Važnost sustava HLA u reumatologiji

Žuvela, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:901610

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lucija Žuvela

VAŽNOST SUSTAVA HLA U REUMATOLOGIJI

Završni rad

Split, 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Lucija Žuvela

VAŽNOST SUSTAVA HLA U REUMATOLOGIJI

THE IMPORTANCE OF HLA COMPLEX IN RHEUMATOLOGY

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

dr.sc. Esma Čečuk – Jeličić

Split, 2017.

Popis kratica

CDC – engl. *Complement Dependent Citotoxicity*; citotoksičnost ovisna o komplementu

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EMA – endomizijska autoantitijela

GWAS – engl. *Genome Wide Association Studies* – proučavanje genomskih asocijacija

HLA – engl. *Human Leukocyte Antigen*; humani leukocitni antigen

kDa – kilodalton; jedinica atomske mase od 1000 daltona; opisuje molekularnu težinu velikih molekula poput npr. proteina

LD – engl. *Linkage disequilibrium;* neravnoteža udruživanja

MHC – engl. *Major Histocompatibility Complex*; Glavni sustav tkivne snošljivosti

MLCT – engl. *microlymphocitotoxicity test*; test mikrolimfocitotoksičnosti

PsA – psorijatični artritis

PCR – SSO – engl. *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide*

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

SAPE – engl. *Streptavidin–Phycoerytherin*; R-fikoeritrin konjugirani streptavidin

SLE – sistemski lupus eritematodes, autoimuna bolest

SSc – sklerodermija ili sistemska skleroza

Tc – citotoksični limfociti

anti – TG –2 – anti - tkivna transglutaminaza

Th – pomoćnički limfociti

TNF – engl. *Tumor Necrosis Factors*; faktor tumorske nekroze

SADRŽAJ

1. UVOD..... 1

1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major histocompatibility complex, MHC)*..... 1

1.1.1. Građa i funkcija molekula HLA 3

1.1.1.1. Molekule HLA razreda I..... 3

1.1.1.2. Molekule HLA razreda II..... 4

1.2. Nasljeđivanje gena HLA..... 6

1.3 Nomenklatura gena i antigena sustava HLA..... 7

1.3.1. Nomenklatura gena HLA..... 8

1.3.2. Nomenklatura antigena HLA..... 9

1.4. Autoimune bolesti..... 10

1.4.1. Promjena autoantigena..... 11

1.4.2. Križnoreaktivni epitopi..... 11

1.4.3. Čimbenici autoimunosti..... 12

1.4.4. Patogenetski mehanizmi autoimunosti 12

1.4.5. Autoantitijela i kompleks antigen – antitijelo..... 14

1.4.6. Liječenje autoimunih bolesti 14

1.5. Reumatoidni artritis 15

1.6. Sistemska skleroza..... 16

1.7. Psorijatični artritis..... 17

1.8. Celijakija..... 17

2. CILJ RADA..... 20

3. METODE..... 21

3.1. Serološko određivanje HLA antigena..... 21

3.1.1. Izvođenje testa MLCT..... 22

3.2. Molekularno određivanje alela sustava HLA..... 24

3.2.1. PCR – SSO metoda..... 25

3.2.1.1. Izvođenje HLA tipizacije PCR – SSO metodom..... 26

3.2.2. PCR – SSP metoda 27

3.2.2.1. Izvođenje HLA tipizacije PCR - SSP metodom..... 28

4. RASPRAVA..... 30

5. ZAKLJUČAK..... 32

6. LITERATURA..... 33

7. SAŽETAK..... 34

8. SUMMARY..... 35

9. ŽIVOTOPIS..... 36

1. UVOD

1.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major histocompatibility complex, MHC*)

Tridesetih godina prošlog stoljeća, Peter Gorer i George Snell otkrili su sustav koji su imenovali Sustav H - 2 (H za *histocompatibility*, 2 za *antigen II*). Gorer i Snell bavili su se transplantabilnošću tumora kod miševa i gotovo su istodobno otkrili da je prihvaćanje ili odbacivanje presatka kontrolirano malim brojem lokusa. Ovo su bili rani početci onoga što će se poslije nazvati Glavnim sustavom tkivne snošljivosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC), koji je prisutan ne samo kod miševa, nego i kod drugih kralježnjaka. (2)

Osnove na kojima je dokazano postojanje HLA kompleksa kod ljudi postavljaju 1958. godine Jean Dausset, Jon van Rood i Rose Payne. Dausset i van Rood prvi opisuju antitijela koja su pronašli u serumima politransfundiranih bolesnika i trudnica. Ovaj je sustav kod ljudi poznat pod nazivom sustav HLA, odnosno sustav humanih leukocitnih antigena, jer je najprije otkriven na leukocitima. Geni HLA zadani su rođenjem i tokom života se ne mijenjaju. (5)

U projektu mapiranja ljudskog genoma ova je kromosomska regija prva bila u potpunosti sekvencionirana. Sustav HLA zauzima područje od 4 milijuna parova baza, što čini 1% ljudskog genoma.

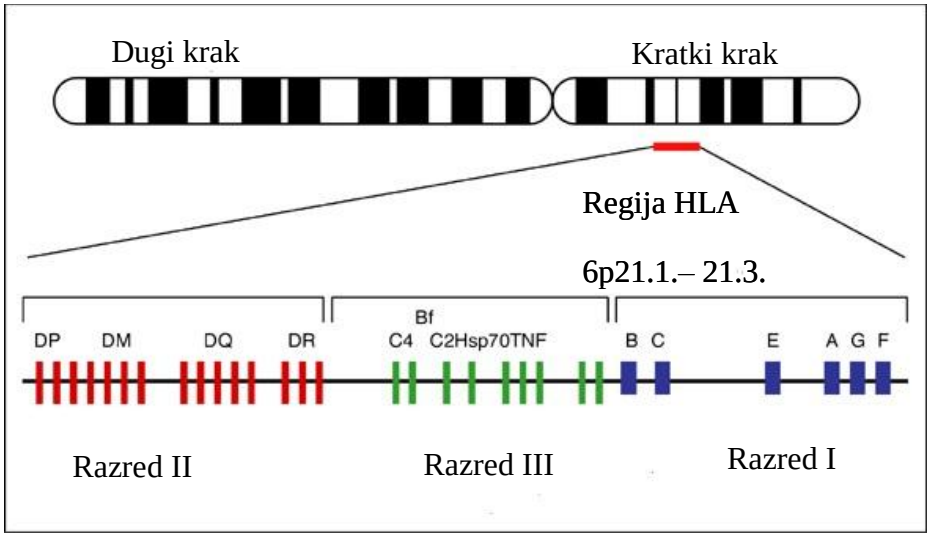
Sve tjelesne stanice na svojoj membrani imaju mnogobrojne bjelančevine koje u tuđem organizmu mogu izazvati imunoreakciju, odnosno djelovati kao antigeni. Tkivni su antigeni brojni i dijele se na slabe i jake. Jake antigene, koji imaju važnu imunoregulacijsku ulogu, kodira glavni kompleks gena tkivne podudarnosti. Produkti tih gena su molekule HLA, koje su po strukturi najčešće glikoproteini ili polisaharidi. Njihova glavna uloga je predočavanje patogenih peptida T stanicama potičući adaptivni imunosni odgovor. (1)

Limfocit T prepoznaje antigenske molekule spregnuto, tako da jednim dijelom svojega receptora prepoznaje antigen, a drugim vlastitu molekulu MHC. (1)

Specifična imunoreakcija izostaje ukoliko limfocit T ne prepozna kompleks molekule HLA i tuđeg antigena. Upravo je ta sposobnost restrikcije imunosnog odgovora posredovanog T limfocitima, razlikujući tako vlastito od tuđeg, glavna imunološka barijera pri transplantaciji solidnih organa i matičnih stanica.

Polimorfizam (postojanje više od 500 alelnih oblika pojedinih gena) i poligenija glavna su svojstva sustava HLA. Izraziti se polimorfizam ostvaruje brojnim genskim mehanizmima - genskom konverzijom, genskom rekombinacijom i točkastim mutacijama (promjena pojedinih nukleotida). Polimorfizam i poligenija sustava HLA u jedinki (20 – 25) i u vrsti (nekoliko stotina) čini da se jedinke antigenski uvijek međusobno razlikuju. Raznolikost alela HLA na razini vrste olakšava klicama da nađu tkivni antigen kojemu su istovjetne, ali ipak ih u jedinki dočekaju različiti limfocitni klonovi, odabrani prema različitim vlastitim molekulama HLA. Polimorfizam čini jedinke različitijima. Mnogo različitih alelnih oblika molekula HLA čini i mnogo različitih klonova koji mogu reagirati na zarazne klice. (1)

Kod ljudi geni HLA čine kompleks sa više od 200 gena na kratkom (p) kraku šestog kromosoma.



