Učestalost dva najčešća podtipa gena HLA-B*27 kod ispitanika Splitsko-dalmatinske županije

Pejić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:176:115284

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

Ivana Pejić

UČESTALOST DVA NAJČEŠĆA PODTIPA GENA HLA-B*27 KOD ISPITANIKA SPLITSKO – DALMATINSKE ŽUPANIJE

Završni rad

Split, 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO-LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivana Pejić

UČESTALOST DVA NAJČEŠĆA PODTIPA GENA HLA-B*27 KOD ISPITANIKA SPLITSKO – DALMATINSKE ŽUPANIJE

INCIDENCE OF THE TWO MOST COMMON SUBTYPES OF HLA-B*27 GENE IN RESPONDENTS OF SPLIT – DALMATIA COUNTY

Završni rad / Bachelor's thesis

Mentor:

doc. dr. sc. Esma Čečuk-Jeličić

Split, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina
Znanstveno polje: Biologija

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

UČESTALOST DVA NAJČEŠĆA PODTIPA GENA HLA-B*27 KOD ISPITANIKA SPLITSKO – DALMATINSKE ŽUPANIJE

Ivana Pejić, 311211

Sažetak:

Uvod: Sustav humanog leukocitnog antigena, koji se još naziva i glavnim kompleksom tkivne podudarnosti, jedan je od najviše opisanih i istraživanih genetskih sustava kod čovjeka. Ima svoj značaj u tome što kodira molekule zadužene za regulaciju imunoloških procesa i predočavanje endogenih i egzogenih antigena imunološkim stanicama (uglavnom limfocitima T). Sustav se nalazi na kratkom kraku kromosoma 6 a podijeljen je u tri razreda, koji su podijeljeni u lokuse. Sustav čini 1% cjelokupnog ljudskog genoma. Gen HLA – B*27 je gen iz razreda I sustava HLA za kojeg je dokazano da posjeduje povezanost sa brojnim autoimunim bolestima, u prvom redu reumatskim bolestima.
Cilj:U ovom radu analizirali smo učestalost najčešćih podtipova gena HLA – B*27 kod ispitanika sa područja Splitsko – dalmatinske županije korištenjem osnovnih statističkih formula i direktnim brojanjem.
Metode: Metode koje se koriste za dokazivanje gena HLA sustava su serološke i molekularne. Serološko testiranje uključuje test mikrolimfocitotoksičnosti, a molekularno testiranje uključuje metode PCR-SSO i PCR-SSP.
Rezultati: Podtip HLA – B*27:02 je bio prisutan kod najvećeg broja naših pacijenata, sa učestalošću od 43%, zatim slijedi HLA – B*27:05 sa nešto manjom učestalošću od 38%. Inače rijeđi alel, HLA – B*27:03, smo uočili kod naših pacijenata u malo većem broju, sa učestalošću od 18%, a iznimno rijedak alel HLA – B*27:08 utvrđen je kod jednog pacijenta (1%).
Rasprava: Proučavanjem učestalosti ustanovljenih alela gena HLA – B*27 u populacijama svijeta možemo reći da je učestalost najviše uočenih alela HLA – B*27:02 i HLA – B*27:05 unutar našeg uzorka jednaka sa učestalostima tih istih podtipova na području Europe. Podtip HLA – B*27:03 je u našem uzorku ustanovljen kod više pacijenata nego što je to bilo za očekivati, s obzirom da je njegova učestalost veća u nekim drugim dijelovima svijeta (Sjeverna Amerika) nego na području Europe. Podtip HLA – B*27:08 zamijećen je kod jednog pacijenta, a promatrajući njegovu svjetsku rasprostranjenost, ima malu zastupljenost na području Europe, osobito Španjolske.
Zaključak: Učestalost dva najčešća podtipa gena HLA – B*27 kod ispitanika na području Splitsko – Dalmatinske županije se ne razlikuje puno od globalne učestalosti najčešćih podtipova.

Ključne riječi: Podtip, Gen HLA – B*27, Učestalost, Bolesti

Rad sadrži: 60 stranica, 28 slika, 9 tablica, 0 priloga, 30 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
University Department for Health Studies
Medical laboratory diagnostics

Scientific area: Biomedicine
Scientific field: Biology

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

INCIDENCE OF THE TWO MOST COMMON SUBTYPES OF HLA-B*27 GENE IN RESPONDENTS OF SPLIT – DALMATIA COUNTY

Ivana Pejić, 311211

Summary:

Introduction: The human leukocyte antigen system, also known as the major histocompatibility complex, has long gone been described in literature, as one of the most researched systems in the field of genetics.. It has its significance in that it encodes molecules responsible for the regulation of immune processes and the presentation of endogenous and exogenous antigens to immune cells (mainly T lymphocytes). It is located on the short tail of the chromosome 6 and is divided into three classes, which are then divided into loci. It makes up for 1% of the entire human genome. The HLA - B * 27 gene, which is a class I gene in the HLA system, has previously been linked to a numerous autoimmune diseases, primearly to reumatoid diseases.
Methods: In this bachelor thesis, the frequency of the most common subtypes of the HLA - B * 27 gene in the population of the Split - Dalmatia County was analyzed with the usage of the basic statistical formulas and direct counting.
The methods used to detect HLA system genes are serological and molecular. Serological testing includes a microlymphocitotoxicity test, and molecular testing includes PCR-SSO and PCR-SSP methods.
Results : The HLA - B * 27: 02 subtype was present in the largest number of our patients, with a frequency of 43%, followed by HLA - B * 27: 05 with a slightly lower frequency of 38%. The otherwise rarer allele, HLA - B * 27: 03, was observed in our patients in a slightly higher number, with a frequency of 18%, and an extremely rare allele HLA - B * 27: 08 was found in one patient (1%).
Disscusion: By studying the frequencies of established alleles of the HLA - B * 27 gene in world populations, we can say that the frequency of the most observed HLA - B * 27: 02 and HLA - B * 27: 05 alleles within our sample is equal to the frequencies of these same subtypes in Europe. The HLA - B * 27: 03 subtype was found in our sample in more patients than expected, as its frequency is higher in some other parts of the world (North America) than in Europe. The HLA - B * 27: 08 subtype was observed in one patient, and observing its worldwide distribution, it has a small representation in Europe, especially in Spain.
Conclusion: The frequency of the two most common subtypes of the HLA - B * 27 gene in subjects in the Split - Dalmatia County does not differ much from the global frequency of the most common subtypes.

Keywords: Subtype, Gene HLA – B*27, Incidence, Diseases

Thesis contains: 60 pages, 28 figures, 9 tables, 0 supplements, 30 references

Original in: Croatian

POPIS KRATICA

MHC – engl. Major Histocompatibility Complex, glavni kompleks tkivne podudarnosti

HLA – engl. Human Leukocyte Antigen, sustav humanog leukocitnog antigena

IHWS – engl. International Hystocompatibility Workshops, Internacionalna radionica histokompatibilnosti

MLCT – engl. Microlymphocitotoxicity Test, test mikrolimfocitotoksičnosti

CDC – engl. Complement – Dependent Citotoxicity, citotoksičnost ovisna o komplementu

PCR – engl. Polymerase Chain Reaction, lančana reakcija polimeraze

PCR-SSO – engl. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Oligonucleotids, lančana reakcija polimerazom sa oligonukleotidama specifičnih sekvenci

PCR-SSP - engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer, lančana reakcija polimerazom sa početnicama specifičnih sekvenci

RFLP - engl. Restriction Fragment Lenght Polymorphism, polimorfizmi dužine restrikcijskih fragmenata

LD – engl. Linkage Disequilibrium, neravnoteža udruživanja (genska)

CREG – engl. Cross-Reactive Epitope Groups, križno reaktivne skupine epitopa

TNF–α – engl. Tumor Necrosis Factor – α, faktor tumorske nekroze α

MS – engl. Multiple Sklerosis, Multipla Skleroza

RA – engl. Reactive Arthritis, Reaktivni artritis

AS – engl. Ankylosing Spondylitis, Ankliozatni spondilitis

ReA – engl. Rheumathoid Arthritis, Reumatoidni artritis

PsA – engl. Psoriatic Arthritis, Psorijatični artritis

RF – engl. Reumatoid Factor, Reumatoidni faktor

EDTA – engl. Ethylenediaminetetraacetic acid, Etilendiamintetraoctena kiselina

DNA – engl. Deoxyribonucleic Acid, Deoksiribonukleinska kiselina

SAPE – engl. Streptavidin – Phycoerytherin, R-fikoeritrin konjugiranog streptavidina

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Povijest glavnog sustava tkivne podudarnosti 1

1.2. Obilježja i funkcije sustava HLA 5

1.2.1. Funkcije sustava HLA 5

1.2.2. Obilježja sustava HLA 6

1.3. Građa molekula HLA 12

1.3.1. HLA razred I 13

1.3.2. HLA razred II 14

1.4. Nomenklatura sustava HLA 16

1.5. Nasljeđivanje gena HLA 18

1.6. Povezanost sustava HLA sa bolestima 19

1.7. Gen HLA – B*27 21

1.7.1. Povezanost gena HLA – B*27 sa bolestima 22

2. CILJ RADA 25

3. MATERIJALI I METODE 26

3.1. Materijali 26

3.2. Metode 26

3.2.1. Serološko određivanje 27

3.2.2. Molekularno određivanje 30

4. REZULTATI 36

4.1. Raspodjela učestalosti određenih podtipova gena HLA – B*27 36

4.2. Raspodjela pacijenata prema njihovoj dobi 39

4.3. Raspodjela pacijenata prema dijagnozi 42

5. RASPRAVA 48

6. ZAKLJUČAK 54

7. LITERATURA 55

8. ŽIVOTOPIS 58

POPIS TABLICA 59

POPIS ILUSTRACIJA 59

1. UVOD

1.1. Povijest glavnog sustava tkivne podudarnosti

Sam početak onoga što je danas poznato kao sustav HLA ili glavni sustav tkivne snošljivosti (MHC, *engl. Major Histocompatibility Complex*) počinje 1901. godine sa otkrićem sustava krvnih grupa na eritrocitima od strane austrijskog znanstvenika Karla Landsteinera, koje je u konačnici potaknulo interes za potragom i pronalaskom sličnog sustava na leukocitima.

35 godina kasnije, Peter A. Gorer je 1936. otkrio nešto što je nazvao Antigen II na eritrocitima miševa, a samo godinu nakon izvijestio je da je taj antigen identičan genu koji kontrolira osjetljivost na sarkom koji se može transplantirati između miševa. Miševi koji nisu imali podudarne alele Antigena II nisu prihvatili transplantirani tumor, tj. odbacili su ga, što dovodi do zaključka da aleli kod oba miša moraju biti isti kako bi transplantacija bila uspješna. (1)

TABLE V.—Anti-albino *Serum No.* 1. *Diluted* 1/10 *Prior to Absorption. Demonstrating Effect of Successive Absorptions. Experiment at* 37° *C.*

Tested on cells of—	Serum absorbed *once* with cells of BLACKS. Diluted up to— 1/40.	1/80.	1/160.	1/320.	Serum absorbed *twice* with cells of BLACKS. Diluted up to— 1/40.	1/80.	1/160.	1/320.
Al. ♂ 149	+++	+	±	−	+++	++	±	−
Al. ♂ 137	++	+	tr.	−	++	+	ft. tr.	−
Al. ♀ 12	+++	++	+	−	+++	++	+	ft. tr.
Ag. ♂ 18	−	−	−	−	−	−	−	−
Ag. ♂ 19	−	−	−	−	−	−	−	−

Tested on cells of—	Serum absorbed *once* with cells of AGOUTIS. Diluted up to— 1/40.	1/80.	1/160.	1/320.	Serum absorbed *twice* with cells of AGOUTIS. Diluted up to— 1/40.	1/80.	1/160.	1/320.
Al. ♂ 149	+++	+	tr.	−	+	ft. tr.	−	−
Al. ♂ 137	++	+	tr.	−	tr.	ft. tr.	−	−
Al. ♀ 12	+++	++	+	−	+	tr.	−	−
Ag. ♂ 18	−	−	−	−	−	−	−	−
Ag. ♂ 19	−	−	−	−	−	−	−	−

Al. = Albino. Ag. = Agouti.

