja i prisustvom ovoga alela u haplotipu poznatom kao DR2: HLA-DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02.

U kontrolnoj skupini učestaliji je i alel HLA-DRB1*11 s AF=15,5% u odnosu na učestalost od 5,56 % među oboljelima od T1DM-a. Alel HLA-DRB1*11 dio je haplotipa koji je u istraživanjima bjelačke populacije naveden kao haplotip s umjerenom zaštitom od T1DM-a: HLA-DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01 s OR=0,18 (14, 26).

Analiza učestalosti alela lokusa HLA-DQA1, napravljena na 40 uzoraka oboljelih od T1DM-a, pokazuje da je najučestaliji alel HLA-DQA1*03:01 s AF=37,50%, u odnosu na kontrolnu skupinu gdje isti alel ima AF=10%. Nasuprot tomu, može se uočiti veća učestalost alela HLA-DQA1*01:02 u kontrolnoj skupini (AF=29%) od učestalosti (AF=7,5%) istoga alela kod pacijenata. Dva spomenuta HLA-DQA1 alela dijelom su najspominjanijih haplotipova: jedan visokopredisponirajućeg DR4 haplotipa (HLA-DRB1*04:xx-DQA1*03:01-DQB1*03:02), a drugi DR2 haplotipa koji ima jaku zaštitnu ulogu (HLA-DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02), tako da je ovakva raspodjela alela HLA-DQA1 na neki način očekivana. Veća učestalost alela HLA-DQA1*03:03 i -DQA1*05:05 među tipiziranim pacijentima nema podršku u obrađenoj literaturi.

Za ukupno 40 pacijenata oboljelih od T1DM-a analizirani su haplotipovi HLA-DRB1*-DQA1*-DQB1*. Najučestaliji haplotip u literaturi je spominjan kao DR4 (DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02) i ima HF=37,5 %. Haplotip poznat i kao DR3 (HLA-DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01) ima HF=26,25%. 33/40 (82,5%) pacijenata nositelji su jednoga ili oba haplotipa. 13/40 (32,5%) pacijenata su heterozigoti za DR3-DR4 haplotip, što potvrđuje navode iz literature da je približno 40% djece s T1DM-om heterozigot DR3-DR4 u usporedbi s oko 2% zdrave djece. Heterozigoti DR3-DR4 imaju veću sklonost razvoju bolesti od homozigota za bilo koji od tih haplotipova (14). Dva spomenuta haplotipa imaju najjaču pozitivnu povezanost s T1DM-om, što su potvrdile mnoge studije provedene većinom na populacijama bijele rase i uglavnom se na njih odnosi spominjanih 50% genetske sklonosti ka T1DM-u (10, 14). 7/40 (17,5%) pacijenata nema niti jedan od spomenutih haplotipova. 2/40 (5%) pacijenta nositelji su haplotipa (HF=2,5 %) sa slabom zaštitom DRB1*04-DQA1*03:03-DQB1*03:01, dok je samo 1/40 (2,5 %) homozigot za umjerenom zaštitni haplotip DRB1*11-DQA1*05:01-DQB1*03:01.

6. Zaključak

Iz rezultata istraživanja HLA rizičnih genotipova za T1DM u oboljelih u istočnoj Hrvatskoj može se zaključiti:

1. Aleli HLA-B*08; -DRB1*04; -DRB*03; -DQB1*02; -DQB1*03 (DQ8) i -DQA1*03:01 su učestaliji među oboljelima.
2. Aleli HLA-B*07; -DRB1*11; -DRB1*15; -DQB1*06 i -DQA1*01:02 su učestaliji među zdravim kontrolama.
3. Haplotip HLA-DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) je uz haplotip HLA-DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 najučestaliji u skupini pacijenata (63,75%), i samo 7 od 40 pacijenata nema niti jedan od ovih haplotipova.
4. Haplotip HLA-DRB1*04-DQA1*03:03-DQB1*03(DQ7) je haplotip s najmanjom frekvencijom (2,5%) među oboljelima.

Sve navedeno ukazuje da su rizični HLA genotipovi, objavljeni u izvješćima različitih studija provedenih među pripadnicima bijele rase, prisutni i u populaciji oboljelih od T1DM-a na području istočne Hrvatske.

