

Povezanost gena HLA-B27 s razvojem spondiloartropatija u populaciji istočne Hrvatske

Mesić, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:713952>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



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

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Katarina Mesić

**POVEZANOST GENA HLA-B27 S
RAZVOJEM SPONDILOARTROPATIJA
U POPULACIJI ISTOČNE HRVATSKE**

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Katarina Mesić

**POVEZANOST GENA HLA-B27 S
RAZVOJEM SPONDILOARTROPAZIJA
U POPULACIJI ISTOČNE HRVATSKE**

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Osijek.

Mentor rada: doc.dr.sc. Saška Marzi

Rad ima 33 stranice, 5 tablica i 6 slika.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Sustav HLA	1
1.1.1. Geni i molekule HLA	1
1.1.2. HLA-B27	4
1.2. Spondiloartropatije	6
1.2.1. Ankilozantni spondilitis	6
1.2.2. Psorijatični artritis	7
1.2.3. Reaktivni artritis	7
1.2.4. Nediferencirane spondiloartropatije	8
1.3. Mehanizam povezanosti HLA-B27 sa spondiloartropatijama.....	8
1.4. Hipoteza	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3. ISPITANICI I METODE	11
3.1. Ustroj istraživanja.....	11
3.2. Ispitanici i uzorci.....	11
3.3. Metode.....	12
3.3.1. Izolacija DNA iz pune krvi.....	12
3.3.2. Mjerenje koncentracije i određivanje kakvoće DNA	13
3.3.3. Tipizacija lokusa HLA-B*27 metodom PCR-SSP.....	13
3.3.4. Agarozna gel elektroforeza – predočavanje rezultata PCR-a.....	15
3.3.5. Analiza rezultata određivanja prisutnosti alela HLA-B*27 metodom PCR-SSP.....	17
3.3.6. Statističke metode.....	18
4. REZULTATI	19
4.1. Osnovna demografska obilježja ispitivanih skupina bolesnika	19
4.2. Učestalost alela HLA-B*27 u ispitivanim skupinama spondiloartropatija	20
4.3. Usporedba učestalosti alela HLA-B*27 između skupina SpA i kontrolne skupine	20
4.4. Usporedba učestalosti HLA-B27 u skupinama spondiloartropatija u populaciji istočne Hrvatske i u drugim populacijama.....	22
6. ZAKLJUČAK	28
7. SAŽETAK	29
8. SUMMARY	30
9. LITERATURA	31
10. ŽIVOTOPIS	33

Popis kratica

AF (eng. *allele frequency*) učestalost alela

AS (eng. *ankylosing spondylitis*) ankilozantni spondilitis

CD4 (eng. *cluster of differentiation 4*) glikoprotein

CD8 (eng. *cluster of differentiation 8*) glikoprotein

CI (eng. *confidence interval*) interval pouzdanosti

DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*) deoksiribonukleinska kiselina

dATP deoksiadenozin trifosfat

dCTP deoksicitidin trifosfat

dGTP deoksigvanozin trifosfat

dTTP deoksitimidin trifosfat

EDTA (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*) etildiamintetraoctena kiselina

HLA (eng. *human leukocyte antigens*) ljudski leukocitni antigen

KCl kalijev klorid

MgCl₂ magnezijev klorid

MHC (eng. *major histocompatibility complex*) glavni kompleks tkivne podudarnosti

MLCT (eng. *microlymphocitotoxicity*) test mikrolimfocitotoksičnosti

OR (eng. *odds ratio*) omjer izgleda

PCR (eng. *polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimerazom

PCR-SSP (eng. *sequence-specific primer polymerase chain reaction*) metoda lančane reakcije polimerazom sa sekvencno specifičnim početnicama za pojedini alel ili skupinu alela

PsA psorijatični artritis

ReA reaktivni artritis

SD standardna devijacija

TAE (eng. *tris-acetate-EDTA*) tris acetat-EDTA

TCR T-stanični receptor

uSpA nediferencirane spondiloartropatije

1. UVOD

1.1. Sustav HLA

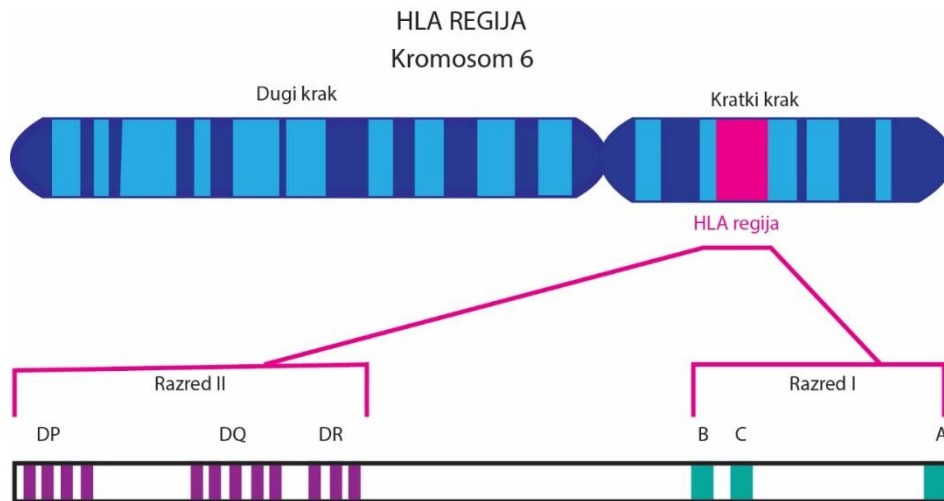
Sustav HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) naziv je za glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *MHC - Major Histocompatibility Complex*) čovjeka. Produkti gena MHC u čovjeka, MHC antigeni, prvo su pronađeni na leukocitima i otud potječe naziv HLA.

Sustav HLA sadrži više od 200 gena i najpolimorfniji je sustav čovjekovog tijela (1,2). U ovom trenutku poznato je 17166 alelnih varijanti lokusa HLA (3).

Glavna uloga HLA sustava razlikovanje je stranih od vlastitih antigena i usmjeravanje imunološke reakcije u smjeru uništenja stranoga antigena (1). Mnoga istraživanja ukazuju na veću ili manju povezanost određenih bolesti, većinom autoimunih i infektivnih, s genima sustava HLA, koje nastaju uslijed kombinacije okolišnih faktora i neprimjerene reakcije organizma na vlastite antigene (4,5).

1.1.1. Geni i molekule HLA

Gene sustava HLA nalazimo na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21.3) (Slika 1). Ekspimirani su kodominantno (2), a kodiraju sintezu proteina koji prezentiraju antigene imunološki kompetentnim stanicama (1).



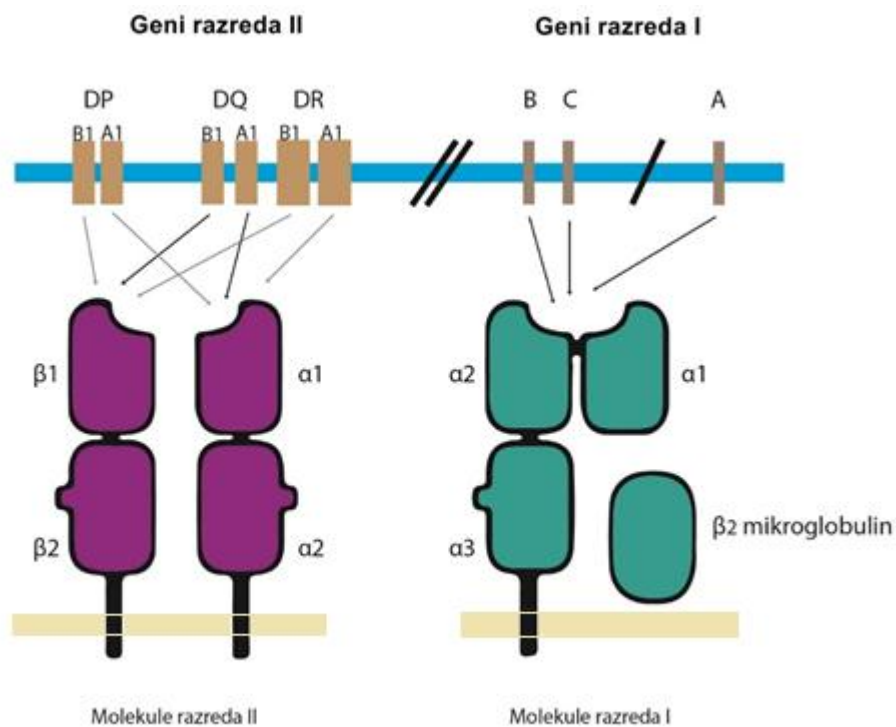
Slika 1. Shematski prikaz položaja gena HLA razreda I i II na kromosomu 6
(sliku izradila Katarina Mesić)

Regija HLA sadrži oko 4 milijuna parova baza DNA. Iz funkcionalnih razloga gene i molekule HLA kompleksa dijelimo u tri razreda. Razredi I i II imaju ulogu u preradbi i predočavanju stranih antigena limfocitima T, dok regija HLA razreda III, koja se u genomu nalazi između regija HLA I i II, sadržava gene koji iako sudjeluju u imunosnoj reakciji, nemaju središnju ulogu kao molekule razreda I i II (1). Geni HLA razreda I podijeljeni su u tri skupine: klasični HLA geni (HLA-A, -B, -C), neklasični (HLA-E, -F, -G) i pseudogeni ili dijelovi gena (HLA-H, -J, -K, -L). Geni HLA razreda II podijeljeni su u šest podregija (HLA-DM, -DO, -DN, -DP, -DQ, -DR), a u klasične gene razreda II spadaju HLA-DP, -DQ i -DR. Klasični geni HLA razreda I i II kodiraju sintezu molekula HLA razreda I i II. Oznaka antigena/gena HLA sadrži oznaku lokusa te identifikacijski broj antigena/alela. Ako je prisutnost antigena određena serološkom metodom tada je oznaka npr. HLA-B27, a ako je gen određen molekularnom metodom oznaka je npr. HLA-B*27 (broj od lokusa odvojen zvjezdicom).

