

# Povezanost migrene i alela HLA DRB1\*

---

**Bitunjac, Tina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:823097>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-15**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Tina Bitunjac**

**POVEZANOST MIGRENE I ALELA HLA-DRB1\***

**Završni rad**

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Tina Bitunjac**

**POVEZANOST MIGRENE I ALELA HLA–DRB1\***

**ASSOCIATION OF MIGRAINE AND HLA–DRB1\* ALLELES**

**Završni rad / Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Doc.dr.sc. Esmā Čečuk – Jeličić**

Split, 2022.

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo  
Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: Doc. dr. sc. Esma Čečuk - Jeličić

## Povezanost migrene i alela HLA – DRB1\*

Tina Bitunjac, 311236

### Sažetak:

**Cilj rada:** Cilj je ovoga rada odrediti zastupljenost alela sustava HLA u pacijenata kojima je dijagnosticirana migrena i kod pacijenata koji pate od jakih glavobolja na području Splitsko-dalmatinske županije kao i prikazati zastupljenost pojedinih alela lokusa HLA-DRB1\*.

**Materijali i metode:** Za određivanje alela sustava HLA u ovoj studiji koristili smo serološke i molekularne metode. Serološko određivanje antigena sustava HLA podrazumijeva test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT), dok su za molekularno određivanje alela lokusa sustava HLA korištene metode PCR-SSO i PCR-SSP.

**Rezultati:** Određivanjem alela lokusa HLA-DRB1 u skupini ispitanika s migrenom, uočeno je 14 različitih alela, od kojih najveću zastupljenost imaju HLA-DRB1\*16 (19,59%) te HLA-DRB1\*11,-13,-15 s učestalosti od 10,14%. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, utvrđeno je da je učestalost alela HLA-DRB1\*16 (19,59% vs 9,60%,  $p=0,0063$ ) i HLA-DRB1\*10 (2,7% vs 0%,  $p=0,0327$ ) statistički značajno povećana kod skupine pacijenata s migrenom ili jakom glavoboljom.

**Zaključak:** Određivanjem alela sustava HLA kod pacijenata s migrenom i jakim glavoboljama utvrdili smo povećanu učestalost alela HLA-DRB1\*16 u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika dobrovoljnih darivatelja krvi s područja Splitsko-dalmatinske županije.

**Ključne riječi:** HLA, alel, migrena, PCR-SSP, PCR-SSO, MLCT

**Rad sadrži:** 52 stranica, 28 slika, 7 tablica, 26 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**University Department for Health Studies**  
**Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health  
**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** Doc. dr. sc. Esma Čečuk - Jeličić

### **Association of migraine and HLA–DRB1\* alleles**

Tina Bitunjac, 311236

#### **Summary:**

**Objectives:** The objective of this work is to determine the representation of alleles of the HLA system in patients suffering from migraines and severe headaches in the Split-Dalmatia County, as well as to show the representation of individual alleles of the HLA-DRB1\* locus.

**Material and methods:** To determine the alleles of the HLA system we used serological and molecular methods. The serological determination of HLA system antigens includes the microlymphocytotoxicity test (MLCT, Microlymphocytotoxicity test), while the PCR-SSO (Polymerase chain reaction - Sequence Specific Oligonucleotids) and PCR-SSP (Polymerase chain reaction - Sequence Specific Primer) methods were used for the molecular determination of alleles of the HLA system locus.

**Results:** While determining the alleles of the HLA-DRB1 locus in the group of subjects with migraine, we noticed 14 different alleles, of which the highest prevalence is HLA-DRB1\*16 (19.59%) and HLA-DRB1\*11,-13,-15 with a frequency of 10.14%. Compared to the control group, the frequency of alleles HLA-DRB1\*16 (19.59% vs 9.60%,  $p=0.0063$ ) and HLA-DRB1\*10 (2.7% vs 0%,  $p=0.0327$ ) statistically significantly increased in the group of patients with migraine or severe headache.

**Conclusion:** While determining the alleles of the HLA system in patients with migraine and severe headaches, we determined an increased frequency of the HLA-DRB1\*16 allele in comparison to the control group of healthy subjects of voluntary blood donors from the Split-Dalmatia County.

**Keywords:** HLA, allele, migraine, PCR-SSP, PCR-SSO, ML  
**Thesis contains:** 52 pages, 28 figures, 7 tables, 26 references  
**Original in:** Croatian

## ZAHVALE

Veliku zahvalnost dugujem svojoj dragoj mentorici doc.dr.sc Esmi Čečuk-Jeličić, koja mi je pružila priliku i omogućila sve potrebno za izradu ovog završnog rada, što je uvijek imala vremena, strpljenja i razumijevanja za sva moja pitanja i nejasnoće. Hvala Vam od srca na svim savjetima, povjerenju, lijepim riječima, pomoći i podršci koju ste mi nesebično pružali tijekom cijelog procesa stvaranja ovog rada, ali i kroz sve godine studiranja i što ste učinili da ovo za mene bude predivno iskustvo koje ću zauvijek pamtiti.

Veliko hvala i svim ostalim djelatnicima i djelatnicama Laboratorija za tipizaciju tkiva, KBC Split, koji su svojim savjetima i susretljivošću uvelike doprinijeli u stvaranju ovoga rada, a posebice se zahvaljujem mag.biol.mol. Sonji Jaman na strpljenju, nesebičnoj pomoći i prenesenom znanju.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljicama i prijateljima koji su mi uvijek bili velika potpora, oslonac i ugodno društvo te su period mog studiranja učinili laganim, bezbrižnim i zabavnim.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i baki na bezuvjetnoj ljubavi i podršci, što su me usmjerili na pravi put, omogućili mi obrazovanje i oduvijek me učili kako se svaki trud isplati. Vi ste zaslužni za sva moja postignuća i ovaj rad posvećujem vama. Hvala Vam!

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Povijest HLA.....	1
1.2 Sustav HLA.....	3
1.2.1 HLA razred I.....	5
1.2.2 HLA razred II.....	7
1.3 Obilježja sustava HLA.....	8
1.4 Nomenklatura sustava HLA.....	10
1.5 Nasljeđivanje gena sustava HLA.....	11
1.6 Povezanost sustava HLA s bolestima.....	12
1.7 Migrena.....	14
1.7.1 Patofiziologija migrene.....	14
1.7.2 Genetička osnova u razvoju migrene.....	16
2. CILJ RADA.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1 Ispitanici.....	18
3.2 Materijali i metode kojima se određuju geni i aleli sustava HLA.....	18
3.2.1 Određivanje gena sustava HLA serološkom metodom.....	18
3.2.1.1 Izvođenje testa mikrolimfocitotoksičnosti.....	20
3.2.2 Određivanje gena sustava HLA molekularnom metodom.....	21
3.2.2.1 Izolacija DNA.....	21
3.2.2.2 PCR metoda.....	21
3.2.2.3 PCR–SSO metoda.....	22
3.2.2.4 PCR–SSP metoda.....	23
3.2.2.4.1 Izvođenje PCR–SSP testa.....	24
3.3 Postupak određivanja alela lokusa HLA–DRB1*.....	26
3.3.1 Izolacija DNA.....	26

3.3.2 Izvođenje PCR–SSO testa.....	27
3.4 Statistička obrada podataka.....	30
4. REZULTATI.....	31
5. RASPRAVA.....	38
6. ZAKLJUČAK.....	40
7. LITERATURA.....	41
8. SAŽETAK.....	43
9. SUMMARY.....	44
10. ŽIVOTOPIS.....	45



# 1. UVOD

## 1.1 Povijest HLA

Sustav HLA (humani leukocitni antigen) glavni je sustav tkivne podudarnosti. Otkriće HLA sustava seže u 1936. godinu kada je britanski liječnik Peter Gregor ispitivao uspješnost transplatacije tumora kod određenih sojeva miševa. Vrlo slično istraživanje provodio je i američki genetičar George Snell. Rezultati su pokazali da uspješnost transplatacije ovisi o malom broju lokusa koji čine sustav kojeg su nazvali H-2.

Za otkriće HLA sustava kod ljudi zaslužani su Jean Dausset, Rose Payne i Jon van Rood. Godine 1958. u svojim istraživanjima dolaze do otkrića do tada nepoznatih protutijela u serumima višerotkinja i politransfundiranih pacijenata. Rezultati njihovih ispitivanja postavili su temelj za daljnja istraživanja koja su u konačnici dovela do spoznaje da na ljudskim leukocitima postoji polimorfni sustav antigena. Zasluge za otkriće prvog antigena HLA sustava pripadaju Jeanu Daussetu koji je došao do zaključka kako različita antitijela u serumima pacijenata ukazuju na razlike u građi leukocitnih staničnih membrana. Prvi otkriveni antigen naziva MAC kako bi odao počast trima dobrovoljcima koji su bili dio njegovog eksperimenta. Kasnije se antigenu MAC naziv mijenja u HLA-A2. Na kraju svog istraživanja Jean Dausset iznosi mišljenje kako bi leukocitni antigeni mogli biti od velike važnosti pri transplantacijama tkiva, posebice koštane srži. Teza se u konačnici pokazala točnom. Važan su doprinos u otkriću HLA sustava donijeli Rose Payne i Jon van Rood koji su 1963. godine u serumima pacijenata otkrili dvije nove skupine leukocitnih antigena koje su nazvali 4a i 4b. Godinu dana kasnije Payne otkriva novi sustav kojeg naziva LA. (1)

Njihova su otkrića postavila temelje za daljnja istraživanja koja su ubrzo rezultirala otkrićem mnogih drugih antigena koja pripadaju ovom polimorfnom sustavu. Međunarodna je suradnja postala imeprativ kojim se omogućio brz, točan i precizan razvoj ove specifične grane medicine. Kako bi to bilo moguće osnovan je International Hystocompatibility Workshops (IHWS). To je uvelike olakšalo komunikaciju između znanstvenika, razmjenu reagensa, metoda i rezultata. Godine 1964. održan je prvi sastanak. Cilj mu je bio usporediti dotadašnja saznanja, tehnike i metode u otkrivanju HLA antigena. Drugi radni sastanak bio je pod vodstvom Jon van Rooda 1965. godine. Treći je sastanak održan 1967. godine. Svrha mu je bila genetska analiza do tada otkrivenih antigena. Korištene su različite tehnike i metode. Jedan od njih bio je i test

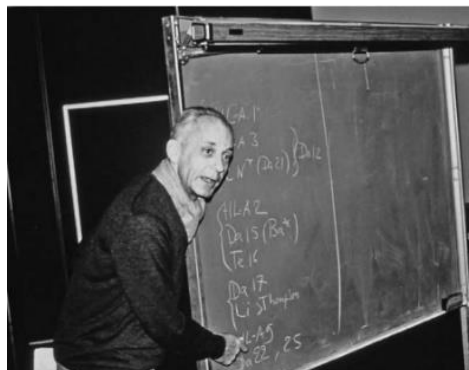
mikrolimfocitotoksičnosti koji su razvili Terasaki i McClelland. Spomenuti test kasnije postaje standardom za serološko dokazivanje antigena lokusa sustava HLA. Jedan od vežnijih rezultata tog sastanka svakako je bilo to što je prvi put ukazano na povezanost HLA antigena i razvoja određenih bolesti. Do danas je održano 18 takvih sastanaka, s tim da je posljednji bio u svibnju ove godine u Amsterdamu. Godine 1968. osniva se odbor za nomenklaturu zbog otkrića sve većeg broja antigena koji i dalje djeluje. (2,3)

Zahvaljujući brzom napretku i brojim otkrićima javlja se potreba za sastavljanjem registara u kojima bi bili pohranjeni podaci o HLA tipizaciji pacijenata.

Godine 1967. Jon van Rood iznosi ideju o osnivanju Eurotransplana koji bi djelovao kao neprofitna organizacija. U svibnju 1969. godine Eurotransplant je i pravno utemeljen. (3)

Govoreći o glavnom sustavu tkivne snošljivosti neizostavno je spomenuti Svjetski registar dobrovoljnih darivatelja krvotvornih matičnih stanica (BMDW) kamo spada i naš nacionalni registar osnovan 1996. godine u Zavodu za tipizaciju tkiva, Klinike za urologiju, KBC Rebro čiji je predstavnik bio akademik Andrija Kaštelan, a prva voditeljica doc.dr.sc. Esma Čečuk - Jeličić.

Danas preko Zaklade Ana Rukavina Hrvatska ima više od 61970 potencijalnih darivatelja te 150 transplatacija iz Hrvatskog registra. (3, 4)



**Slika 1.** Jean Dausset (preuzeto iz 1.)



**Slika 2.** Jon van Rood (preuzeto iz J. van Rood; Jon van Rood, FRCP: Senior Consultant Eurodonor Foundation)



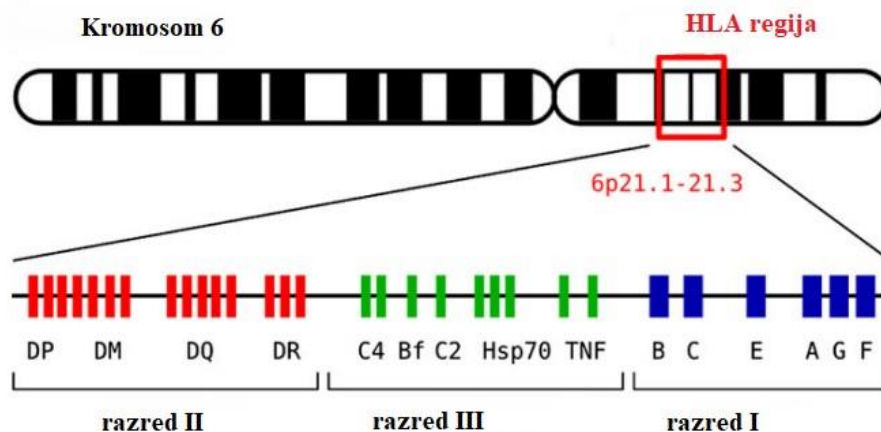
**Slika 3.** Rose Payne (preuzeto iz E. Thorsby; A short history of HLA)

## **1.2 Sustav HLA (Sustav humanog leukocitnog antigena)**

Sustav HLA (humani leukocitni antigeni) kratica je za glavni sustav tkivne snošljivosti kod čovjeka. Sustav HLA čini velik broj gena čija se značajna uloga očituje u imunološkoj reakciji, odnosno sudjeluju u obrani organizma od njemu stranih antigena koji mu mogu potencijalno naštetiti. (2)

Geni koji pripadaju sustavu HLA nalaze se na kraćem kraku kromosoma 6, na odsječku 6p21.2-21.3 i procjenjuje se da obuhvaćaju oko 4 milijuna baznih parova i dijele se u tri razred: razred I, razred II te razred III. (1)

Geni koji pripadaju razredu I telomerično su smješteni na kromosomu, geni razreda II centromerično, dok se geni razreda III nalaze između njih.