Slika 1. Smještaj regije HLA na kraćem kraku kromosoma

(preuzeto sa www.imgt.org/LocusView)

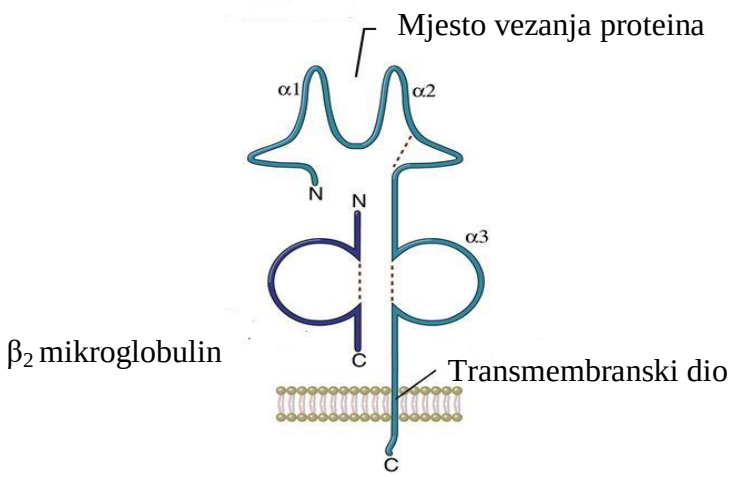
I geni i molekule HLA dijele se u tri razreda: I (A, B i C), II (DP, DQ i DR) i III. Razredi I i II određuju molekule koje imaju ključnu ulogu u preradbi i predočavanju antigena. Razred III sadrži gene za molekule koje sudjeluju u imunoreakciji, no nemaju središnju imunoregulacijsku ulogu. Geni razreda III određuju neke komponente komplementa. Razred I nalazi se telomerno od razreda II, a razred III nalazi se umetnut između razreda I i II. U području gdje se nalaze geni HLA razreda II smješteni su geni prijeko potrebni za konačan ustroj molekule HLA razreda I. Dva gena, nazvana TAP1 i TAP2, određuju dijelove crpke koja prenosi peptide – dijelove prerađenog tuđeg antigena iz citosola u lumen endoplazmatske mrežice, gdje se oni spajaju s novostvorenim molekulama HLA razreda I. (1)

1.1.1. Građa i funkcija molekula HLA

1.1.1.1. Molekule HLA razreda I

HLA molekule razreda I su heterodimerni glikoproteini vezani za membranu. Sastoje se dva polipeptidna lanca: polimorfnog α ili teškog lanca, i nepolimorfnog β – lanca, koji se naziva β_2 mikroglobulin. Polimorfni α lanac kodiraju geni unutar regije HLA razreda I, a β_2 mikroglobulin kodira gen na petnaestom kromosomu. Polimorfni α lanac se vezuje za staničnu membranu, a na njega se nekovalentno veže β – lanac. Lanac β može se naći i slobodan u serumu. Lanac α se sastoji od triju glikoziliranih vanstaničnih domena: α_1, α_2 i α_3, hidrofobne transmembranske regije i hidrofilnog citoplazmatskog lanca. Lanac β se nalazi izvan stanice. (2)

Cijela se molekula HLA razreda I može podijeliti na 4 dijela: dio koji veže peptide (α_1 i α_2), dio koji sliči imunoglobulinu, transmembranski dio i citoplazmatski dio. Potpuni oblik molekule HLA razreda I potreban za njen stabilan izražaj na staničnoj membrani jest heterotrimer sastavljen od α – lanca, β_2 mikroglobulina i vezanog antigenskog ulomka. (1)



Slika 2. Molekula HLA razreda I

(preuzeto sa http://medweb4.unige.ch/immunologie/)

Najvažniji dio molekule je onaj koji veže peptid, odnosno dijelove prerađenih tuđih antigena. Tako se stvara kompleks kojeg prepoznaju limfociti. Taj se dio sastoji od oko 180 aminokiselina stereokemijski podijeljenih u dijelove koji zajedno tvore pravilno građenu pukotinu u koju se smješta prerađeni peptid. Pukotina može primiti antigenski ulomak od 8 do 11 aminokiselina. Pukotina je okružena sa aminokiselinama koje se razlikuju u molekulama HLA razreda I što ih određuju alelni geni (npr. HLA – B1 ili HLA – B2). Polimorfizam gena HLA razreda I zapravo služi za stvaranje različitosti stereokemijske površine pukotina koje vežu prerađene antigenske ulomke. Ostatak varijabilnih aminokiselina koje tvore dio oko pukotine prepoznaje receptor CD8+ citototoksičnog limfocita T. (1)

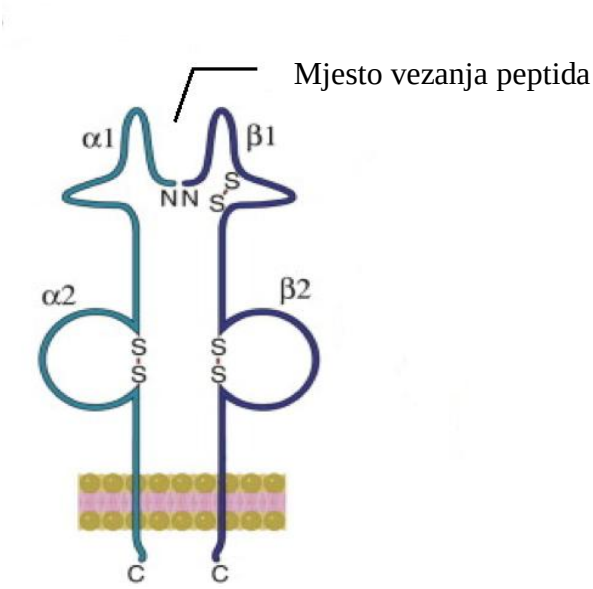
HLA molekule razreda I izražene su na gotovo svim stanicama koje imaju jezgru, iako njihov izražaj varira među stanicama.

1.1.1.2. Molekule HLA razreda II

Molekule HLA razreda II također su heterodimerni glikoproteini vezani za membranu. Građene su od dvaju međusobno sličnih, nekovalentno vezanih polimorfnih lanaca: α i β. Lanac α je nešto veći zbog većeg stupnja glikozilacije.

Ovaj razred molekula HLA građen je slično molekulama iz razreda I, pa tako imaju dio koji veže peptid, dio koji sliči konstantnom dijelu imunoglobulina, transmembranski i citoplazmatski dio.

Kao i kod molekula razreda I, potpuni oblik molekule HLA razreda II koji je potreban za njezin stabilni izražaj na staničnoj membrani je heterotrimer sastavljen od α – lanca, β – lanca i vezanog antigenskog ulomka. Oba lanca, α i β, kodiraju geni unutar HLA regije II. Izvanstanični dijelovi lanaca mogu se funkcijski podijeliti u podjedinice od po 90 aminokiselina, pa tako imamo α_1 i α_2, odnosno β_1 i β_2. (1) (2)



Slika 3. Molekula HLA razreda II

(preuzeto sa http://medweb4.unige.ch/immunologie/)

Podjedinice α_1 i β_1 nalaze se distalno staničnoj površini i zajedno tvore dio koji veže antigenski peptid. Njihovim zajedničkim „smatanjem“ nastaje pukotina u dijelu koji veže peptid. Za razliku od molekula HLA razreda I, oba su kraja pukotine otvorena, stoga vezani antigenski peptid može stršati izvan nje. Pukotina HLA molekula razreda II zato može vezati veće peptide, od 10 do 30 aminokiselina (ili više).

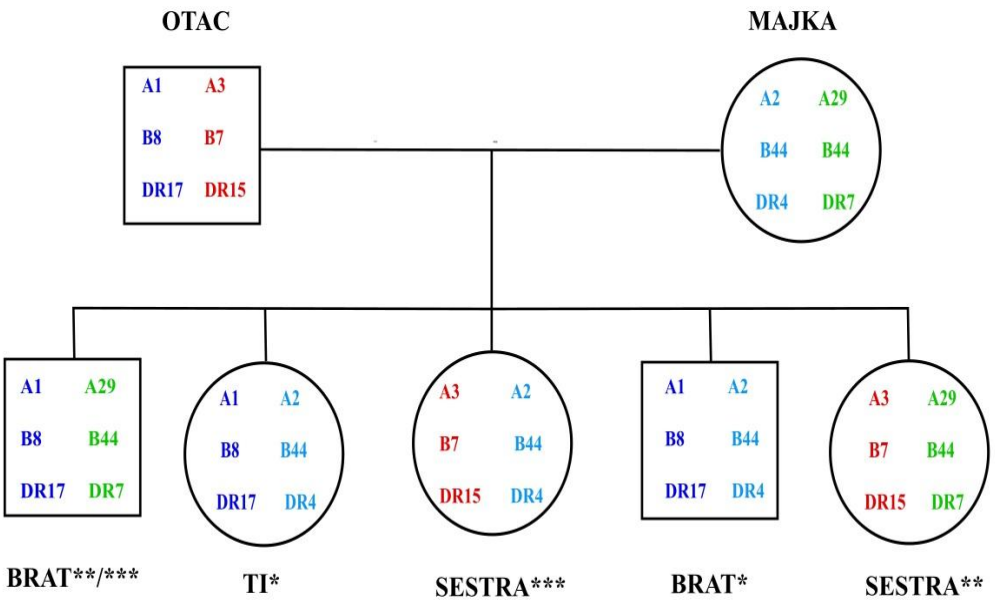
Podjedinice α_2 i β_2 nalaze se proksimalno od stanične membrane i čine dio molekule koji sliči konstantnom dijelu imunoglobulina C. Važni su za nekovalentno povezivanje lanaca α i β. (1). U ljudi polimorfizmu više doprinosi β – lanac molekule HLA razreda II. (1)

Glavna je uloga molekula HLA razreda II prezentiranje izvanstanično prerađenih peptida receptorima CD4+ pomoćničkih T-limfocita. Time potiču imunosni odgovor koji uključuje aktivaciju B stanica. Aktivirane B stanice zatim proizvode antitijela te aktiviraju citotoksične limfocite T. (2)

1.2. Nasljeđivanje gena HLA

Geni sustava HLA nasljeđuju se kodominantno kao HLA haplotip. Haplotip je kombinacija alelnih oblika gena na jednom kromosomu. Haplotip HLA naslijeđuje se od oba roditelja prateći Mendelove zakone nasljeđivanja. Osobe imaju heterozigotne haplotipove, što znači da se svi (ili većina) alelnih oblika gena odgovarajućih skupina razlikuju između naslijeđenih haplotipova. Svaki se haplotip sastoji od gena skupina I i II i to se svojstvo naziva poligenija. Geni HLA razreda I na jednom kromosomu (haplotipu) jesu A, B i C, a geni HLA razreda II čine lokusi HLA-DR, -DQ, -DP. (1). Naslijeđeni haplotip je kombinacija gena lokusa razreda I i II sustava HLA.

Tri su moguća ishoda nasljeđivanja s obzirom na moguće kombinacije gena HLA. Dvoje srodnika ima 25% šanse da naslijede iste haplotipove od oba roditelja i budu HLA haplotipski identični, 50 % šanse da naslijede samo jedan isti haplotip i budu poluidentični i 25% šanse da su naslijedili različite haplotipove od roditelja i da nisu HLA identični. Moguće nasumične kombinacije antigena s različitih HLA lokusa na pojedinom HLA haplotipu su jako velike. U nekim se populacijama određeni HLA aleli na pojedinim haplotipovima mogu naći češće od očekivanog. Taj se fenomen naziva neravnoteža udruživanja (eng. *linkage disequilibrium*).