Molekule HLA razreda I smještene su na membrani stanica koje imaju jezgru, s iznimkom endotela rožnice, egzokrinog dijela gušterače i neurona središnjeg živčanog sustava. Teški α -lanac i laki β -lanac dva su polipeptidna lanca koja čine molekulu HLA razreda I. Teški α -lanac građen je od tri izvanstanične domene ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), hidrofilnog dijela u citoplazmi i hidrofobnog transmembranskog dijela. Laki β -lanac ($\beta 2$ -mikroglobulin) nalazi se izvan stanice, a kodiran je genom na kromosomu 15 (2,6). Molekula HLA I podijeljena je na četiri

dijela: dio koji nalikuje imunoglobulinu ($\alpha 3$, $\beta 2$ mikroglobulin), dio koji veže strani peptid ($\alpha 1, \alpha 2$), transmembranski i citoplazmatski dio. Pukotina tvorena od domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ odnosno dio koji veže unutarstanični peptid najvažniji je dio same molekule HLA razreda I. U pukotinu se mogu vezati peptidi duljine 8-10 aminokiselina. Dio molekule koji oblikom podsjeća na imunoglobulin sadrži vezno mjesto za CD8⁺ limfocite T. Laki lanac molekule HLA razreda I nužan je za izražavanje molekula na staničnoj površini i on je građen kao konstantni dio imunoglobulina (2,6).

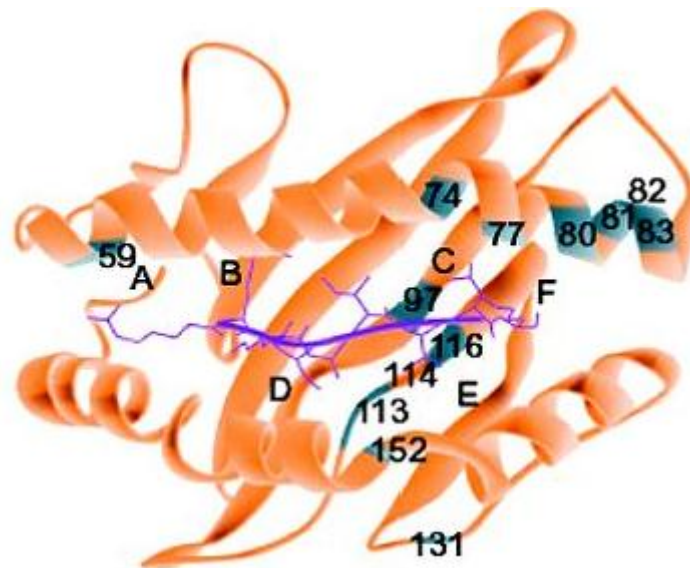
Molekule HLA razreda II građene su od dva polimorfna nekovalentno vezana polipeptidna lanca α i β , kodirana genima A i B (Slika 2). Također se sastoje od četiri regije. U pukotini mogu vezati duže peptide u odnosu na molekule HLA razreda I. Membrane antigen predočnih stanica (limfocita B, aktiviranih limfocita T, makrofaga, monocita, dendritičnih stanica) mjesta su gdje nalazimo molekule HLA razreda II. Prezentiraju izvanstanične peptide CD4⁺ limfocitima T (2,6).



Slika 2. Shematski prikaz građe molekula HLA razreda I i II
(sliku izradila Katarina Mesić)

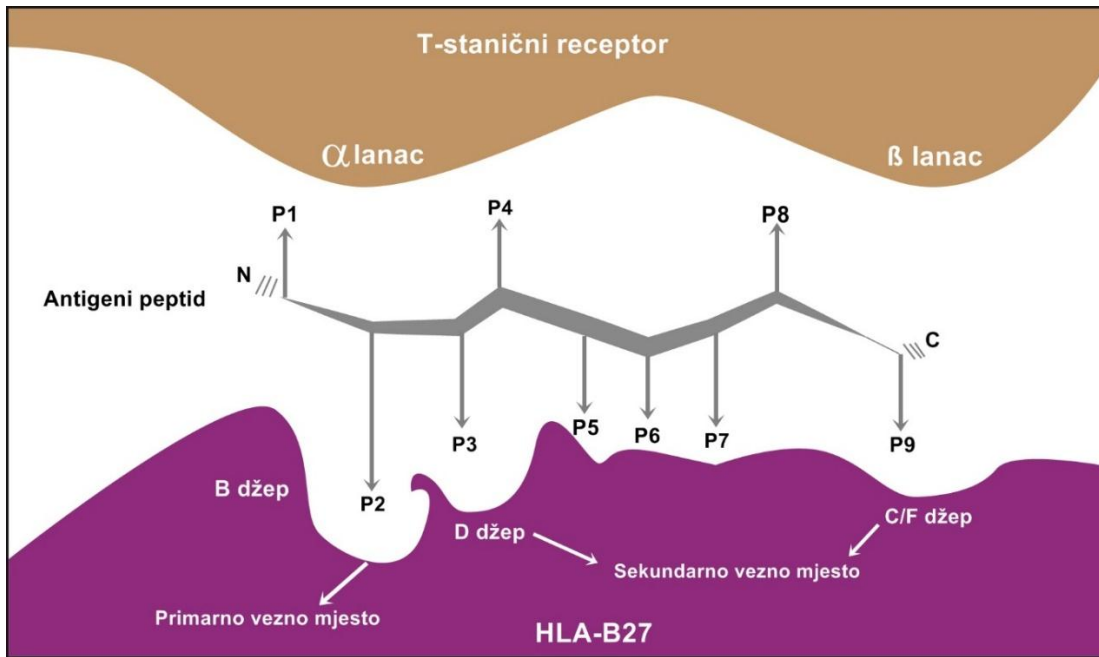
1.1.2. HLA-B27

Gen HLA-B27 pripada genima HLA razreda I. Molekula HLA-B27 kao i sve ostale molekule HLA razreda I građena je od jednog lakog i jednog teškog lanca. Teški lanac kodiran genom HLA-B27 prolazi kroz staničnu membranu, a laki lanac je kodiran genom na kromosomu 15. Teški lanac tvore tri domene (α_1 , α_2 i α_3), a laki lanac tvori β_2 -mikroglobulin. α_1 i α_2 domene su kodirane egzonima 2 i 3, a zajedno tvore bočne strane pukotine u kojoj vežu se dijelovi stranih antigena. Domena α_3 odgovorna je za zatvaranje dna pukotine u kojoj veže se strani antigen, a kodirana je egzonom 4 (4). Unutar pukotine nalazi se 6 veznih mjesta („džepova“) za vezanje peptida koji označavaju se slovima A do F (Slika 3).



Slika 3. Trodimenzionalna struktura α_1 i α_2 domena molekule HLA-B*27:05. Ljubičasto je označen peptid koji je u interakciji sa „džepovima“ pomoću vodikovih veza. Svaki od 6 džepova (A-F) može vezati bočni lanac pojedine aminokiseline. (Prilagođeno prema(7)).

Pozicije unutar antigenog peptida P2, P3 i P9 služe za vezanje na molekulu HLA, pozicijama P1, P4 i P8 veže se na TCR-T stanični receptor, dok su dijelovi peptida P5, P6 i P7 vezna mjesta za molekulu HLA i T stanični receptor (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz vezanja antigenog peptida u pukotinu molekule HLA-B*27 i prepoznavanje od strane T staničnog receptora. (sliku izradila Katarina Mesić i prilagodila prema(8)).

Gen HLA-B27 vrlo je polimorfan. Poznato je 105 različitih podtipova tj. alelnih varijanti toga gena, koji se imenuju HLA-B*27:01 do HLA-B*27:106 (9). Zamjena jedne ili više aminokiselina u egzonu 2 i 3, koji kodiraju domenu α_1 i α_2 teškog lanca, rezultira nastankom većine alelnih varijanti gena HLA-B27 (4). Podtipovi HLA-B27 vežu različite peptide, međutim sam raspored aminokiselina u peptidima se preklapa kod većine podtipova. Poznato je da se radi o peptidima koji na poziciji P2 gotovo uvijek imaju aminokiselinu arginin, a na poziciji P9 aminokiselinu histidin. Poznavanje peptida koje vežu molekule HLA-B27 i poznavanje struktura podtipova molekule HLA-B27 može dati odgovore o ulozi HLA-B27 u razvoju spodiloartropatija (4).

1.2. Spondiloartropatije

Upalne reumatske bolesti, klinički obilježene pojavom perifernog artritisa sa zahvaćenošću sakroilijakalnih zglobova i zglobova kralježnice s pojavom promjena na koži, očima, srčanim zaliscima i aorti, spadaju u skupinu spondiloartropatija (SpA) (10). Dijagnostički i klasifikacijski kriteriji SpA oslanjaju se na kliničke karakteristike.