7. Sažetak

Cilj istraživanja: Povezanost dijabetesa tipa 1 i HLA sustava predmetom je istraživanja posljednjih četrdesetak godina. Cilj je ovoga istraživanja je analizirati raspodjelu alelnih (HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1, -DQA1 lokusa) i haplotipnih (DRB1-DQA1-DQB1) varijanti gena HLA sustava te odrediti njihovu povezanost s T1DM-om, u smislu prisutnosti tih varijanti u oboljelih na području istočne Hrvatske.

Materijali i metode: Iz EDTA uzoraka pune krvi 81 pacijenta oboljelog od T1DM-a izolirana je DNA i svi su tipizirani PCR-SSP metodom niske ili visoke rezolucije. Kao kontrole korišteni su ranije objavljeni rezultati HLA tipizacije zdravih, nesrodnih osoba.

Rezultati: Značajna razlika u učestalosti alela kod pacijenata i kontrolne skupine uočena je za alel HLA-B*8, međutim značajnost alela HLA razreda I pripisana je neravnoteži udruživanja s alelima HLA razreda II. Učestalost alela HLA razreda II u korist pacijenata je: DQB1*03:02 (31,86 %); DQB1*02 (32,10 %); DRB1*04 (31,48 %); DRB1*03 (27,16%); DQA1*03:01 (37,50 %). Niža učestalost alela kod pacijenata je: DQB1*06 (6,79 %); DRB*15 (1,85 %); DRB*11 (5,56 %); DQA1*01:02 (7,5 %). Najučestaliji haplotipovi među pacijentima su i prema literaturi navedeni kao pozitivno povezani s T1DM-om: DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) (37,%) i DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (26,25 %) i samo 7/40 (17,5 %) pacijenata nema niti jedan od spomenutih haplotipova.

Zaključak: Rezultati istraživanja i na malom uzorku, kakav je naš, pokazuju da je genetska sklonost pacijenata oboljelih od T1DM-a s područja istočne Hrvatske povezana s alelima HLA DR i DQ lokusa, točnije s pojedinim haplotipnim kombinacijama (DQB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01/DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8)), što je u skladu s objavljenim rezultatima istraživanja na populacijama bijelaca.

Ključne riječi: dijabetes tipa 1, aleli HLA razreda I i II, oboljeli u istočnoj Hrvatskoj.

8. Summary

HLA RISK GENOTYPES FOR TYPE 1 DIABETES IN PATIENTS OF EASTERN CROATIA

The aim of the study: The link between type 1 diabetes (T1DM) and the HLA system has been continuously studied for the past 40 years. The aim of this study was to investigate the distribution of allelic- (HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1, -DQA1 loci) and haplotype- (DRB1-DQA1-DQB1) variants of the HLA system genes and their possible connection to T1DM as risk variants in diabetic patients of Eastern Croatia.

Materials and Methods: DNA was isolated from whole blood EDTA samples of 81 patients diagnosed with T1DM. HLA typing was done using high or low resolution PCR-SSP method. The data for control samples were obtained from previously typed, healthy, non-related individuals.

Results: Significant differences in allele frequencies between diabetic patients and the control group were found for HLA-B*08 and -B*07 allele. However, the significance of HLA class I alleles has been ascribed to the linkage disequilibrium with class II alleles. The frequencies of class II alleles in favor of patients were: DQB1*03(DQ8) (31.86%); DQB1*02 (32.10 %); DRB1*04 (31.48 %); DRB1*03 (27.16%); DQA1*03:01 (37.50 %). DQB1*06 (6.79 %); DRB*15 (1.85 %); DRB*11 (5.56 %); DQA1*01:02 (7.5 %) showed lower allele frequencies in patients. The most frequent haplotypes among patients were also in concordance with the existing literature as positively correlated to T1DM: DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8) (37 %) and DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (26.25 %). Only 7/40 (17.5 %) of patients had none of the abovementioned haplotypes.

Conclusion: The results of this study, even in a small sample pool as ours, indicate that the genetic susceptibility in T1DM patients of Eastern Croatia is linked to the alleles of the HLA DR and DQ locus, precisely to the following haplotype combinations: DQB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 / DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03 (DQ8). The results are in agreement with the available research results of studies in Caucasians.