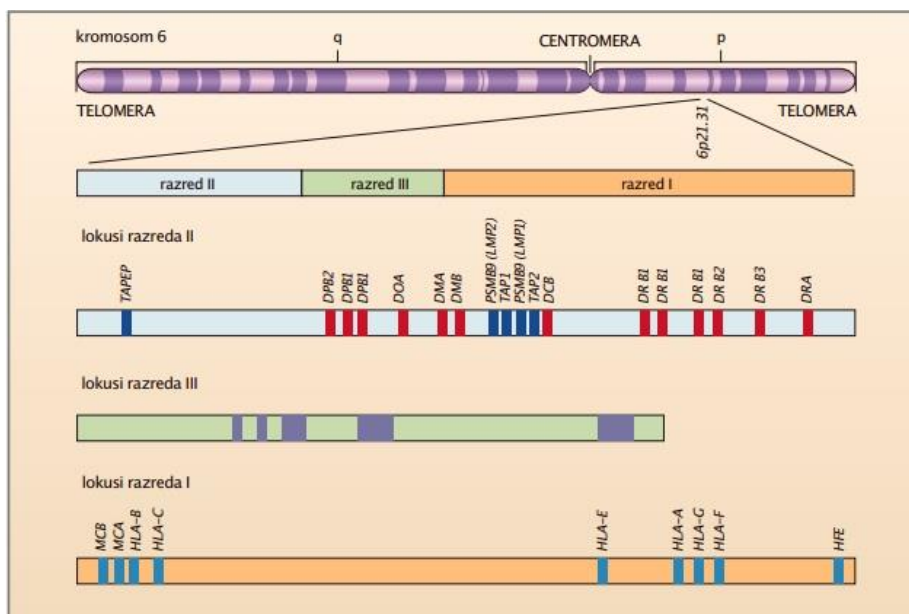


**Slika 4.** Prikaz položaja HLA regije na kromosomu 6 (preuzeto i prilagođeno iz Iwaszko M., Bogunia – Kubik K.; Clinical Significance of HLA – E and CD94/NKG2)

Geni razreda I i II sudjeluju u sintezi HLA antigena, a geni razreda III odgovorni su za sintezu komponenti komplementa, dakle ne sudjeluju u imunološkim reakcijama. (2, 3,18)

Sustav HLA zadužen je za obavljanje više zadataka stoga ima vrlo značajnu ulogu u normalnom funkcioniranju organizma. Jedna od najznačajnijih uloga sustava HLA svakako je kontrola imunološkog prepoznavanja stranih antigena. Nadalje, sudjeluje u kontroli sinteze tkivnih antigena, kontrolira proizvodnju specifičnih antitijela, nadzire interakcije među limfoidnim stanicama koje sudjeluju u imunološkoj reakciji usmjerenoj protiv stranog antigena. Važnu ulogu imaju u sazrijevanju limfocita T koja se odvija u timusu. Proces sazrijevanja uspješan je samo za one T limfocite koji razviju sposobnost prepoznavanja i razlikovanja vlastitih molekula sustava HLA procesom selekcije koja može biti pozitivna i negativna.

Somatskom rekombinacijom dolazi do stvaranja brojnih limfocitnih klonova koji se dijele u dvije grupe. Prvu skupinu klonova čine oni koji imaju receptore slabog afiniteta za vlastite HLA antigene, a drugoj skupini pripadaju oni limfocitni klonovi koji imaju jak afinitet receptora za svoje HLA antigene. Procesom pozitivne selekcije limfociti prve skupine opstaju, dok procesom negativne selekcije limfociti druge skupine bivaju uklonjeni. Taj je proces ključan za osiguravanje preživljavanja samo onih limfocita T koji su sposobni prepoznati i razlikovati tuđe HLA antigene od vlastitih. (2, 18)



**Slika 5.** Genska karta sustava HLA – shematski prikaz (Preuzeto iz 18.)

### 1.2.1 HLA razred I

Regija HLA razreda I nalazi se telomerično i čine ju dvije skupine gena: klasični i neklasični. Klasičnim genima HLA razreda I pripadaju geni HLA–A, -B, i –C, a njihovi su produkti to jest molekule razreda I, izražene na gotovo svim stanicama s jezgrom, uz rijetke iznimke. Skupinu neklasičnih gena HLA razreda I pripadaju geni HLA–E, -F i -G. Od klasičnih se gena razlikuju zbog značajno slabijeg polimorfizma, ograničene tkivne rasprostanjenosti njihovih molekula te specifične funkcije. Geni HLA–E imaju najmanji polimorfizam unutar ove skupine gena, sa samo 27 do sada poznatih alela. Njihove se molekule mogu pronaći na površini gotovo svih tkiva. Geni HLA–F imaju malo veći broj do sada otkrivenih alela (N=38), s tim da je ekspresija njihovih molekula usko ograničena na tkiva poput kože, slezene, jetre te mjehura. Najveći polimorfizam u skupini neklasičnih gena HLA razreda I pokazuju geni HLA–G (N=61) kao i najspecifičniju tkivnu ekspresiju molekula koja je uglavnom ograničena na stanice trofoblasta.

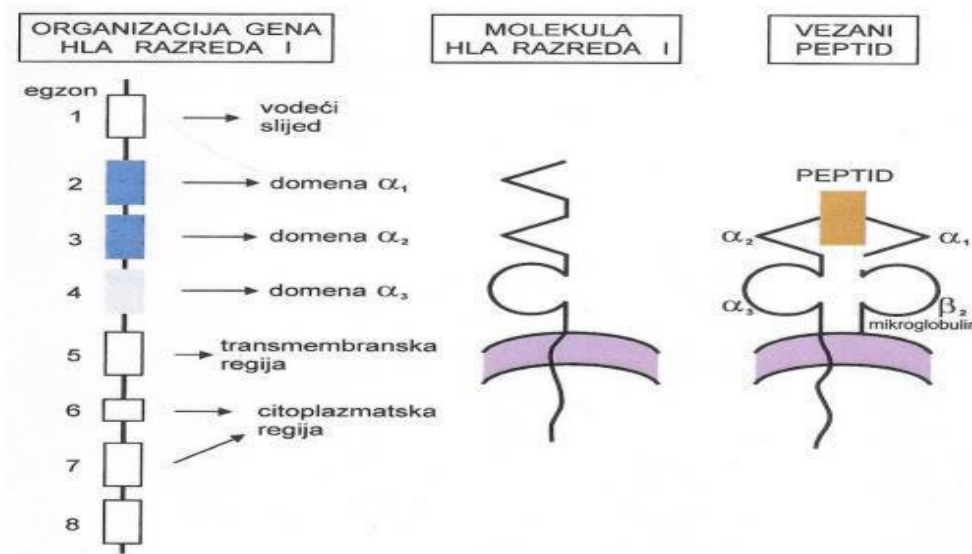
U regiji HLA razreda I smještena je porodica gena MIC (MHC class I – related chain) kao i pojedini pseudogeni koji se smatraju zasebnom podskupinom gena HLA razreda I. (2, 5)

Molekule HLA razreda I građene su od dva različita polipeptidna lanca, teškog i lakog. Teški lanac je  $\beta$ 2 mikroglobulin, a laki glikoprotein  $\alpha$ .

Laki lanac čini 350 aminokiselina, a podijeljen je na tri dijela: transmembranski, citoplazmatski te ekstracelularni koji ima tri domene ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  te  $\alpha_3$ ). Svaka od domena ekstracelularnog dijela sadržava oko 90 aminokiselina. Upravo su domene, odnosno raspored aminokiselina koje se nalaze u njima zaslužne za polimorfizam HLA sustava. Domene  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  čine pukotinu za koju se veže strani antigen te se time smatraju najvažnijim dijelom molekule. Domena  $\alpha_3$  reagira sa staničnim receptorima za limfocite T te djeluje kao vezno mjesto. (2, 5, 6)

Teški lanac,  $\beta_2$  mikroglobulin, kodira gene smještene na kromosomu 15. Može se pronaći u serumu i slobodan. Uloga mu je stabilizacija molekule. Ne djeluje kao antigen prezentirajuća molekula. Za  $\alpha$  se lanac veže nekovalentnim vezama. (2, 7)

Molekule koje čine HLA razred I predočavaju peptide između 9. i 11. aminokiseline. To su u najvećem broju tumorski i virusni antigeni. (8)



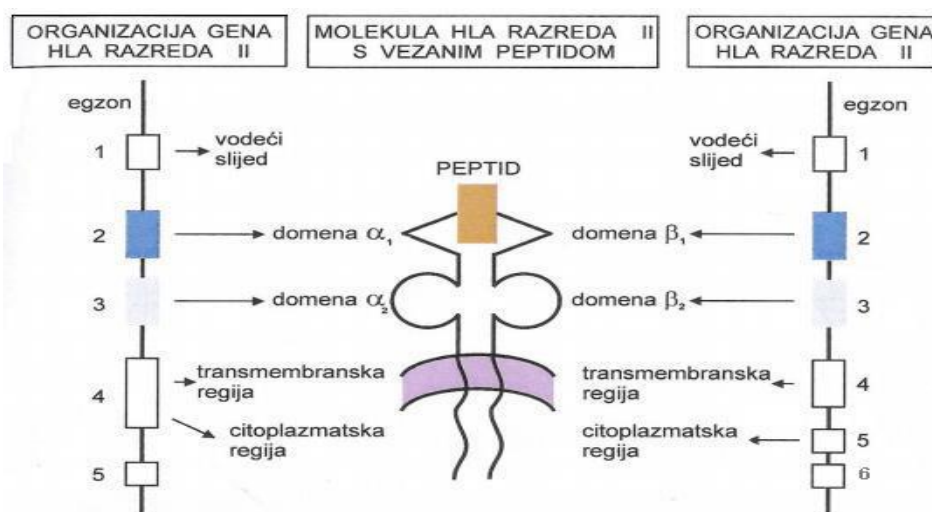
**Slika 6.** Organizacija egzona gena HLA razreda I i molekule HLA razreda – shematski prikaz (preuzeto iz 2.)

## 1.2.2 HLA razred II

Geni koji pripadaju HLA razredu II smješteni su centromerično na kraćem kraku kromosoma 6. Podijeljeni su na šest subregija: HLA-DM, HLA-DR, HLA-DO, HLA-DQ, HLA-DN i HLA-DP. Svaka od tih subregija sadržava molekule građane od dva gena, A i B, koji kodiraju sintezu  $\alpha$  i  $\beta$  lanaca. (3, 8)

Molekule koje čine HLA razred II nalaze se na antigen prezentirajućim stanicama poput B limfocita, dendritičnih stanica te makrofaga. Nadalje, nalaze se na pomoćničkim limfocitima T (CD34+) koji su zaslužni za stvaranje specifičnih antitijela na određene antigene. (2)

Molekule razreda HLA II građene su od dva polipeptidna lanca koja se vežu nekovalentnim vezama. Suprotno HLA razredu I, u HLA razredu II oba lanca kodiraju HLA molekule. Teški lanac ( $\alpha$ ) kodiraju geni A poput HLA-DRA1 te HLA-DPA1. Laki lanac ( $\beta$ ) kodiraju geni B kao što su HLA-DPB1 i HLA-DRB1. Kao i kod HLA razreda I, građa gena HLA razreda II može se podijeliti na transmembranski, citoplazmatski te ekstracelularni dio. Ekstracelularni dio sadržava četiri domene ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  i  $\beta_2$ ). Najpolimorfniji dio molekule sačinjavaju promjenjive  $\alpha_1$  i  $\beta_1$  domene koje tvore vanjsku pukotinu koja čini vezno mjesto za strane peptide.  $\alpha_2$  i  $\beta_2$  čine nepromjenjivo područje. Na  $\beta_2$  dio vežu se pomoćnički limfociti T. Kod molekula koje su dio HLA razreda I vezna pukotina nešto je šira, otvorenija te veže duže peptide nego li vezna pukotina u molekula HLA razreda II. (2, 3)



**Slika 7.** Organizacija gena i molekula HLA razreda II – shematski prikaz (preuzeto iz 2.)

Kada strani antigen uđe u tijelo, slijedi njegova fagocitoza do malih peptida. Istovremeno započinje sinteza molekula HLA koja se odvija u endoplazmatskom retikulumu. HLA molekule potom vežu nepoznati peptid i predočuju ga pomoćničkim T limfocitima. Limfociti T nadalje prepoznaju kompleks stvoren između HLA molekule i antigena te s time započinje imunološki odgovor koji potiče oslobađanje interleukina, kemokina i mnogih drugih citokina. Time je ostvarena glavna uloga molekula HLA razreda II, a to je egzogeni put predočavanja antigena. (3, 7)

### 1.3 Obilježja sustava HLA

Neka od temeljnih obilježja sustava HLA su polimorfizam, nepravila tkivna zastupljenost, pravilna segregacija, crossing-over, križna reaktivnost, rasna i populacijska specifičnost.