Podskupine SpA-a obuhvaćaju ankilozantni spondilitis (AS), psorijatični artritis (PsA), reaktivni artritis (ReA), enteropatski artritis (spondilitis/artritis povezan s upalnim bolestima crijeva) te nediferencirane SpA (uSpA) (1,11). Tijek bolesti, prognoza i liječenje razlikuju se između pojedinih entiteta unutar skupine SpA. Iako je klinički spektar SpA širok, te bolesti imaju mnoga zajednička obilježja, među kojima su i negativni nalaz reumatoidnog faktora u krvi te često pojavljivanje bolesti među bliskim rođacima, što ukazuje na ulogu genetskih čimbenika (10).

Mnoga istraživanja potvrđuju da su pojava i razvoj svih podskupina SpA-a povezane s etničkim, genetskim i okolišnim čimbenicima (11). Pronađeno je da značajno viši rizik za razvoj SpA-a, a osobito ankilozantnog spondilitisa, imaju osobe koje nose gen HLA-B27 (4).

1.2.1. Ankilozantni spondilitis

Ankilozantni spondilitis (AS) kronična je reumatska bolest koja zahvaća kralježnicu i velike proksimalne zglobove. Sinovitis koji vodi u osifikaciju veziva i hrskavice s posljedičnim stvaranjem kosti osnova je patohistološkog zbivanja. Upalni proces najprije zahvaća sakroilijakalne, kostovertebralne zglobove, kostosternalne sinhondroze te hvatišta tetiva i ligamenata. Kod bolesnika pojavljuje se križobolja i ukočenost lumbosakralne kralježnice te umor, anoreksija, gubitak tjelesne težine i pojačano noćno znojenje. Uz svakodnevnu bol i ukočenost u križima javljaju se artralgijske, artritisi te entezitisi (10). Bolest se pojavljuje u dobi od 20-e do 40-e godine. U 15-20% bolesnika pozitivna je obiteljska anamneza (10).

Prevalencija AS ovisi o učestalosti gena HLA-B27 te raspodjeli podtipova gena HLA-B27 u različitim etničkim skupinama (10,11). Novija istraživanja pokazuju da, osim HLA-B27, postoje i dodatni geni koji utječu na razvoj AS (12,13).

1.2.2. Psorijatični artritis

Psorijatični artritis (PsA) kronična je upalna bolest koja se javlja kod pacijenata s kožnom psorijazom (bolest abnormalne proliferacije keratinocita udružena s upalnom reakcijom kože). Bolest zahvaća kralježnicu, kukove kao i zglobove prstiju ruku i nogu. Može doći do pojave deformiteta. PsA je postupno progresivna bolest, iako može započeti i burno s izraženim općim simptomima. Klinička je slika raznolika. Dolazi do upale perifernih zglobova, promjena aksijalnog skeleta, entenzitisa, daktilitisa. Bol i ukočenost vrata i kralježnice česta su pojava kod pacijenata s PsA-om. Najučestaliji simptom je psorijaza kože i noktiju (10). Prevalencija PsA u Hrvatskoj viša je u muškaraca nego u žena (11). Obiteljskim studijama dokazano je da srodnici bolesnika imaju oko 50 puta veći rizik obolijevanja od PsA-a u odnosu na nasumce odabrane ispitanike (14).

Veliku ulogu u razvoju psorijatičnog artritisa imaju imunogenetički i okolišni čimbenici. Istraživanja su pokazala povezanost PsA-a s HLA-B*39, -B*57, -B*27 i -B*13 u Hrvatskoj (14), te s HLA-B*07, -B*13, -B*27, -B*38, -B*39, -B*57, Cw*0602 i -DRB1*07u drugim populacijama (15).

1.2.3. Reaktivni artritis

Najčešći okidači za razvoj reaktivnog artritisa (ReA) su urogenitalne infekcije (*Chlamydia trachomatis*), gastrointestinalne (*Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*) ili infekcije dišnog sustava (*Chlamydia pneumoniae*). Zglobovi donjih udova najčešća su mjesta pojave ReA-a koji može biti asimetričan, oligoartikularan, ponekad monoartikularan i karakteriziran pojavom "kobasičastog" prsta na stopalu (10). Pojavnost kod muškaraca je 10-20 puta veća nego kod ženske populacije. ReA se javlja između 16-te i 35-te godine života, ali to ne isključuje mogućnost pojave u ranijoj životnoj dobi (10). Većinom se reaktivni artritis javlja kod genetski predisponiranih osoba pozitivnih na prisustvo gena HLA-B27 (4,11).

1.2.4. Nediferencirane spondiloartropatije

U grupu nediferenciranih spondiloartropatija (uSpA) ubrajaju se bolesnici mlađe životne dobi sa slabije izraženim obilježjima SpA-a, kao što su upalna križobolja, perzistirajuća bol u stražnjici, entenzitisi i daktilitisi. Bolesnici kod kojih se preklapaju klinička obilježja dva ili više entiteta SpA mogu se klasificirati kao uSpA. Veliki broj ovih bolesnika s vremenom poprimi značajke neke od navedenih podskupina SpA-a (1,10).

1.3. Mehanizam povezanosti HLA-B27 sa spondiloartropatijama

Seronegativne spondiloartropatije (SpA) skupina su upalnih reumatskih bolesti koje se zajednički klasificiraju zbog sličnih kliničkih, epidemioloških te genetičkih obilježja (16). Povezanost između HLA-B27 i razvoja spondiloartropatija ostaje najjača poznata veza između antigena MHC kompleksa i razvoja bolesti, čak i 30 godina nakon otkrića te povezanosti (17). Razvija li se spondiloartropatija zbog bakterijske infekcije ili infekcija zajedno s prisutnošću HLA-B27 te može li biti okidač za razvoj neke od SpA-a, još nije znanstveno dokazano (17).

U samim počecima postavljanja teorija o povezanosti HLA-B27 i spondiloartropatija pretpostavljalo se da je gen HLA-B27 gen biljeg za bolest te da sama prisutnost gena neće uzrokovati bolest. Danas postoje različite pretpostavke, a nekima od njih temelj su istraživanja na transgeničnim miševima kod kojih miševi s HLA-B27 razvijaju bolest sličnu ljudskoj spondiloartropatiji te ukazuju na moguću direktnu ulogu HLA-B27 u patogenezi SpA. Hipoteze o povezanosti HLA-B27 i SpA-a možemo svrstati u tri skupine(4).

Limfociti T na poticaj križno reaktivnih bakterijskih peptida, prirodne ligande molekula HLA-B27 mogu prepoznati kao ciljne antigene. To objašnjenje svrstavamo u „hipotezu artrogenog peptida“(4). Odnosno, T limfociti specifični protiv stranih peptida budu usmjereni i protiv vlastitih peptida koji pokazuju svojstvo molekularne mimikrije sa specifičnim mikrobnim peptidima (17).

Druga je hipoteza o aktivaciji neuobičajenog imunološkog odgovora limfocita T i nastanka upale uslijed neklasičnog prepoznavanja teških lanaca (α lanac) molekule HLA-B*27 koji nemaju uza se vezane lake lance (β 2-mikroglobulin). Jedan teški (α lanac) i jedan laki lanac (β 2 lanac) osnovna su građa molekula HLA-a razreda I, a s tim i same molekule HLA-B27. Teški lanac tvore tri domene (α 1, α 2, α 3), a molekularna veličina mu iznosi

otprilike 42 kilodaltona. Uloga T-staničnog receptora (engl. *T cell receptor*, TCR) limfocita prepoznavanje je stranog peptida u pukotini molekule HLA razreda I, kao i prepoznavanje veznog mjesta na molekuli HLA. Pukotina molekule HLA razreda I građena je od domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$. Teški lanac kodiraju geni HLA razreda I, građeni od 8 egzona. Za kodiranje domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ odgovorni su egzon 2 i 3. Bočna strana pukotine u koju se vežu dijelovi stranih antigena građena je od te dvije domene teškog lanca. Egzonom 4 kodirana je domena $\alpha 3$, koja nije toliko polimorfna kao domene $\alpha 1$ i $\alpha 2$ i ona zatvara dno pukotine za vezanje peptida. Za vezanje peptida unutar pukotine postoji 6 specifičnih džepova koji se označavaju slovima od A do F (Slika 3). Pozicije na molekuli peptida označavaju se od P1 do P9. Svaka pozicija služi za vezanje na neko od mjesta, bilo to na molekulu HLA ili T stanični receptor (Slika 4). Primarno vezno mjesto na peptidu za molekulu HLA je pozicija P2, dok su pozicije P3 i P9 sekundarna vezna mjesta. Iako različiti podtipovi gena HLA-B27 vežu različite peptide, raspored se aminokiselina u peptidima preklapa. Peptidna analiza ukazuje da na poziciji 2 imaju aminokiselinu arginin, a na poziciji 9 histidin. Uloga gena, struktura HLA-B27 kao i kombinacije peptida koji vežu HLA mogu dati odgovore na ulogu molekula HLA-B27 u nastanku spondiloartropatija (4).

Treća hipoteza, hipoteza upale, povezuje se s odgovorom endoplazmatskog retikuluma na stres pri čemu dolazi do nagomilavanja teških lanaca molekule HLA-B27, a bez $\beta 2$ mikroglobulina. Uslijed nagomilavanja teških lanaca, koji su međusobno povezani disulfidnom vezom na poziciji 67, dolazi do stvaranja homodimera. Postoji li povezanost između nastanka SpA-a sa specifičnim nagomilavanjem homodimera i koja je njihova uloga, dosadašnje spoznaje još nisu dale točne odgovore na tu hipotezu (4).