Slika 1. Otkriće antigena II

(Preuzeto sa: https://www.immunopaedia.org.za/immunology/historical-fun-facts/history-of-mhc-1901-1970/)

1948. godine Gorer, Lyman i Snell objavili članak u kojem su dokazali da je antigen koji je prisutan u tumorima dva soja ispitivanih miševa identičan prethodno otkrivenom Antigenu II te da je glavni čimbenik uspješnosti prihvaćanja presađenog tkiva. Gen je dobio ime H2, gdje je H skraćenica za histokompatibilnost, a brojka 2 označava Antigen II. Ovo su postali prvi obrisi onoga što danas poznajemo kao sustav HLA ili MHC. (1)

TABLE 5. THE SEGREGATION OF FUSED IN VARIOUS BACKCROSSES

tumour-susceptible grandparent	sex of F_1	fused	normal
A	♂	77	104
dba	♂	26	17
dba	♀	12	21

TABLE 6. LINKAGE OF H_2^d TO FUSED, TESTED WITH *dba* TUMOUR

	response to tumour		
phenotype of mouse	+	−	total
fused	5	33	38
normal	35	3	38
totals	40	36	76

TABLE 7. SURVIVAL TIMES OF BACKCROSS TO *P* STOCK

	survival time (weeks)							
	2	3	4	5	6	12	17	total
normal mice	2	18	9	5	1	0	0	35
fused mice	0	1	1	0	1	1	1	5
total	2	19	10	5	2	1	1	40

(2) *With* dba *tumour P* 1534

Slika 2. Tablica koja prikazuje rani sustav H2

(Preuzeto sa: https://www.immunopaedia.org.za/immunology/historical-fun-facts/history-of-mhc-1901-1970/)

Glavni kompleks tkivne podudarnosti ima svoj značaj u tome što nije prisutan samo kod životinja nego i kod ljudi. U usporedbi sa nekoliko alela koji su bili prepoznati 1948. godine, danas postoji preko 30 000 opisanih alela unutar sustava HLA, uključujući klasične i neklasične lokuse, a ta brojka iz godine u godinu stalno raste. Sam sustav HLA otkrili su davne 1958. godine Jean Dausset, Jon van Rood i Rose Payne. Upravo su oni svojim istraživanjima su prvi opisali antitijela pronađena u serumima višerotkinja, kao i kod pacijenata koji su primili veći broj transfuzija krvi. Zbog toga što je otkriven na leukocitima čovjeka, ovaj sustav je nazvan HLA, odnosno sustav humanih leukocitnih antigena (*engl. Human Leukocyte Antigen*). Unutar kasnijeg projekta mapiranja ljudskog genoma, regija HLA gena je prva koja je u potpunosti bila sekvencionirana, gdje se saznalo da zauzima područje od oko 4 milijuna parova baza što čini oko 1% ljudskog genoma.

Ubrzo su otkriveni i mnogi drugi antigeni unutar ovog novog sustava, što je izazvalo potrebu za međunarodnom suradnjom kako bi se mogli usporediti dobiveni rezultati, korištene tehnike i reagensi među pojedinim znanstvenicima i njihovim otkrićima. Tako je osnovan IHWS (*engl. International Hystocompatibility Workshops*) od strane Bernarda Amosa, a 1964. godine je održan prvi sastanak. Tokom prvog sastanka uspoređivale su se tehnike dokazivanja antigena HLA, s obzirom da su različiti laboratoriji koristili različite tehnike. Neke od tehnika uključivale su leukoaglutinaciju, miješanu aglutinaciju, idirektni antiglobulinski test, test fiksacije komplementa i test mikrocitotoksičnosti. Ovo je dovelo do početka veoma produktivne internacionalne kolaboracije što je iznimno doprinjelo daljnjem definiranju HLA lokusa sa njegovim mnogobrojnim alelima. U zanosu dosadašnjih spoznaja pokrenuto je mnogo studija o antropološkom značaju HLA polimorfizama, kliničkom značaju povezanosti lokusa HLA sa bolestima, utjecaju podudarnosti gena HLA donora i primatelja, određivanju antitijela u pojedinim organima te o transplantaciji krvotvornih matičnih stanica (1).

Jon van Rood organizirao je drugi sastanak 1965. godine, a cilj mu je bio genetska analiza do tada poznatih antigena. Nerki su istraživači koristili test mikrolimfocitotoksičnosti (*engl. Microlymphocitotoxicity test*, MLCT) , kojeg su godinu dana prije, odnosno 1964. razvili Paul Terasaki i John McClelland. Poznat je i kao test citotoksičnosti koji je ovisan o komplementu (CDC, *engl. Complement - Depended Cytotoxicity*). Kasnije ovaj test postaje standardna serološka tehnika za dokazivanje i tipizaciju HLA i križanje u kliničkoj transplantaciji tkiva.

Treći sastanak je organizirao talijanski genetičar Ruggiero Ceppellini 1967. godine, a bio je posvećen izučavanju povezanosti antigena HLA i bolesti. Do danas su znanstvenici uspješno povezali više od 100 autoimunih bolesti, kao i malignih i infektivnih bolesti sa genima unutar HLA lokusa. Do sada je organizirano 18 ovakvih radionica, a zadnja je bila palnirana za svibanj 2021. godine.

Ceppellini, Amos, van Rood i Dausset su svojim radovima dokazali da je HLA sustav vrlo bitan za preživljavanje transplantiranog organa. 1967. godine je van Rood dobio ideju o osnivanju Eurotransplanta koji kasnije pravno utemeljen 12. svibnja 1969. godine. Zbog otkrića sve većeg broja antigena 1968. godine je osnovan i odbor za nomenklaturu koji je odgovoran za dodjelu službenih imena gena i antigena HLA sustava, a operativan je i danas.

1977. godine Julia i Walter Bodmer su definirali HLA-D i HLA-DR lokus, a 1980. je objavljena prva slika genske regije HLA, koja se nalazi na kratkom kraku kromosoma 6 sa genima lokusa HLA-A, HLA-B i HLA-C koji imaju jako izraženi polimorfizam, a kodiraju antigene na svim stanicama sa jezgrom i trombocitima. Produkti gena HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP se nalaze na limfocitima B i na antigen-predočnim stanicama – monocitima i dendritičkim stanicama. S obzirom da se nalaze na svim stanicama vezanim za imunitet čovjeka, geni HLA igraju važnu ulogu kod imunološkog odgovora i razlikovanja „vlastitog od stranog“.

Kary Mullis i suradnici su sredinom osamdesetih shvatili kako mogu započeti i zaustaviti djelovanje enzima polimeraze na jednolančanu molekulu DNK te su utemeljili osnove tehnike lančane reakcije polimerazom (*engl. Polymeraze Chain Reaction*, PCR). Pomoću tehnike PCR moguće je višestruko replicirati ciljne odsječke DNK veličine 100 do 30 000 parova baza kada znamo koji djelić DNK želimo umnožiti. Otkad je otkrivena, tehnika PCR se odmah počela primjenjivati u svrhu molekularnog testiranja gena HLA. Prve studije polimorfizama gena HLA bile su zasnovane na analizi polimorfizama dužine restrikcijiskih fragmenata (engl. RFLP, *Restriction Fragment Lenght Polymorphism*). RFLP je tehnika koja proučava i koristi varijacije unutar homolognih DNK sekvenci tako da bi se međusobno mogli razlikovati pojedinci, populacije i vrste ili kako bi se odredila lokacija određenog gena unutar sekvence.

Uvođenje tehnika tipizacije koje su zasnovane na principima PCR i pojava cijenom pristupačnih komercijalnih kitova devedesetih je imalo značajni utjecaj na dosadašnje poznavanje važnosti različitih varijacija unutar genskih lokusa HLA sustava.

1.2. Obilježja i funkcije sustava HLA

1.2.1. Funkcije sustava HLA

Sustav HLA sadrži velik broj gena koji sudjeluju u imunološkoj reakciji. Njegove funkcije unutar organizma su mnogobrojne, ali one koje imaju najveći značaj su:

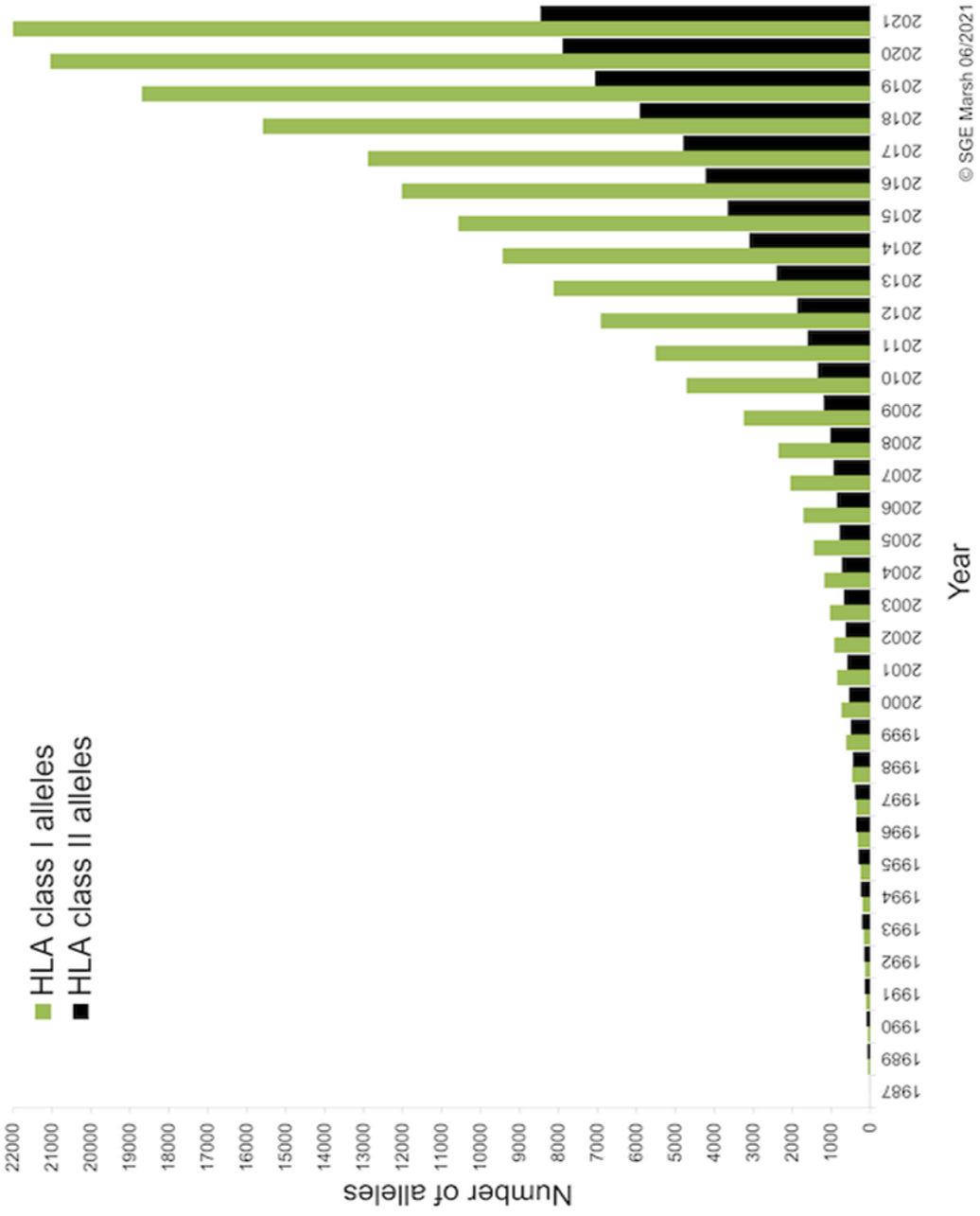
a) Regulacija imunološkog prepoznavanja stranog imunogena
b) Kontrola interakcije i suradnje stanica tijekom imunološke reakcije
c) Regulacija proizvodnje specifičnih antitijela, komplementa i ostalih medijatora imunološke reakcije
d) Kontrola sinteze tkivnih antigena