Sustav HLA smatra se jednim od najpolimorfnijih genskih sustava zbog velikog broja lokusa i velikog broja alela smještenih na tim lokusima. Broj otkrivenih alela u sustavu HLA stalno raste. Tako npr. iz tablice 1. vidimo raspodjelu novootkrivenih alela iz 2019. godine, a prema posljednjim podacima objavljenim u ožujku 2022. godine, broj otkrivenih alela dosegao je 33 490.

**Tablica 1.** Broj poznatih alela najpolimorfnijih gena HLA (baza IPD-IMGT/HLA, verzija 3.34; listopad, 2019. godine)

LOKUS	BROJ ALELA
HLA-A	5907
HLA-B	7126
HLA-C	5709
HLA-DRB1	3331
HLA-DQA1	229
HLA-DQB1	1795
HLA-DPA1	168
HLA-DPB1	1537
<b>Ukupno</b>	<b>25802</b>



Nije u potpunosti dokazano što je uzrok ovalikom polimorfizmu, ali postoje dva moguća objašnjenja. Prvim se razlogom smatra to da je taj sustav jednostavno bio brži i napredniji u razvoju od ostalih genskih sustava. Drugi razlog smatra kako je polimorfizam rezultat prirodne selekcije, to jest kako je polimorfizam nastao kao rezultat stvaranja alela HLA koji su bili otporni na različite uzročnike bolesti. Nekoliko mehanizama omogućuje polimorfizam. To su genska rekombinacija koja se događa između alela koji se nalaze na istom lokusu, genska konverzija kod koje dolazi do zamjene dijelova genskog materijala između dva različita gena i točkaste mutacije koje rezultiraju promjenama nukleotida. (2, 5)

Svaka jedinka u svom genotipu sadrži po dva haplotipa molekula HLA. Kao rezultat crossing-over-a može doći do promjena u haplotipovima, ali to se rijetko događa kod HLA gena. Razlog tome je taj što su lokusi HLA gena smješteni vrlo blizu, a učestalost crossing-over -a raste s povećanjem udaljenosti između lokusa.

Segregacija gena sustava HLA pravilna je te djeluje po Mendelovom zakonu, što znači da u pojedinoj populaciji postoji jednak broj pozitivnih i negativnih potomaka za određeni gen kroz generacije.

Genska neravnoteža udruživanja (linkage disequilibrium) jedno je od važnih obilježja HLA sustava. Označava pojavu kada se aleli dvaju ili više usko vezanih lokusa HLA gena javu u istom haplotipu više puta nego što se to očekuje.

Križna reaktivnost gena koji su dio HLA sustava podrazumijeva činjenicu kako HLA ima opću i privatnu specifičnost. To znači da imunizacija može izazvati reakciju imunskog sustava usmjerenu protiv antigena HLA koji je potaknuo imunološku reakciju, ali i protiv nekih drugih HLA antigena koji sadrže epitope iste ili slične opće specifičnosti kao i antigen HLA koji je uzrokovao imunizaciju. To je česta pojava među genima istih lokusa.

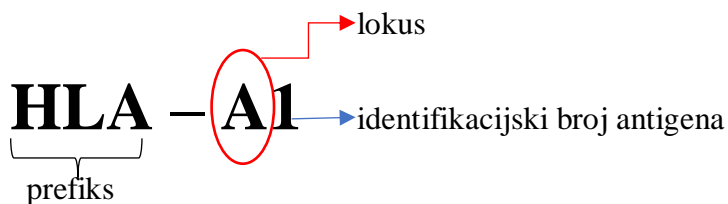
Važna karakteristika HLA sustava svakako je i nepravilna tkivna specifičnost, odnosno činjenica da se molekule HLA akumuliraju na limfatičkom tkivu, staničnim membranama stanica, tkiva i organa koji sudjeluju u imunološkoj reakciji. Suprotno tomu, zastupljenost HLA molekula u središnjem živčanom sustavu, masnom te mišićnom tkivu vrlo je mala. (2)

## 1.4 Nomenklatura sustava HLA

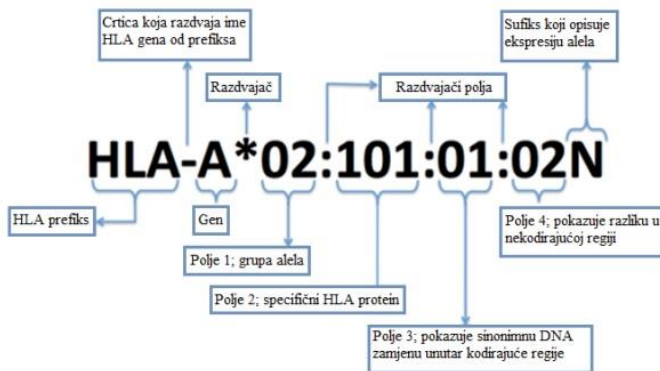
HLA sustav otkriven je 1958. godine, a na samim počecima znanstvenici nisu bili usuglašeni kod imenovanja gena i alela te su često identičnim genima nadjenuta različita imena. Da bi se izbjegli nesporazumi, 1968. godine osnovan je Odbor za nazivlje sustava HLA koji djeluje i danas. Odbor je odgovoran za davanje službenih imena genima i antigenima koji pripadaju HLA sustavu. (2)

Imenovanje gena i antigena sustava HLA vrlo je specifično. Naziv antigena dokazanih serološkom metodom sadrži oznaku lokusa (HLA-A, HLA-B, HLA-C) kao i identifikacijski broja antigena koji označava njegovu specifičnost. Taj se broj navodi prije dvotočke te ako je jednoznamenkast, piše se bez nule. (2, 3)

**Primjer 1.** Imenovanje antigena sustava HLA određenih serološkom metodom



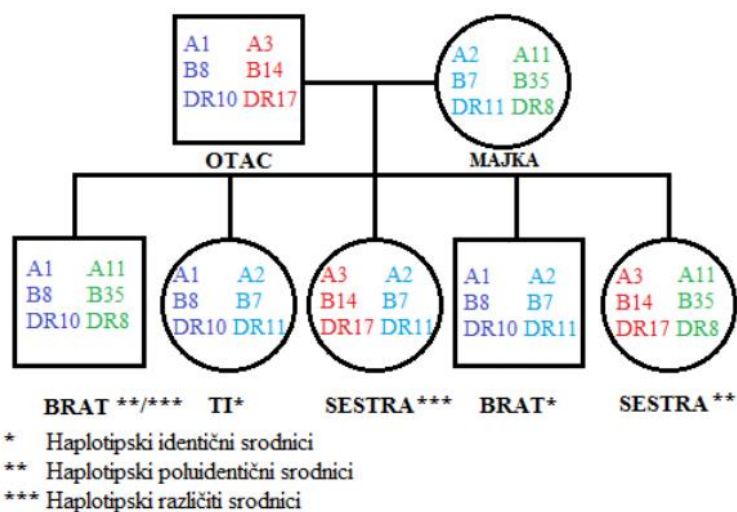
Imenovanje antigena koji se dokažu molekularno metodom kojom se određuje alel ponešto je drugačije. Svaki alel ima jedinstveni kod koji se sastoji od najmanje četiri seta brojeva odijeljena dvotočjem. Naziv gena sadrži oznaku lokusa kraj koje stoji oznaka \* koja odvaja identifikacijski broj alela. Sljedeći broj koji dolazi nakon dvotočke označava podtip gena, a određen je redom kojim je otkrivan slijed DNA. Nazivlje završava s još dva seta brojeva koji ukazuju na eventualno postojanje neke mutacije u genima HLA. Nije neobično da se na samom kraju imena nalazi jedno slovo koje obilježava ekspresiju alela tog gena. Slovo N označava alel bez ekspresije (nul alel), slovo L označava alel s niskom ekspresijom, slovo S označava alel koji se izlučio, slovo C označava alel koji se izluči unutar citoplazme, slovo Q označava alel s neodređenom ekspresijom te slovo A označava alel s nepravilnom ekspresijom. (2, 7, 9, 10)



**Primjer 2.** Imenovanje antigena sustava HLA određenih molekularnom metodom (preuzeto iz <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, 1. svibnja, 2022.)

### 1.5 Nasljeđivanja gena sustava HLA

Geni HLA sustava nasljeđuju se kodominantno, od oba roditelja i poštuju Mendelove zakone nasljeđivanja. Dakle, dijete nasljeđuje po jedan haplotip određenog gena od svakog roditelja. Ovisno o mogućoj kombinaciji nasljeđenih haplotipova u djece, razlikuju se tri ishoda. Braća i sestre mogu biti haplotipski identični ako su naslijedili iste haplotipove od jednog i drugog roditelja. Sljedeća je mogućnost da budu haplotipski poluidentični što bi značilo da su naslijedili samo jedan isti haplotip. Zadnja mogućnost, ujedno i najnepovoljnija, je ta da srodnici naslijede različite HLA haplotipove te da uopće ne dijele HLA materijal. (2)



**Slika 8.** Prikaz HLA haplotipova u obitelji

## 1.6 Povezanost sustava HLA s bolestima

Sustav HLA povezuje se s više bolesti nego li ijedan drugi genski sustav u genomu. Ta se povezanost pretežno odnosi na autoimune bolesti, ali ni neke druge skupine bolesti nisu iznimka. Povezanost sustava HLA i određene bolesti objašnjava se na principu da osobe koje nose gen povezan s tom bolesti imaju veću šansu da u budućnosti obole od te bolesti za razliku od osoba koje nisu nosioci tog gena. Međutim povezanost pojedinih gena HLA sustava i bolesti ne podrazumijeva da je ekspresija tog gena uzrokovala bolest. Veza između sustava HLA i bolesti vrlo je složena, a razlikuju se dva moguća objašnjenja. Prva mogućnost jest postojanje neravnoteže udruživanja među alelima određenog lokusa koji je odgovoran za nastajanje bolesti i pojedinog gena sustava HLA povezanog s tom bolesti. Drugo je objašnjenje da molekula HLA sama po sebi ima ulogu u nastanku bolesti djelovanjem po nekom od četiri različita modela. Prvi model objašnjava da molekula HLA slabo predočuje bakterijski ili virusni antigen. Prema drugom modelu molekula HLA smještena na površini stanice djeluje kao vezno mjesto za bakterijski ili virusni uzročnik bolesti. Treći model opisuje HLA molekulu kao molekulu koja omogućuje transport bakterijskoj ili virusnoj čestici u stanicu. Prema posljednjem, četvrtom, modelu molekularna podudarnost HLA molekule i nekog patogena uzrokuje to da stanice domaćina strani antigen ne prepoznaju kao patogen. Temeljna je pretpostavka da su u mehanizam nastanka bolesti povezanih sa sustavom HLA uključena sva četiri modela, samo u različitim omjerima ovisno o kojoj bolesti se radi. (2, 17)

**Tablica 2.** Bolesti povezane s HLA sustavom (preuzeto iz Gough i Simmonds, 2007; PPP Imunogenetika, Doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić, mag.biol.mol.)

Utjecaj HLA razreda II		AUTOIMUNA BOLEST	Utjecaj HLA razreda I	
Podložni	Zaštitni		Podložni	Zaštitni
		<b>Ankilozantni spondilitis</b>	B*27:02 B*27:30 B*27:04 B*27:05	B*27:06 B*27:09
DR3 DRB1*08	DR7	<b>Gravesova bolest</b>	C*07 B*08	C*16 C*03 B*44
DR4 DR3	DR7	<b>Hashimotov tiroiditis</b>		
DR3		<b>Mijastenija gravis</b>		
DR3		<b>Addisonova bolest</b>		
Zajednički epitopi DRB1*01:01 DRB1*01:02 DRB1*04:01 DRB1*04:04 DRB1*04:05 DRB1*04:08 DRB1*10:01 DRB1*14:02	DRB1*01:03 DRB1*07:01 DRB1*12:01 DRB1*13:01 DRB1*15:01	<b>Reumatoidni artritis</b>		
DQ2 DQ8		<b>Celijakija</b>		
DR15	DR14	<b>Multipla skleroza</b>	C*05 C*15	C*01
DR3 DR4 DQB1 pozicija β57	DR15 DR14	<b>Šećerna bolest tipa 1 (DMT1)</b>	B*39 B*18 A*24	A*01 A*11 A*31
DR3 DR8 DR15		<b>Sistemska lupus eritematodes</b>		

## 1.7 Migrena

Migrena je ponavljajuća, umjereno jaka do vrlo jaka glavobolja u trajanju između 4 i 72 sata u slučaju kada se ne liječi. Nerijetko je prati mučnina, povraćanje, preosjetljivost na svjetlo i zvuk. Obavljanjem fizičke aktivnosti jačina simptoma može se povećati. Naziv joj potječe od grčke riječi *hemikrania* što označava bol u jednom dijelu glave. Vrlo je rasprostranjena po cijelom svijetu, a pretpostavlja se da pođaga 1 milijardu ljudi. Migrena se najčešće javlja u dobi između 18 i 50 godina. Prevalencija kod žena iznosi 20.7%, a kod muškaraca 9.7%. Glavobolja se najčešće opisuje kao jednostrana, pulsirajuća te s dužim trajanjem. Bolesnici često doživljavaju simptome aure kao što su kratkotrajni poremećaji vida, govora, osjeta te motorike koji im ukazuju na to da će uskoro uslijediti glavobolja. U općoj populaciji migrena nije dovoljno prepoznata i istražena. Nerijetko pacijenti s migrenom dobiju pogrešnu dijagnozu, primjerice da boluju od tenzijske ili sinusne glavobolje. Veliki udio oboljelih nikada nije posjetio neurologa specijaliziranog za dijagnosticiranje i liječenje migrena. Postavljanje točne dijagnoze migrene ključno je u odabiru pravilne i djelotvorne terapije za pacijenta. (14, 15)



Slika 9. (preuzeto iz <https://www.plivazdravlje.hr/>, 22. lipnja, 2022.)