Povezanost gena HLA-B27 i infekcije u patogenezi SpA-a još nije jasno razjašnjena. Molekularna mimikrija jedna je od teorija temeljena na opažanju sličnosti dijelova mikroba i molekule HLA-B27. Smatra se da je mikroorganizam odgovoran za razvoj reaktivnog artritisa i da se preklapa u svojoj strukturi s molekularnom strukturom HLA-B27. Sekvenciranje gena HLA-B27 i mikrobnih antigena dovodi do provedbe usporedbe sličnosti i razlika na razini nukleotida i aminokiselina (16).

1.4. Hipoteza

Prisutnost HLA-B27 u populaciji oboljelih od SpA-a na području istočne Hrvatske predisponirajući je faktor rizika ovisno o tipu spondiloartropatije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti učestalost alelne varijante HLA-B*27 u oboljelih od spondiloartropatija (SpA), te u svakoj od ispitivanih skupina SpA-a: ankilozantnog artritisa (AS), psorijatičnog artritisa (PsA), reaktivnog artritisa (ReA) i nediferenciranih spondiloartropatija (uSpA) u populaciji istočne Hrvatske.
2. Usporediti učestalost HLA-B*27 u podskupinama ispitanika s podacima alelne frekvencije HLA-B*27 u kontrolnoj skupini.
3. Usporediti učestalost HLA-B*27 u podskupinama SpA-a ispitanika iz istočne Hrvatske s ranije objavljenim podacima učestalosti HLA-B*27 u skupinama oboljelih u drugim populacijama.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Rad je osmišljen kao retrospektivna studija (18).

3.2. Ispitanici i uzorci

Ovim su istraživanjem obuhvaćena 73 bolesnika s postavljenom dijagnozom seronegativnih spondiloartropatija (SpA). Ispitanicima je postavljena odgovarajuća dijagnoza te se redovito prate u Zavodu za reumatologiju, kliničku imunologiju i alergologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC-a Osijek.

Skupine ispitanika podijeljenih prema dijagnozi obuhvaćaju 7 bolesnika (2 Ž, 5 M) oboljelih od ankilozantnog spondilitisa, 16 bolesnika (7 Ž, 9 M) oboljelih od psorijatičnog artritisa, 23 bolesnika (12 Ž, 11 M) koji boluju od reaktivnog artritisa i 27 bolesnika (17 Ž, 10 M) koji boluju od nediferencirane spondiloartropatije.

Uzorci krvi bolesnika bili su popraćeni liječničkom uputnicom i pri dolasku u laboratorij označeni su jedinstvenom oznakom. U radu su korišteni uzorci venske krvi bolesnika, 5 ml krvi u epruveti s EDTA-om kao antikoagulansom.

Svim je ispitanicima prisutnost gena HLA-B*27 testirana molekularnom metodom u rutinskom dijagnostičkom programu u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek u periodu od 2009. do 2016. godine.

Istraživanje je provedeno u periodu od prosinca 2016. do svibnja 2017. godine. Odobreno je od strane etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

Kontrolnu skupinu predstavljali su ranije objavljeni rezultati molekularne tipizacije HLA-a 4000 dobrovoljnih nesrodnih darivatelja koštane srži iz hrvatske populacije (19).

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija DNA iz pune krvi

Za izolaciju genomske DNA iz uzorka pune krvi korišten je komercijalni set *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača (20). Princip metode je da uz pomoć pufera za razgradnju, enzim proteinaza K, razgrađuje proteine stanične membrane i na taj način omogućava izlazak DNA iz jezgre. Sloj staklene mrežice na koloni izolacijskog seta mjesto je vezanja slobodne DNA.

Materijal: 200 μ L pune periferne krvi s antikoagulansom EDTA, *High Pure PCR Template Preparation Kit*, izopropanol, apsolutni etanol, destilirana H₂O.

Pribor: Mikropipete (volumena do 20 μ L, do 200 μ L, do 1000 μ L), nastavci (sterilni, nekoristeni), plastične tubice volumena 1,5 mL i 2,0 mL (sterilne, nekoristene), mikrocentrifuga (2000 – 14200 o/min) s regulacijom temperature, grijač/*shaker* *Thermo Shaker TS-100* sa zamjenjivim blokom za 20 x 2 mL tubice, zamrzivač (-20 °C), hladnjak (+4 °C), nitrilne rukavice bez pudera.

Postupak: 200 μ L uzorka krvi, 200 μ L pufera za razgradnju i 40 μ L vodene otopine proteinaze K pomiješamo u sterilnoj mikroepreveti volumena 1,5 mL. Inkubiramo uzorke 10 minuta na 72°C. Poslije inkubacije dodajemo 100 μ L izopropanola, te ukupni sadržaj izolacijske smjese prenesemo u kolonice sa staklenom mrežicom koje su prethodno označene. Slijedi centrifugiranje u trajanju od 1 minute pri brzini od 8000xg. DNA se veže na staklenu mrežicu. Tubu sa staklenom mrežicom prenosimo u novu kolektor tubu, ispiramo DNA s 500 μ L pufera za uklanjanje inhibitora i dva puta puferom za ispiranje (2x500 μ L). Poslije svakog koraka centrifugiramo jednu minutu pri brzini od 8000xg. Nakon posljednjeg centrifugiranja ostatke pufera uklanjamo kratkom centrifugom (1300xg/10 s). DNA eluiramo dodatkom 200 μ L elucijskog pufera na mrežicu. Elucijski pufer prethodno mora biti zagrijan na 70°C. Opet centrifugiramo pri brzini od 8000xg / 1minutu. DNA prenesemo u obilježenu mikroeprevetu za čuvanje uzoraka volumena 2,0 mL. Uzorak DNA uskladišten je na -20°C do predviđene analize.

3.3.2. Mjerenje koncentracije i određivanje kakvoće DNA

Uzorci izolirane DNA analizirani su pomoću spektrofotometra u svrhu određivanja koncentracije i čistoće DNA. Mjerena je apsorbancija uzoraka DNA na valnim duljinama 230 nm, 260 nm i 280 nm. Vrijednost apsorbancije pri 260 nm uređaj koristi za izračun koncentracije DNA uzorka. Omjer apsorbancija OD_{260}/OD_{280} za čistu DNA trebao bi biti između 1,8 i 2,0. Povećana apsorbancija pri 280 nm ukazuje na onečišćenost uzorka proteinima. Vrijednost apsorbancije pri 230 nm pokazuje nam je li uzorak DNA onečišćen organskim spojevima ili solima koje su sastojci puferских otopina.

Materijal: pufer (elucijski pufer iz seta korištenog za izolaciju DNA), uzorci genomske DNA, destilirana H_2O .

Pribor: Spektrofotometar SpectraMax QuickDrop UV-Vis, mikropipeta volumena 10 μL , sterilni nekorišteni nastavci, nitrilne rukavice bez pudera.

Postupak: Vrijednosti apsorbancija izmjerenih za elucijski pufer, u kojem su uzorci genomske DNA otopljeni, u daljnjim mjerenjima služile su kao slijepa proba. Mjerenja apsorbancije vršena su u volumenu uzoraka DNA od 2 μL . Nakon mjerenja koncentracija je svakog uzorka prilagođena na 30 $ng/\mu L$.

3.3.3. Tipizacija lokusa HLA-B*27 metodom PCR-SSP

Tipizacija HLA-a može se izvoditi na dvjema razinama: antigenskoj i genskoj. Antigeni HLA-a određuju se serološki, testom mikrolimfocitotoksičnosti MLCT, a rezultat toga testa daje nam uvid u polimorfizam na razini molekule HLA na površini stanice. Polimorfizam na razini gena HLA određujemo molekularnim metodama. Molekularne metode tipizacije HLA-a temelje se na lančanoj reakciji polimerazom. Tom metodom umnožavamo fragmente DNA u izvanstaničnim uvjetima. U reakciji koristimo DNA polimerazu, enzim koji omogućava sintezu DNA te specifično sintetizirane početnice za ciljni fragment kojeg želimo umnožiti. S obzirom na razinu određivanja polimorfizama HLA-a razlikujemo tipizaciju niskog i visokog razlučivanja. Tipizacijom niskog razlučivanja određuju se skupine alela (npr. HLA-B*27), dok se tipizacijom visokog razlučivanja određuju pojedini aleli (npr. HLA-B*27:05).

Prisutnost gena HLA-B*27 u uzorcima DNA analizirana je metodom PCR-SSP (eng. Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers) pomoću komercijalnog seta niskog razlučivanja prema uputama proizvođača (Olerup, Stockholm, Švedska).

Tipizacijski set za jedan uzorak sastoji se od dvije PCR tubice. U svakoj od njih nalaze se:

- 5' i 3' početnice za identifikaciju HLA-B27 specifičnosti, od HLA-B*27:01 do HLA-B*27:138
- Kontrolni par početnica, kako bi se provjerila učinkovitost same reakcije
- Smjesa deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) za nastanak nove umnožene DNA molekule
- Pufer (pH 8,3) koji se stoji od odgovarajuće koncentracije KCl, TrisHCl i MgCl₂
- Taq DNA polimeraza (termostabilni enzim iz bakterije *Thermus aquaticus*)
- Genomska DNA (30 ng/μL)

Materijal: Olerup SSP HLA-B*27 – unit dose (Olerup), Taq DNA polimeraza (5 units/μL, Euroclone), H₂O redestilirana (Aqua pro injectione, sterilna), DNA uzoraka.