Molekule HLA tokom imunoloških procesa predočavaju antigene imunološkim stanicama, limfocitima T, koje tada reagiraju u korist ili u nekim slučajevima, protiv koristi organizma što pokreće adaptivni imunološki odgovor. T stanica tada prepoznaje molekulu HLA i peptid kojeg ona predstavlja, razaznajući vlastite od stranih peptida, što predstavlja sposobnost ograničavanja odgovora T stanica na strani imunogen. Isto tako molekule HLA imaju glavnu ulogu u sazrijevanju limfocita T u timusu djelovanjem procesa pozitivne i negativne selekcije kojom je osigurano preživljavanje samo onih stanica koje adekvatno prepoznaju i razlikuju vlastite molekule HLA od onih stranih koje trebaju vezati sa velikim afinitetom. Limfociti T posjeduju specifični receptor za antigen i njime prepoznaju kompleks od dva antigena : prerađeni strani antigen (kojeg bi, u korist organizma, trebali jako vezati) i vlastiti antigen tkivne podudarnosti (kojeg bi trebali što manje vezati). Svaka molekula HLA ima samo jedno mjesto za antigeni peptid za koje se mogu vezati različiti antigenski peptidi, ali u jednom trenutku samo jedan. (17)

Na površini svih membrana stanica prisutne su različite bjelančevine koje u stranom organizmu mogu potencijalno dovesti do imunološke reakcije, odnosno za taj organizam oni imaju djelovanje antigena. Podjela antigena je na slabe i jake , ovisno o njihovoj imunoregulacijskoj ulozi. (17)

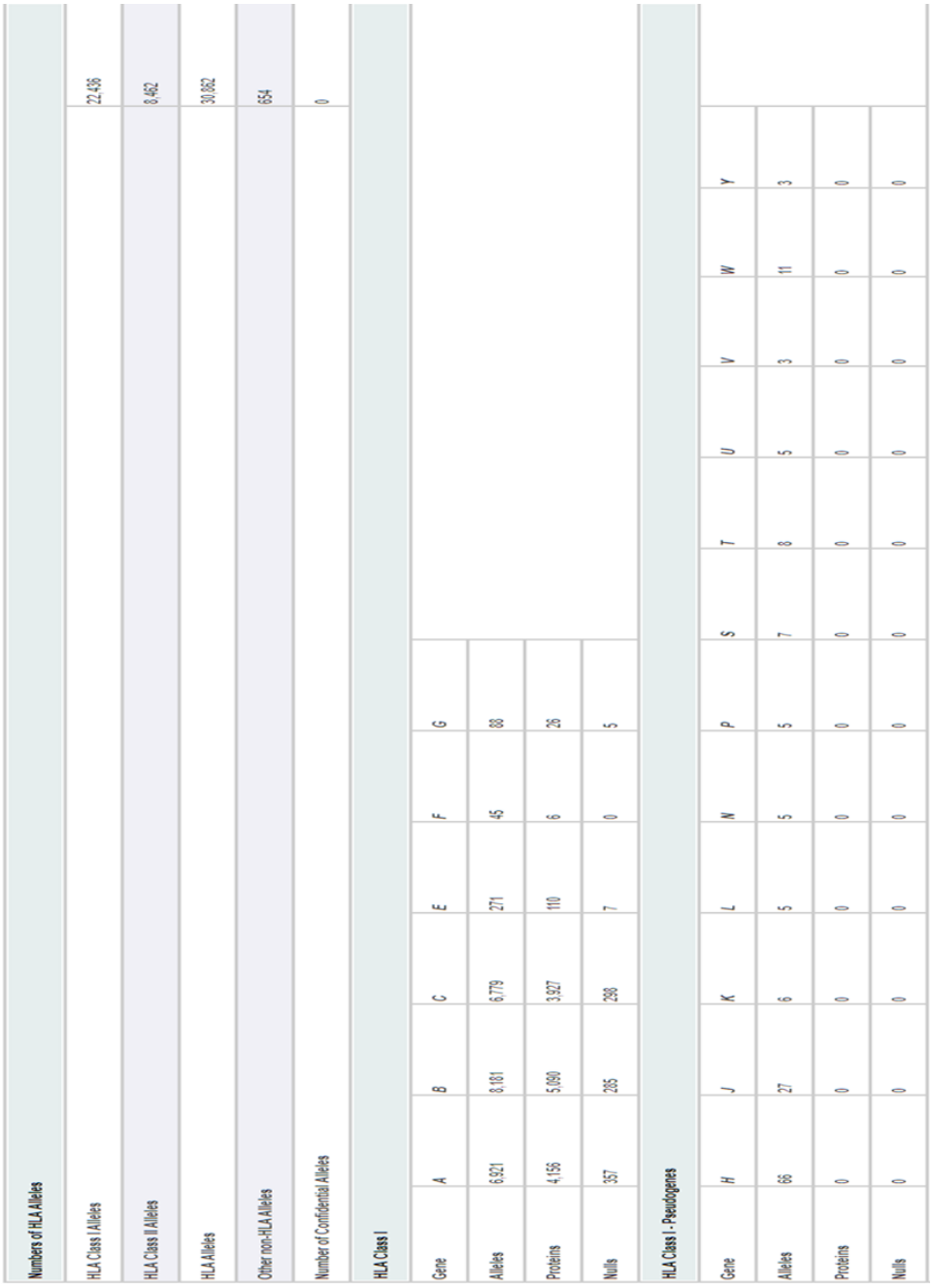
1.2.2. Obilježja sustava HLA

Najbitnije obilježje sustava je njegov polimorfizam, odnosno postojanje velikog broja alela na lokusima ali i samih lokusa. Aleli ili alelomorfi su različiti oblici gena koji određuju istu osobinu jedinke. Uvijek zauzimaju identično mjesto na dvama homolognim kromosomima i zajedno su gen koji ima svoj određeni lokus na kromosomu. Homologni kromosomi nose gene za ista svojstva, ali zbog polimorfizma, nisu genetički identični. Za sada su dana dva moguća objašnjenja za velik broj polimorfizama sustava HLA. Prvo je da se sustav razvijao brže nego drugi genetski sustavi, a drugo kaže da je ova pojava najvjerojatnije posljedica prirodne selekcije koja se događala svaki put kada bi jedinka došla u kontakt sa nečim nepoznatim. U kontaktu sa uzročnikom (bakterija, virus i sl.), stvarali su se aleli HLA koji bi se kasnije probirali i ostali bi oni koji su najbolje prepoznavali antigene i koji su bili najuspješniji u imunološkoj obrani. Zbog toga je sustav HLA prepoznat kao najraznovrsniji genetski sustav u čovjeka. Broj alela koji su otkriveni do danas, po zadnjim podatcima sa http://hla.alleles.org (ažurirani 7. srpnja 2021.g.) prikazani su u Tablici 1. i Tablici 2., dok na sljedećoj slici možemo vidjeti postepeni porast broja novootkrivenih alela razreda I i II do kraja 2020. godine.



Slika 3. Grafikon prikazuje broj imenovanih alela sustava HLA od 1987. do 2021. g.

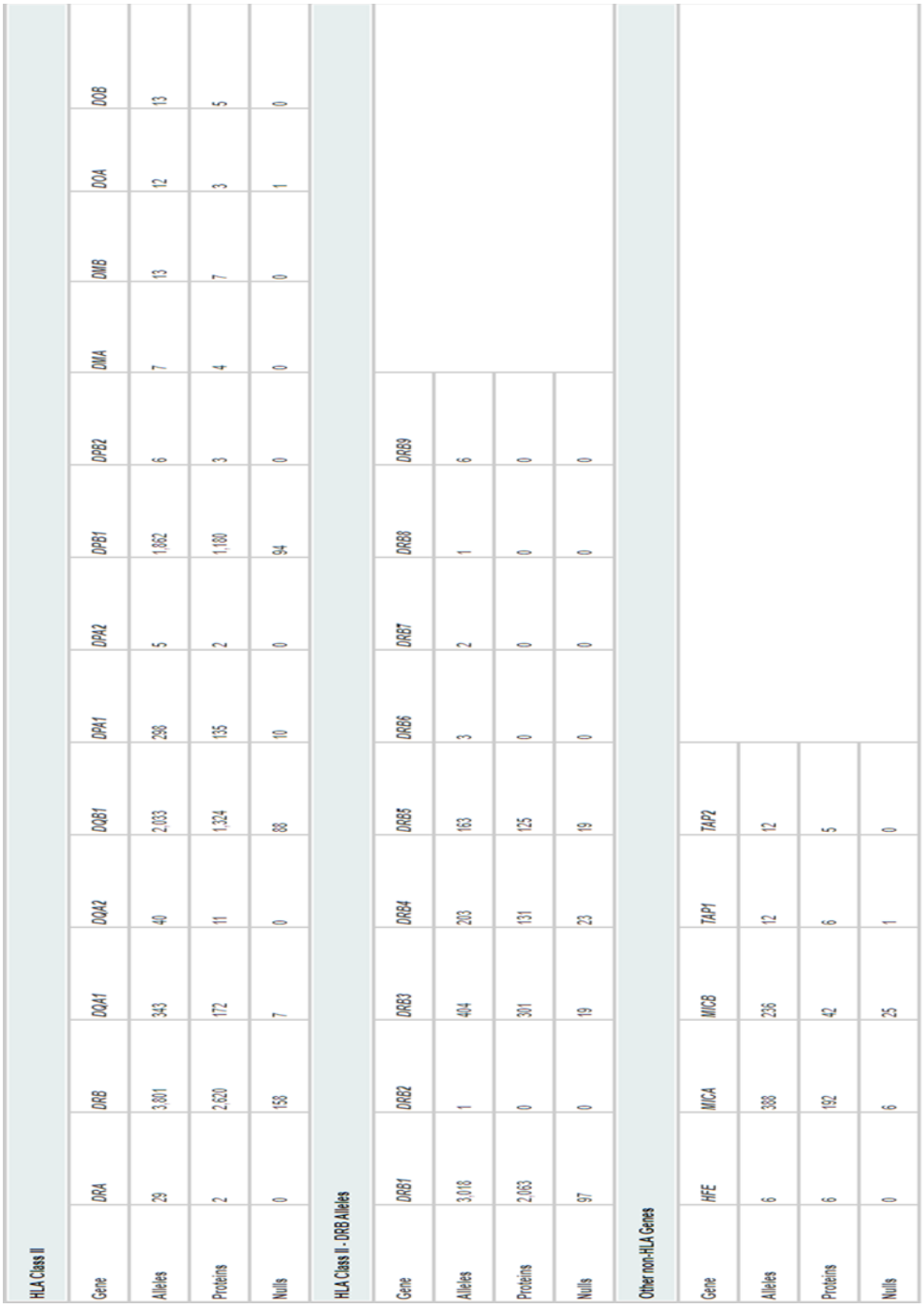
(Preuzeto sa : http://hla.alleles.org)



Numbers of HLA Alleles																							
HLA Class I Alleles	22,436																						
HLA Class II Alleles	8,462																						
HLA Alleles	30,862																						
Other non-HLA Alleles	654																						
Number of Confidential Alleles	0																						
HLA Class I																							
Gene		A	B	C	E	F	G																
Alleles		6,921	8,181	6,779	271	45	88																
Proteins		4,156	5,090	3,927	110	6	26																
Nulls		357	285	298	7	0	5																
HLA Class I - Pseudogenes																							
Gene	H	J	K	L	N	P	S	T	U	V	W	Y											
Alleles	66	27	6	5	5	5	7	8	5	3	11	3											
Proteins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
Nulls	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											

Slika 4. Prvi dio tablice koja prikazuje sveukupni broj otkrivenih gena i alela sustava HLA i HLA razred I

(Preuzeto sa: http://hla.alleles.org)



HLA Class II													
Gene	DRA	DRB	DQA1	DQA2	DQB1	DPA1	DPA2	DPB1	DPB2	DMA	DMB	DOA	DOB
Alleles	29	3,801	343	40	2,033	298	5	1,862	6	7	13	12	13
Proteins	2	2,620	172	11	1,324	135	2	1,180	3	4	7	3	5
Nulls	0	158	7	0	86	10	0	94	0	0	0	1	0

HLA Class II - DRB Alleles									
Gene	DRB1	DRB2	DRB3	DRB4	DRB5	DRB6	DRB7	DRB8	DRB9
Alleles	3,018	1	404	203	163	3	2	1	6
Proteins	2,063	0	301	131	125	0	0	0	0
Nulls	97	0	19	23	19	0	0	0	0

Other non-HLA Genes					
Gene	HFE	MICA	MICB	TAP1	TAP2
Alleles	6	388	236	12	12
Proteins	6	192	42	6	5
Nulls	0	6	25	1	0

Slika 5. Drugi dio tablice koja prikazuje gene HLA razreda II i ostale nesvrstane gene

(Preuzeto sa: http://hla.alleles.org)

Sljedeće obilježje je nepravilna tkivna zastupljenost. Unutar različitih tkiva molekule HLA su zastupljene različitim intenzitetom. U najvećem broju ih ima na limfnom tkivu i staničnim membranama organa i tkiva koji sudjeluju u imunološkoj reakciji, dok su u najmanjem broju prisutne unutar mišićnog i masnog tkiva, kao i središnjeg živčanog sustava.