### 1.7.1 Patofiziologija migrene

Iako točan mehanizam nastajanja migrene nije upotpunosti otkriven, u posljednje vrijeme došlo je do velikog napretka kako u razumijevanju načina nastanka, tako i u otkriću uspješnijih terapija. Temeljeno na dosadašnjim spoznajama smatra se da je u slučaju migrene riječ o primarno neuralnoj disfunkciji koja uzrokuje sekundarne promjene u cerebralnoj perfuziji. Neurovaskularna teorija objašnjava da pacijent koji boluje od migrene kada nema glavobolje ima hiperekscitabilnost neurona moždane kore. Teorija kortikalne šireće depresije objašnjava

pojavu migrene s aurom, odnosno iz početne točke kreće širenje vala ekscitacije/depolarizacije određenom brzinom i tada nastupaju simptomi aure. Nakon toga dolazi do aktivacije trigeminalnog sustava što čini podlogu za početak glavobolje.

Kada se objašnjava patofiziologija migrene, neizostavan je neuropeptid CGRP (calcitonin gene-related peptide). Taj se neuropeptid izlučuje u moždanim ovojnica iz C-vlakana te se potom veže na trigemino-vaskularna vlakna, čime stimulira prijenos akutne boli. Drugi vrlo važan peptid u razvoju migrene je pituitarni peptid koji aktivira adelinat-ciklazu (PACAT). Više stvari, događaja i ponašanja može djelovati kao okidač za migrenu. Neki od tih su jak stres, hormonalne promjene kod žena, nesаница, alkohol, gladovanje, promjene vremena, određene namirnice, toplina te mirisi. Nerijetko se događa to da epizodične migrene prijeđu u kronične, a faktori koji to potiču su pretilost, loš san, prevelika konzumacija kofeinskih napitaka. Na ove čimbenike moguće je utjecati, međutim postoje brojni faktori na koje nije moguće preventivno utjecati kao što su ženski spol, ozljede glave, neučinkovito liječenje akutne migrene, niži socioekonomski uvjeti te psihijatrijske bolesti.

Postoje četiri faze kod razvoja migrene. Prva je prodromalna faza koja ima veliku prevalenciju kod oboljelih, prate je blagi simptomi koji se pojavljuju nekoliko sati do nekoliko dana prije nastupanja glavobolje. Pacijenti se u ovoj fazi žale na umor, ukočenost vrata, žeđ, često mokrenje, kognitivne poteškoće, proljeve ili opstipaciju. Sljedeća je faza aure koja objedinjuje cijeli skup neuroloških simptoma. Traje oko 60 minuta. Neki od simptoma su poremećaji vida, utrnulost, osjećaj težine u udovima. Zatim slijedi faza glavobolje koja se razvija tijekom 2 sata, a traje 4–72 sata. Posljednju fazu čine postdromalni simptomi poput osjećaja umora, opće slabosti te iscrpljenosti. Sve faze nisu uvijek prisutne kod svih pacijenata.

Novija istraživanja sve više upućuju na povezanost pojave migrene s genetskom komponentom.

(14)



**Slika 10.** (preuzeto iz <https://www.adiva.hr/zdravlje>)

### 1.7.2 Genetička osnova u razvoju migrene

Migrena je bolest koja ima jako složenu gensku pozadinu. Jedna od prve potvrde te tvrdnje bilo je otkriće genske osnove obiteljske hemiplegične migrene (familiar hemiplegic migraine, FHM), rijetkog nasljednog oblika migrene koji se naljeđuje autosomno–dominantno. Otkriveno je da svi geni koji se povezuju s tim tipom migrene kodiraju proteine koji reguliraju dostupnost neurotransmitera glutamata u sinaptičkim završetcima i time dolazi do pojačane podražljivosti. Razlikuju se tri tipa obiteljske hemiplagične migrene:

- FHM1 tip nastaje kao posljedica mutacije na genu CACNA1A koji je smješten na kromosomu 19p13.
- FHM2 tip uzrokuje mutacija na genu ATP1A2 koji se nalazi na kromosomu 1q23.
- FHM3 tip posljedica je mutacije na genu SCN1 smještenom na kromosomu 2q24.

Mutacije u sva tri gena dovode do slabe regulacije aktivnosti eksitacijskih neurona.

Do sada je otkriveno preko 12 lokusa koji se povezuju s povećanim rizikom za razvoj migrene.

Jedni od njih svakako su i lokusi alela unutar HLA sustava (HLA–DRB1, HLA–A, HLA–B, HLA–C). (14, 16, 24)

Postoji nekoliko čimbenika rizika povezanih s razvojem migrene. U nepromjenjive čimbenike spadaju genetika, dob i spol. Osoba kojoj jedan roditelj boluje od migrene ima vjerojatnost od 40% da će i sama oboljeti od migrene. Kod osoba kojima su oba roditelja obolje od migrene, vjerojatnost da će oni oboljeti iznosi 75%. Podjele prema spolu pokazuju kako žene u odrasloj dobi oboljevaju od migrene 3 puta više nego muškarci iste životne dobi. S druge strane, u predadolescentskoj dobi migrene su učestalije kod dječaka. Migrene počinju već u ranom djetinjstvu, ali vrhunac prevalencije postiže se u srednjim životnim godinama. Do smanjenja prevalencije dolazi kod osoba u starijoj životnoj dobi. (25)



## 2. CILJ RADA

Cilj je ovog rada odrediti zastupljenost pojedinih alela sustava HLA u pacijenata kojima je dijagnosticirana migrene i kod pacijenata oboljelih od jakih glavobolja na području Splitsko-dalmatinske županije.

Također, cilj rada bio je prikazati zastupljenost pojedinih alela DRB1 lokusa te izdvojiti gen koji se pokazao najpodložnijim, odnosno gen koji se s najvećom učestalošću pojavljuje kod ispitanika oboljelih od migrene i jakih glavobolja. U istraživanje je bilo uključeno 74 pacijenata koji boluju od migrene. Njihovi uzorci obrađeni su u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split. Uz utvrđivanje učestalosti i povezanosti alela sustava HLA i migrene, cilj nam je bio prikazati raspodjelu bolesti prema spolu kao i dobnim skupinama.

Povezanost migrene i gena sustava HLA potvrđena je molekularnim metodama.

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

#### **3.1 Ispitanici**

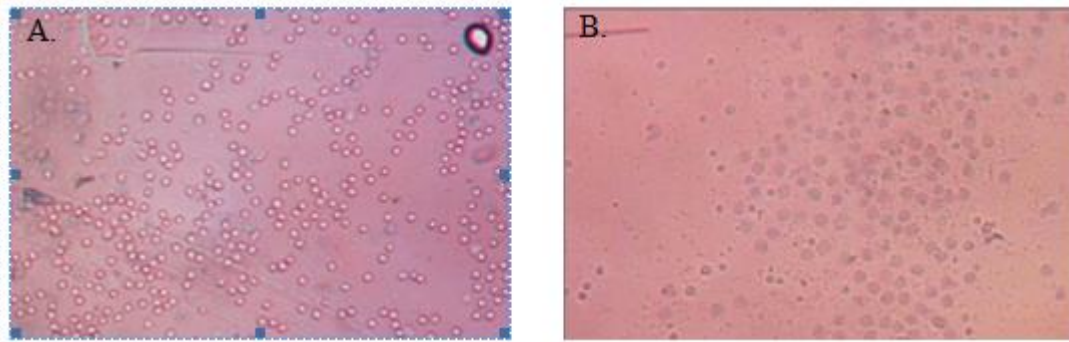
U ovom su istraživanju obuhvaćena 74 pacijenta s područja Splitsko–dalmatinske županije. Dijagnoza svih navedenih pacijenata bila je migrena ili jaka glavobolja. Svi ispitanici su pacijenti čija je tipizacija napravljena u rutinskom radu Laboratorija za tipizaciju tkiva, KBC Split kroz 2022. godinu.

#### **3.2 Materijali i metode kojima se određuju geni i aleli sustava HLA**

Metode određivanja gena sustava HLA su serološke i molekularne. Odabir metode najčešće ovisi i mogućnostima i potrebama laboratorija. (2)

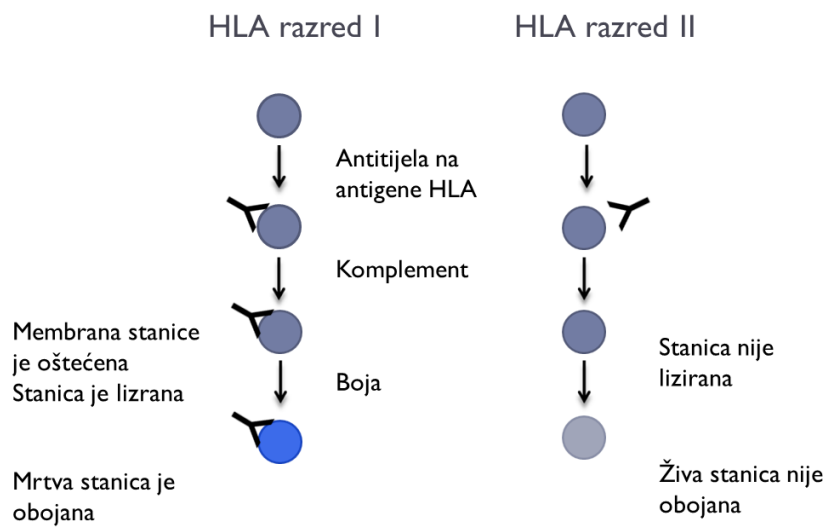
##### **3.2.1 Određivanje gena sustava HLA serološkom metodom**

Test mikrolimfocitotoksičnosti (MCLT, microlymphocitotoxicity test) standardna je metoda serološkog testiranja. Metoda je temeljena na reakciji poznatih poliklonskih antitijela koja se dobiju iz seruma imuniziranih višerotkinja ili monoklonskih antitijela koja se dobiju imuniziranjem miševa te antigena koji se nalaze na limfocitima pacijenta. Kada su antitijelo i antigen komplementarni, stvara se kompleks antigen–antitijelo. Ako pak nisu komplementarni, kompleks se ne stvara. Stvoreni kompleks antigen–antitijelo označava da je reakcija pozitivna, a nastali je kompleks potrebno vizualizirati. Vizualizaciju omogućava označavanje antitijela pomoću komplementa kunića. Taj se komplement veže za antitijelo u nastalom kompleksu antitijelo–antigen i uzrokuje oštećenje stanične membrane limfocita. Nakon toga se dodaje boja koja ulazi u liziranu stanicu, a rezultat je moguće vidjeti pod mikroskopom. Stanice se boje u plavo. Ako ne dolazi do obojenja, reakcija se smatra negativnom. (3, 11, 18)



**Slika 11.** Prikaz serološke tipizacije pod svjetlosnim mikroskopom (test mikrolimfocitotoksičnosti): a) negativna reakcija, b) pozitivna reakcija

(fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)



**Slika 12.** Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti (preuzeto iz 3.)

### 3.2.1.1 Izvođenje testa mikrolimfocitotoksičnosti

Za izvođenje testa mikrolimfocitotoksičnosti potreban uzorak jest periferna krv izvađena u epruvetu s heparinskim antikoagansom. Prvi korak je separacija limfocita iz pune krvi na gradijentu gustoće. Odvojenim se limfocitima određuje koncentracija pomoću Burker–Turkove komorice na način da se na komoricu dodaje pripravak od 5 uL suspenzije limfocita te 5uL tripanskog modrila nakon čega se stanice broje pod mikroskopom. Ovisno u rezultatu, limfociti se dodatno razrjeđuju ili centrifugiraju. Optimalne brojke za tipizaciju antigena sustava HLA su 5–6 obojenih stanica po kvadratiću, odnosno 10–12 neobojenih. Sljedeći je korak nanošenje uzorka na Terasakijeve pločice Hamilton mikrolitarskom špricom. Terasakijeve su pločice napravljene na način da se u svakoj jažici nalaze po jedno ili više antitijela s kojima će reagirati antigeni iz uzorka. Nakon toga slijedi inkubacija koja traje trideset minuta te se zatim u jažice dodaje kunićev komplement i ostavlja se na inkubaciji još sat vremena. Po završetku inkubacije uklanja se višak kunićevog komplementa protresanjem Terasakijeve pločice da se odstrani višak nevezanog komplementa te slijedi bojanje tripanskim modrilom. Tripansko modrilo difundira u mrtve stanice, a jažice sa zadovoljavajućim brojem obojenih mrtvih stanica označavaju pozitivnu reakciju te se upisuju u tipizacijski listić. Rezultat se vizualizira pomoću svjetlosnog mikroskopa. (2)