Pribor: PCR uređaj (VERITI *Thermal Cycler*, *Applied Biosystems*), kabinet za sterilni rad (Aura PCR, Bioair Euroclone Division), mikropipete (volumena do 2.5 μL, 10 μL, 100 μL, 200 μL, 1000 μL), filter nastavci (sterilni, nekoristeni), plastične tubice 1,5 mL, Centrifuga (HERAEUS Multifuge[®] 3S/3S-R), zamrzivač (-20 °C), nitrilne rukavice bez pudera.

Postupak: Tipizacija HLA-a započinje ispunjavanjem radnog lista i evidencije. Upisuje se ime i prezime bolesnika, identifikacijski broj uzorka, datum testiranja, lot korištenog komercijalnog seta kao i izračun sastojaka za PCR reakcijsku smjesu.

Reakcijska smjesa za svaki uzorak mora sadržavati točno određenu količinu komercijalnog mastermiksa (Taq DNA polimeraza i pufer s deoksiribonukleotidima, 3μL), redestilirane sterilne H₂O (5μL) i uzorka DNA (2 μL). Reakcijska smjesa za više uzoraka priprema se tako da se potrebna količina komercijalnog mastermiksa i vode pomnoži s brojem uzoraka, te se tako pripremljena vorteksira 5 s nakon čega se spusti na dno tubice pomoću pulse-spin centrifuge.

U svaku PCR tubicu komercijalnog seta doda se po 8μL reakcijske smjese. Zatim se za svaki uzorak u svaku od dvije tubice dodaje po 2 μL uzorka genomske DNA. Jedan set od 2 tubice predstavlja negativnu kontrolu (umjesto uzorka DNA stavlja se redestilirana sterilna

H₂O), dok jedan set od 2 tubice predstavlja pozitivnu kontrolu (uzorak pozitivan za HLA-B*27 u sastavu komercijalnog seta). Ukupni volumen u tubicama iznosi 10 μ L.

Tubice se prekriju samoljepljivom folijom, centrifugiraju (1 min, 1000 o/min), te se smjeste u PCR uređaj.

U PCR uređaju, reakcija se odvija prema predviđenom programu (Tablica 1). U svakom ciklusu PCR reakcije prvo dolazi do denaturacije, odnosno kidanja vodikovih veza komplementarnih lanaca kalupa DNA na temperaturi 94°C. Komplementarno vezanje početnica na kalup DNA (eng. *annealing*) odvija se pri temperaturi od 61°C i 65°C. Pri temperaturi 72°C odvija se sinteza novoga komplementarnog lanca fragmenta DNA (eng. *extension*).

Tablica1. Uvjeti PCR reakcije

Stupanj	Broj ciklusa	Temperatura (°C)	Trajanje (min)
1	1	94	2:00
2	10	94	0:10
		65	1:00
3	20	94	0:10
		61	0:50
		72	0:30
4	1	RT	<8h
		4	>8h

3.3.4. Agarozna gel elektroforeza – predočavanje rezultata PCR-a

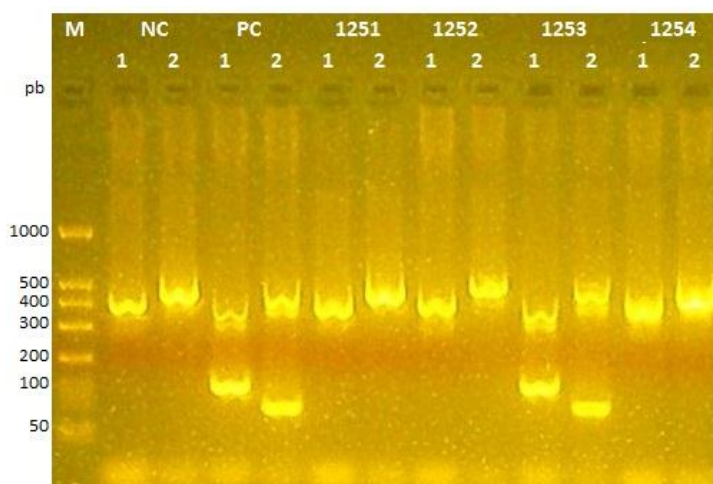
Elektroforeza je postupak pomoću kojeg produkte umožene PCR reakcijom možemo razdvojiti na osnovu razlike u njihovoj veličini, te ih predočiti pomoću boje koja se veže na nukleinske kiseline. Elektroforeza se izvodi uporabom agaroznog gela. Razdvajanje fragmenata DNA događa se pod utjecajem istosmjerne struje. Razdvajanje je ovisno o veličini i konformaciji umnoženog fragmenta DNA, naponu struje, koncentraciji agaroze i puferu. Negativno nabijeni fragmenti DNA kreću se prema elektrodi suprotnog naboja, anodi. Veći fragmenti DNA prema elektrodi putuju sporije, dok manji fragmenti putuju brže i dalje (21).

Materijal: Agarozna (Roche), pufer 1xTAE, GelRed boja za bojanje nukleinskih kiselina u agarozni (Olerup) i DNA marker 50-1000 pb (Olerup)(22).

Pribor: Sustav za elektroforezu VG-SYS *wide Vari-Gel System* (SCIE-PLAS), transformator *PowerPac Basic* (BIORAD), UV transiluminator *ImageQuant100* (*Life Sciences*), mikropipeta volumena do 10 μ L, filter nastavci (sterilni, nekoristeni), analitička vaga (*Mettler Toledo*), mikrovalna pećnica, staklena okrugla tikvica (250 mL), staklena čašica (10 mL), menzura (250 mL), zamrzivač (-20°C), hladnjak (+4°C), nitrilne rukavice bez pudera.

Postupak: Pufer 1xTAE u količini od 132 mL pomiješamo s 2,64 g agaroze u laboratorijskoj tikvici. Mješavinu otapamo u mikrovalnoj pećnici sve do vrenja te nakon toga ohladimo pod mlazom hladne vode do 60 °C. 80 μ L GelRed boje dodajemo u ohlađenu, još tekuću agarozu. Otopinu agaroze prelijemo u kadu za elektroforezu s postavljenim češljevima koji oblikuju jažice. Polimerizacija traje od 20 do 30 minuta. Nakon završene polimerizacije, uklonimo češljeve, a agarozni gel uranjamo u kadu za elektroforezu ispunjenu puferom 1xTAE. Ukupna količina reakcijske smjese svake PCR tubice (10 μ L) pipetira se u jažice gela. DNA marker pipetiramo u prvu jažicu svakog reda kako bismo odredili veličinu umnoženih fragmenata DNA u reakcijskim smjesama. DNA marker je smjesa točno određenog broja fragmenata DNA poznatih veličina (50, 100, 200, 300, 400, 500 i 1000 pb). Agarozna gel elektroforeza odvijala se 20 minuta, pri naponu struje od 200 V.

Razdvojeni fragmenti DNA pod UV svjetlom transiluminatora fluoresciraju zbog toga što molekule GelRed boje fluoresciraju kada su vezane na DNA. Svaki se agarozni gel fotografira (Slika 5). Fotografija gela se označi, analizira te arhivira.



Slika 5. Fotografija gela agarozne elektroforeze molekularne tipizacije alela HLA-B*27 pomoću Olerup SSP komercijalnog seta. M = marker DNA, NC = negativna kontrola, PC = pozitivna kontrola

3.3.5. Analiza rezultata određivanja prisutnosti alela HLA-B*27 metodom PCR-SSP

Rezultati molekularne tipizacije HLA-B*27 analizirani su pomoću lot-specifičnih tablica interpretacije i specifičnosti prema uputama proizvođača (Tablica 2). U ovisnosti o prisutnosti, tj. odsutnosti specifične alelne varijante HLA-B*27 u uzorku DNA mogući su sljedeći rezultati:

Tablica 2. Tablica interpretacije rezultata molekularne tipizacije HLA.B*27

Alelne varijante HLA-B*27		Rezultat
tubica/jažica 1	tubica/jažica 2	
*27:01-27:05:08, 27:05:10-27:05:22, 27:05:24-27:11, 27:13-27:15, 27:17, 27:19-27:21, 27:24-27:25, 27:27-27:28, 27:30, 27:32-27:74, 27:76, 27:78-27:84, 27:86-27:91, 27:93-27:100, 27:102-27:118, 27:120-27:128, 27:130-27:138	*27:01-27:05:15, 27:05:17-27:05:31, 27:08, 27:10, 27:12-27:13, 27:15-27:18, 27:23, 27:25-27:26, 27:28-27:29, 27:31, 27:36-27:40, 27:42, 27:44-27:45, 27:47-27:69, 27:71-27:75, 27:77, 27:79-27:80, 27:82-27:90:03, 27:92-27:101, 27:103-27:105, 27:108-27:124, 27:126, 27:128-27:129, 27:131-27:135, 27:137	
+	-	B*27 pozitivan
-	+	B*27 pozitivan
+	+	B*27 pozitivan
-	-	B*27 negativan

3.3.6. Statističke metode

Učestalost alelne varijante HLA-B*27 u svakoj od skupina spondiloartropatija određena je direktnim brojanjem. U slučaju da je osoba pozitivna za HLA-B*27 uzeto je u obzir da može imati jedan ili oba pozitivna alela. Za uzorak koji je HLA-B*27 pozitivan, pomoću korištenog komercijalnog set, nije moguće odrediti je li on homozigot za HLA-B*27, odnosno posjeduje li B*27 na jednom ili na oba alela. Iz tog razloga u statističkoj obradi podataka uzimane su u obzir obje mogućnosti te je za prikaz rezultata korišten raspon frekvencija alela, kao i raspon OR te raspon pripadajućih vrijednosti *P*.