Rekombinacija homolognih kromosoma, ili *crossing-over* je izmjena dijelova nesestrinskih kromatida sa njihovim pripadajućim genima. Iako je prisutna, rekombinacija na HLA regiji je rijetka, jer su udaljenosti između lokusa HLA vrlo male, a poznato je da se crossing-over događa češće kod udaljenijih lokusa.

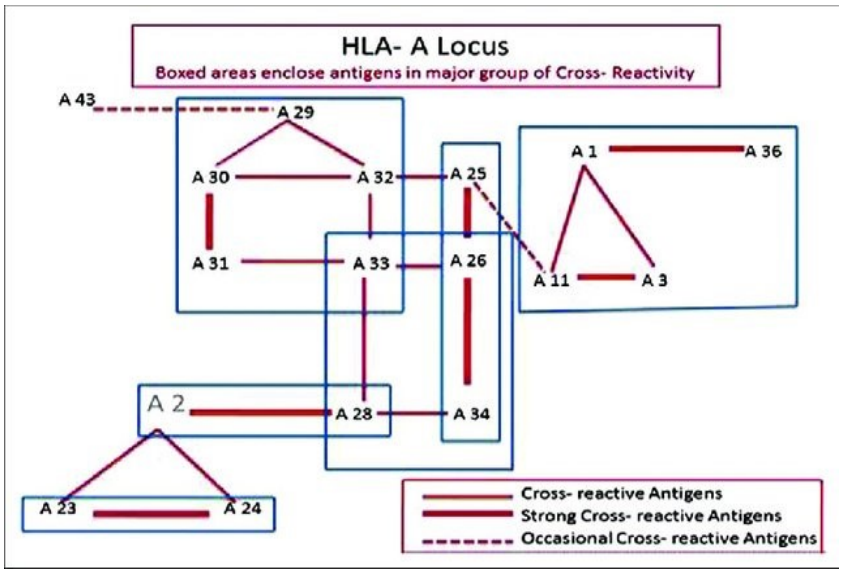
Segregacija gena HLA je pravilna i podliježe Mendelovim zakonima nasljeđivanja.

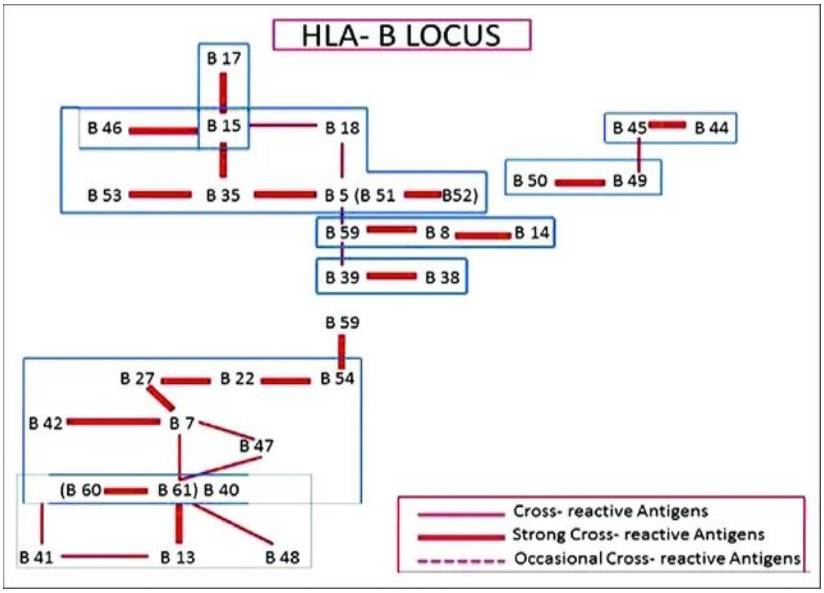
Osobitost sustava HLA je genska neravnoteža udruživanja (LD, *engl. Linkage Disequilibrium*), zbog koje se različiti aleli dva ili više usko vezanih lokusa javljaju češće u istom haplotipu nego što je to očekivano s obzirom na njihovu pojedinačnu učestalost.

Jedna od osobina je i križna reaktivnost, tj. postojanje križno – reaktivnih skupina epitopa (CREG, *engl. Cross-Reactive Epitope Groups*). Križno reaktivni geni HLA dijele važne strukturne elemente ali i dalje imaju svoj pojedinačni integritet. (Slika 6.)

Sustav HLA ukazuje i na osobitosti pojedinih populacija. Rasprostranjenost i zastupljenost pojedinih alela HLA značajno se razlikuje između pojedinih etničkih skupina i populacija, u smislu da se unutar pojedine skupine i populacije javlja samo dio alela ili haplotipova ili ih uopće nema. (18)

Uloga sustava HLA u transplantacijskoj medicini je ključna iz tog razloga što je za uspješnu transplantaciju organa i krvotvornih matičnih stanica potrebno poklapanje gena HLA donora i primatelja kako bi primateljevo tijelo prihvatilo donirani organ ili tkivo kao da je poteklo od njegovog tijela. Predtransplantacijska obrada uključuje testove tipizacije alela HLA primatelja i darivatelja, određivanje broja i vrste protutijela HLA u serumu primatelja, te križnu reakciju između primatelja i davatelja. (2)





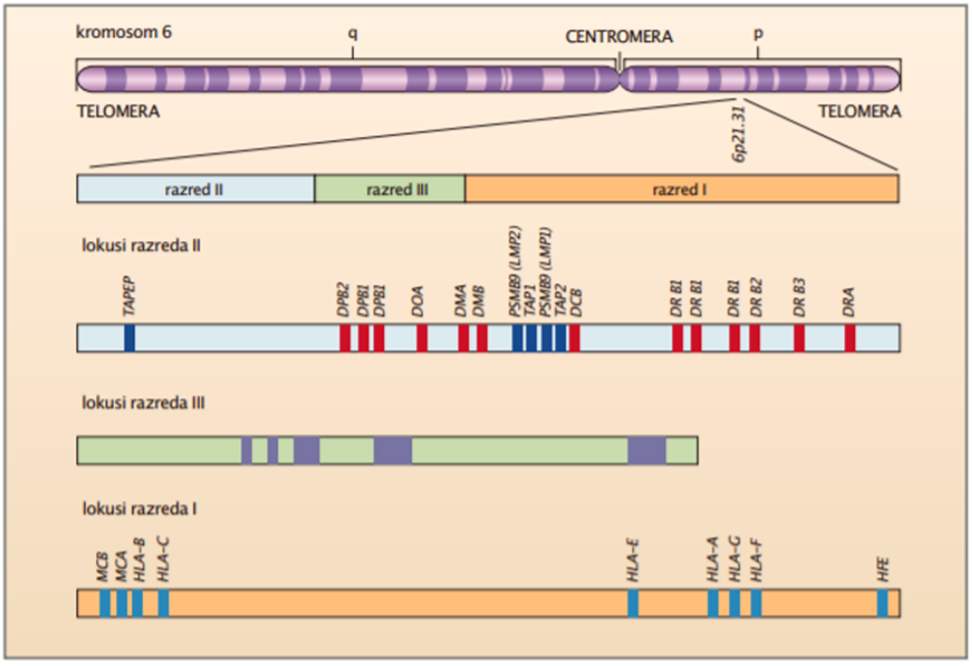
Slika 6. Križno – reaktivne skupine HLA lokusa A (gore) i HLA lokusa B (dolje)

(Preuzeto sa:
https://www.researchgate.net/publication/319647129_The_human_leukocyte_antigen_system_simplified/figures?lo=1)

1.3. Građa molekula HLA

Geni koji kodiraju sustav HLA se kod čovjeka nalaze na kratkom kraku kromosoma 6 (odsječak 6p21.1 – 21.3), te su podijeljeni u tri razreda : I (lokusi A, B i C), II (lokusi DP, DQ i DR) i III (geni koji uglavnom kodiraju komponente komplementa). Unutar pojedinih razreda postoje i druge skupine ili podregije. Tako se razred I djeli na klasičnu (A, B i C), neklasičnu (E, F i G) i pseudogensku ili djelomičnu skupinu (H, J, K i L), a razred II zapravo ima šest podregija (DM, DO, DN, DP, DQ i DR). Razred I je smješten najbliže telomeri, razred II najbliže centromeri, a razred III je smješten u sredini. (17)

Geni unutar HLA razreda I prezentiraju endogene antigene, a geni unutar razreda II prezentiraju egzogene antigene. Geni koji se nalaze unutar razreda III kodiraju komponente komplementa, faktor tumorske nekroze α (*engl. Tumor Necrosis Factor – α*, TNF – α) i proteine toplinskog šoka. Geni unutar ovog razreda nemaju središnju imunoreakcijsku ulogu kao razred I i II.



Slika 7. Položaj HLA lokusa na kromosomu 6

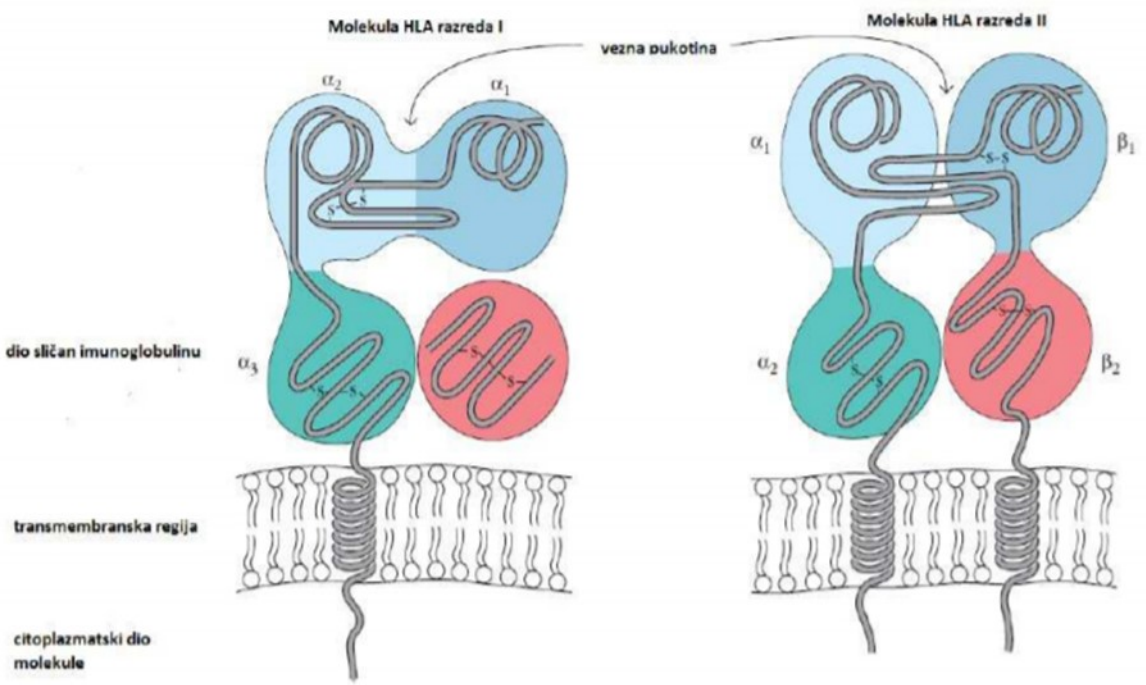
(Preuzeto sa : https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A588/datastream/PDF/view)