**Tablica 3.** Interpretacija rezultata testa mikrolimfocitotoksičnosti

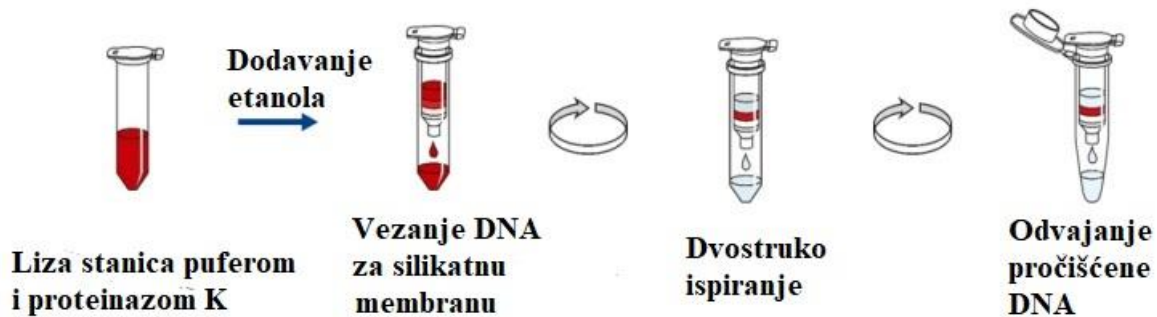
<b>Postotak mrtvih stanica</b>	<b>Rezultat</b>	<b>Interpretacija</b>
<b>0 - 10</b>	1	negativno
<b>11 - 20</b>	2	pozitivno/negativno (+)
<b>21 - 50</b>	4	slabo pozitivno (++)
<b>51 - 80</b>	6	pozitivno (+++)
<b>81 - 100</b>	8	jako pozitivno (++++)

### 3.2.2 Određivanje gena sustava HLA molekularnom metodom

Molekularna metoda za određivanje alela sustava HLA omogućuje da se aleli odrede većom rezolucijom nego što je to moguće serološkom metodom. Rezultati dobiveni molekularnom metodom pouzdaniji su i kasnije se koriste kod transplatacije krvotvornih matičnih stanica. Razlikuju se dvije metode za određivanje: PCR-SSO metoda te PCR–SSP metoda. Za izvođenje oba testa potreban uzorak je izolirana DNA molekula pacijenta. (2)

### 3.2.2.1 Izolacija DNA

Izolacija DNA prvi je korak u molekularnoj metodi određivanja alela sustava HLA. Uzorak iz kojeg se izdvaja DNA jest periferna krv izvađena u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Uzorku je potrebno dodati pufer za lizu stanica te proteinazu K koja će razgraditi proteinske molekule te će doći do oslobađanja DNA molekule koja je smještena u staničnoj jezgri. Nakon inkubacije uzorku se dodaje etanol, a potom ga je potrebno vorteksirati. Sljedeći je korak premiještanje uzorka u filter tubu. Tu se DNA zajedno sa nečistoćama veže za silikatnu membranu. Takvu je DNA potrebno ispirati puferima. Postupak se ponavlja dva puta. Posljednji je korak izolirati čistu DNA elucijskim puferom. (2)



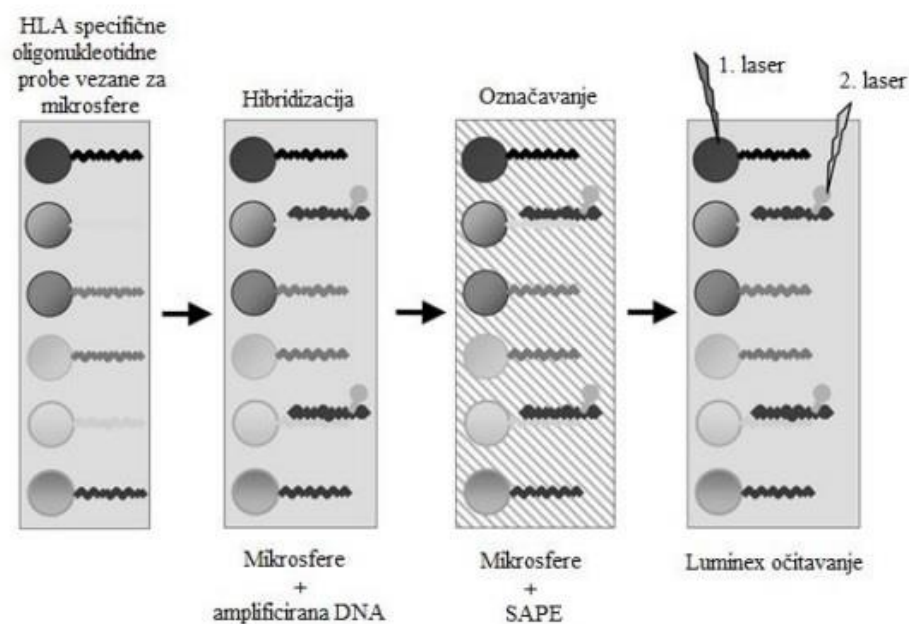
**Slika 13.** Izolacija DNA iz uzorka pune krvi (preuzeto i prilagođeno iz <https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qnzJ>)

### 3.2.2.2 PCR metoda

PCR ili Polymerase chain recation metoda je kojom se stvaraju mnogobrojne kopije određenog dijela DNA molekule. Proces se dijeli na tri koraka. Prvi je korak denaturacija lanca zagrijavanjem molekule na 94–96°C. Slijedi vezanje DNA početnica na teperaturi od 50–56°C. Posljednji je korak sinteza novog lanca na temperaturi od 72°C. (12)

### 3.2.2.3 PCR–SSO metoda (Polymerase chain reaction – Sequence Specific Oligonucleotids)

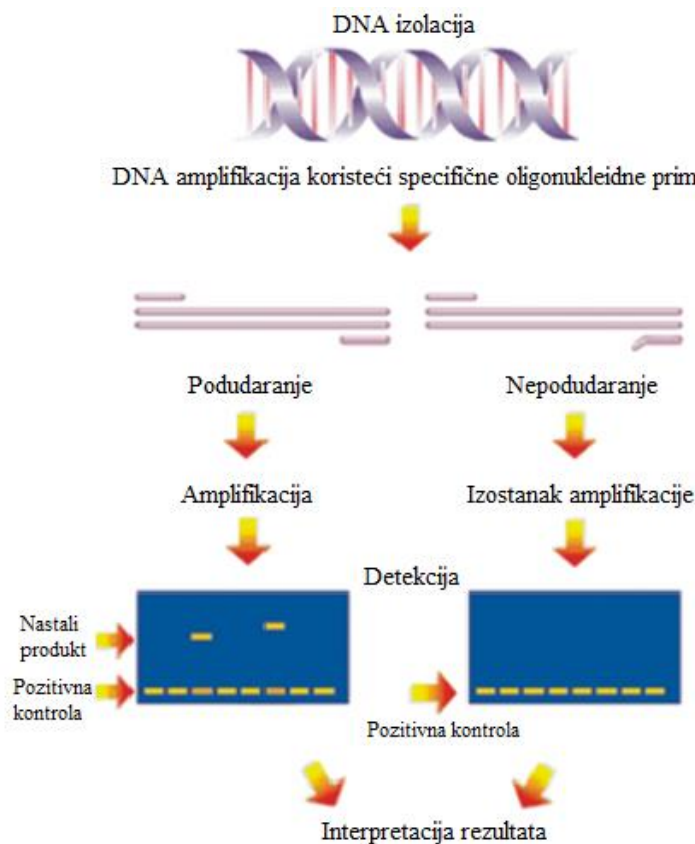
PCR–SSO metoda temeljena je na specifičnom vezanju između izolirane i PCR-om umnožene DNA molekule za mikrosfere na čijim se površinama nalaze oligonukleotidne probe. Oligonukleotidne su probe slijedovi DNA koji se bojaaju kombinacijom crvene i infracrvene boje, a služe za prikazivanje točno određenog HLA lokusa ukoliko je on prisutan u uzorku. Uređaj koji se koristi u PCR–SSO metodi je Luminex koji djeluje na principu protočne citometrije kojom dovodi mikrosfere do lasera, jednu po jednu. Uređaj koristi dva lasera kojima može identificirati određenu mikrosferu, a to radi na temelju različitih slijedova boja specifičnih za pojedinu mikrosferu. Prvi lasera služi za klasifikaciju mikrosfere i određivanja vezne probe, dok drugi kvantificira količinu vezane probe na pojedinoj mikrosferi. Rezultat se očitava pomoću softvera. (13)



**Slika 14.** Princip PCR–SSO metode (preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.omixon.com>)

### 3.2.2.4 PCR–SSP metoda (Polymerase chain reaction – Sequence Specific Primer)

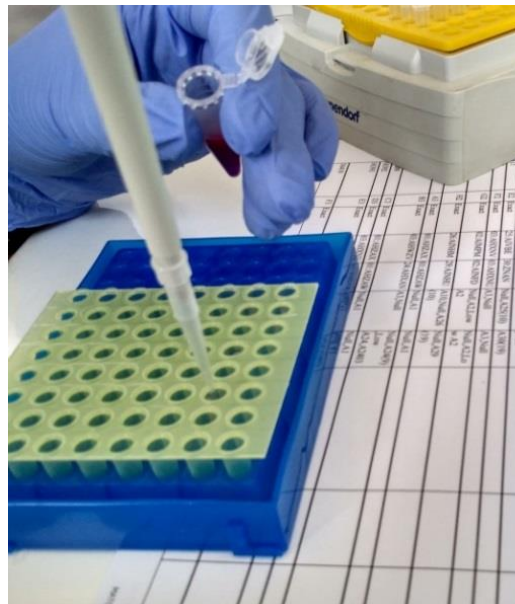
Temelj PCR–SSP metode je kompatibilnost oligonukleotidnih početnica s određenim alelima. Za razliku od PCR-SSO metode, PCR–SSP omogućava određivanje HLA alela u visokoj rezoluciji. Pozitivnim se rezultatom smatra pojava u kojoj dolazi do amplifikacije ciljane DNA molekule. Ako pak do amplifikacije ne dođe, to jest ako zadane početnice ne odgovaraju nukleotidnom slijedu, rezultat se smatra negativnim. U slučaju kada je reakcija pozitivna, amplificirane je produkte potrebno odvojiti gel elektroforezom. Rezultati se očitavaju na temelju brzine gibanja, a njihovu brzinu uvjetuje njihova duljina. (2)



**Slika 15.** Shema PCR – SSP metode (preuzeto iz 2.)

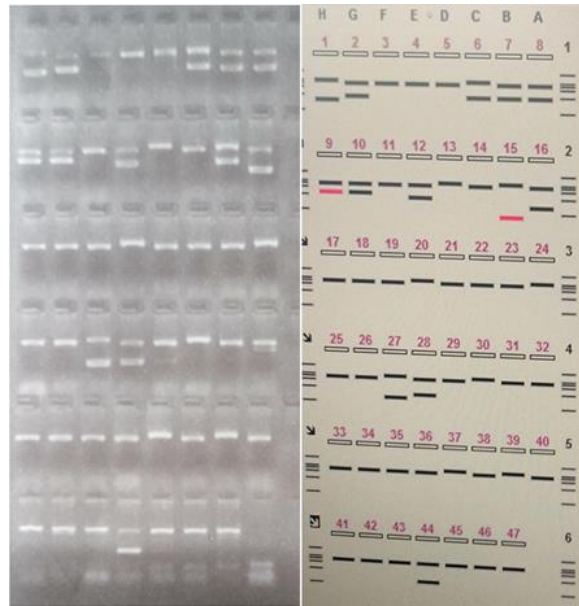
### 3.2.2.4.1 Izvođenje PCR – SSP testa

Kod izvođenja PCR- SSP testa prvi je korak priprema reakcijske mješavine koja sadrži Master MIX (reakcijski pufer specifičan za pojedini lokus), Taq polimerazu te destiliranu vodu. Tako se pripremljenoj mješavini dodaje izolirana DNA te se smjesa postavlja u uređaj Thermocycler u kojem će se odviti amplifikacija DNA. Nakon toga potrebno je produkt zajedno s bojom (etidijev bromid, SimplySafe) postaviti na gel elektroforezu. Nakon 15 minuta moguća je vizualizacija rezultata pomoću UV svjetla. Postojanje negativne kontrole je neizostavno jer ona služi za provjeru kontrole testa. Rezultati se očitavaju preko Helmborg SCORE programa, a temeljeni su na tome postoji li ili ne produkt na gelu. (2)



**Slika 16.** Postavljanje PCR–SSP testa (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)





**Slika 17.** Prikaz rezultata dobivenih na gelu (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)



**Slika 18.** Analiza rezultata PCR - SSP metode (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

### 3.3 Postupak određivanja alela lokusa HLA–DRB1\*

Za određivanje prisutnosti alela lokusa HLA–DRB1\* u ispitanika koristili smo molekularnu metodu PCR–SSO.