Slika 4. Dijagram nasljeđivanja HLA gena

** Haplotipski identični srodnici

** Haplotipski poluidentični srodnici

*** Haplotipski različiti srodnici

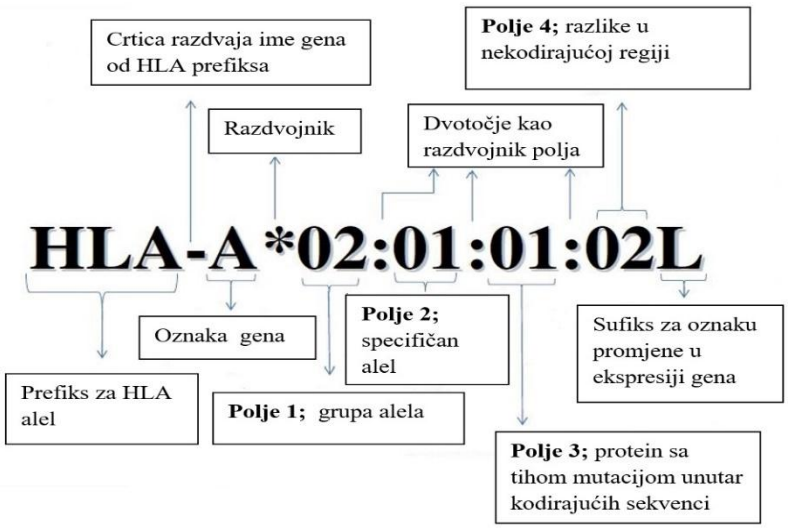
1.3. Nomenklatura gena i antigena sustava HLA

Kako bi geni i antigeni sustava HLA mogli dobiti svoju službenu nomenklaturu, 1968. godine osnovan je Odbor za nazivlje HLA sustava pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*). Prije imenovanja pojedinih gena ili antigena sustava HLA, sve novootkrivene sekvence prolaze stroge kontrole i analize. Ukoliko se utvrdi da je sekvenca dosad neotkrivena, ta sekvenca zajedno s imenom se onda objavljuje u bazi podataka IPD-IMGT/HLA Database (14). U travnju 2010. godine predstavljen je novi način imenovanja sustava HLA. Glavni povod promjeni nomenklature bio je taj što se stari način više nije mogao prilagoditi broju opisanih HLA alela. (1) Trenutno postoji više od 5 700 alela opisanih u svim klasičnim i neklasičnim lokusima HLA.

1.3.1. Nomenklatura gena HLA

Stari način imenovanja bio je značajno ograničen činjenicom da se njime moglo opisati samo do 99 alela koji su se mogli razlikovati na bilo kojem paru pozicija. Prvi aleli koji su naišli na ovaj problem bili su aleli HLA – A*02 i B*15, za koje se opisalo više od 99 alela.

Ovaj način imenovanja dodavao bi značenje parovima znamenaka u nomenklaturi HLA. Primjerice, kod alela HLA – A*02010102L, oznaka HLA ga označava kao alel sustava HLA. Crtica (-) odvaja HLA oznaku od gena, u ovom slučaju, gena „A“. Zvjezdica je razdvojnik. U imenu alela prve dvije znamenke (**02**010102L) predstavljaju grupu alela. To su najčešće bili sinonimi za serološke tipove (u našem slučaju, A2). Specifični alel identificiraju treća i četvrta znamenka. (02**01**0102L). Svi aleli sa razlikom u nomenklaturi na prve četiri pozicije kodiraju proteine sa različitim sekvencama. Aleli sa razlikom u nomenklaturi na petoj i šestoj poziciji (0201**01**02L) kodiraju proteine sa tihim mutacijama unutar kodirajućih sekvenci. Sekvence koje su se razlikovale u mutacijama unutar introna ili netranslatiranih regija na 3' i 5' krajevima egzona su se označavale drugačijim znamenkama na sedmoj i osmoj poziciji (020101**02**L). Slovima označeni nastavci koristili su se kako bi se identificirali null aleli (N), aleli sa niskom ekspresijom (L), izlučeni aleli (S), aleli koji se mogu naći u citoplazmi (C), oni sa upitnom ekspresijom (Q) ili pak oni aleli sa aberantnom ekspresijom (A).



Slika 5. Nazivlje HLA alela (preuzeto sa http://hla.alleles.org/nomenclature)

Tablica 1. Nomenklatura HLA alela (6)

Nomenklatura	Značenje
HLA	Oznaka regije HLA i prefiks za HLA gen
HLA-DRB1	Određeni HLA lokus, ovdje DRB1
HLA-DRB1*13	Grupa alela koja kodira DR13 antigen
HLA-DRB1*13:01	Određeni HLA alel
HLA-DRB1*13:01:02	Alel koji se razlikuje u sinonimnoj mutaciji od alela *DRB1*13:01:01*
HLA-DRB1*13:01:01:02	Alel s mutacijom izvan kodirajuće regije u odnosu na alel *DRB1*13:01:01:01*
HLA-A*24:09N	„Null alel“ – alel koji nema ekspresiju
HLA-A*30:14L	Alel koji kodira protein sa značajno niskom ili smanjenom (*low*) ekspresijom
HLA-A*24:02:01:02L	Alel HLA koji kodira protein čija je zastupljenost na površini stanice niska, s mutacijom utvrđenom izvan kodirajuće regije
HLA-B*44:02:01:02S	Alel koji kodira protein zastupljen kao „skrivena molekula“
HLA-A*32:11Q	Alel s mutacijom znanom da ima značajan utjecaj na zastupljenost proteina na površini stanice (nepotvrđeno, upitna zastupljenost)

1.3.2. Nomenklatura antigena HLA

Antigeni sustava HLA dokazani serološkim metodama određivanja imenuju se drukčije od gena (i alela) sustava HLA. Antigeni HLA imenuju se prvo oznakom lokusa HLA – A, HLA –B, HLA – C. Oznaku lokusa slijedi identifikacijski broj (specifičnost) antigena, npr. HLA – A1, HLA – B27, pri čemu se jednoznamenkasti broj piše bez nule. (5)

Tablica 2. Nazivlje antigena i gena sustava HLA

ANTIGENI	GENI	
HLA – A1	HLA –A*01	HLA – A*0103
HLA – B27	HLA –B*27	HLA – B*2705
HLA – DR4	HLA – DRB1*04	HLA –DRB1*0401

1.4. Autoimune bolesti

Autoimune su bolesti razmjerno česte, ponekad vrlo teške. Nastanak autoimunosti posljedica je zatajenja osnovne funkcije imunosnog sustava – razlikovanja vlastitog od tuđeg. Autoimune bolesti su bolesti u kojima je autoimuni proces začetnik bolesnog stanja i susljednih kliničkih simptoma. U autoimunosnom procesu organizam na vlastite antigene reagira kao na tuđe, odnosno prekida se prirodna imunotolerancija nekih vlastitih antigena. Mehanizme nastanka autoimunosti možemo podijeliti na one koji počinju zbog promijenjenih značajki reagiranja na vlastite antigene i one koji nastaju zbog pojave zabranjenih klonova. Autoimune bolesti mogu biti organskospecifične i organskonespecifične. (1)

U organizmu postoje limfociti B koji mogu biti autoreaktivni. U slučaju autoimunosti, njihovu reakciju uz pomoć limfocita T izazivaju autoantigeni. Niske koncentracije autoantitijela (primjerice antitireoglobulinskih) mogu postojati i kod zdravih osoba. U autoimunosti se na neki tjelesni autoantigen stvaraju antitijela na nekoliko njegovih epitopa. U tim slučajevima autoimuna reakcija ne započinje mutacijom na imunoglobinskim genima ili poliklonskom aktivacijom limfocita B, nego autoantigen podražuje specifične klonove s receptorima komplementarnim svojim epitopima. (1)

1.4.1. Promjena autoantigena

Svi antigeni koje ima neka jedinka nazivaju se autoantigeni. Postoje antigeni specifični za vrstu, koji se nalaze na stanicama svih jedinki određene životinjske vrste i zovemo ih ksenoantigenima. Razlikuju se od vrste do vrste, što znači da jedna molekula u dvjema različitim vrstama postoji u dva različita oblika. Antigeni specifični za jedinku unutar iste vrste zovu se aloantigeni. Antigeni specifični za tkivo specifični su za određenu funkcijsku skupinu stanica. Kada u organizmu dođe do autoimune bolesti, dolazi prvenstveno do promjene autoantigena.

Autoantigen počne podraživati autoreaktivne limfocite najčešće nakon unošenja tuđih, vanjskih antigena koji služe kao imunogenični nosač. Imunotolerancija na autoantigene koji se nalaze u krvi u visokim koncentracijama (primjerice, albumin), održava se tolerancijom limfocita B i T, a imunotolerancija na one koji se u krvi nalaze u niskim koncentracijama (primjerice, tireoglobulin) održava se na razini limfocita T. Uloga limfocita T je pomagačka, jer se njihovom aktivacijom posljedično potiču i limfociti B. Autoimunost prema nekim autoantigenima počinje gubitkom tolerancije limfocita T. Ako se izmijeni samo onaj dio autoantigena koji služi kao nosač, na taj novi nosač limfociti T gube toleranciju. (1)

1.4.2. Križnoreaktivni epitopi

Ponekad mikroorganizmi iz okoliša mogu imati neke epitope istovjetne, a neke različite epitopima domaćina. Oni različiti u tom slučaju mogu poslužiti kao nosač i podražiti odgovarajuće limfocite T koji u organizmu postoje jer su takvi epitopi organizmu strani i na njih nije razvijena prirodna imunotolerancija. Pritom, nametnički epitopi istovjetni domaćinovima djeluju kao hapteni pa organizam tijekom infekcije stvara antitijela protiv unesenog antigena, ali i autoantijela protiv vlastitoga haptena (autoantigena) zbog križne reakcije. Tako virusi mogu izazvati autoimunosnu reakciju kad na membrani domaćinove stanice iskažu svoj antigen koji može poslužiti kao nosač (primjerice, limfocit B zaraženi Epstein – Barr virusom). Limfociti T reagiraju na taj tuđi nosač i potiču zatim na reagiranje limfocite B. To odgovara činjenici da većinu autoimunosnih bolesti uzrokuje humoralni, a ne stanični oblik imunosti. (1)

1.4.3. Čimbenici autoimunosti

Geni HLA koji kodiraju molekule HLA razreda I i HLA razreda II glavni su čimbenici genske imunoregulacije. Te molekule najprije probiru klonove limfocita T za vrijeme njihova sazrijevanja u timusu, a potom služe kao biljeg stanice pri spregnutom prepoznavanju tuđih antigena.