Usporedba učestalosti alela HLA-B*27 između ispitanika i kontrolne skupine izražena je omjerom izgleda (eng. odds ratio, OR) uporabom tablice 2x2 i Fischerovog egzaktnog testa uz interval pouzdanosti 95% (eng. confidence interval, CI). Razina statističke značajnosti određena je vrijednošću $P < 0,05$. Podaci su statistički obrađeni pomoću programa STATISTICA 12 i Microsoft Excel 2013.

4. REZULTATI

4.1. Osnovna demografska obilježja ispitivanih skupina bolesnika

Provedenim istraživanjem obuhvaćene su ukupno 73 osobe s područja istočne Hrvatske oboljele od spondiloartropatija. Ispitanicima je molekularno testiranje prisutnosti alelne varijante HLA-B*27 učinjeno u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek u periodu od 2009. do 2016. godine. Prema dijagnozi je ukupan broj ispitanika podijeljen u slijedeće skupine: 7 bolesnika s ankilozantnim spondilitisom (9,6%), 16 oboljelih od psorijatičnog artritisa (21,9%), 23 bolesnika s reaktivnim artritisom (31,5%) i 27 bolesnika s nediferenciranom spondiloartropatijom (36,9%) (Tablica 3). Prosječna dob bolesnika pri testiranju HLA-B*27 bila je 50 godina (raspon od 23 do 78 godina). Ukupno je omjer broja bolesnika muškog i ženskog spola bio 1:1,7. Najveća razlika u omjeru broja muških i ženskih ispitanika bila je prisutna u skupini ankilozantnog spondilitisa, omjer 2,4:1.

Tablica 3. Prikaz ispitivanih skupina bolesnika prema spolu i dobi

	broj ispitanika N (% od SpA)	dob (godina) prosjek ± SD	muški spol (%)	ženski spol (%)
			dob (godina) prosjek ± SD	
AS	7 (9,6)	51 ± 16,1	71 53 ± 17,7	29 47 ± 18,4
PsA	16 (21,9)	52 ± 12,3	56 48 ± 6,7	44 57 ± 16,2
ReA	23 (31,5)	48 ± 17,4	48 49 ± 19,5	52 47 ± 16,1
uSpA	27 (36,9)	51 ± 14,4	37 45 ± 13,9	63 55 ± 13,9
Ukupno SpA	73	50 ± 14,9	37 48 ± 14,6	63 52 ± 15,1
Kontrolna skupina	4000		40	60

4.2. Učestalost alela HLA-B*27 u ispitivanim skupinama spondiloartropatija

Analizom učestalosti alelne varijante HLA-B*27 u svim je ispitivanim skupinama uočena veća učestalost HLA-B*27 u odnosu na kontrolnu skupinu. Najveća razlika u alelnim frekvencijama HLA-B*27 u odnosu na kontrolu (6,2%) uočena je za skupinu ankilozantnog spondilitisa (71,4%) (Tablica 4).

Tablica 4. Učestalost alela HLA-B*27 u ispitivanim skupinama SpA i kontrolnoj skupini

	broj ispitanika	broj HLA-B*27 pozitivnih ispitanika	AF HLA-B*27 (%)	raspon broja alela HLA-B*27	raspon AF alela HLA-B*27 (%)
AS	7	5	71,4	5-10	35,7-71,4
PsA	16	2	12,5	2-4	6,3-12,5
ReA	23	3	13,0	3-6	6,5-13,0
uSpA	27	6	22,2	6-12	11,1-22,2
Ukupno SpA	73	16	21,9	16-32	10,9-21,9
Kontrolna skupina	4000	248	6,2	497	6,2

AF = učestalost alela (engl. allele frequency)

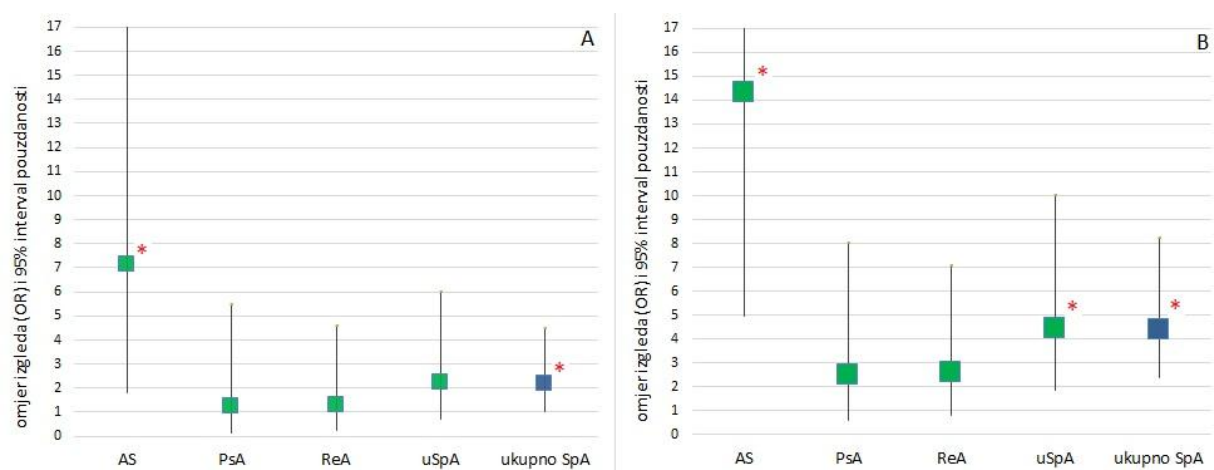
4.3. Usporedba učestalosti alela HLA-B*27 između skupina SpA-a i kontrolne skupine

Uporabom navedenog komercijalnog seta moguće je utvrditi je li uzorak DNA pozitivan ili negativan na prisustvo HLA-B*27, no za pozitivne uzorke nemamo informaciju o tome je li ispitanik homozigot ili heterozigot za HLA-B*27. Iz tog je razloga u daljnjoj analizi rezultata računat raspon između obje mogućnosti, tj. između mogućnosti da su svi pozitivni uzorci heterozigoti i mogućnosti da su svi homozigoti za HLA-B*27. Rezultati alelnih frekvencija HLA-B*27, kao i izračunati omjeri izgleda te razine statističke značajnosti, unutar su dobivenog raspona.

Povećanje učestalosti HLA-B*27 u odnosu na kontrolnu skupinu statistički je značajno za skupinu ankilozantnog spondilitisa (raspon od OR=7,14 (95% CI=1,82-23,45), $P=2,6 \times 10^{-7}$)

³do OR=14,29 (95% CI=4,98-39,03), $P=4,0 \times 10^{-7}$), za ukupno sve spondiloartropatije (raspon od OR=2,19 (95% CI=1,04-4,54), $P=0,033$ do OR=4,38 (95% CI=2,36-8,25), $P=6,4 \times 10^{-7}$) i nediferencirane spondiloartropatije (OR=4,44 (95% CI=1,87-10,05), $P=0,0305$ u slučaju da su svi HLA-B*27 pozitivni ispitanici homozigoti za ispitivani alel) (Slika 6).

Za ostale ispitivane skupine SpA također možemo uočiti trend porasta vrijednosti OR za opciju HLA-B*27 homozigota (Slika 6). U skupinama PsA i ReA vrijednost OR-a se povećava od 1,25, tj. 1,3 na 2,5, tj. 2,61 za opciju HLA-B*27 homozigotnosti, no i dalje se ne razlikuje statistički značajno u odnosu na kontrolu. Gledajući ukupno, omjer izgleda se za SpA statistički značajno razlikuje u odnosu na kontrolu.



Slika 6. Omjer izgleda i 95%-tni interval pouzdanosti za odnos alelne frekvencije HLA-B*27 u ispitivanim skupinama SpA u odnosu na kontrolnu skupinu. A - prikaz rezultata za opciju u kojoj HLA-B*27 pozitivni ispitanici posjeduju po jedan alel HLA-B*27, B - prikaz rezultata za opciju u kojoj su HLA-B*27 pozitivni ispitanici homozigoti za taj alel.

4.4. Usporedba učestalosti HLA-B27 u skupinama spondiloartropatija u populaciji istočne Hrvatske i u drugim populacijama

Dobiveni rezultati učestalosti HLA-B27 u ispitivanim skupinama spondiloartropatija iz populacije istočne Hrvatske uspoređeni su s ranije objavljenim vrijednostima učestalosti HLA-B27 kod odgovarajućih skupina bolesnika u drugim populacijama (Tablica 5).

Kod ispitanika koji boluju od AS-a učestalost HLA-B27 ne razlikuje se značajno između populacija istočne Hrvatske te populacija Sardinije (23) i kontinentalne Italije (23). Značajniju razliku učestalosti HLA-B27 u skupini AS možemo uočiti između naših rezultata (71,4%) i podataka objavljenih za populacije zapadne Europe (95%) te za kinesku Han populaciju (47,5%) (4,24). U skupini oboljelih od PsA-a rezultati učestalosti HLA-B27 jednaki su podacima za PsA u ukupnoj hrvatskoj populaciji (4), za Sardiniju i kontinentalnu Italiju (23), dok je učestalost HLA-B27 u PsA nešto veća u populacijama zapadne Europe (4), Vojvodini-Srbija (25), te u bjelačkoj populaciji Brazila (24). Kod ispitanika oboljelih od ReA-a u populaciji istočne Hrvatske znatno je manja učestalost HLA-B27 (13,0%) u odnosu na podatke za ReA oboljele u populacijama zapadne Europe (40 - 80%) (4), Vojvodine-Srbija (33,3%) (25) i Kolumbije (46,6%) (27). U skupini uSpA-a istočne Hrvatske (22,2%) učestalost HLA-B27 vrlo je slična podacima za Kolumbiju (27), no znatno niža u odnosu na populacije zapadne Europe (70%) (4) i bjelačku populaciju Brazila (61,3%) (28).