#### 3.3.1 Izolacija DNA

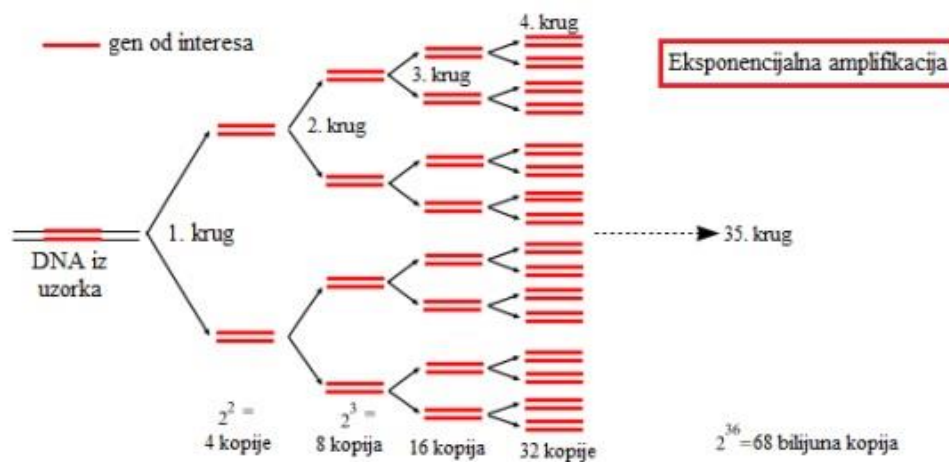
Prvi nam je korak bio izolacija DNA svakog ispitanika iz uzorka periferne krvi izvađene u epruvetu koja sadrži EDTA antikoagulans. Na samom početku potrebno je zagrijati parnu kupelj na temperaturu od 70°C u kojoj zagrijemo Elution Buffer. Sljedeći je korak dodavanje 200µl uzorka pune krvi, 200µl Binding Buffera te 40µl proteinaze K u tubicu za centrifugiranje volumena 1.5mL. Pripremljenu je smjesu potrebno vorteksirati te staviti na inkubaciju 10 minuta na temperaturu od 70°C. Nakon inkubacije u smjesu se dodaje 100µl izopropanola te se sve zajedno promiješa na vorteksu. Sljedeće je potrebno smjesu premjestiti u filter tubicu koju smo prije toga stavili u tubu za sakupljanje. Uzorak se centrifugira jednu minutu na 8000 okretaja, a potom je potrebno filter tubu premjestiti u novu tubu za sakupljanje. Nakon toga se u filter tubu dodaje 500µl Inhibitor Removal Buffera te se to ponovo centrifugira jednu minutu na 8000 okretaja. Nadalje se filter tubice premješta u novu tubu za sakupljanje, doda se 500µl Wash Buffera te se postavlja u centrifugu na jednu minutu i 8000 okretaja. Postupak ispiranja potrebno je ponoviti dva puta. Nakon centrifuge izbacujemo supernatant prikupljen u tubi za sakupljanje, a filter tubicu premještamo u novu tubu za sakupljanje. Filter tubici dodajemo 200µl zagrijanog Elution Buffera te ponovo centrifugiramo jednu minutu na 8000 okretaja. Zadnji korak izolacije DNA je odvajanje same pročišćene DNA od supernatanta. Tako se izolirana DNA pohranjuje u sterilnoj tubici volumena 1.5 mL na temperaturi od +4°C ili -20°C.



**Slika 19.** Komercijalni set za izolaciju genomske DNA (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

### 3.3.2 Izvođenje PCR–SSO testa

Sljedeći korak kod određivanja prisutnosti traženih alela jest izvođenje PCR–SSO testa, a uzorak je prethodno izolirana DNA pacijenta. Najprije je potrebno izoliranu DNA umnožiti pomoću PCR metode (Polymerase chain reaction). Reakcijska mješavina koja se radi za amplifikaciju mora odgovarati HLA lokusima koje ispituje. Reakcijska se smjesa sastoji od 0,6 $\mu$ l Master MIX-a odnosno reakcijskog pufera koji sadrži oligonukleotidne početnice (primer), 0,2 $\mu$ l Taq polimeraze i 8,8 $\mu$ l destilirane vode. Pripremljenoj reakcijskoj smjesi potrebno je dodati 5 $\mu$ l izolirane DNA te tu mješavinu staviti u Thermocycler gdje će se DNA amplificirati. Taq polimeraza tijekom procesa amplifikacije prepoznaje komplementarne dijelove DNA na koje se vežu oligonukleotidne početnice. Proces se ponavlja 30 puta i to rezultira brojem od 68 milijardi kopija DNA.



**Slika 20.** Shema - PCR reakcija (preuzeto iz: Andy Vierstraete, Principle of the PCR, 1999.)

Nakon uspješnog procesa amplifikacije DNA slijedi proces hibridizacije. Za hibridizaciju je potrebna smjesa koja sadrži 5 $\mu$ l PCR produkta i 15 $\mu$ l suspenzije mikrosfera. Hibridizacija je

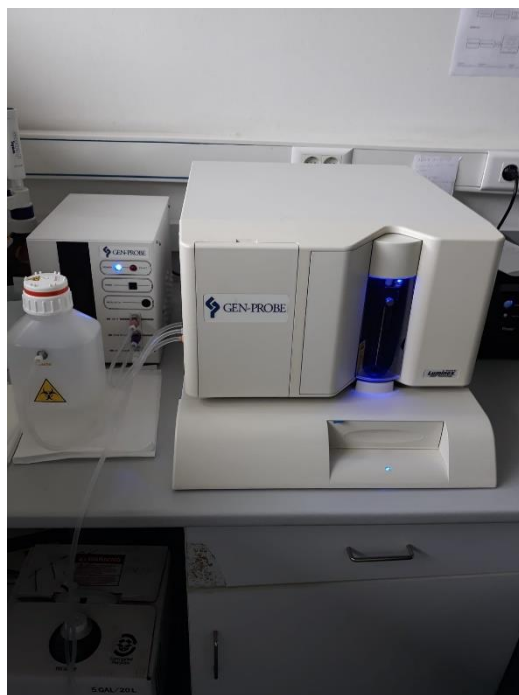
proces u kojem dolazi do vezanja između PCR produkta i specifičnih oligonukleotidnih proba koje se nalaze na mikrosferama. Za vizualiziranje nastalog kompleksa dodaje se 170 $\mu$ l fluorescentne boje za obilježavanje koja se pripremi od 170 $\mu$ l dilucijske otopine i 0.75 $\mu$ l streptavidina. Fluorescentna boja djeluje tako što se dijelom veže za biotin smješten na početnicama, a dijelom za nastali kompleks ako je došlo do njegovog stvaranja. Nakon toga potrebno je Cluster pločicu na kojoj se test izvodio staviti u Luminex aparat te očitati rezultat.



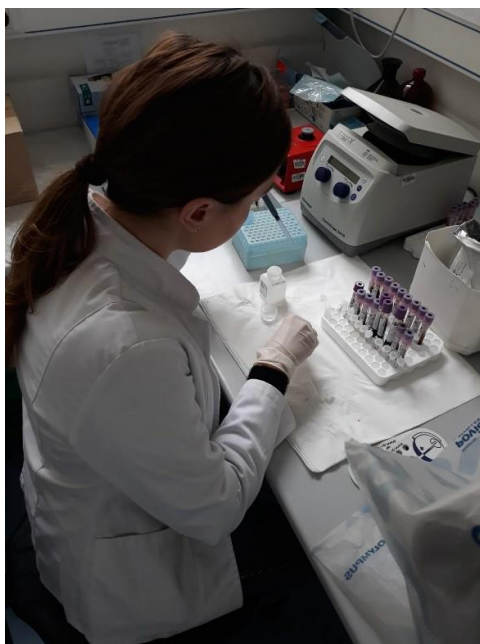
**Slika 21.** Shematski prikaz PCR-SSO testa



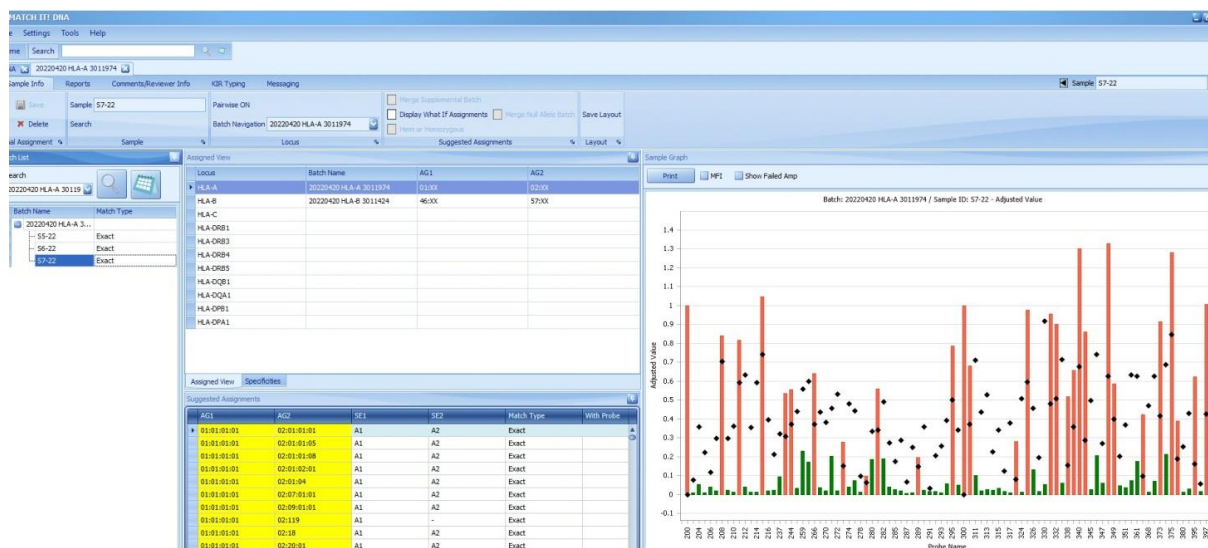
**Slika 22.** PCR-kabinet (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)



**Slika 23.** Uređaj Luminex (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)



**Slika 24.** Priprema uzoraka krvi ispitanika (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)



**Slika 25.** Analiza rezultata PCR-SSO metode u programu Match It DNA (fotografija snimljena u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

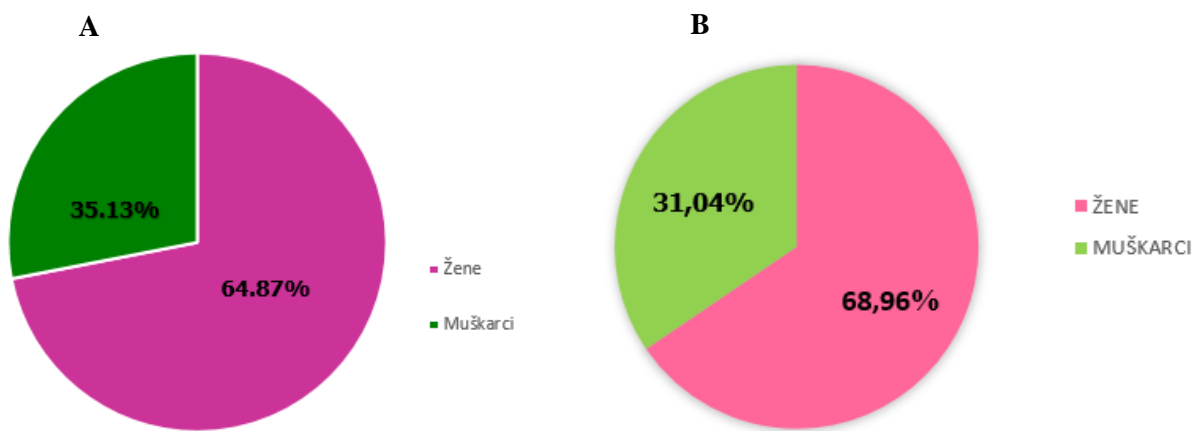
### 3.4 Statistička obrada podataka

Učestalost alela lokusa HLA-B i HLA-DRB1 sustava HLA utvrđena je izravnim brojanjem. Za usporedbu rezultata između ispitivane i kontrolne skupine korištena je 2x2 tablica. Za vrijednosti koje su bile manje od 5 upotrebljen je Fisher-ov egzaktni test koji statistički značajnim rezultatom smatra svaki kojemu je vrijednost  $P < 0,05$ . Podaci su statistički obrađeni pomoću on-line web programa VassarStats. (22)

## 4. REZULTATI

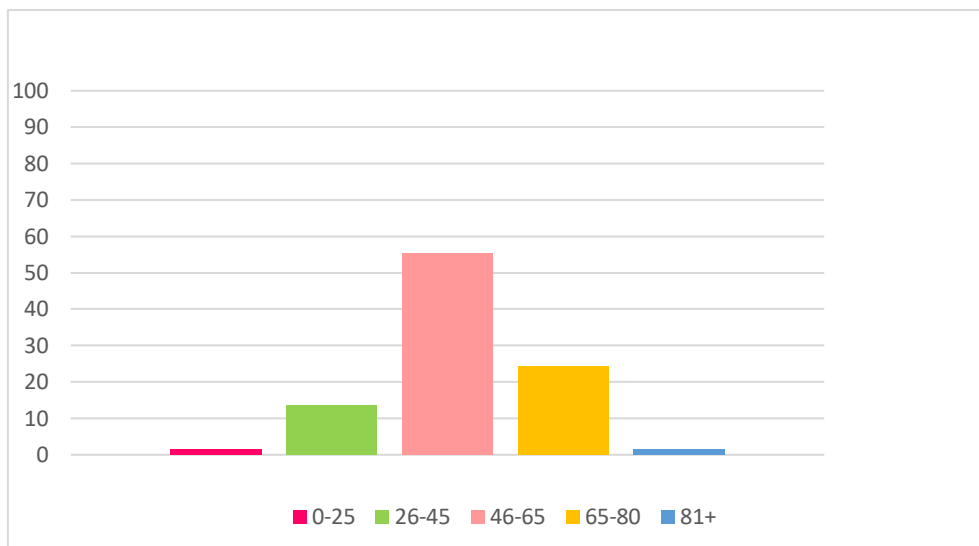
U istraživanju provedenom na 74 pacijenta koji su u Laboratorij za tipizaciju tkiva, KBC Split upućeni s dijagnozom migrene ili jake glavobolje, ispitano je je 48 žena (64.87%) i 26 muškaraca (35.13%) (Slika 26.).

Od 29 ispitanika kod kojih je utvrđen HLA–DRB1\*16, žena je bilo (68.96%) dok je muškaraca bilo 9 (31.04%). (Slika 26.)