Osim gena HLA, u nastanku autoimunih bolesti mogu sudjelovati i brojni drugi geni uključenu u regulaciju upalnog odgovora, izražaja citokina i kemokina te njihovih receptora, kostimulacijskih molekula, rasporeda i izražaja tkivnih antigena i drugih molekula. Poremećaji tih gena sudjeluju u mehanizmima uspostave (i gubitka) tolerancije te u patogenezi autoimunih bolesti i krajnjih oštećenja ciljnih organa. No genska povezanost nije jednoznačna, što znači da se bolest razvija češće tek uz postojanje nekoliko genskih lokusa koji označavaju veću sklonost razvoju bolesti.

U ostale čimbenike autoimunosti prvenstveno pripadaju spol i dob, jer se autoimunosne bolesti češće susreću u žena nego kod muškaraca, te kod starijih osoba (učestalost pojave autoantitijela povećava se sa životnom dobi promatrane populacije). Pojava autoimunosti podudara se ponekad s postojanjem drugih imunoloških poremećaja te s prethodnom pojavom neke zarazne bolesti. Prethodne zaraze i neki drugi utjecaji (npr. pušenje), pripadaju okolišnim čimbenicima koji mogu pospješiti autoimunost. (1)

1.4.4. Patogenetski mehanizmi autoimunosti

Genska podloga pogoduje prekidanju imunotolerancije na vlastite antigene, a infekcija razvoju upale i aktivaciji imunosnih stanica. Oštećenja tkiva nastaju više zbog izazvane (i neodgovarajuće regulirane) reakcije, nego zbog samog djelovanja mikroorganizma. Aktiviranje autoreaktivnih klonova prvi je korak na putu do kliničke slike autoimunosne bolesti. Nakon neželjenog podražaja, aktivirani autoreaktivni klonovi stvaraju izvršne čimbenike imunoreakcije – stanice ili antitijela koja će reagirati s autoantigenima. Bolest uzrokuje reagiranje izvršnoga kraka autoimunosne reakcije s ciljnim antigenima.

Očitovanja bolesti mogu se veoma razlikovati od osobe do osobe. Ponekad je posljedica autoimunosti tek pojava autoantitijela u krvi, a ponekad teška bolest koju niti najjača imunosupresija ne može zaustaviti. U patogenezi autoimunosnih bolesti ključnu ulogu imaju pomagački limfociti T CD4+ koji uzrokuju upalu i oštećenje tkiva poticanjem lučenja antitijela i aktiviranjem drugih izvršnih stanica. (1)

Tablica 3. Patogenetski mehanizmi nekih autoimunosnih bolesti (prema tablicama 5-3. i 19-1. iz (1))

Bolest/sindrom	**Ciljni autoantigen**	**Posljedični poremećaj**	**Povezanost s antigenom/alelom HLA**
Autoimuna hipertireoza	TSH receptor (tireoidni)	Tireotoksikoza	HLA - DR3
Myasthenia gravis	Acetilkolinski receptor	Progresivna slabost mišića	HLA -DR3
Šećerna bolest (inzulin ovisna)	Antigen pankreasnih β-stanica	Oštećenje β-stanica	HLA –DR3, HLA -DR4
Sistemski eritematozni lupus	DNA, histoni, ribosomi	Glomerulonefritis, vaskulitis, artritis	HLA –B8, DR3/B*08, -DRB1*03
Reumatoidni artritis	Antigen zglobnih ovojnica	Oštećenje zglobova, taloženje imunokompleksa	HLA –DR1, -DR4/DRB1*01, -DRB1*04
Multipla skleroza	Mijelinska bazična bjelančevina	Kljenut	HLA – DR15, HLA – DQB1*0602 HLA – DQA1*0102

1.4.5. Autoantitijela i kompleks antigen – antitijelo

Autoantitijela djeluju na neizmijenjeni ili izmijenjeni autoantigen na staničnoj površini u citoplazmi ili u jezgri. Djelovanje autoantitijela može biti trojako: 1. Stanica koja nosi ciljni autoantigen se razara pa se bolest očituje kao posljedica tog oštećenja (npr. autoimuna hemolitička anemija) uz pokretanje upalnih mehanizama; 2. Ciljni je antigen neki od staničnih receptora pa autoantitijelo sprječava djelovanje fiziološkoga liganda na taj receptor, što znači da izostaje odgovarajuća stanična fiziološka funkcija (bez značajnog razvoja upale); 3. Ciljni je antigen neki stanični receptor, pa autoantitijelo djeluje kao ligand za taj receptor i oponaša učinak fiziološkog liganda (hipotireoza). Određivanje titra (razine) stvorenih antitijela često služi kao važna dijagnostička i prognostička značajka bolesti. Razaranje stanica i organa koji nose ciljne molekule najčešći je mehanizam nastanka bolesti. (1)

Kompleksi antigen – antitijelo, koji se odlažu nakon nastanka u tijelu, izazivaju oštećenja i autoimunost. Oni nastaju kad se u reakciji na antigen stvaraju specifična antitijela. Te imunokomplekse uklanjaju eritrociti i fagociti, no kada je riječ o velikim količinama antigena ili kad je antigen trajno prisutan u organizmu, stvaraju se prevelike količine imunokompleksa koji se ne mogu odmah ukloniti, nego se talože u zglobnim ovojnicama, stijenkama malih krvnih žila, glomerulima bubrega i korioidnom pleksusu (slučaj kod nekih autoimunih bolesti, tablica 2.). Značajke autoimunih bolesti proizlaze iz mjesta nakupljanja imunokompleksa, a ne iz vrste antigena. (1)

1.4.6. Liječenje autoimunih bolesti

Liječenje autoimunih bolesti ne uklanja uzrok bolesti, nego samo smanjuje njezine simptome. Učinkovito se liječe autoimune (antireceptorske) bolesti u kojima dajemo agonističke ili antagonističke tvari (primjerice, davanje tiroksina kod hipotireoze ili antagonističkih antitireoidnih tvari kod hipertireoze). Ostale autoimune bolesti najčešće se liječe nespecifičnom imunosupresijom kortikosteroidima, imunosupresivima ili citostaticima, nesteroidnim protuupalnim lijekovima i drugim tvarima (primjerice, penicilamin).

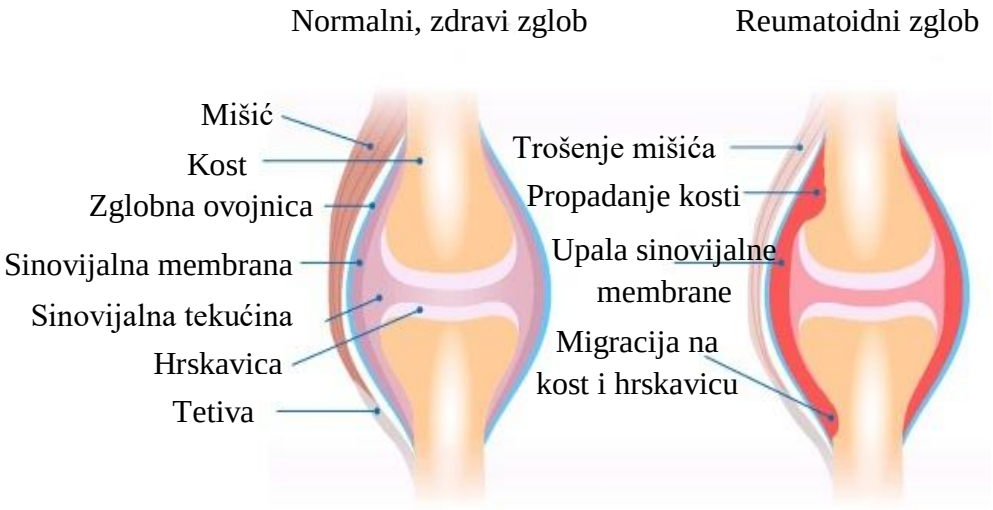
Time se ublažava upalna reakcija i smanjuje razaranje tkiva uzrokovano pokrenutim efektorskim mehanizmima (stanice i antitijela) u autoimunom procesu, ali česti su brojni i ozbiljni sporedni učinci. U autoimunim bolestima (i u nekim drugim poremećajima, poput reakcije presatka protiv primaoca), nastoji se usmjeriti imunosni odgovor od štetnog prema razmjerno manje štetnom odgovoru. (1)

1.5. Reumatoidni artritis

Reumatoidni artritis je kronična upalna bolest vezivnog tkiva koja se najviše očituje na zglobovima, a za sada je uzrok nepoznat. U ovom poremećaju imunološki sustav napada hrskavično tkivo, kosti i ponekad unutarnje organe. Od zglobova su najčešće zahvaćeni mali zglobovi šake, zglavci, ramena, koljena i gležnjevi.

Karakteristična obilježja RA su perzistirajući sinovitis (upala sinovijske ovojnice zgloba) koji najčešće simetrično zahvaća periferne zglobove i dovodi do strukturnih promjena, te prisutnost reumatoidnog faktora (RF) u serumu bolesnika. RA je prisutan širom svijeta te se češće pojavljuje kod žena nego kod muškaraca, a literaturni podaci ukazuju na povećan rizik od RA u pušača. Dosadašnja ispitivanja pokazuju čvrstu genetsku povezanost teškog oblika bolesti s određenim alelima lokusa HLA razreda I i II. (9)

Teški oblik bolesti RA povezan je s alelima lokusa HLA – DRB1, koji su i najbolje istraženi genetski faktor rizika za razvoj bolesti. Prema teoriji zajedničkog epitopa, prisutnost pojedinih alela lokusa HLA-DRB1 (HLA-DRB1*04:01, -*04:04, -*04:05, -*04:08, -*01:01, -*10:01 i -*14:02) povezuje se s destruktivnijim oblikom bolesti, posebice ako su prisutna oba alela. Kod nosioca ovih alela incidencija pojave RA je 5-7 puta veća. (9)



Slika 6. Normalni zglob i zglob u reumatoidnom artritisu (preuzeto sa http://www.aihw.gov.au)

1.6. Sistemska skleroza

Sistemska skleroza je kronična bolest nepoznatog uzroka obilježena difuznom fibrozom, degenerativnim promjenama i žilnim abnormalnostima kože, zglobova i unutarnjih organa (jednjaka, donjeg probavnog trakta, pluća, srca i bubrega). Prvi klinički simptom sistemske skleroze je zadebljanje proksimalnih i metakarpofalangealnih zglobova, uz gotovo uvijek prisutan Raynaudov fenomen. Raynaudov fenomen je vazospazam dijelova šake potaknut hladnoćom ili emocionalnim uzbuđenjem koji uzrokuje neugodnost i promjenu boje kože (blijedilo, cijanozu, eritem ili kombinaciju ovih simptoma) u području jednog ili više prstiju.