9. Literatura

1. Jayaraman S. Novel Methods of Type 1 Diabetes Treatment, *Discovery medicine* 06/2014; 17(96): 347-355.
2. Cooke D.W, Plotnick L. Type 1 Diabetes Mellitus in Pediatrics. *Pediatr.Rev.* 2008; 29; p.374-385.
3. Jaïdane H, Sané F, Gharbi J, Aouni M, Romond MB, Hober D. Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25(7):591-603.
4. Tičinović Kurir T i sur. Patofiziologija endokrinopatija. Split: Redak; 2013. str. 49-60.
5. Vučić Lovrenčić M, Ročić B. Klinička biokemija šećerne bolesti; U: Sertić J, i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str.292-300.
6. Aganović I, Metelko Ž. Šećerna bolest; U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina, Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 1244-1264.
7. Živić S, Vlaški J, Kocić G, Pešić M, Ćirić V, Đurić Z. Značaj oksidativnog stresa u nastanku dijabetesa tipa 1- određivanje aktivnosti katalaze u limfocitima obolelih. *Med Pregl* 2008; 59(9-10): 458-463.
8. Magaš S. Razvoj kroničnih komplikacija u dijabetičara i potencijalni učinak antioksidansa u hrani. *Kardio list.* 2010; 5(5-6): 69-75.
9. Poljičanin T, Metelko Ž. Epidemiologija šećerne bolesti u Hrvatskoj i svijetu. *Medix;* No. 80/81; 2009. str. 82-88.
10. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of Type 1 Diabetes. *Clinical Chemistry* 2011; 57:2; 176-185.
11. Mehers KL, Gillespie KM. The genetic basis for type 1 diabetes, *British Medical Bulletin* 2008; 88: 115-129.
12. Noble JA, Erlich HA. Genetics of Type 1 Diabetes, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: a007732
13. Žunec R. Molekularna tipizacija HLA, primjena u transplantaciji i dijagnostici; U: Sertić J, i sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str.292-300.
14. Kantarova D, Buc M. Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus in Humans. *Physiol. Res.* 2007; 56: 255-266.
15. <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>

16. Kerhin-Brkljačić V, Grubić Z. Glavni sustav tkivne snošljivosti u ljudi; U: Grgičević D, i sur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 254-258.
17. Marušić M, Grčević D. Glavni kompleks molekula tkivne podudarnosti; U: Taradi M, urednik. Imunologija. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 98-113.
18. Grubić Z, Burek Kamenarić M, Mikulić M, Štingl Janković K, Maskalan M, Žunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *International Journal of Immunogenetics*, 2014; 41: 211-221.
19. Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A, Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and DQB1 haplotypes in a Croatian population. *European Journal of Immunogenetics* 2000; 27: 47-51.
20. www.roche-applied-science.com
21. <http://www.olerup-ssp.com>

22. Middleton D. HLA Typing from Serology to Sequencing Era. *Iranian journal of allergy, asthma and immunology* 2005, Vol.4, No. 2.
23. Pećina-Šlaus N, Nikuševa Martić T, Perić J. Odabrane metode molekularne biologije. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
24. Noble JA, i sur. HLA Class I and Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2010; Vol.59: 2972-2980.
25. Brorsson C, Hansen NT, Bergholdt R, Brunak S, Pociot F. The Type 1 Diabetes – HLA Susceptibility Interactome – Identification of HLA Genotype-Specific Disease Genes for Type 1 Diabetes. *Plos one* 2010, Vol. 5, No. 2.
26. Erlich HA, i sur. HLA DR-DQ Haplotypes and genotypes and Type 1 Diabetes Risk, *Diabetes* 2008; Vol.57: 1084-1092.
27. Katahira M. (2011) Relationship of Type 1 Diabetes with Human Leukocyte Antigen (HLA) Class II Antigens Except for DR3 and DR4, *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*, Prof. David Wagner (Ed.), ISBN: 978-953-307-362-0, InTech, dostupno na: <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-pathogenesis-genetics-and-immunotherapy>

10. Životopis

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Anelka Bugarin
Datum i mjesto rođenja: 25. rujna 1968., Osijek
Adresa stanovanja: Crkvena 97, Osijek
E-mail: bugarin.andelka@gmail.com

OBRAZOVANJE

1975. - 1983. - osnovno obrazovanje

1983. -1987. - ŠC "Ruđer Bošković", Osijek; smjer: sanitarno-laboratorijski stručni radnik

2010. -2013. – Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

ZAPOSLENJE

Odjel za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva

Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku

Klinički bolnički centar Osijek