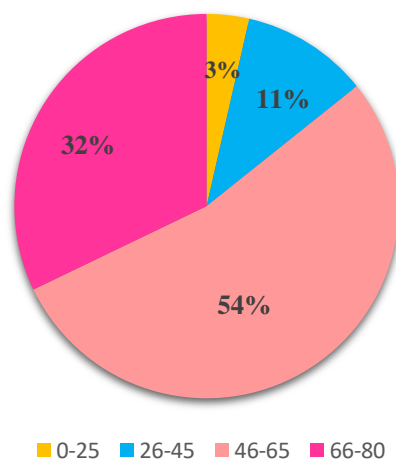


**Slika 26.** Grafički prikaz odnosa spolova u skupini ispitanika sa migrenom ili jakom glavoboljom (A); prikaz raspodjele spolova u skupini ispitanika kojima je utvrđen alel HLA-DRB1\*16 (B)

Podjela prema dobnim skupinama pokazala je kako osobe svih dobnih skupina obolijevaju od migrene, s tim da najveći udio pacijenata pripada srednjoj dobnjoj skupini, između 46 i 65 godina (55.40%) (Slika 27.). Taj podatak upućuje na to da se migrena najčešće javlja, ali i dijagnosticira upravo u toj životnoj dobi. Sukladno tomu, rezultati tipizacije pacijenata pokazali su kako najveći udio ispitanika koji posjeduju alel HLA–DRB1\*16 također pripada srednjoj dobnjoj skupini, između 46 i 65 godina života (Slika 28.).



**Slika 27.** Zastupljenost ispitanika sa migrenom ili jakom glavoboljom prema dobi



**Slika 28.** Zastupljenost alela HLA-DRB1 \*16 prema dobi ispitanika



**Tablica 4.** Tipizacija HLA-A, -B i -DRB1 alela ispitanika sa migrenom ili jakim glavoboljom

REDNI BROJ	PACIJENT	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB1	DOB	SPOL
1.	B.A.	*01, *02	*18, *52	*04, *15	1989.	Z
2.	B.M.	*02, *28	*27, *53	*13, *16	1958.	Z
3.	B.P.	*02, *23	*15, *18	*07, *13	1979.	M
4.	B.B.	*02, *32	*18, *40	*11, *16	1955.	Z
5.	B.M.	*02, *11	*15, *35	*07, *16	1962.	Z
6.	B.I.	*01, *32	*35, *51	*07, *12	1985.	Z
7.	B.M.	*02, *32	*27, *51	*13, *16	1974.	Z
8.	B.L.	*02, *28	*27, *51	*01, *04	1976.	Z
9.	B.L.	*02, -	*18, *38	*11, *16	1971.	M
10.	C.M.	*03, *24	*07, *51	*11, *15	1982.	Z
11.	Č.J.E.	*23, *26	*40, *44	*07, *15	1958.	Z
12.	Č.A.	*02, *03	*35, *44	*01, *07	1984.	Z
13.	Č.G.	*24, *28	*39, *44	*13, *15	1950.	Z
14.	Ć.R.	*11, *28	*08, *39	*03, *16	1954.	Z
15.	G.M.	*11, *24	*15, *39	*01, *04	1973.	Z
16.	G.J.	*02, *28	*35, *57	*04, *08	1974.	M
17.	J.R.J.	*02, -	*08, *51	*04, *16	1952.	Z
18.	J.K.	*02, *32	*07, *40	*10, *16	2001.	M
19.	K.N.	*02, *26	*18, *44	*01, *07	1953.	Z
20.	K.Ž.	*02, *03	*27, -	*03, *04	1953.	M
21.	K.K.	*02, -	*07, *44	*13, *15	1945.	Z
22.	K.D.	*02, *32	*39, *57	*15, *16	1973.	Z
23.	L.A.		*35, *39	*04, *16	1971.	Z
24.	L.B.	*02, -	*07, *39	*15, *16	1946.	M
25.	M.J.	*02, *32	*41, -	*08, *15	1957.	M
26.	M.M.	*32, -	*15, *35	*04, *11	1973.	Z
27.	M.I.	*01, *03	*57, -	*01, *07	1967.	Z
28.	M.D.	*26, *28	*18, *38	*13, *16	1963.	M
29.	P.I.	*02, *32	*18, *40	*14, *16	1989.	M
30.	P.T.	*02, *03	*18, *44	*04, *11	1948.	M
31.	P.M.	*02, -	*41, *51	*15, *16	1956.	Z
32.	P.Ž.	*02, *11	*07, *40	*01, *10	1969.	Z
33.	P.R.	*02, *03	*09, *14	*01, *16	1970.	Z
34.	S.Z.	*23, *32	*18, *51	*01, *16	1964.	Z
35.	S.I.	*02, *32	*35, *51	*11, *13	1956.	M
36.	S.N.	*11, *24	*39, -	*12, *16	1949.	Z
37.	S.A.	*11, -	*18, *39	*15, *16	1963.	Z
38.	V.M.	*01, *02	*27, -	*13, *15	1954.	Z
39.	V.A.	*02, *32	*15, *39	*14, *15	1971.	M
40.	V.D.	*02, *32	*15, *18	*01, *04	1963.	Z

41.	V.M.	*02, *26	*38, *57	*04, *16	1966.	Z
42.	V.A.	*02, *33	*14, *44	*01, *16	1965.	Z
43.	V.C.	*02, -	*44, *51	*02, *16	1954.	Z
44.	K.P.	*01, *26	*07, *35	*01, *04	1976.	M
45.	B.I.	*24, *32	*08, *35	*03, *16	1957.	M
46.	B.V.	*02, *31	*27, *41	*13, *16	1951.	Z
47.	M.N.	*01, *25	*07, *37	*13, *15	1970.	Z
48.	E.R.	*02, -	*44, *51	*01, *04	1958.	Z
49.	A.J.	*02, *03	*41, *44	*13, *16	1987.	Z
50.	D.D.	*24, *32	*07, *18	*04, *16	1963.	M
51.	K.J.	*02, *32	*44, *56	*11, *13	1948.	Z
52.	K.Ž.	*02, *03	*27, -	*01, *03	1951.	M
53.	Ć.I.	*01, *25	*18, *35	*04, *16	1972.	Z
54.	M.S.	*02, -	*51, *40	*11, *11	1974.	Z
55.	J.P.	*32, -	*15, *57	*13, *16	1972.	M
56.	V.L.	*02, *11	*13, *34	*07, *16	1996.	M
57.	M.T.	*25, -	*44, *56	*07, *10	1957.	Z
58.	B.E.	*02, *25	*35, *57	*01, *15	1961.	M
59.	K.D.	*02, *32	*39, *57	*08, *08	1954.	M
60.	R.T.	*01, *02	*15, *49	*04, *11	1973.	M
61.	M.S.	*02, *26	*18, *44	*01, *07	1972.	M
62.	V.R.	*02, *32	*08, *18	*03, *11	1963.	Z
63.	B.H.	*24, -	*18, *51	*07, *14	1960.	Z
64.	A.P.	*02, *26	*15, *51	*01, *07	1960.	M
65.	S.P.	*01, *32	*51, *57	*01, *07	1951.	Z
66.	B.U.	*01, *11	*08, *35	*01, *03	1952.	Z
67.	Č.A.	*24, *26	*35, *53	*13, *15	1986.	M
68.	M.K.	*24, *26	*38, *48	*11, *13	1957.	M
69.	B.V.	*01, *23	*08, *44	*03, *07	1950.	Z
70.	P.D.	*01, *02	*07, *08	*03, *11	1972.	Z
71.	Ž.L.	*02, *24	*35, *38	*01, *10	1941.	Z
72.	M.L.	*02, *32	*27, *51	*11, -	1958.	M
73.	S.J.	*01, *32	*08, *15	*03, *06	1987.	Z
74.	K.R.	*01, *32	*08, *57	*03, *16	1957.	Z

**Tablica 5.** Zastupljenost alela lokusa HLA–A u pacijenata oboljelih od migrene

<b>HLA-A alel</b>	<b>Zastupljenost kod ispitanika (N=74)</b>	<b>Učestalost alela</b>
*01	14	0,0760
*02	55	0,3716
*03	8	0,0540
*11	9	0,0608
*23	4	0,0270
*24	11	0,0743
*25	5	0,0337
*26	9	0,0608
*28	6	0,0405
*31	1	0,0067
*32	25	0,1689
*33	1	0,0067
<b>ukupan broj alela</b>	<b>148</b>	

U rezultatima našeg rada analizom alela lokusa HLA-A u skupini ispitanika sa migrenom ili jakim glavoboljama pronađeno je 12 različitih alela lokusa HLA-A, od kojih su najzastupljeniji alel HLA-A\*02 (37,16%) i HLA\*32 (16.89%) (Tablica 5.).

**Tablica 6.** Zastupljenost alela lokusa HLA-B u pacijenata oboljelih od migrene u usporedbi s kontrolnom skupinom

HLA-B alel	Zastupljenost kod ispitanika (N=74)	Učestalost alela	Zastupljenost kod kontrolne skupine (N=99)	Učestalost alela	p vrijednost
*07	9	0,0608	16	0,0808	0.3109
*08	9	0,0608	8	0,0404	0.2667
*09	1	0,0067	0	0	0.4277
*13	1	0,0067	1	0,0051	0.6732
*14	2	0,01351	6	0,0303	0.2574
*15	10	0,0675	6	0,0303	0.0853
*18	16	0,1081	14	0,0707	0.1515
*27	11	0,0743	13	0,0657	0.4567
*34	1	0,0067	0	0	0.4277
*35	14	0,0945	31	0,1566	0.0611
*37	1	0,0067	1	0,0051	0.6732
*38	5	0,3378	11	0,0556	0.2460
*39	11	0,0743	11	0,0556	0.3116
*40	6	0,0405	5	0,0253	0.3084
*41	5	0,0337	2	0,0101	0.1232
*44	14	0,0945	14	0,0707	0.2705
*45	0	0,0000	2	0,0101	0.3267
*47	0	0,0000	1	0,0051	0.5722
*48	1	0,0067	2	0,0101	0.6079
*49	1	0,0067	7	0,0354	0.0778
*50	0	0,0000	1	0,0051	0.5722
*51	15	0,1013	24	0,1212	0.3445
*52	1	0,0067	7	0,0354	0.0778
*53	2	0,0135	0	0	0.1822
*55	0	0,0000	1	0,0051	0.5722
*56	2	0,0135	7	0,0354	0.1798
<b>*57</b>	<b>10</b>	<b>0,0675</b>	<b>4</b>	<b>0,0202</b>	<b>0.0267*</b>
*58	0	0,0000	3	0,0152	0.1861
<b>Ukupan broj alela</b>	<b>148</b>		<b>198</b>		

\* statistički značajna razlika između skupine ispitanika i kontrolne skupine;  $p < 0,05$

Analizom alela lokusa HLA-B pronađeno je 23 različita alela, od kojih su se najzastupljenijim pokazali aleli HLA-B\*51 (10,13%), HLA-B\*18 (10,81%) i HLA-B\*35 (9,45%) (tablica 06.). Usporedbom sa kontrolnom skupinom zdravih ispitanika (dobrovoljni darivatelji krvi s područja Splitsko-dalmatinske županije) pokazano je kako je učestalost alela HLA-B\*57 statistički značajno povećana u skupini ispitanika sa migrenom ili jakom glavoboljom ( 6,75 % vs 2,02%;  $p = 0.0267$ ) (Tablica 6.).

**Tablica 7.** Zastupljenost alela lokusa HLA–DRB1 u pacijenata oboljelih od migrene u usporedbi s kontrolnom skupinom

HLA-DRB1 alel	Zastupljenost kod ispitanika (N=74)	Učestalost alela	Zastupljenost kod kontrolne skupine (N=99)	Učestalost alela	p vrijednost
*01	19	0,1284	21	0,1061	0.3167
*02	1	0,0068	0	0,0000	0.42774
*03	10	0,0676	16	0,0808	0.4023
*04	16	0,1081	23	0,1162	0.4776
*06	1	0,0068	0	0,0000	0.4277
*07	14	0,0946	17	0,0859	0.4607
*08	4	0,027	5	0,0253	0.5874
<b>*10</b>	<b>4</b>	<b>0,027</b>	<b>0</b>	<b>0,0000</b>	<b>0.0327*</b>
*11	15	0,1014	29	0,0303	0.1391
*12	2	0,0135	6	0,0303	0.2574
*13	15	0,1014	33	0,1667	0.0555
*14	3	0,0203	4	0,0202	0.6406
*15	15	0,1014	25	0,1263	0.2939
<b>*16</b>	<b>29</b>	<b>0,1959</b>	<b>19</b>	<b>0,0960</b>	<b>0,0063*</b>
<b>Ukupan broj alela</b>	<b>148</b>		<b>198</b>		

\* statistički značajna razlika između skupine ispitanika i kontrolne skupine;  $p < 0,05$

Određivanjem alela lokusa HLA-DRB1 u skupini ispitanika s migrenom, uočeno je 14 različitih alela, od kojih najveću zastupljenost imaju HLA-DRB1\*16 (19,59%) te HLA-DRB1\*11, -13, -15 s učestalosti od 10,14%. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, pokazalo se da je učestalost alela HLA-DRB1\*16 (19,59% vs 9,60%,  $p=0,0063$ ) i HLA-DRB1\*10 (2,7% vs 0%,  $p=0,0327$ ) statistički značajno povećana u skupini pacijenata s migrenom ili jakom glavoboljom (Tablica 7.).

## 5. RASPRAVA

Glavni cilj ovog rada bio je odrediti zastupljenost alela lokusa HLA-DRB1 sustava HLA u pacijenata sa dijagnozom migrene ili jakih glavobolja s područja Splitsko - dalmatinske županije te usporediti učestalosti utvrđenih HLA-DRB1 alela sa kontrolnom skupinom zdrave populacije dobrovoljnih darivatelja krvi s područja Splitsko-dalmatinske županije.