Bolest je relativno rijetka i zahvaća žene triput češće nego muškarce. Tek se iznimno pojavljuje u djetinjstvu, a najčešće se pojavljuje u dobi od 30-te do 50-te godine života. Etiologija bolesti je nepoznata. Kao mogući etiološki čimbenici najčešće se navode vaskularni i imunološki poremećaji koji dovode do prekomjerne sinteze kolagena. Temeljna je patogenetska promjena u sklerodermiji prekomjerno i za organizam štetno stvaranje novih vezivnih vlakana – fibrogeneza.

Uloga nasljeđivanja u nastanku sistemske skleroze još uvijek nije razjašnjena, iako su prethodna istraživanja pokazala visoku povezanost sistemske skleroze s alelima lokusa HLA-DRB1 (HLA – DRB1*01, HLA – DRB1*03 i HLA – DRB1*05) (4)

1.7. Psorijatični artritis

Psorijatični artritis (PsA) je kronično asimetrično oboljenje zglobova šaka i stopala koje se javlja u bolesnika koji boluju od psorijaze kože i noktiju. Obilježja PsA su zahvaćenost perifernih zglobova (erozivni artritis) i aksijalnog skeleta (ankilozirajuće promjene sakroilijakalnih zglobova i kralježnice). Učestalost PsA podjednaka je i kod muškarca i kod žena i najčešće se javlja u dobi od 35 do 50 godina. Uzrok bolesti je nepoznat, no izvjesno je da su u nastanku PsA važni i vanjski i unutarnji (nasljedni) čimbenici.

Brojnim istraživanjima utvrđena je povezanost antigena sustava HLA sa psorijatičnim artritisom (HLA- B 13, B-17, B-37 i B-39). Još uvijek nisu u potpunosti razjašnjena ni stanična međudjelovanja niti molekulski mehanizmi upale u PsA, ali su poznate osnovne histopatološke značajke: pojačana vaskularizacija sinovije iz obilnu inflitraciju limfocita i neutrofilnih leukocita te obilje citokina, posebice TNF –a, uz poremećaj remodeliranja kosti. (4)

1.8. Celijakija

Celijakija je kronični upalni poremećaj tankog crijeva s autoimunom komponentom i velikom mogućnošću da bude naslijeđena. Bolest se pojavljuje širom svijeta i češće je imaju žene nego muškarci. (8) Karakterizirana je proljevom, abdominalnim širenjem, slabom dobivanju na težini i niskim rastom. Celijakija je cjeloživotno stanje i jedini učinkoviti tretman je kompletno isključivanje glutena iz prehrane. (2)

Gluten je bjelančevinasta tvar koja se može naći u žitu, ječmu i pšenici. Peptidi glutena prolaze epitelnu barijeru tankog crijeva u laminu propriu, gdje se deaminiraju enzimom transglutaminazom. Kod osoba s celijakijom, deaminirani peptid glutena potiče kaskadu prirođenog adaptivnog imunosnog odgovora. Limfociti infiltriraju proksimalni dio tankog crijeva, što dovodi do uništavanja crijevnog epitela i mukoze. Posljedice uništavanja crijevnog epitela su atrofija crijevnih resica (vila) i hiperplazija crijevnih kripti, kao i značajna malapsorpcija nutrijenata. (2)

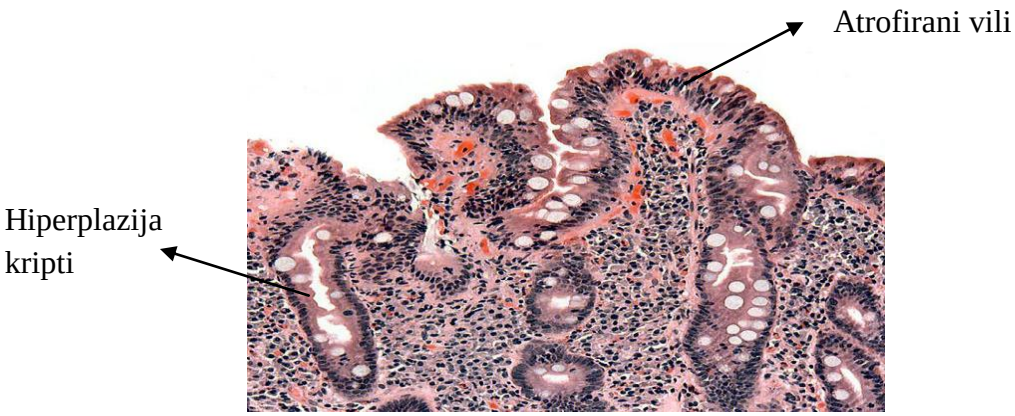
Bolest se najčešće utvrđuje serološkim testovima kojima se traže anti-tkivna transglutaminaza (anti – TG2) i anti – endomizijska autoantitijela (EMA). Za potvrdu oštećenja tankog crijeva potrebno je napraviti biopsiju i histološku analizu. Neliječena bolest može dovesti do malapsorpcije, autoimune bolesti jetre, periferne neuropatije i maligniteta. Bolest ima širok raspon simptoma.

Celijakija je multifaktorijalna bolest, stoga ne ovisi isključivo o specifičnoj mutaciji pojedinog gena već ju mogu uzrokovati kombinacija okolišnih čimbenika ili varijacije u više gena. Razvoju celijakije mogu pridonijeti virusne infekcije koje smanjuju propusnost crijevnog epitela, crijevni mikrobi, dojenje ili (ne)pravovremeno uvođenje prehrane sa sadržajem glutena kod male djece. (8)

Istraživanja su pokazala visoku povezanost pojedinih gena sustava HLA sa obolijevanjem od celijakije. Posebnu povezanost s obolijevanjem od celijakije pokazuju geni lokusa HLA-DQ kao što su HLA-DQ2 i HLA-DQ8. (2). Deaminirani se peptidi glutena jakim vezama vežu na antigene lokusa HLA – DQ2 i DQ8, prezentirajući tako kompleks HLA – gluten peptid, koji aktivira CD4+ stanice. CD4+ T stanice stvaraju proupalne citokine, uključujući interferon gamu. Interferon γ preoblikovanjem tkiva uništava crijevnu mukozu. U stvorenom imunološkom odgovoru razvijaju se antitijela na gluten i autoantitijela na endogenu tkivnu transglutaminazu. (2)

Tipizacija alela lokusa HLA-DQB1/A1 od izuzetne je važnosti u dijagnostici ove složene autoimune bolesti. Posljednjih je godina GWAS-om (engl. *genome wide association studies* – proučavanje genomskih asocijacija; ispitivanje mnoštva zajedničkih genetičkih varijanti različitih osoba) identificirano dosta non - HLA gena povezanih s povećanim rizikom za obolijevanje od ove bolesti.

Tipizacija alela sustava HLA nema apsolutnu dijagnostičku vrijednost, ali pokazuje relativan rizik za obolijevanje od celijakije. Prisutnost antigena HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 indicira gensku podložnost, no to ne znači nužno da će se bolest razviti. (8)



Slika 7. Sluznica tankog crijeva kod celijakije

(preuzeto sa http://www.pathpedia.com)

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada je bio naglasiti važnost antigena i alela sustava HLA te njihovu povezanost s raznim bolestima (celijakijom, narkolepsijom, reumatoidnim i psorijatičnim artritisom, myasthenijom gravis, sistemskom i multiplom sklerozom, sistemskim eritematoznim lupusom,…)

Svakim se danom otkriva sve veći broj alela koji govore u prilog gore navedenom, posebno iz područja reumatoloških, gastroenteroloških, neuroloških i autoimunih bolesti.

3. METODE

Gene i antigene sustava HLA možemo odrediti serološkim i molekularnim metodama. Pojedini laboratoriji koriste određene metode ovisno o svojim potrebama i mogućnostima.

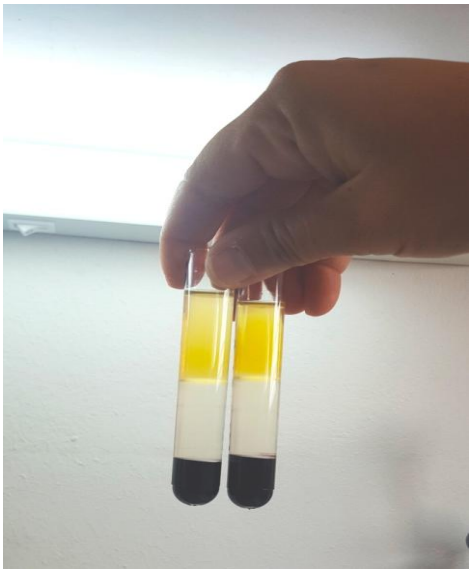
3.1. Serološko određivanje HLA antigena

Standardna metoda za serološko određivanje HLA antigena razreda I i II, kao i HLA antitijela, naziva se test mikrolimfocitotoksičnosti (engl. *microlymphocitotoxicity test,* MLCT) ili metoda citotoksičnosti ovisne o komplementu (engl. *Complement dependent cytotoxicity*, CDC). Temelj testa je reakcija između poznatih HLA antitijela i antigena HLA koji se nalaze na limfocitima pacijenta te posljedična aktivacija komplementa. Poznata se antitijela dobivaju iz seruma aloimuniziranih žena višerotkinja, čija su se antitijela odredila koristeći već poznate HLA antigene, dok se monoklonska antitijela dobivaju iz imuniziranih miševa.