1.3.1. HLA razred I

Molekule HLA razreda I su heterodimerni glikoproteini vezani za membranu gotovo svake stanice koja posjeduje jezgru. Sastoje se od dva polipeptidna lanca , α i β, koji su međusobno povezani kovalentnim vezama. Sveukupna građa molekule posjeduje tri dijela: citoplazmatski, transmembranski i izvanstanični dio sa 3 domene α1, α2, α3 i β domenom. Izvanstanični ili ekstracelularni dio se još može podijeliti na dio sličan imunoglobulinu sačinjen od α3 domene, na β domenu koju još nazivamo β2 mikroglobulin, dio koji veže peptid sačinjen od α1 i α2 domene, i vezno mjesto za peptide, odnosno pukotinu, koja je ujedno i najpolimorfniji dio molekule koji može vezati veliki broj antigena veličine 7 do 11 aminokiselina. α lanac, koji se naziva teški lanac, kodiran je genima unutar regije HLA razreda I (HLA – A, HLA – B i HLA – C) na kromosomu 6, dok je β2 mikroglobulin, tj. laki lanac, kodiran genima na kromosomu 15. Teški lanac je podložan mutacijama, točnije izmjenama slijedova baza, te je zato promjenjivi dio molekule uvjetovan polimorfizmima gena koji ga kodiraju, pogotovo u području pukotine. Molekula je pričvršćena za membranu stanice samo samo α lancem, i to sa njegovom α3 podjedinicom. Laki lanac, koji je ujedno i topiv u vodi, nepolimorfni je dio molekule koji služi za njezinu stabilnost i učvrščivanje, pa kao takav ne sudjeluje u imunološkim reakcijama. α3 domena reagira sa staničnim receptorom cijepajući membranu papainom (proteolitički enzim) te se tako veže na vezno mjesto CD8+ citotoksičnih stanica T. Nakon razgradnje antigena na peptide unutar stanice i sinteze HLA molekule, prerađeni dio antigena se veže unutar utora koji se stvori preklapanjem α1 i α2 domene molekule te takav bude prezentiran na površini CD8+ citotoksičnih T stanica, koji se onda određenim afinitetom vežu za strani antigen i površinu HLA molekule mehanizmom spregnutog prepoznavanja. Na ovaj način molekule HLA razreda I prezentiraju endogene (citosolno izvedene) antigene. Tada kad su peptidi patogene prirode, npr. tumorski ili virusni, to može rezultirati imunološkim odgovorom, a naposlijetku i ubijanjem zaražene stanice. (18)

1.3.2. HLA razred II

Molekule HLA razreda II su, slično kao i molekule HLA razreda I, heterodimerni glikoproteini vezani većinski za membrane dendritičkih stanica, makrofaga i limfocita B, odnosno antigen prezentirajućih stanica, kao i na CD4+ pomoćničkim T limfocitima koji proizvode protutijela za adekvatne antigene. Sastoje se od dva polipeptidna polimorfna lanca α i β koji su povezani nekovalentnim vezama. U usporedbi sa HLA razredom I, i α i β lanac su kodirani genima unutar regije HLA razreda II. Oba lanca imaju po dvije domene, α1 i α2 te β1 i β2. Teški lanac α kodiran je A genima (npr. HLA – DRA1), a laki lanac β B genima (npr. HLA – DPB1). Jednako kao i razred I, molekula HLA razreda II posjeduje citoplazmatski, transmembranski i izvanstanični dio. Ekstracelularni dio se još može podijeliti na dio sličan imunoglobulinu (α2 i β2 domene) koji se nalazi bliže površini stanice, dio koji veže peptid (α1 i β1 domene) koji je udaljeniji od stanice, i na pukotinu, tj. vezno mjesto za strane peptide koje nastaje preklapanjem α1 i β1 domene. U ovom slučaju utor je na oba kraja otvoren, što omogućuje vezanje većih i dužih peptida sastavljenih od 10 do 30 aminokiselina. Ovaj dio molekule je njen najpolimorfniji dio i najpodložniji je izmjenama i mutacijama, što znači da su domene α1 i β1 promjenjivi dio molekule dok su α2 i β2 nepromjenjivi dio molekule. Na β2 domenu se vežu pomoćnički T limfociti. Nakon ulaska stranog antigena u organizam, on tada biva fagocitiran i razgrađen do peptida veličine 10 do 30 aminokiselina. U isto vrijeme dolazi do sinteze HLA molekula koje tada mogu vezati te peptide kako bi ih mogle „pokazati“ CD4+ pomoćnićkim T limfocitima što izazove imuni odgovor, kao i aktivaciju B limfocita koji proizvode antitijela i aktivaciju citotoksičnih T stanica. Na ovaj način molekule HLA razreda II prezentiraju izvastanične (egzogene) antigene koji su ušli u organizam, za razliku od molekula HLA razreda I koje prezentiraju antigene koji nastaju unutar organizma. (18)



Slika 8. Prikaz građe molekula HLA razreda I (lijevo) i razreda II (desno)

(Preuzeto sa : https://repozitorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A699/datastream/PDF/view)

1.4. Nomenklatura sustava HLA

1968. godine je osnovan Odbor za nazivlje HLA sustava pod pokroviteljstvom Svjetske zdravstvene organizacije (*engl. The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*), koji obavlja funkciju dodjeljivanja adekvatne službene nomenklature za pojedini novootkriveni gen ili antigen sustava HLA. Prije imenovanja sve nove sekvence prolaze kroz vrlo stroge analize i kontrole koje uključuju različite metode dokazivanja gena i antigena u niskoj i visokoj rezoluciji. Ako se utvrdi da je predložena sekvenca nova i do sada neotkrivena, ona se zajedno sa svojim imenom objavljuje u bazi podataka IPD – IMGT/HLA Database.

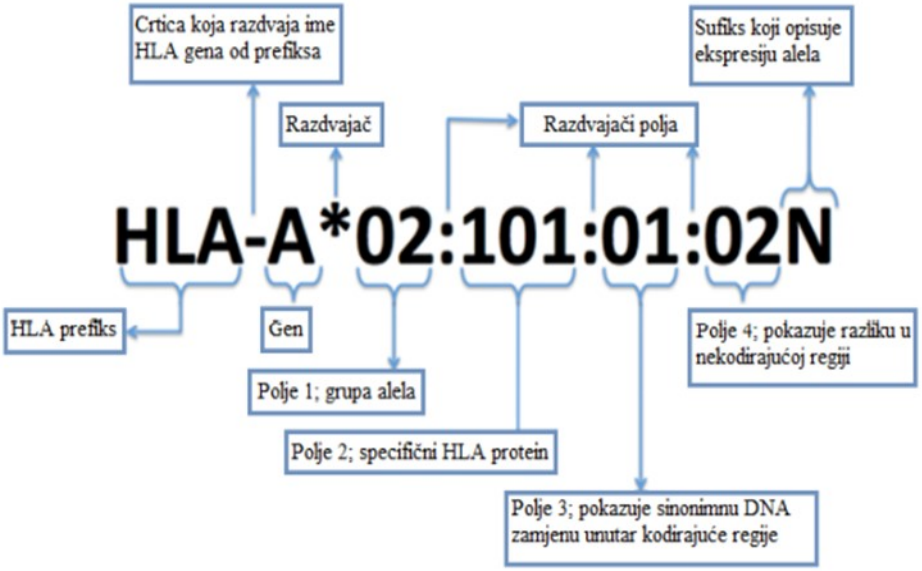
Do travnja 2010. godine korišteni su stariji principi nomenklature koji su uvedeni 90-ih. Međutim, promijenjeni su jer stara nomenklatura nije više mogla prihvatiti sve veći broj novih alela, čiji se broj danas popeo na preko 31 000.

Svaki naziv pojedinog HLA alela posjeduje jedinstveni broj koji se sastoji od najviše četiri skupa znamenki koje su odjeljene dvotočkama. Duljina oznake alela ovisi o specifičnoj sekvenci alela i njegovom najbližem srodniku. Svi aleli posjeduju najmanje četiri znamenke unutar svog naziva, što odgovara prvim dvama setovima znamenki, a dulji nazivi sa više znamenki i oznakama se dodjeljuju samo kada je to nužno.

Prva stavka u imenu je prefiks HLA koji označava sustav u kojem se nalazi gen. Nakon toga slijedi crta koja razvaja ime HLA gena od prefiksa. Zatim u nazivu imamo slovo ili slova koja reprezentiraju ime gena (npr. A, B, DR), a nakon toga dolazi separator u obliku zvijezdice koji odvaja gen od polja koja brojčano opisuju alele. Brojevi koji se nalaze u prvome polju (prije prve dvotočke) opisuju alelnu skupinu, koja najčešće odgovara specifičnom serološkom antigenu a dobivaju se metodom niske rezolucije. Polje nakon prve dvotočke (drugo polje) sadrži brojeve koji opisuju podtip alela, a dodijeljen je prema specifičnom redosljedu određenih DNA sekvenci. Aleli koji imaju različite znamenke u prva dva polja se moraju razlikovati u jednoj ili više nukleotidnih supstitucija, tj. moraju imati drugačiji redosljed aminokiselina unutar kodiranog proteina. Treće polje sadrži brojeve koji prikazuju mutacije unutar kodirajuće regije (egzoni), a četvrto polje unutar nekodirajuće regije (introni). Četvrto polje često može posjedovati određeni sufiks koji se koristi za opis ekspresije alela.

Aleli za koje je dokazano da nemaju ekspresiju na površini stanice imaju sufiks „N“, koji dolazi do „null“, odnosno nule. Aleli koji mogu imati alternativnu ekspresiju, tj. drugačiju od normalne, mogu imati neki od sufiksa : „L“, „S“, "C“, „A“ ili „Q“.

Sufiks „L“ se koristi za označavanje alela za kojeg je dokazano da ima nisku (*engl. Low*) ekspresiju na površini stanice u odnosu na normalne razine ekspresije. Sufiks „S“ označava alel sa specifičnim proteinom koji se izlučuje (*engl. Secreted*) u obliku otopljene molekule, ali nije prisutan na površini stanice. „C“ sufiks se dodjeljuje onim alelima koji proizvode proteine prisutne u Citoplazmi ali ne i na površini stanice. „A“ sufiks označava aberantnu, odnosno abnormalnu ekspresiju gdje postoji sumnja ili nije poznato da li je protein uopće prisutan na površini, tj. da li alel uopće posjeduje ekspresiju. Konačno, sufiks „Q“ označava upitnu ekspresiju alela u smislu mutacije za koju je ranije utvrđeno da ima velik utjecaj na zastupljenost normalnih razina proteina na membrani stanice za druge alele, ali za konkretan alel nije još potvrđena pa ostaje upitna (*engl. Questionable*). (12, 9)

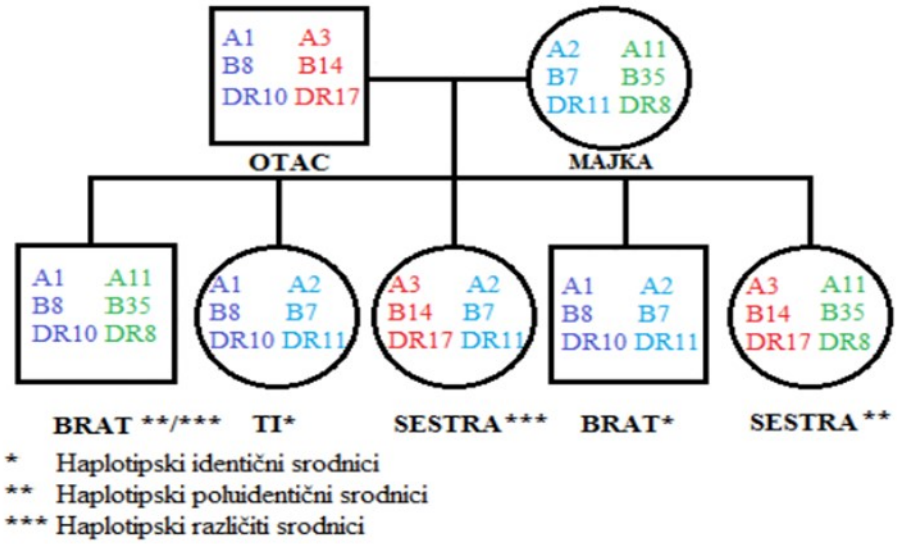


Slika 9. Nomenklatura sustava HLA

(Preuzeto i prilagođeno prema : http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html)

1.5. Nasljeđivanje gena HLA

Geni unutar sustava HLA se nasljeđuju od oba roditelja kodominantno u obliku HLA haplotipa. Haplotip HLA se nasljeđuje prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Od svakog roditelja dijete dobije po jednu kobinaciju gena na jednom kromosomu. Postoje 3 moguća ishoda nasljeđivanja gena HLA za buduće potomke. Među srodnicima postoji 25%-tna vjerojatnost nasljeđivanja haplotipa identičnom onom od roditelja, što bi ih učinilo HLA haplotipski identičnim srodnicima. Ovakav ishod je vrlo pogodan ako je jednom od identičnih srodnika potrebna transplantacija krvotvornih matičnih stanica. U drugom slučaju srodni potomci posjeduju 50% šanse da naslijede samo po jedan identičan haplotip od oba roditelja, što ih čini haplotipski poluidentičnim srodnicima. U zadnjem slučaju srodni potomci imaju šansu od 25% da se njihov genetički HLA materijal ne poklapa jer su naslijedili oba različita haplotipa od oba roditelja, stoga ih to čini haplotipski različitim srodnicima i između njih nije moguće izvesti transplantaciju krvotvornih matičnih stanica. (Slika 10.)