Tablica 5. Učestalost HLA-B27 u skupinama spondiloartropatija u populaciji istočne Hrvatske i u drugim populacijama.

		Broj ispitanika u skupinama oboljelih	Učestalost HLA-B27 u skupinama oboljelih (%)	Broj zdravih ispitanika - kontrolna skupina	Učestalost HLA-B27 u zdravoj populaciji - kontrolna skupina (%)	Broj reference
AS	istočna Hrvatska	7	71,4	4000	6,2	
	populacije zapadne Europe	-	95	-	4-8	(4)
	Sardinija	128	69,5	-	-	(23)
	kontinentalna Italija	143	75,5	-	-	(23)
	Kina, Han populacija	360	47,5	350	3,8	(24)
PsA	istočna Hrvatska	16	12,5	4000	6,2	
	populacije zapadne Europe	-	30-75	-	4-8	(4)
	Hrvatska	58	12,1	157	5,2	(4)
	Srbija, Vojvodina	3	33,3	224	6,3	(25)
	Sardinija	54	12,9	-	-	(23)
	kontinentalna Italija	209	12,4	-	-	(23)

	Brazil (podaci za bjelačku populaciju)	23	58,3	-	-	(26)
ReA	istočna Hrvatska	23	13,0	4000	6,2	
	populacije zapadne Europe	-	40-80	-	4-8	(4)
	Srbija, Vojvodina	3	33,3	-	-	(25)
	Kolumbija	30	46,6	-	-	(27)
uSpA	istočna Hrvatska	27	22,2	4000	6,2	
	populacije zapadne Europe		70		4-8	(4)
	Brazil (podaci za bjelačku populaciju)	111	61,3	-	-	(28)
	Kolumbija	57	26,3%	-	-	(27)

5. RASPRAVA

Povezanost HLA-B27 s razvojem spondiloartropatija i dalje je temelj i jedna od glavnih hipoteza brojnih istraživanja. Unatoč velikom broju istraživanja te značajnom razvoju medicine i tehnologije, uloga gena HLA-B27 u patogenezi spondiloartropatija još nije potpuno razjašnjena.

Ovim istraživanjem o povezanosti gena HLA-B27 s razvojem spondiloartropatija željeli smo prikazati učestalost gena HLA-B27 u pojedinim skupinama seronegativnih spondiloartropatija na području istočne Hrvatske te vrijednosti učestalosti usporediti s kontrolnom skupinom ranije objavljenih rezultata molekularne tipizacije HLA za 4000 dobrovoljnih nesrodnih darivatelja koštane srži iz hrvatske populacije. Nadalje, uspoređeni su i rezultati učestalosti HLA-B27 u skupinama spondiloartropatija u populaciji istočne Hrvatske s ranije objavljenim podacima za oboljele od spondiloartropatija u drugim populacijama. Istraživanjem su obuhvaćena 73 bolesnika kojima je molekularna tipizacija HLA-B*27 učinjena u periodu od 2009. do 2016. godine u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek.

U skupini bolesnika s postavljenom dijagnozom ankilozantnog spondilitisa učestalost alela HLA-B*27 je 71,4%. U kontrolnom uzorku od 4000 ispitanika učestalost HLA-B*27 iznosi 6,2%. Uočavamo statistički značajnu razliku između naših rezultata i rezultata kontrolne skupine (raspon OR iznosi 7,14 do 14,29). U populacijama zapadne Europe učestalost HLA-B27 je za 23,6% veća u odnosu na naše rezultate, dok je u kineskoj populaciji Han za 23,9% manja u odnosu na naše rezultate za skupinu ankilozantnog spondilitisa. Naši su rezultati u skladu s istraživanjima Paladini i sur. (23) za područje Sardinije i kontinentalne Italije. Broj oboljelih od AS-a u našoj ispitanjoj skupini mnogo je niži (7 ispitanika) u odnosu na veličinu ispitanih skupina u referentnoj literaturi (128 – 360 ispitanika). U svrhu poboljšanja statističke jakosti testa u eventualnim daljnjim istraživanjima povezanosti HLA-B27 s AS-om potrebno je povećati skupinu ispitanika.

U skupini od 16 oboljelih od psorijatičnog artritisa učestalost HLA-B*27 iznosi 12,5%. Primijetimo povećanje učestalosti HLA-B*27 u skupini PsA-a u odnosu na kontrolnu skupinu no nije statistički značajno. Slično kao u skupini oboljelih od AS-a, i kod PsA-a naši rezultati poklapaju se s podacima za PsA u populacijama Sardinije i kontinentalne Italije (23). U populacijama zapadne Europe je veliki raspon učestalosti HLA-B27 u oboljelih od PsA-a (4), no i takav raspon predstavlja 2,4 do 6 puta veću učestalost HLA-B27 u odnosu na

učestalost kod PsA-a u istočnoj Hrvatskoj. Podatci za PsA skupinu za Vojvodinu (25) i Brazil (26) u razini su učestalosti HLA-B27 u zapadnoj Europi. Broj PsA ispitanika u uspoređivanim populacijama varira od 3 (Vojvodina) do 209 (kontinentalna Italija).

Na našem području u skupini ReA-a brojimo 23 oboljela ispitanika s učestalošću HLA-B*27 od 13%. U ovoj skupini kao i u skupini PsA-a ne postoji statistički značajna razlika u frekvenciji HLA-B*27 u odnosu na kontrolnu skupinu. Za razliku od ostalih podskupina u slučaju ReA-a postoji poznat uzrok odnosno okidač za razvoj bolesti. Prema studijama populacija zapadne Europe 40-80% osoba s postavljenom dijagnozom reaktivnog artritisa pozitivno je na HLA-B27 što je 3 do 6 puta veća učestalost u odnosu na istočnu Hrvatsku. Učestalosti HLA-B27 u populacijama Kolumbije (27) i Vojvodine-Srbija (25) u razini su s populacijama zapadne Europe za oboljele od ReA-a. Sve uspoređivane skupine ReA-a, osim populacija zapadne Europe za koje nemamo podatke, sastoje se od vrlo malog broja (3 do 30) ispitanika (Tablica 4).

Kod nediferenciranih spondiloartropatija, odnosno oblika koji uključuje samo neka klinička obilježja koja nisu dovoljno izražena za svrstavanje u druge skupine seronegativnih spondiloartropatija, alelna frekvencija HLA-B*27 u oboljelih u populaciji istočne Hrvatske veća je u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 6) te je u skladu s rezultatima za nediferenciranu spondiloartropatiju u populaciji Kolumbije (27). U populacijama zapadne Europe (4) i bjelačke populacije Brazila (28) učestalost HLA-B27 je značajno veća (3,15 do 2,8 puta) u odnosu na naše rezultate (Tablica 4).

Hipoteza o HLA-B27 kao prediktivnom faktoru za razvoj neke od spondiloartropatija, postoji dugi niz godina. Najviše se povezuje s razvojem ankilozantnog spondilitisa (4). U bjelačkim populacijama, u skupini oboljelih od spondiloartropatija, 80-85% ispitanika su pozitivni na HLA-B27. Međutim manje od 5% bijelaca sa ovim alelom razviju bolest. Iako se čini da HLA-B27 ima veliku ulogu u razvoju i nastanku bolesti i dalje nisu poznate sve činjenice o povezanosti HLA-B27 s razvojem bilo kojeg oblika spondiloartropatije. HLA-B27 pokazao se kao manje susceptibilan za obolijevanje od spondiloartropatija u ostalim populacijama u usporedbi s bjelačkom populacijom (27).

U populaciji istočne Hrvatske je u odnosu na kontrolnu skupinu povećanje učestalosti HLA-B*27 statistički značajno za skupinu ankilozantnog spondilitisa (Slika 6). Za ispitanike oboljele od AS-a koji su pozitivni na HLA-B*27 s obzirom na uporabljenu metodu trenutno ne možemo reći jesu li HLA-B*27 homozigoti, odnosno nose li tu alelnu varijantu na oba

alela ili samo na jednom alelu. Mogućnosti daljnjeg istraživanja uključivale bi tipizaciju lokusa HLA-B kako bi se utvrdilo jesu li ispitanici pozitivni na HLA-B*27 heterozigoti ili homozigoti za ispitivanu alelnu varijantu te utječe li HLA-B*27 homozigotnost na povećani rizik obolijevanja od AS-a, kao što je to pokazala studija Jaakkola i sur (29). Nadalje, HLA tipizacijom visokog razlučivanja mogli bismo za pozitivne ispitanike iz skupine alelnih varijanti razlučiti koji su to alelni podtipovi HLA-B*27 pozitivno povezani s AS-om u populaciji istočne Hrvatske.