Dodavanjem seruma pacijenta poznatim antitijelima potiče se reakcija između tih antitijela i antigena u serumu. Ako su antitijelo i antigen komplementarni, doći će do stvaranja kompleksa antigen-antitijelo, a ukoliko nisu komplementarni, stvaranje kompleksa antigen – antitijelo će izostati. Vezana antitijela potrebno je označiti kako bi se moglo odrediti koji antigeni i u kolikom broju su se vezali za antitijela. Antitijela se označavaju dodavanjem antihumanog komplementa koji se veže za antitijelo iz nastalog antigen – antitijelo kompleksa. Antihumani komplement oštećuje membranu stanice. Time stanicu lizira, a boja prodire unutar stanice. To obojenje je vidljivo pod svjetlosnim mikroskopom i označava pozitivan rezultat. Ukoliko do stvaranja kompleksa antigen-antitijelo nije došlo, neće doći do vezanja komplementa, lize stanice i prodora boje te će takav rezultat pod mikroskopom biti negativan.

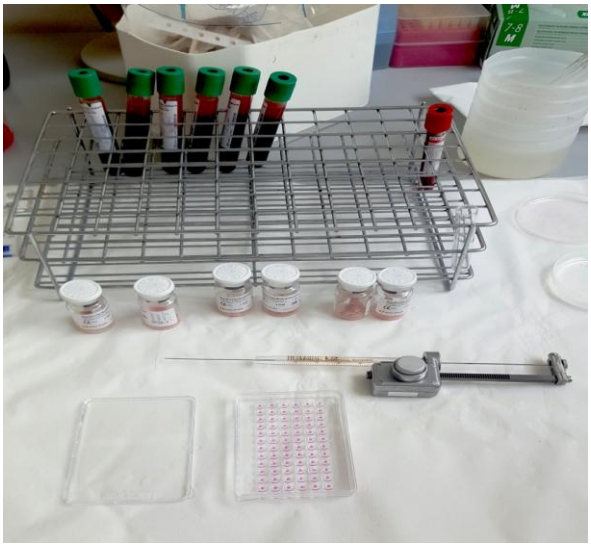
3.1.1. Izvođenje testa MLCT

Kako bi se izveo test mikrolimfocitotoksičnosti, od pacijenta se uzima 7 ml periferne krvi u epruvetu koja kao antikoagulans sadrži heparin. Iz tog se uzorka radi separacija limfocita na gradijentu gustoće te se određuje njihova koncentracija, koja se podešava uz pomoć Burker – Turk-ove komorice.



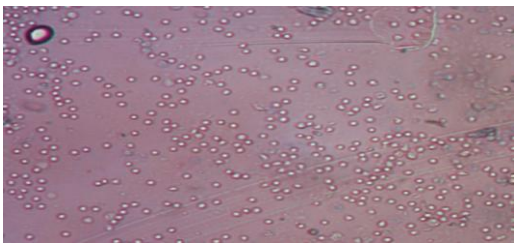
Slika 8. Limfociti separirani na gradijentu gustoće – vidljiv limfocitni prsten (fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

Na Burker – Turk –ovu komoricu stavlja se suspenzija od 5 µL limfocita i 5 µL tripanskog modrila te se koncentracija limfocita određuje pod mikroskopom brojanjem obojenih stanica. Za tipizaciju antigena HLA potrebno je po kvadratiću imati 10-12 neobojenih ili 5-6 obojenih stanica. Po potrebi se koncentracija limfocita modificira razrjeđivanjem ili ponovnim centrifugiranjem suspenzije limfocita. Nakon toga se uzorak uz pomoć Hamilton mikrolitarske šprice stavlja na Terasakijeve pločice, koje u svakoj jažici sadrže antitijela za jedan ili više antigena razreda HLA koji se određuje.

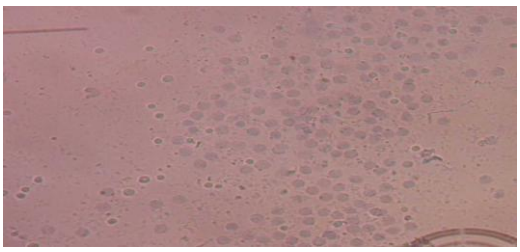


Slika 9. Terasakijeva pločica, Hamiltonova šprica, komplement i uzorci (fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

Poslije polusatne inkubacije dodaje se komplement dobiven od kunića te se ponovno inkubira 1h. Terasakijeve pločice se nakon toga istresaju kako bi se uklonio višak nevezanog komplementa te se uzorak boja tripan modrilom. Jažice koje sadrže dovoljan broj obojenih mrtvih stanica se upisuju u tipizacijske listiće, čime se određuju tkivni antigeni pacijenta.



a) Pozitivna reakcija



b) Negativna reakcija

Slika 10. Pozitivna (a) i negativna reakcija (b) u testu MLCT (fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Split)

Broj mrtvih, odnosno liziranih i obojanih stanica, mjeri se skalom od 1-8. Broj 1 označava najslabiju reakciju (manje od 20% liziranih stanica), a broj 8 najjaču reakciju (više od 80% liziranih stanica).

Tablica 4. Interpretacija rezultata testa MLCT

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

3.2. Molekularno određivanje alela sustava HLA

Molekularno se određivanje gena HLA izvodi dvjema PCR metodama (engl. *Polymerase chain reaction* – lančana reakcija polimerazom). Prva je PCR – SSO metoda (engl. *Polymerase chain reaction – Sequence Specific Oligonucleotide*), a druga PCR – SSP (engl. *Polymerase chain reaction - Sequence Specific Primer*) metoda. PCR metoda omogućava eksponencijalno umnožavanje ciljnog dijela molekule DNA. Bazira se na promjenama temperature u *thermocycler* uređaju koja je potrebna za denaturaciju i enzimatsko umnažanje molekule DNA uz pomoć specifičnih početnica (*primera*).

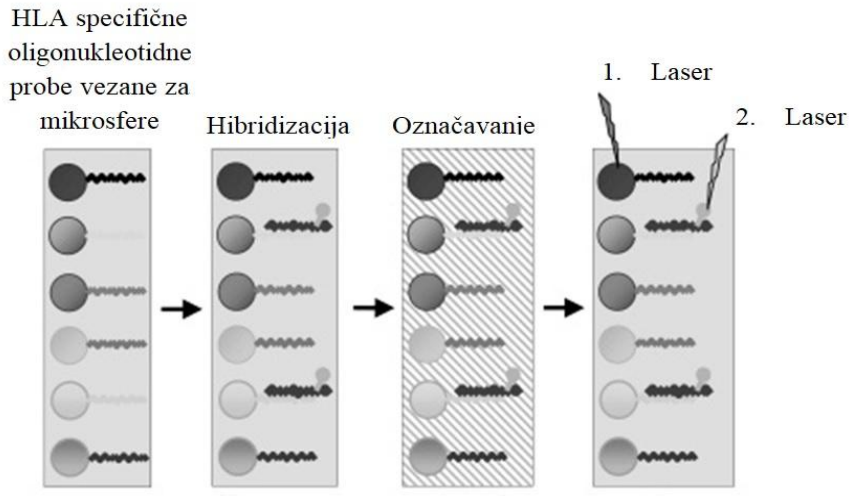
Kod obje metode potrebno je prije testa izolirati pacijentovu DNA. Uzorak za izolaciju je 2 ml periferne krvi izvađene u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Proces izolacije izvodi se u nekoliko koraka, pri čemu se koristi komercijalni kit za izolaciju. Prvo se uzorku dodaje pufer za lizu i proteinaza K. Proteinaza K je enzim koji razgrađuje (denaturira) stanične proteine i tako omogućava oslobađanje DNA iz jezgre stanice.

Nakon denaturacije proteina, oslobođenoj se molekuli DNA dodaje etanol kako bi se spriječio njen prolaz kroz membranu, te se nizom ispiranja različitim raegensima dobiva čista DNA koja se koristi u nastavku testiranja.

3.2.1. PCR – SSO metoda

Metoda PCR-SSO za tipizaciju alela sustava HLA temelji se na principu specifičnog vezanja umnožene DNA za flouresecentno obilježene polistirenske mikrosfere (kuglice).

Svaka je mikrosfera obojana jedinstvenom kombinacijom crvene i infracrvene boje što omogućava identifikaciju svake pojedine mikrosfere pomoću jedinstvenih signala koje daju pri aktivaciji laserom. Kemijski sastav površine mikrosfera omogućava da se one oblažu različitim molekulama, uključujući i HLA sekvence i čitave HLA antigene. Glavna uloga mikrosfera je utvrditi prisutnost ili odsustvo traženih analita. Luminex platforma radi na principu protočne citometrije. Mikrosfere protiču u jednom stupcu kroz par lasera. Crveni laser se koristi za pobuđivanje i identifikaciju specifične mikrosfere, dok zeleni laser pobuđuje i detektira sekundarna antitijela obilježena fikoeritrinom.

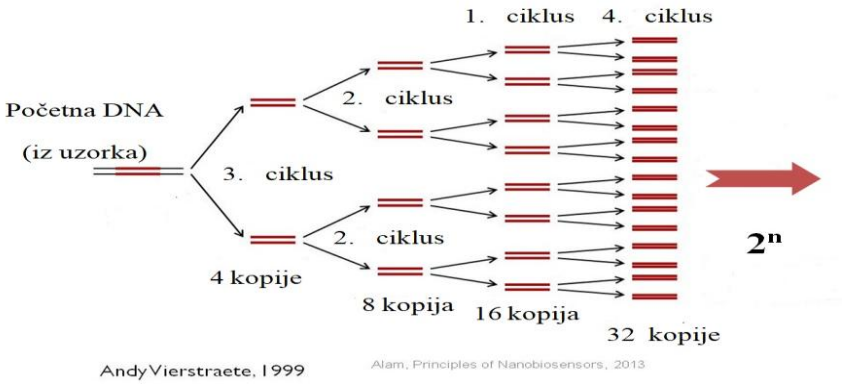


Slika 11. Princip PCR-SSO metode

(preuzeto sa https://www.omixon.com/wp-content/uploads/2016/07/Luminex.png)