Slika 10. Princip nasljeđivanja gena HLA

(Preuzeto sa : https://repo.ozs.unist.hr/islandora/object/ozs%3A338/datastream/PDF/view)

1.6. Povezanost sustava HLA sa bolestima

S obzirom da molekule HLA imaju važnu ulogu unutar imunološkog sustava pojedinca, logično je i da je njihova povezanost sa bolestima, pogotovo onima autoimunog karaktera, snažno prisutna već više od 50 godina. Autoimune bolesti, npr. multipla skleroza (MS), reumatoidni artritis (RA), ankliozatni spondilitis (AS) i mnoge druge pogađaju više od 5% svjetske populacije. Kada osoba oboli od autoimune bolesti, njezino tijelo stvara autoantitijela protiv vlastitih antigena, što dovodi do manifestacije različitih simptoma i stanja različitog intenziteta, a u najgorem slučaju može dovesti do autoimunog uništenja organa ili tkiva zbog limfocitne infiltracije i aktivacije određenih imunoloških procesa (npr. uništenje β-stanica gušterače kod šećerne bolesti tipa 1). HLA regija je, u usporedbi sa drugim regijama unutar ljudskog genoma, povezana sa najviše bolesti koje su uglavnom imunološke prirode, a svakim danom se otkrivaju nove povezanosti i korelacije sa drugim stanjima. (5)

Ako se ustanovi da osoba posjeduje određeni HLA gen za kojeg je poznata povezanost za nastanak bolesti specifične za taj gen, ona tada ima određeni rizik za nastanak te bolesti, ali to najčešće ne znači da je bolest već prisutna, tj. da će osoba oboljeti. Ukoliko osoba posjeduje HLA – B*27 gen, on značajno povećava njenu mogućnost obolijevanja od raznih reumatskih bolesti, u prvom redu ankilozatnog spondilitisa u odnosu na osobu koja taj gen ne posjeduje. Unatoč ovome, ne smijemo interpretirati postojanje povezanosti između nekih gena HLA i određenih bolesti na način da samo prisustvo određenih gena HLA uzrokuje bolest jer postoje i drugi faktori i čimbenici koji utječu na razvoj bolesti, kao i još nedovoljno poznat mehanizam korelacije između gena HLA i bolesti koji je vrlo složen. Prezentacija antigena i aktivacija T limfocita se vide kao ključni pokretači imunološkog odgovora, a s obzirom koliko je taj proces kompleksan, znanstvenici ga najviše promatraju zajedno sa pratećim molekulama i komponentama kako bi se mogli ustanoviti točni razlozi za nastanak imunoloških i drugih bolesti. (5)

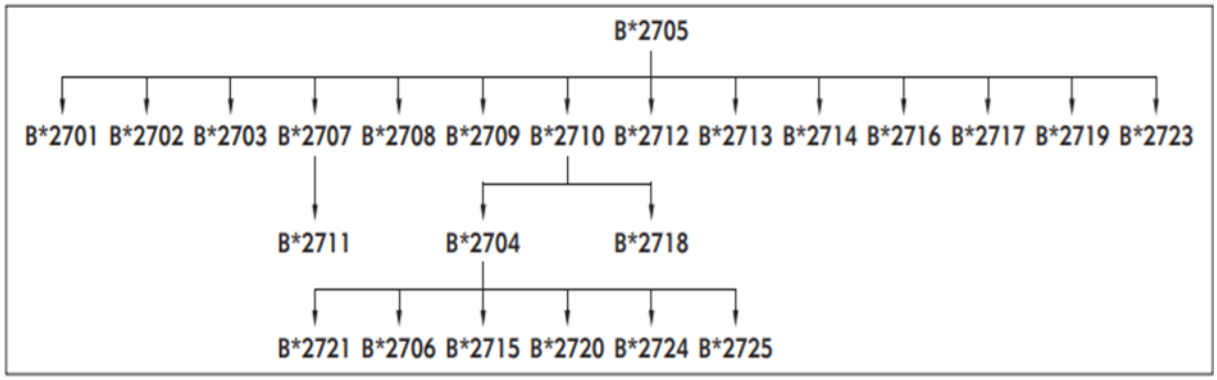
Tablica 1. Povezanost nekih bolesti sa genima sustava HLA

(Preuzeto i prilagođeno prema (8), (11) i (17))

BOLEST	POVEZANA MOLEKULA HLA	RELATIVNI RIZIK
Ankliozatni spondilitis	B27	90 - 100
Reumatoidni artritis	DR4	4
Sistemski eritematozni lupus	DR3	6
Diabetes mellitus tip 1	DR3, DR4	5 - 25
Multipla skleroza	DR2	16
Hashimotov tireoiditis	DR5	3
Reiterov sindrom	B27	40
Bechetova bolest	B51	59
Tubulointersticijski nefritis i uveitis	DQA1,DQB1,DRB1	72
Psorijaza	A1, B17	2 – 5

1.7. Gen HLA – B*27

Gen HLA – B*27 pripada razredu I HLA sustava i čini skupinu od 58 dosad otkrivenih alela koji se međusobno razlikuju u jednoj ili više aminokiselina unutar svojih kodirajućih regija. Smatra se da je većina alela gena HLA – B*27 nastalo iz jednog podtipa, HLA – B2705 (Slika 10.). Do sada su mnoga istraživanja dokazala da se u pukotinu molekula HLA razreda I može vezati i do 10 000 različitih peptida, što daje prostor za različite „pogreške“ i poremećaje unutar tog procesa, a posljedično i mogući nastanak bolesti. Isto tako zbog samog stupnja raznolikosti među peptidima koji se mogu vezati za vezno mjesto, moguće je da dolazi do nepravilnog slaganja proteina nakon sinteze molekule HLA, kao i nastanka dimera (dva teška α lanca se spoje u jednu molekulu), koji onda šalju drugačiju informaciju limfocitima od one predviđene, odnosno kada je molekula normalna. (17, 3)



Slika 11. Pretpostavljena evolucija podtipova (alela) gena HLA – B*27

(Preuzeto sa : (3))

1.7.1. Povezanost gena HLA – B*27 sa bolestima

Prva povezanost HLA sustava sa bolešću ustanovljena je 1973. godine kada su dva znanstvenika, Schlosstein i Brewerton, nezavisno jedan o drugome, povezali nastanak ankliozatnog spondilitisa sa genom HLA – B*27. Za sada je ovo jedna od najsnažnijih otkrivenih korelacija gena HLA sustava sa nekom bolešću, jer je ustanovljeno da je relativni rizik za nastanak bolesti veći od 90%. Zbog ovoga je gen HLA – B*27 u narednim godinama bio dosta istraživan, te je naknadno otkriveno da je ovaj gen povezan sa još 100 drugih oboljenja. (8) Bolesti s kojima je gen povezan uključuju bolesti oka, sistemske bolesti i bolesti u obliku popratnih manifestacija (upalne bolesti i druge bolesti oka). Posljedično je gen HLA – B*27 postao jedan od najpodrobnije opisanih gena HLA sustava, međutim nisu još u potpunosti objašnjeni mehanizmi iza njegovog patološkog utjecaja na organizam i nastanka bolesti.

Skupina bolesti s kojima je gen HLA – B*27 najviše povezan nazivaju se spondiloartropatije, skupina kroničnih autoimunih bolesti zglobova. Neke od zajedničkih osobina ovih bolesti uključuju lumbalgiju, uveitis, probavne smetnje i osipe, a najčešće su pacijenti koji imaju ovakva oboljenja pozitivni na HLA – B*27 (Tablica 3.). Kliničke manifestacije i genetske sličnosti pokazuju da bi spondiloartropatije mogle imati zajedničke uzroke i patofiziologiju, ali to još do danas nije potpuno objašnjeno. (17,3)

Tablica 2. Učestalost prisustva gena HLA – B*27 kod povezanih bolesti

(Preuzeto i prilagođeno sa : (3))

Bolest povezana sa HLA – B*27	Učestalost HLA – B*27
Ankliozatni spondilitis (AS)	90%-100%
Akutni anteriorni (prednji) uveitis	40%-50%
Reaktivni artritis (ReA)	60%
Psorijatični artritis (PsA)	50%
Sakroileitis	40%-50%
Upalna bolest crijeva (IBD)	25%
Nedefinirane spondiloartropatije	70%

Spondiloartropatije se dijele na seropozitivne i seronegativne spondiloartropatije. Razlika je u tome što pacijenti sa seropozitivnim spondiloartropatijama u cirkulaciji imaju prisustvo reumatoidnog faktora (RF), odnosno autoantitijela klase IgM, dok osobe koje imaju neku od seronegativnih spondiloartropatija nemaju prisustvo RF-a. HLA – B*27 je najviše povezan sa seronegativnim tipom.

Ankliozatni spondilitis (AS) je jedan od glavnih oblika kroničnog upalnog artritisa i prototipski je primjer spondiloartropatija koji ima globalnu zastupljenost (rijeđe kod crne rase). Karakterizira ga artritis koji zahvaća kralježnicu i zdjelicu, posebno sakroilijakalni zglob, u početku uzrokujući bol i reverzibilnu ukočenost koja je jača u početku dana i jenjava kasnije tokom dana uz tjelovježbu. U nekim slučajevima dolazi do progresivne fuzije zahvaćenih zglobova i nepovratne ukočenosti sa deformacijama. Komparativne studije su potvrdile da je osjetljivost, odnosno nastanak AS-a genetski uvjetovana postojanjem snažne povezanosti s molekulom HLA razreda I, HLA – B*27, koja je primijećena u više od 90% slučajeva. Postoji nekoliko teorija koje objašnjavaju mehanizme nastanka bolesti, uključujući pretpostavku da je AS izazvan izlaganjem nekim uobičajenim okolišnim patogenima. Predložene teorije mehanizama uključuju "artrogeni peptid", "molekularnu mimikriju" i stres endoplazmatskog retikuluma koji je uzrokovan pogrešnim slaganjem podjedinica (domena) molekule HLA – B27 te njihovo nakupljanje. Teorija artrogenog peptida predlaže da bolest proizlazi iz ograničenog odgovora HLA-B27 na citotoksični odgovor T limfocita na peptid ili peptide koji se nalaze samo u zglobovima i drugim zahvaćenim tkivima. Teorija molekularne mimikrije pretpostavlja da neki napadajući patogeni imaju slične ili iste odrednice antigena sa antigenima stanične površine u zglobu što onda može rezultirati imunološkim odgovorom. Različiti aleli B27 imaju različitu razinu povezanosti sa AS-om, što čini molekularno testiranje puno korisnijim od onog serološkog. HLA – B*27:02 i HLA – B*27:05 pokazuju snažnu povezanost sa nastankom AS-a, a prethodno se mislilo da su B*27:06 i B*27:09 zaštitni geni, no sve je više slučajeva gdje osobe posjeduju i ove alele a imaju manifestaciju AS-a, stoga je potrebno napraviti dodatna istraživanja. (3,5,17)

Akutni prednji uveitis se najčešće može pronaći kao popratna bolest kod osoba koje imaju AS ili nekakvu drugu spondiloartropatiju. Uveitis je najčešći oblik upalnih bolesti oka i najčešći je uzrok oštećenja vida i sljepoće. Izaziva upalu sloja oka poznatog kao "uvea" (šarenica, cilijarno tijelo i žilnica), ali najčešće opisuje bilo koji upalni proces koji se odvija u unutrašnjosti oka. Prednji uveitis uključuje upalu prednje komore i šarenice i javlja se u 90% slučajeva uveitisa.

Reaktivni artritis se najčešće javlja kao upala zglobova nakon nekakve infekcije bakterijskog podrijetla ili izlaganja nekom patogenu, a još se naziva i Reitersov sindrom. Osobe koje su pozitivne na HLA- B*27 često dobiju reaktivni artritis nakon ili tokom trajanja infekcije, najčešće urogenitalnog ili gastrointestinalnog sustava. Reaktivni artritis ima neke zajedničke karakteristike s drugim spondiloartropatijama kao što su AS i psorijatični artritis (PsA). Brojne bakterije koje su mogući izvori infekcije su identificirane kao pokretač nastanka reaktivnog artritisa, a neke od njih su Campylobacter, Salmonella i Chlamydia.