Obzirom da se pri obradi pacijenata u Laboratoriju za tipizaciju tkiva u dijagnostičke svrhe rutinski određuju aleli lokusa HLA-A, -B i -DRB1, pri obradi pacijenta sa migrenom i jakom glavoboljom, uzeti su u obzir i podaci o učestalostima HLA-A i -B lokusa pacijenata, odnosno proširenje studija na više lokusa s ciljem da se utvrdi postoji li povezanost navedenih lokusa s pojavnošću migrene ili jake glavobolje.

Analizom alela lokusa HLA-A u skupini ispitanika sa migrenom ili jakim glavoboljama pronađeno je 12 različitih alela lokusa HLA-A, od kojih su najzastupljeniji aleli HLA-A\*02 (37,16%) i HLA\*32 (16,89%). Ovaj rezultat je očekivan obzirom da su navedeni aleli jedni od najučestalijih u Hrvatskoj, a i u europskim populacijama. (19, 20)

Promatrajući učestalost alela lokusa HLA-B pronađena su 23 različita alela, od kojih su se najzastupljenijim pokazali aleli HLA-B\*51 (10,13%), HLA-B\*18 (10,81%) i HLA-B\*35 (9,45%), što odgovara učestalosti navedenih alela u hrvatskoj populaciji. (19)

Usporedbom sa kontrolnom skupinom zdravih ispitanika (dobrovoljni darivatelji krvi s područja Splitsko - dalmatinske županije) pokazano je da je učestalost alela HLA-B\*57 statistički značajno povećana u skupini ispitanika sa migrenom ili jakom glavoboljom (6,75 % vs 2,02%;  $p = 0.0267$ ).

Prethodna istraživanja o povezanosti HLA-B\*57 alela s autoimunim bolestima u velikom broju ukazuju na značajnu povezanost HLA-B\*57 sa psorijazom i psorijatičnim artritisom, no u istraživanjima vezanim uz migrenu navedena asocijacija do sada nije pronađena. (21)

Određivanjem alela lokusa HLA-DRB1 u skupini ispitanika s migrenom, uočeno je 14 različitih alela, od kojih najveću zastupljenost imaju HLA-DRB1\*16 (19,59%) te HLA-DRB1\*11, -13, -15 s učestalosti od 10,14%. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, utvrđeno je da je učestalost

alela HLA-DRB1\*16 (19,59% vs 9,60%,  $p=0,0063$ ) i HLA-DRB1\*10 (2,7% vs 0%,  $p=0,0327$ ) statistički značajno povećana u skupini pacijenata s migrenom ili jakim glavoboljom.

Pretraživajući on-line platformu PubMed na temu asocijacije migrene i alela lokusa HLA-DRB1, pronašla sam istraživanja u kojima su uočene povezanosti alela HLA-DRB1 \*16 u talijanskoj populaciji gdje je navedeni alel imao značajno veću zastupljenost kod pacijenata oboljelih od migrene ( $p=0.02$ ), dok je u tajvanskoj populaciji pronađena značajna povezanost HLA-B \*39, HLA-B \*51, HLA-B \*58 i HLA-C \*03. (23, 26)

## 6. ZAKLJUČAK

Sustav HLA je najsloženiji genetski sustav kod čovjeka. Između ostalog, osobitosti ovog sustava su izraziti polimorfizam kao i povezanost ovog sustava s bolestima.

Istraživanja učestalosti alela lokusa DRB1\* sustava HLA i migrene te jakih glavobolja pokazala je značajniju učestalost alela HLA-DRB1\*16 u ispitanika Splitsko-dalmatinske županije koji su upućivani u Laboratorij za tipizaciju tkiva, KBC Split u odnosu na kontrolnu skupinu zdrave populacije dobrovoljnih darivatelja krvi s područja Splitsko-dalmatinske županije.

Uspoređujući naše rezultate alela HLA-DRB1\*16 s ostalim populacijama (Italija, Francuska, Njemačka) utvrdili smo da se naši rezultati poklapaju s rezultatima grupe talijanskih istraživača.

Kod ispitanika s migrenom i jakim glavoboljama koji su imali HLA-DRB1\*16, zastupljenost spolova pokazuje da je znatno veći postotak oboljelih žena (68.96%) nego muškarca (31.04%).

Najveći broj ispitanika je bio u dobnoj skupini od 46 do 65 godina.

Budući da su našim ispitanicima u dijagnostičke svrhe određivani i aleli lokusa HLA razreda I (HLA-A, HLA-B) prilikom analize uočena je statistički značajna povezanost alela HLA-B\*57 kod pacijenata s migrenom i jakim glavoboljama s obzirom na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

Da bismo sa sigurnošću govorili o povezanosti migrene i jakih glavobolja i alela HLA-DRB1\*16 i ostalih alela lokusa sustava HLA (HLA-A, HLA-B) svakako je potrebno proširiti studiju na veći broj ispitanika.



## 7. LITERATURA

1. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*. 10 July 2009. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x.
2. Čečuk – Jeličić E, Jaman S, *Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti (skripta)*. Split, 2019. (in press)
3. Crnić – Martinović M, *Osnove glavnog sustava tkivne snišljivosti u čovjeka (predavanje)*. Rijeka, 2005.
4. <https://zaklada-ana-rukavina.hr/>
5. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Lukinović – Škudar V. i sur. *Imunologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2010.
6. Marsh SGE, Parham P, Barber LD. *The HLA: Facts Book*. Elsevier Science, 2000.
7. Kallon D. *Histocompatibility & Immunogenetics*. 2011.
8. Tumer G, Simpson B, Roberts TK. *Genetics, Human Major Histocompatibility Complex (MHC)*.
9. Hurely CK. Naming HLA diversity: A review of HLA nomenclature. 2020 May 8. DOI: 10.1016/j.humimm.2020.03.005.
10. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernandez – Vina M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maires M, Mayr WR, Muller CR, Parhm P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. 2010 April. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x
11. Moalic V, Ferec C. HLA typing, analysis methods, and clinical applications. 2005 September. DOI: 10.1016/s0755-4982(05)84126-0.
12. Ramesh R, Munshi A, Panda SK. Polymerase chain reaction. May-June 1992.
13. Madden K, Chabot-Richards D. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory. 2019 February. DOI: 10.1007/s00428-018-2501-3.
14. Bašič Kes V, Demarin V. *Migrena*. Medicinska naklada; Zagreb, 2022.
15. Burch R. *Migraine and Tension-Type Headache: Diagnosis and Treatment*. 2019 March. DOI: 10.1016/j.mcna.2018.10.003.
16. Charles A. The pathophysiology of migraine: implications for clinical management. 2018 February. DOI: 10.1016/S1474-4422(17)30435-0.
17. Ghodke Y, Joshi K, Chopra A, Patwardhan B. HLA and disease. 2005. DOI: 10.1007/s10654-005-5081-x.

18. Žunec R, Grubić Z, Balen S, 2011. Važnost imunogenetike u transplantaciji organa.
19. Grubić Z, Žunec R, Čečuk – Jeličić E, Kehrin – Brkljačić V, Kaštelan A: Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. 2000 February 27. DOI: 10.1046/j.1365-2370.2000.00193.x.
20. <http://www.allelefreqencies.net/>
21. De Freire Cassia F, Fernandes Cardoso J, Cristovao Porto L, Ramos-e-Silva M, Carneiro S. Association of HLA Alleles and HLA Haplotypes with Psoriasis, Psoriatic Arthritis and Disease Severity in a Miscegenated Population. 2021 May 10. DOI: 10.2147/PTT.S258050
22. <http://vassarstats.net/>
23. Rainero I, Dall'Omo A M, Rubino E, Valfrè W, Fasano M E, Rivoiro C, Brancatello F, Lidia Savi, Gallone S, Pinessi L. HLA-DRB1 genotyping in Italian migraine patients. 2006 Jan 30. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.08.071
24. Ebahimzadeh K, Gholipour M, Samadian M, Taheri M, Ghafouri-Fard S. A Comprehensive Review on the Role of Genetic Factors in the Pathogenesis of Migraine. 30 December 2020. DOI: 10.1007/s12031-020-01788-1
25. Peters G L. Migraine overview and summary of current and emerging treatment options. 2019 January.
26. Huang C, Chen S P, Huang Y H, Chen H Y, Wang Y F, Lee M H, Wang S J. HLA class I alleles are associated with clinic-based migraine and increased risk of chronic migraine and medication overuse. 2020. DOI: 10.1177/0333102420902228

## 8. SAŽETAK

Sustav HLA najstroženiji je genetski sustav kod čovjeka. Između ostalog, osobitosti ovog sustava su izraziti polimorfizam, kao i povezanost ovog sustava s bolestima, što je od izrazite važnosti u dijagnostici autoimunih bolesti kao i neuroloških oboljenja. Migrena je ponavljajuća, umjereno jaka do vrlo jaka glavobolja u trajanju između 4 i 72 sata u slučaju kada se ne liječi. Postoji nekoliko čimbenika rizika povezanih s razvojem migrene. U nepromjenjive čimbenike spadaju genetika, dob i spol.

Cilj je ovog rada odrediti zastupljenost alela sustava HLA u pacijenata kojima je dijagnosticirana migrena i kod pacijenata koji pate od jakih glavobolja na području Splitsko-dalmatinske županije kao i prikazati zastupljenost pojedinih alela lokusa HLA - DRB1\*. Kod ispitanika s migrenom i jakim glavoboljama koji su imali HLA-DRB1\*16, zastupljenost spolova pokazuje da je znatno veći postotak oboljelih kod žena (68.96%) u odnosu na muškarce (31.04%). Najveći broj ispitanika je bio u dobnoj skupini od 46 do 65 godina.

Antigeni i aleli sustava HLA za potrebe ove studije određeni su serološkim i molekularnim metodama. Antigeni sustava HLA određuju se testom mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT), dok su za molekularno određivanje alela lokusa sustava HLA korištene metode PCR-SSO i PCR-SSP.

Određivanjem alela lokusa HLA-DRB1 u skupini ispitanika s migrenom, uočeno je 14 različitih alela, od kojih najveću zastupljenost imaju HLA-DRB1\*16 (19,59%) te HLA-DRB1\*11,-13,-15 s učestalosti od 10,14%. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, utvrđeno je da je učestalost alela HLA-DRB1\*16 (19,59% vs 9,60%,  $p=0,0063$ ) i HLA-DRB1\*10 (2,7% vs 0%,  $p=0,0327$ ) statistički značajno povećana u skupini pacijenata koji boluju od migrene ili jake glavobolje.

Budući da su našim ispitanicima u dijagnostičke svrhe određivani i aleli lokusa HLA razreda I (HLA-A, HLA-B) prilikom analize uočena je statistički značajna povezanost alela HLA-B\*57 kod pacijenata s migrenom i jakim glavoboljama u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

Da bismo sa sigurnošću govorili o povezanosti migrene i jakih glavobolja i alela HLA-DRB1\*16 i ostalih alela lokusa sustava HLA (HLA-A, HLA-B) svakako je potrebno proširiti studiju na veći broj ispitanika.

## 9. SUMMARY

The HLA system is the most complex genetic system in humans. Among other things, the peculiarities of this system are its pronounced polymorphism, as well as the connection of this system with diseases, which is of great importance in the diagnosis of autoimmune diseases as well as neurological diseases. Migraine is a recurrent, moderately severe to very severe headache lasting between 4 and 72 hours if left untreated. There are several risk factors associated with developing migraines. Immutable factors include genetics, age and gender.

The objective of this work was to determine the representation of alleles of the HLA system in patients suffering from migraines and severe headaches in the Split-Dalmatia County, as well as to show the representation of individual alleles of the HLA locus - DRB1\*.

In subjects with migraine and severe headaches who had HLA-DRB1\*16, the representation of genders shows that the percentage of patients is significantly higher in women (68.96%) compared to men (31.04%). The largest number of respondents was in the age group of 46 to 65 years.

Antigens and alleles of the HLA system for the purposes of this study were determined by serological and molecular methods. Antigens of the HLA system are determined by the microlymphocytotoxicity test (MLCT), while the PCR-SSO and PCR-SSP were used for the molecular determination of alleles of the HLA system locus. .

By determining the alleles of the HLA-DRB1 locus in the group of subjects with migraine, 14 different alleles were observed, of which the highest prevalence is HLA-DRB1\*16 (19.59%) and HLA-DRB1\*11,-13,-15 with a frequency of 10, 14%. Compared to the control group, the frequency of alleles HLA-DRB1\*16 (19.59% vs 9.60%,  $p=0.0063$ ) and HLA-DRB1\*10 (2.7% vs 0%,  $p=0.0327$ ) statistically significantly increased in the group of patients with migraine or severe headache.

Since alleles of the HLA class I locus (HLA-A, HLA-B) were also determined for diagnostic purposes in our subjects, the analysis revealed a statistically significant association of the HLA-B\*57 allele in patients with migraine and severe headaches compared to the healthy control group examinee.

In order to talk with certainty about the connection between migraine and severe headaches and the HLA-DRB1\*16 allele and other alleles of the HLA system locus (HLA-A, HLA-B), it is certainly necessary to expand the study to a larger number of subjects.

## 10. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime i prezime: Tina Bitunjac

Datum rođenja: 31.07.2000.

Mjesto rođenja: Sinj, Hrvatska

E-mail adresa: tinabitunjac@gmail.com

### Obrazovanje

2007. – 2015. Osnovna škola Kamešnica, Otok

2015. – 2019. Opća gimnazija Dinka Šimunovića u Sinju, Sinj

2019. – 2022. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split

Smjer: Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### Strani jezici

Engleski jezik