3.2.1.1. Izvođenje HLA tipizacije PCR – SSO metodom

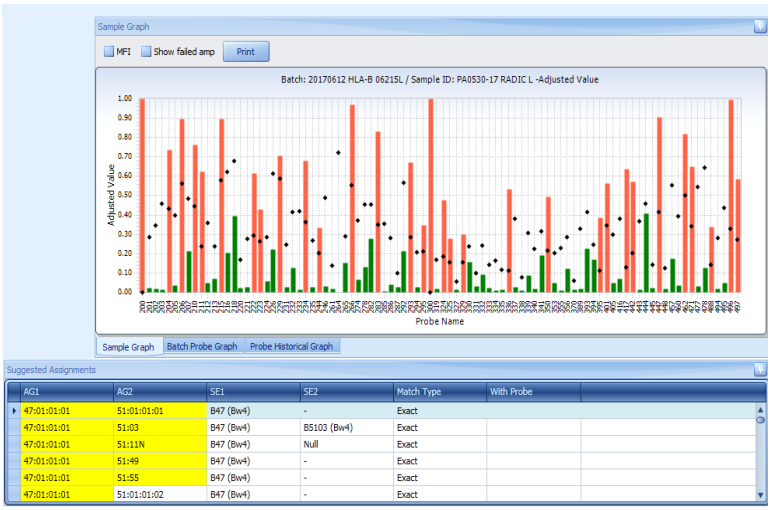
Za HLA tipizaciju metodom PCR - SSO kao uzorak se koristi izolirana genomska DNA. Potrebno je napraviti reakcijsku mješavinu (0.2 µL Taq polimeraze, 6 µL reakcijskog pufera, 8.8 µL destilirane vode) Toj se reakcijskoj smjesi doda 5 µL DNA te se postavlja u PCR – uređaj (*thermocycler*) gdje se DNA amplificira. Tijekom amplifikacije, Taq polimeraza prepoznaje komplementarne dijelove DNA na koje se vežu specifične oligonukleotidne početnice. Ciklus amplifikacije se u *thermocycleru* ponavlja 30 puta. Kao rezultat stoga dobivamo 1 073 741 824 kopija DNA (po formuli 2^n , pri čemu je n broj ponavljanja).



Slika 12. Eksponencijalna amplifikacija DNA metodom PCR
(preuzeto sa https://nanohub.org/app/site/courses/9/2415/slides/011.07.jpg)

Nakon umnažanja ciljne DNA PCR reakcijom slijedi proces hibridizacije. Za hibridizaciju je potrebno 5 µL dobivenog PCR produkta i 15 µL suspenzije mikrosfera. Hibridizacija traje 20 minuta. Tokom nje dolazi do vezanja PCR produkta na specifične oligonukleotidne probe kojima su obložene mikrosfere. Kako bi se nastali kompleks mogao vizualizirati, dodaje se 170 µL fluorescentne boje za obilježavanje koja se priprema pomoću 170 µL dilucijske otopine i 0.75 µL streptavidina (R-fikoeritrin konjugirani streptavidin, engl. *Streptavidin – Phycoerytherin*, SAPE). Dio boje veže se za biotin na početnicama, dok se drugi dio veže za nastali kompleks ukoliko je do nastanka kompleksa došlo. Test se izvodi na Coster pločici, koja se nakon hibridizacije stavlja u Luminex aparat gdje se analizira.

Rezultati hibridizacije dobiveni nakon završene analize služe kako bi se uz pomoć računalnog programa (MatchIT DNA) odredili geni i antigeni sustava HLA ispitivanog pacijenta. Program MatchIT DNA sadrži bazu već određenih, poznatih gena i antigena sustava HLA koje se zatim uspoređuju s rezultatima pacijenta koji su se dobili PCR – SSO metodom.

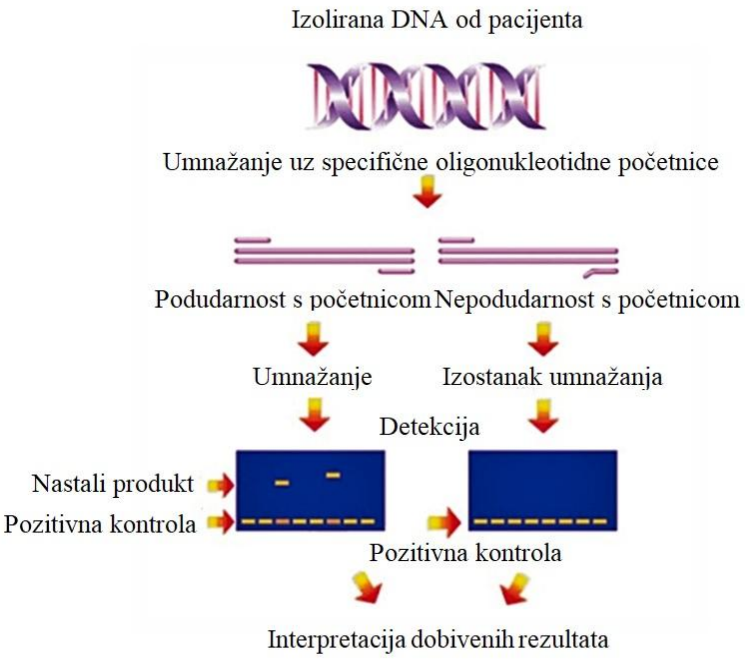


Slika 13. Rezultati dobiveni PCR-SSO metodom u programu MatchIT DNA (fotografirano u Laboratoriju za tipizaciju tkiva, KBC Križine, Split)

3.2.2. PCR – SSP metoda

PCR – SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*) metoda temelji se na lančanoj reakciji polimerazom sa početnicama specifičnih sekvenci. Prednost PCR - SSP metode u odnosu na PCR - SSO metodu je mogućnost određivanja alela sustava HLA u niskoj i visokoj rezoluciji (npr. HLA – A*02, HLA – A*02:01). Metoda se bazira na komplementarnosti oligonukleotidnih početnica s jednim alelom ili grupom alela (ovisno o zahtijevanoj rezoluciji). Ukoliko početnice nisu odgovarajuće, ne dolazi do umnažanja DNA i dobiva se negativan rezultat. Pozitivan se rezultat dobije ukoliko se uspije umnožiti ciljna DNA. Za gene HLA razreda I umnažaju se egzoni 2 i 3, dok se za gene HLA razreda II umnaža samo egzon II. Za svaki lokus HLA postoji različit broj specfičnih reakcija (za HLA – A 24 reakcije, za HLA – B 48 reakcija, za HLA – DRB1 24 reakcije).

PCR – SSP metoda zahtijeva i razdvajanje dobivenih DNA uzoraka elektroforezom na agaroznom gelu. Gel elektroforeza razdvaja odsječke DNA na temelju njihove veličine; duži odsječci DNA putuju sporije kroz gel, dok kraći odsječci putuju brže. Nakon 15 minuta, odvajanje pojedinih odsječaka DNA je gotovo te se rezultati očitavaju.



Slika 14. Princip PCR – SSP metode

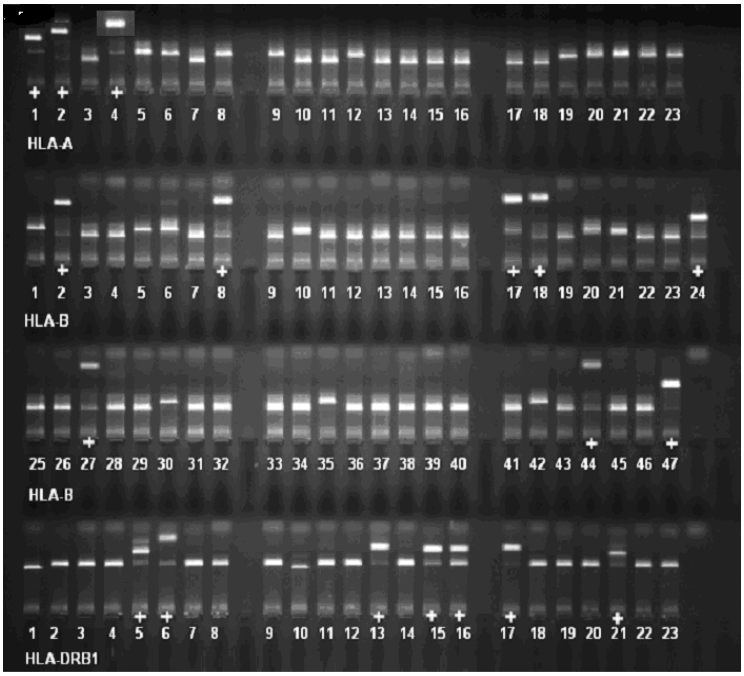
(preuzeto sa http://www.topdiag.com/)

3.2.2.1. Izvođenje HLA tipizacije PCR – SSP metodom

Za određivanje alela sustava HLA metodom PCR-SSP priprema se reakcijska smjesa za amplifikaciju koja sadrži Master MIX s Taq polimerazom, denaturiranu vodu te pacijentovu izoliranu DNA. U jažice sa liofiliziranim specifičnim početnicama na Olerup SSP® pločici pipetira se po 10 µL reakcijske smjese te se se postavlja u PCR – uređaj gdje se DNA amplificira. Nakon amplifikacije, dobiveni se PCR produkt stavlja na gel - elektroforezu s bojom (etidij-bromid) te se nakon 15 minuta očitava rezultat.

Rezultati gel-elektroforeze očitavaju se na UV stoliću na kojem se vizualiziraju pomoću UV svjetla te se dokumentiraju fotografiranjem. Uz uzorke je potrebno staviti i negativnu kontrolu koja pokazuje kvalitetu izvedenog testa.

Uspješna amplifikacija vidljiva je na gelu u obliku svjetlećih pruga, odnosno „bandova“, a pozitivna reakcija vidljiva je kao dvostruka vrpca (produkt kontrolne početnice i alel-specifičnog produkta). Rezultati se unose u program za analizu, a interpretiraju se na osnovu prisutnosti ili odsutnosti produkta na gelu.



Slika 15. Fotografija agaroznog gela s rezultatima tipizacije za lokuse HLA-A, -B i DRB1 metodom PCR-SSP niske rezolucije za jednog ispitanika

4. RASPRAVA

Osobitosti sustava HLA su povezanost ovog složenog genetskog sustava s bolestima kao i njegov izraziti polimorfizam. Razvijanjem i uvođenjem novih tehnika molekularne genetike broj novootkrivenih alela ovog sustava svakodnevno raste. Određivanje gena i antigena sustava HLA pojedinog pacijenta tako postaje važan postupak u postavljanju dijagnoze autoimunih bolesti te u transplantaciji solidnih organa i krvotvornih matičnih stanica.