2. CILJ RADA

U ovom radu korištene su serološke i molekularne metode kojima se prvo definiralo prisustvo gena HLA - B*27 kao i njegovi podtipovi te se potom opisala njegova povezanost sa reumatskim bolestima. Također su navedene i metode koje su korištene za obradu prikupljenih podataka za pacijente kojima je dokazan gen HLA – B*27 kao i njegovi podtipovi.

Na temelju prikupljenih podataka ustanovljeno je i prikazana je učestalost dva najčešća podtipa gena HLA – B*27 na području Splitsko – dalmatinske županije koristeći osnovne statističke formule i grafičke prikaze dobivenih rezultata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za eksperimentalni dio ovog rada podaci su prikupljeni u Laboratoriju za tipizaciju tkiva KBC Split, lokalitet Križine te su obrađeni molekularnom metodom. Ispitani parametri su: dob, spol i primarna dijagnoza pacijenata. Svi pacijenti čiji su podaci obrađeni imaju prebivalište unutar Splitsko – dalmatinske županije i predstavljaju dobar uzorak populacije tog područja. Od 1233 pregledanih rezultata testiranih pacijenata, u obradu je uključeno njih 120 jer su prema rezultatima bili pozitivni na gen HLA – B*27. Podaci koji su obrađeni uključuju rezultate molekularnog određivanja gena HLA sustava pacijenata u periodu od 2019. do 2021. godine koji su dobiveni standardni molekularnim metodama u Laboratoriju za tipizaciju tkiva KBC Split, Križine.

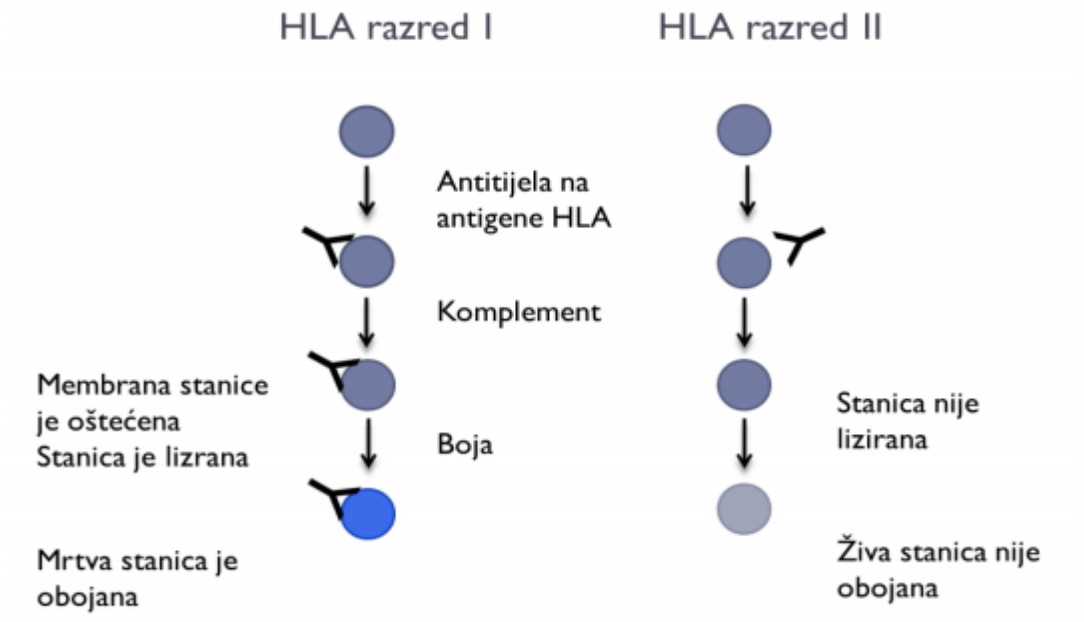
3.2. Metode

Standardne metode koje se koriste za određivanje gena i antigena sustava HLA, odnosno HLA tipizaciju, uključuju serološko i molekularno testiranje uzorka pacijenta. Za serološko određivanje koristi se test mikrolimfocitotoksičnosti (engl. MLCT, Microlymphocitotoxicity test), a za molekularno određivanje koriste se dvije metode koje u svojoj osnovici imaju lančanu reakciju polimerazom (engl. PCR, Polymerase Chain Reaction). Način na koji se provodi testiranje ovisi o mogućnostima laboratorija i potrebama.

Metode koje su korištene za obradu prikupljenih podataka u ovome radu su statističke, odnosno korištene su tehnike direktnog brojanja i osnovnih postupaka izračunavanja postotka određenih skupina pacijenata.

3.2.1. Serološko određivanje

Test mikrolimfocitotoksičnosti (engl. MLCT) se koristi za serološko određivanje antigena razreda I i II sustava HLA, a temelji se na reakciji vezanja između poznatih antitijela za pojedine gene HLA i antigena HLA unutar uzorka pacijenta koji se nalaze na njegovim limfocitima. Ako se antitijelo veže za antigen, dolazi do stvaranja kompleksa antitijelo-antigen i posljedično do aktivacije komplementa i smrti stanice, a ako antigen i antitijelo ne stvore kompleks jer nisu komplementarni, stanica ostaje živa. Kako bi mogli odrediti koji antigen i koliki broj antigena se vezao za protutijela vezana protutijela označavamo dodavanjem antihumanog komplementa. Kada bivaju aktivirane, molekule komplementa oštete membranu stanice što omogućuje boji da prodre u oštećenu liziranu stanicu, stoga obojana stanica pod mikroskopom označava pozitivan rezultat, odnosno prisustvo određenog antigena na limfocitima pacijenta. Ukoliko nije došlo do aktivacije komplementa i prethodnog nastanka kompleksa antigen – antitijelo, stanica nije lizirana, te ostaje živa i neobojena, što označava negativan rezultat, odnosno odsustvo određenog antigena na stanicama. (4)



Slika 12. Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti

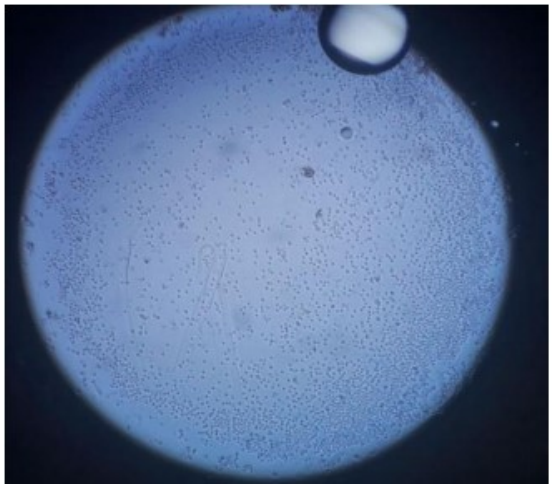
(Preuzeto sa : (4))

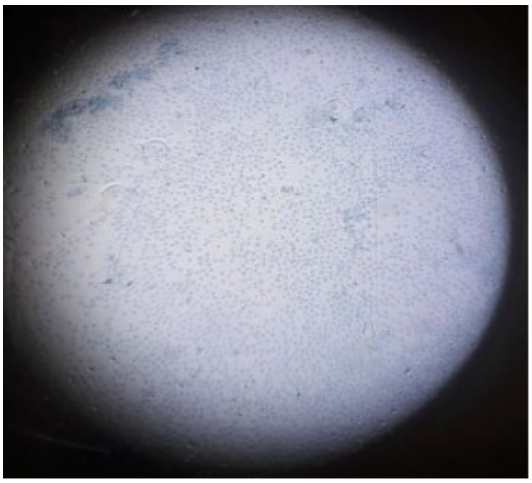
Za samo izvođenje testa od pacijenta je potrebno uzeti uzorak periferne krvi u epruvetu sa heparinom. Nakon toga se iz uzorka odvoje limfociti prema gradijentu gustoće i odredi se njihova koncentracija. Koncentracija limfocita ne smije biti premala niti prevelika kako bi pod mikroskopom vidljivost prisustva i neprisustva reakcije bila dobra. Stoga se koncentracija podešava pomoću Burker – Turkove komorice, tako što se pomiješa 5 µL suspenzije limfocita i 5 µL triptanskog modrila te se dobivena suspenzija stavlja na komoricu. Pod mikroskopom se tada određuje koncentracija brojanjem stanica. Kako bi tipizacija antigena HLA bila moguća, po kvadratiću u komorici potrebno je imati 5-6 obojenih ili 10-12 neobojenih stanica. Ako je to potrebno, naknadno se koncentracija podešava razrjeđivanjem ili ponovnim centrifugiranjem suspenzije do adekvatne koncentracije. Nakon postignute željene koncentracije suspenzija se stavlja u jažice na Terasakijevoj pločici u kojima se nalaze poznata protutijela za određeni razred HLA gena pomoću Hamiltonove mikrolitarske šprice. Svako polje (jažica) ima protutijela za jedan ili više antigena. Pločica se inkubira pola sata, te se nakon toga dodaje komplement kunića i onda se ponovno inkubira na jedan sat. Nakon završene inkubacije sadržaj pločice se istresa te se u jažice dodaje triptansko modrilo kako bi obojali stanice, nakon čega slijedi procjena jačine reakcije (ili njeno odsustvo) pod mikroskopom. Pozitivne reakcije se upisuju na tipizacijski listić prema određenoj tablici interpretacije rezultata (Tablica 3.). (4)

Tablica 3. Interpretacija rezultata serološkog testiranja

(Preuzeto iz : (4))

Postotak mrtvih 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 (++++)

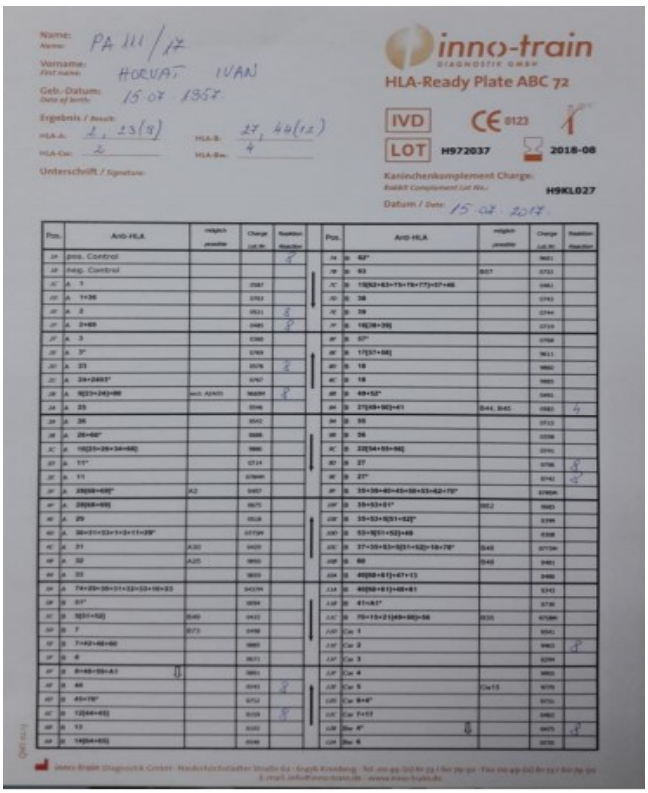




a) Negativna reakcija **b) Pozitivna reakcija**

Slika 13. Test mikrolimfocitotoksičnosti pod mikroskopom

(Preuzeto sa : (4))



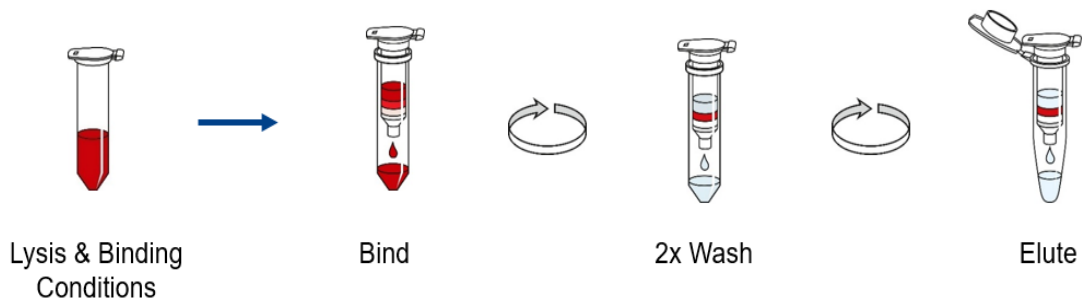
Slika 14. Primjer rezultata serološke tipizacije