6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata istraživanja o povezanosti gena HLA-B*27 s razvojem spondiloartropatija na području istočne Hrvatske možemo zaključiti sljedeće:

1. Analizom učestalosti alelne varijante HLA-B*27 uočena je veća učestalost HLA-B*27 u svim ispitivanim skupinama oboljelih od AS-a, PsA-a, ReA-a i uSpA-a u odnosu na kontrolnu skupinu.
2. Povećanje učestalosti HLA-B*27 statistički je značajno za skupinu AS-a (raspon OR=7,14-14,29), ukupnu skupinu spondiloartropatija (raspon OR=2,19-4,38) i u SpA-a (OR=4,44 za opciju homozigotnosti).
3. Rezultati učestalosti HLA-B*27 za oboljele od AS-a i PsA-a u populaciji istočne Hrvatske u skladu su s literaturnim podacima za populacije Sardinije i kontinentalne Italije. U odnosu na naše rezultate u populacijama zapadne Europe veća je učestalost HLA-B*27 u skupinama oboljelih od AS-a (1,3 puta), PsA-a (2,4 do 6 puta), ReA-a (3 do 6 puta) i uSpA-a (3 puta).

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Odrediti učestalost alelne varijante HLA-B*27 u oboljelih od spondiloartropatija (SpA) u populaciji istočne Hrvatske. Usporediti učestalost HLA-B*27 u podskupinama ispitanika s podacima alelne frekvencije HLA-B*27 u kontrolnoj skupini i skupinama oboljelih u drugim populacijama.

Ispitanici i metode: Rad obuhvaća 73 bolesnika sa dijagnozom seronegativnih spondiloartropatija: ankilozantnog spondilitisa, AS (7), psorijatičnog artritisa, PsA (16), reaktivnog artritisa, ReA (23) i nediferencirane spondiloartropatije, uSpA (27). Iz uzorka pune krvi s anitikoagulansom EDTA, izolirana je DNA. Tipizacija lokusa HLA-B*27 odrađena je metodom PCR-SSP. Kontrolnu skupinu predstavljali su ranije objavljeni rezultati molekularne tipizacije HLA za 4000 dobrovoljnih nesrodnih darivatelja koštane srži iz hrvatske populacije.

Rezultati i zaključak: Analizom učestalosti HLA-B*27 uočena je veća učestalost HLA-B*27 u svim ispitivanim skupinama oboljelih od AS-a, PsA-a, ReA-a i uSpA-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Povećanje učestalosti HLA-B*27 statistički je značajno za skupinu AS-a, ukupnu skupinu spondiloartropatija i uSpA-a. Rezultati učestalosti HLA-B*27 za oboljele od AS-a i PsA-a u populaciji istočne Hrvatske u skladu su s literaturnim podacima za populacije Sardinije i kontinentalne Italije. U odnosu na naše rezultate u populacijama zapadne Europe veća je učestalost HLA-B27 u skupinama oboljelih od AS-a (1,3 puta), PsA-a (2,4 do 6 puta), ReA-a (3 do 6 puta) i uSpA-a (3 puta).

Ključne riječi: HLA-B27, spondiloartropatije, istočna Hrvatska

8. SUMMARY

Objective: The aim of this study was to determine the HLA-B*27 allele frequencies (AF) in subgroups of the spondyloarthropathies (SpA) patients from Eastern Croatia, and to compare them to the HLA-B*27 AF of the control group, also to HLA-B*27 AF of the patients from other populations.

Participants and methods: The research included a total of 73 patients diagnosed with SpA, divided to subgroups of 7 patients diagnosed with ankylosing spondylitis (AS), 16 diagnosed with psoriatic arthritis (PsA), 23 with reactive arthritis (ReA) and 27 diagnosed with undifferentiated spondyloarthropathies (uSpA). The genomic DNA samples were HLA typed at low resolution level with the use of PCR-SSP technique. The control group consisted of 4000 previously typed healthy Croatian bone marrow donors.

Results and conclusion: The HLA-B*27 allele frequencies in all groups of SpA patients were increased compared to the control group. Differences were statistically significant for the AS, uSpA and total SpA groups. The results of the HLA-B*27 allele frequency for AS and PsA groups from the Eastern Croatian population are in concordance with the literature data for AS and PsA groups from Sardinia and continental Italy populations. In comparison to our results in the populations of Western Europe, the HLA-B*27 allele frequency was increased for AS (1.3x), PsA (2.4 to 6x), ReA (3-6x) and uSpA (3x) groups of patients.

Key words: HLA-B27, spondyloarthropathies, Eastern Croatian population

9. LITERATURA

1. Anić B, Čikeš N. Klasifikacija i patogeneza spondiloartropatija. Reumatizam. 2004;51(2):13-15.
2. Sertić J i suradnici. Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Zagreb. Medicinska naklada. 2008.
3. European Bioinformatics Institute. About the IPD-IMGT/HLA Database. Dostupno na adresi: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html>. Datum pristupa: 07.09.2017.
4. Grubić Z. Gen HLA-B27: Polimorfizam, evolucija, raspodjela i povezanost sa spondiloartropatijama. Reumatizam. 2006; 53(1):5-10.
5. Matazaraki V, Kumar V, Wijmenga C, Zhernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious disease. *Genome Biol.* 2017;18-76.
6. Leušić M, Malčić I i sur. Pedijatrijska reumatologija. Genetika i reumatske bolesti. Zagreb. Medicinska naklada. 2014:49-59.
7. Lopez-Larrea C, Gonzalez S, Martinez-Borra, J. The role of HLA-B*27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy. *Mol Med Today.* 1998: 4-540.
8. Bowness, P, Zaccai, N, Bird J, Jones FY. HLA-B*27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Exp Rev Mol Med.* 1999.
9. Khan MA. Polymorphism of HLA-B27: 105 Subtypes Currently Known. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;15:362.
10. Vrhovac B i suradnici. *Interna medicina.* 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak. 2008;1369-1390.
11. Glasnović M. Epidemiologija spondiloartritisa. Reumatizam. 2011;58(2):24-35.
12. Brown MA, Kenna T, Wordsworth P. Genetics of ankylosing spondylitis-insights into pathogenesis. *Rheumatology.* 2016;12:81-91.
13. Bruges-Armas J. Clinical and Molecular Advances in Ankylosing Spondylitis. *InTech.* 2012:103-134.
14. Grubić Z, Perić P, Čečuk-Jeličić E, Žunec R, Čurković B, Kerhin-Brkljačić V. Raspodjela alela Hla razreda I i razreda II u bolesnika s psorijatičnim artritisom u Hrvatskoj. Reumatizam. 2004;51(1):5-11.
15. Barton AC. Genetic epidemiology psoriatic arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4(4):247-251.

16. Anić B, Cerovac M. Etiologija i patogeneza spondiloartropatija. Reumatizam. 2011;58(2):36-38.
17. Sheehan NJ. The ramifications of HLA-B27. JR Soc Med. 2004;97:10-14.
18. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4 izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2008.
19. Grubić Z, Burek Kamenaric M, Mikulić M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. Int.J Immunogenet. 2014;41: 211–221.
20. Roche Molecular Systems, Inc. Dostupno na adresi: https://lifescience.roche.com/global_en.html. Datum pristupa:07.09.2017.
21. Malenica B, Tadić Z. Temeljne imunološke metode, skripta za studente. Zagreb. 2010:7-8.
22. Addgene.Dostupno na adresi:<https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/>. Datum pristupa: 07.09.2017.
23. Paladini F i sur. Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. Arthritis Rheum. 2005;52(10).
24. Yi i sur. Profiling of HLA-B Allels for Association Studies With Ankylosing Spondylitis in the Chinese Population. Open Rheumatol J. 2013;7:51-54.
25. Vojvodić S, Ademović-Sazdanić D, Busarčević I. Human leukocyte antigen-B27 and disease susceptibility in Vojvodina, Serbia. BJMG. 2012;15(2):55-60.
26. Garcia Ruiz D, Lupi O, Leitao de Azevedo MN. HLA-B27 frequency in a group of patients with psoriatic arthritis . An Bras Dermatol. 2012;87(6):847-850.
27. Londono J, Santos AM, Pena P, Calvo E, Espinosa LR, Reveille JD i sur. Analysis of HLA-B15 and HLA-B27 in spondyloarthritis with peripheral and axial clinical patterns. BMJ Open. 2015;5.
28. Sampaio Barros PD, Bortoluzzo AB, Conde RA i sur. Undifferentiated spondyloarthritis: a longtermfollowup. J. Rheumatol.2010; 37(6):1195-1199.
29. Jaakkola E, Herzberg I, Laiho K, Barnando MCNM, Pointon JJ, Kauppi M i sur. Finnish HLA studies confirm the increased riskconferred by HLA-B27 homozygosity in ankylosingspondylitis. Ann Rhezm Dis.2006;65:775-780.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Katarina Mesić

Datum i mjesto rođenja: 25.11.1991., Zagreb

e-mail: katarina.mesic2511@gmail.com

Obrazovanje:

2007. - 2010. - Zdravstvena i veterinarska škola dr. Andrije Štampara, Vinkovci

2010. - 2014. - Zdravstveno veleučilište Zagreb

stručni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

2014. - 2017. - Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera Osijek

diplomski sveučilišni studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

Radno iskustvo:

Lipanj 2014. -lipanj 2015. – Klinički bolnički centar Osijek, stručno osposobljavanje za
prvostupnicu medicinsko laboratorijske dijagnostike

Kolovoz 2016. – do danas – Opća bolnica Vinkovci, prvostupnik medicinsko laboratorijske
dijagnostike na odjelu za patologiju i citologiju.