Brojnim istraživanjima pokazano je da se prisutnost pojedinih alela ovog sustava povezuje s pojavom autoimunih bolesti. Antigeni sustava HLA koje ti aleli kodiraju imaju važnu imunoregulacijsku ulogu, a to je odabir limfocitnih klonova u timusu. Iako geni sustava HLA čine osnovu u predispoziciji ili razvoju autoimunih bolesti, ne treba zanemariti niti brojne druge čimbenike autoimunosti kao što su spol, dob, prethodne infekcije, okolišni čimbenici (primjerice pušenje) ili pak obiteljska povijest imunoloških poremećaja i autoimunosnih bolesti.

U ovom radu prikazana je važnost sustava HLA u dijagnostici autoimunih bolesti, s naglaskom na reumatska oboljenja, posebice reumatoidni artritis, psorijatični artritis i sistemsku sklerozu. Reumatske bolesti su sve učestaliji problem stanovništva zbog svoje dugotrajnosti i radne onesposobljenosti do koje mogu dovesti. Brojnim istraživanjima dokazana je povezanost pojedinih alela i antigena sustava HLA s predispozicijom i obolijevanjem od reumatskih bolesti u općoj populaciji. (9) (10)

Reumatoidni artritis (RA) je kronična bolest u kojoj na podlozi upale sinovijske ovojnice zgloba dolazi do stukturnih promjena dovodeći u konačnici do invalidnosti i povećanog mortaliteta. Najbolje istraženi genetski faktor rizika za razvoj bolesti kao i za teži oblik i lošiji ishod bolesti je HLA-DRB1 lokus. Najčešći aleli sustava HLA koji se povezuju s obolijevanjem od reumatoidnog artritisa su HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB*04:01 te HLA-DRB*04:04. (9).

Psorijatični artritis (PsA) je kronična upalna bolest zglobova šaka i stopala koja se javlja u bolesnika s psorijazom kože i noktiju.

Istraživanja kod pacijenata oboljelih od psorijatičnog artritisa ukazala su na povezanost pojave bolesti s prisutnošću alela lokusa HLA-B (HLA – B*13, HLA-B*57, HLA-B*37) i HLA-C (HLA-C*06:02). (10)

Sistemska skleroza (Ssc) je bolest obilježena upalnim i fibroznim promjenama kože i unutarnjih organa. Povezuje sa alelima lokusa HLA-DRB1 (HLA – DRB1*01, HLA – DRB1*03 i HLA – DRB1*05). (4)

U skupinu autoimunih bolesti spada i sistemski lupus eritematodes (SLE), kod kojeg dolazi do stvaranja antitijela usmjerenih protiv vlastitih stanica, a može zahvatiti kožu, zglobove, pluća, bubrege te živčani sustav. Smatra se da u nastanku bolesti ulogu imaju nasljedni i vanjski faktori. Uočena je povezanost sa alelima lokusa HLA-B (HLA-B*08) i HLA – DRB1 (HLA-DRB1*03). (11)

5. ZAKLJUČAK

Otkriće glavnog sustava tkivne snošljivosti, kao i sva daljnja saznanja o sustavu HLA koja su uslijedila, pokazala su njegovu iznimnu važnost u populacijskoj genetici, transplantacijskoj medicini te u dijagnostici autoimunih bolesti (poput celijakije, sistemskog eritematoznog lupusa, reumatoidnog artritisa, sistemske skleroze, myasthenie gravis...).

Tipizacija antigena i alela sustava HLA svakako je postala neizostavan dio dijagnostike pri sumnji na autoimune bolesti. No ipak, prisutnost pojedinih antigena i alela sustava HLA ne mora nužno značiti da će se kod pacijenta bolest razviti.

Budući da reumatske bolesti postaju sve učestaliji problem stanovništva, brojna se istraživanja populacijske genetike temelje na raspodjeli antigena i alela sustava HLA u reumatskim bolestima. Zbog izrazitog polimorfizma sustava HLA te neravnoteže udruživanja, daljnja istraživanja i pronalazak novih predisponirajućih antigena i alela sustava HLA kod pacijenata s kliničkim simptomima reumatskih bolesti pridonijela bi boljoj dijagnostici, kao i kvalitetnijoj daljnjoj medicinskoj skrbi takvih pacijenata.

6. LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Lukinović-Škudar V. i sur. Imunologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Kallon, D. Histocompatibility & Immunogenetics, A collection of brief revision notes, 2011.
3. Choo, SY. The HLA System: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*. 2007, 48(1): 11–23.
4. Martinović Kaliterna D, Vlak T. Rano prepoznavanje reumatskih bolesti. Split; Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet; 2011.
5. Crnić – Martinović M, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (predavanje), 2005, Rijeka:
6. http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html
7. Crnić-Martinović M, Kapović M, Licul V, Mijandrušić Sinčić B, Ristić S, Starčević Čizmarević N. HLA – DQA1 i HLADQB1 geni u pacijenata s celijakijom. *Medicina Fluminensis.* 2016, 52(1):87 – 94
8. Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science*. 2012, 19(1):88.
9. Babić – Naglić Đ, Ćurković B, Ivanišević G, Laktašić Žerjavić N, Potočki K, Soldo Jureša D, Žunec R. Raspodjela HLA – DRB1 gena u hrvatskih bolesnika s artritisom. *Reumatizam*. 2005, 52(1):12-16.
10. Čečuk – Jeličić E, Ćurković B, Grubić Z, Kerhin – Brkljačić V, Perić P, Žunec R. Raspodjela alela HLA razreda I i razreda II u bolesnika s psorijatičnim artritisom u Hrvatskoj. *Reumatizam* 2004, 51(1):5-11.
11. Beck S, Behrens TW, Criswell LA, Espe K, Gaffney P, Graham RR, Gregersen PK, Harley JB, Kyogoku C, Lange E, Langefeld C, Moser K, Ortmann W, Rodine P, Williams A. Specific combinations of HLA – DR2 and DR3 class I haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *European Jourunal of Human Genetics*. 2007, 15:823 – 830.

7. SAŽETAK

Uvod: Glavni sustav tkivne snošljivosti kod čovjeka, nazvan sustav HLA, jedan je od najistraživanijih genskih sustava. Smješten je na kraćem kraku 6. kromosoma i čine ga antigeni i aleli razreda I, II i III. Zbog izrazitog polimorfizma od iznimnog je značaja u transplantacijskoj medicini, populacijskoj genetici i dijagnostici raznih bolesti. Glavna je uloga sustava HLA razlikovanje vlastitih stanica od tuđih te pokretanje adekvatnog imunološkog odgovora pri kontaktu organizma sa stranim antigenima. Autoimune bolesti nastaju kada dođe do zatajenja te osnovne funkcije imunološkog sustava, odnosno kada organizam na vlastite antigene počne reagirati kao na tuđe. Brojni geni sustava HLA u uskoj su korelaciji s pojavom autoimunih bolesti, poput celijakije, dijabetesa tipa I, bolesti štitnjače i više reumatskih bolesti.

Cilj rada: Prikazati iznimnu važnost sustava HLA u dijagnostici te njegovu povezanost s raznim bolestima među kojima su i autoimune bolesti (reumatoidni artritis, psorijatični artritis, sistemska skleroza, celijakija i brojne druge).

Metode: Laboratoriji za tipizaciju tkiva za određivanje gena i antigena sustava HLA koriste serološke metode i metode molekularne biologije. Za određivanje antigena sustava HLA serološkom metodom koristi se test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT), dok se za određivanje alela sustava HLA molekularnim metodama koriste metode PCR – SSP (lančana reakcija polimerazom s početnicama specifičnih sekvenci) ili PCR – SSO (lančana reakcija polimerazom s oligonukleotidima specifičnih sekvenci.

Zaključak: Određivanje antigena i alela sustava HLA u pacijenata s reumatološkim oboljenjima od iznimne je važnosti u dijagnostici i terapiji pacijenta. Usavršavanjem metoda molekularne biologije svakodnevno se dolazi do novih spoznaja o povezanosti sustava HLA i bolesti.

8. SUMMARY

Introduction: The major histocompatibility complex, named the human leukocyte antigen system, is one of the most researched genetic systems. It is located on the short arm of the 6th. chromosome and it is made of antigens and alleles of class I, II and III. Being highly polymorphic, it is of exceptional importance in fields of transplantation medicine, population genetics and in diagnostics of various diseases. The main role of the HLA system is differentiation between organism's own cells and foreign cells and an adequate initiation of the immune response when in contact with foreign antigens. Autoimmune diseases develop when it comes to failure of the main role of immune system, that is, when an organism fails to recognise its own antigens and starts to react them as to foreign ones, attacking them. Numerous genes of the HLA system are tightly correlated with the development of autoimmune diseases like celiac disease, type I diabetes, thyroid diseases and a number of rheumatic diseases.

Objective: To interpret the extreme importance of the HLA system in disease diagnostics and its correlation to various diseases including autoimmune diseases (rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, systemic sclerosis, celiac disease).

Methods: To determine genes or antigens of the HLA system, tissue typing laboratories use both serological methods and methods of molecular biology. For determination of HLA antigens by serological method the microlymphocitotoxicity test is used (MLCT), while molecular methods for determining the alleles of HLA systems are PCR – SSP (Polymerase Chain Reaction with Specific Sequence Primers) and PCR – SSO (Polymerase Chain Reaction with Specific Sequence Oligonucleotide).

Conclusion: The determination of antigens and alleles of the HLA system in patients with rheumatoid diseases is of exceptional value both in diagnostics and patient's treatment. With the development of molecular biology methods, new findings about the HLA system and its correlation to diseases arise daily.

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNE INFORMACIJE Lucija Žuvela

Prigradica 76, 20271 Blato (Hrvatska)

(+385) 91 536 6427

lucija.zuvela@gmail.com

Datum rođenja 28. 04. 1993. | Državljanstvo hrvatsko

Mjesto rođenja: Split

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2014–2017	**Medicinsko laboratorijska dijagnostika** Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split
2012–2014	**Geodezija** Fakultet građevinarstva, arhitekture i geodezije, Split
2008–2012	**Opća gimnazija Blato** Srednja škola Blato, Blato
2000–2008	**Osnovna škola Blato** Osnovna škola Blato, Blato

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

engleski	C1
njemački	A2
talijanski	A1

Digitalna kompetencija Vješto baratanje paketom MS Office i dobro baratanje određenim programskim alatima za obradu rasterske grafike.