(Preuzeto sa : (4))

3.2.2. Molekularno određivanje

Molekularne metode određivanja antigena i gena HLA su pouzdanije i preciznije jer se koristi pacijentova DNA. Standardne metode koje se koriste za ovakvo testiranje su PCR-SSO (*engl. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Oligonucleotids*) i PCR-SSP (*engl. Polymerase chain reaction – Sequence Specific Primer*). Kod oba testa potrebno je izolirati pacijentovu DNA iz uzorka periferne krvi sa EDTA (etilendiamintetraoctenom kiselinom) kao antikoagulansom. (4)

Za izolaciju DNA iz uzorka koriste se komercijalni setovi za izolaciju DNA. Najčešća metoda se temelji na korištenju kolumni sa silikatnom membranom koja "hvata" molekule DNA prilikom procesa izolacije. Stanice se liziraju s puferom za lizu i proteinazom K prilikom inkubacije. Lizatu se zatim doda etanol da bi se DNA vezala za silikatnu membranu u odgovarajućoj NucleoSpin® Blood kolumni. Nakon toga se uklanjaju moguće nečistoće u lizatu dvostrukim ispiranjem sa puferima. Konačno se čista DNA eluira (odvoji) s membrane pomoću eluacijskog pufera, a to je moguće jer se DNA reverzibilno veže za silikatnu membranu, što je specifično za nukleinske kiseline. (4)



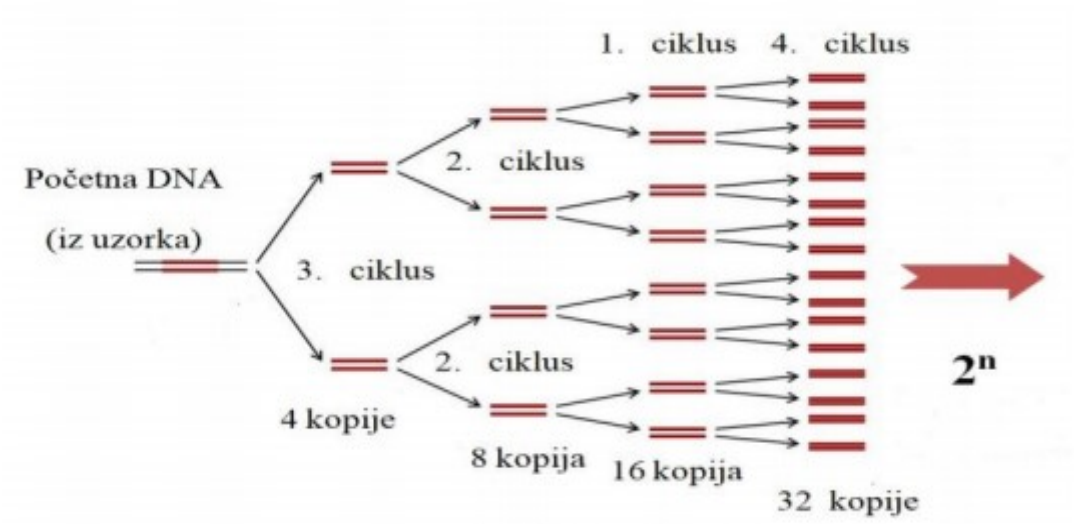
Slika 15. Shematski prikaz izolacije DNA iz uzorka krvi pomoću NucleoSpin Blood komercijalnog kita sa kolonama

(Preuzeto sa : https://onelab.andrewalliance.com/library/nucleospin-blood-protocol-r9M3qnzJ)

3.2.2.1.Metoda PCR-SSO

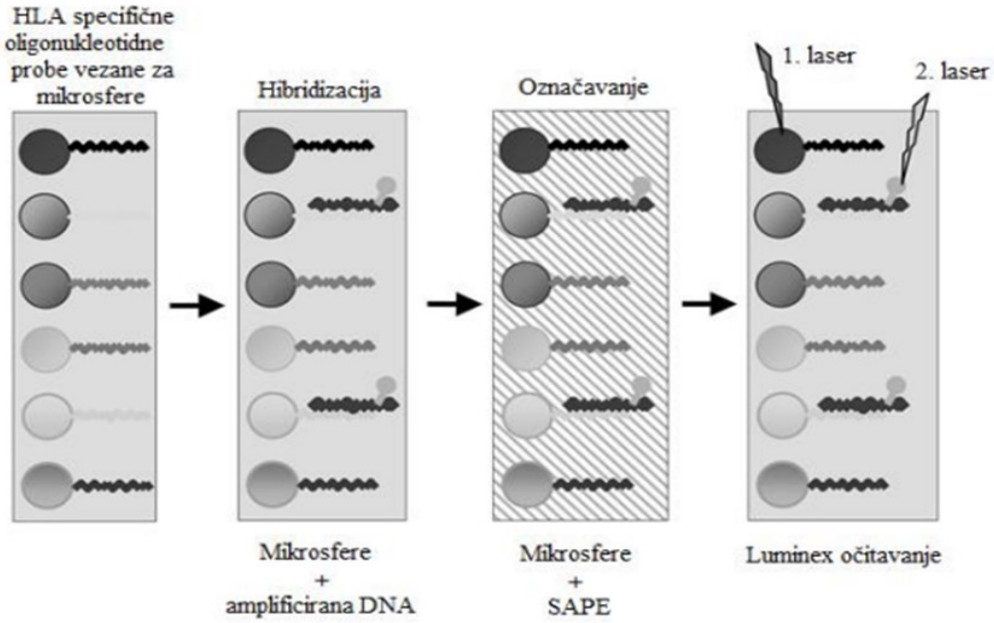
Metoda PCR-SSO uključuje umnažanje izolirane DNA pacijenta pomoću lančane reakcije polimerazom te vezanje umnožene DNA za mikrosfere (kuglice) koje na svojoj površini imaju specifične oligonukleotidne probe (specifične sljedove DNA) pomoću kojih ispitujemo prisustvo ili odsustvo određenih HLA gena u uzorku, a obojane su varijabilnim kombinacijama crvene i infracrvene boje. Za određivanje koristi se uređaj Luminex (Luminex® 100/200™ sistem) koji koristi metode protočne citometrije i uporabu lasera. Kombinacija različitih intenziteta dviju boja omogućuje identifikaciju svake kuglice po jedinstvenom "potpisu", odnosno signalu kojeg pošalje kada je pobudi laserska zraka. Kemijska površina kuglica omogućuje presvlačenje sa različitim molekulama, uključujući sekvence DNA iz HLA lokusa, kao i cijele HLA antigene, stoga se kuglice koriste kako bi se odredila prisutnost ili odsutnost određenih analita. Crveni laser koristi se za pobuđivanje i identifikaciju određene kuglice sa probom koja se vezala za nju, a zeleni laser očitava relativnu količinu vezane probe na svakoj pojedinoj mikrosferi na temelju čega se očitava rezultat. (4)

Uzorak koji je potreban za izvođenje testa je uzorak krvi izvađen u epruvetu sa EDTA iz kojeg se prethodno izolira DNA koju je tada potrebno umnožiti (amplificirati) metodom PCR. Kako bi umnažanje bilo uspješno potrebno je napraviti reakcijsku mješavinu koja sadrži Taq polimerazu (0,2 µL), Master MIX (6 µL) u kojem se nalaze oligonukleotidne početnice, odnosno primeri i 8,8 µL destilirane vode. Reakcijskoj mješavini se potom doda 5 µL DNA pacijenta. Smjesa tada ide u uređaj "Thermocycler" u kojem se pomoću određenih ciklusa izmjenjivanja specifičnih temperatura DNA amplificira. Tijekom reakcije Taq polimeraza registrira komplementarne dijelove DNA na koje se trebaju vezati oligonukleotidni primeri. Jedan ciklus izmjenjivanja temperatura se najčešće ponavlja 30 puta, što rezultira u približno 68 bilijuna kopija DNA. (4)



Slika 16. Shematski prikaz procesa amplifikacije DNA metodom PCR

(Preuzeto i prilagođeno iz : https://nanohub.org/app/site/courses/9/2415/slides/011.07.jpg)



Slika 17. Princip metode PCR – SSO

(Preuzeto i prilagođeno iz : https://www.omixon.com/wp-content/uploads/2016/07/Luminex.png)

Nakon što je amplifikacija gotova slijedi proces hibridizacije za kojeg je potrebno 5 µL PCR produkta i 15 µL suspenzije sa mikrosferama (kuglicama). Tijekom 20-minutne hibridizacije produkti PCR reakcije vežu se za specifične primere na mikrosferama, a kako bi smo mogli vidjeti nastali kompleks u smjesu se dodaje 170 µL fluorescentne boje za obilježavanje. Boja se mora prethodno pripremiti korištenjem 169 µL dilucijske otopine i 0,75 µL R-fikoeritrin konjugiranog streptavidina (engl. SAPE, *Streptavidin – Phycoerytherin*). Jedan dio boje se veže na nastali kompleks ako je došlo do njegovog stvaranja a drugi na biotin koji se nalazi na početnicama (primerima). Nakon završetka hibridizacije, posebna Coster pločica se stavlja u Luminex aparat koji tada vrši očitanje rezultata. Rezultati se najčešće pregledavaju u programu Match IT DNA koji u sebi sadrži bazu već poznatih gena i antigena sustava HLA koje uspoređuje sa rezultatima dobivenim PCR-SSO metodom. (4)

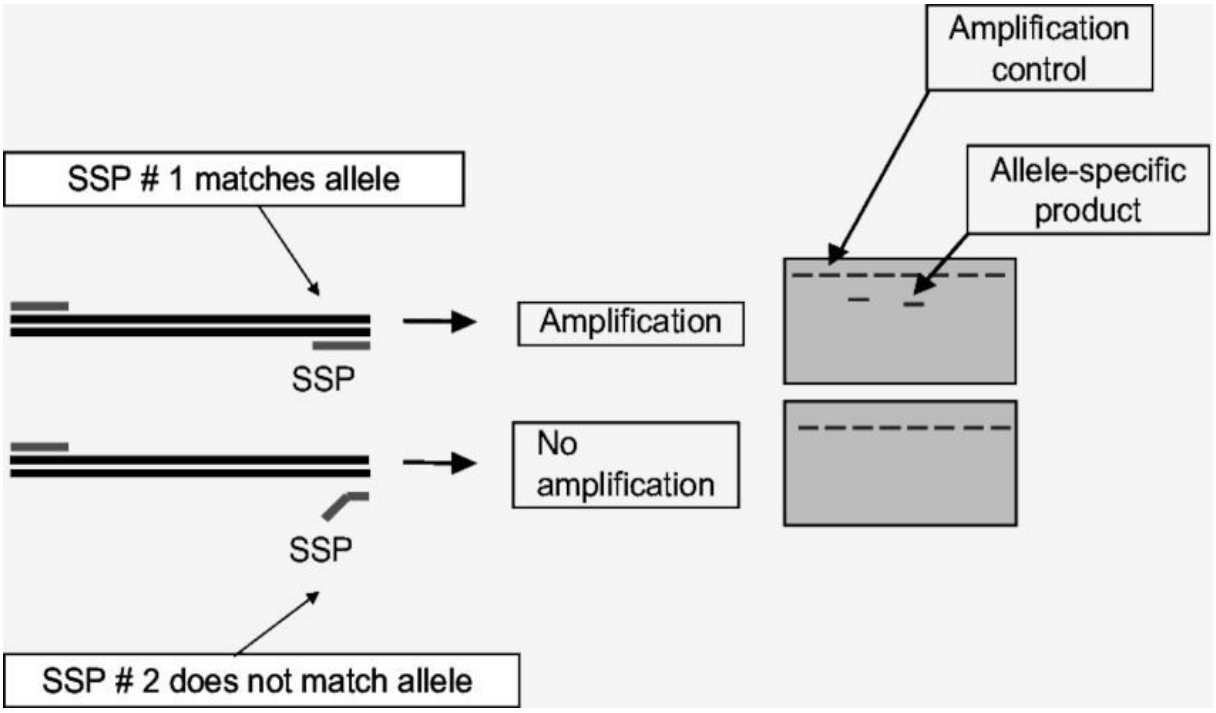


Slika 18. Primjer rezultata metode PCR-SSO u programu Match It DNA

(Preuzeto sa : https://docplayer.rs/docs-images/111/199134021/images/34-1.jpg)

3.2.2.2. Metoda PCR-SSP

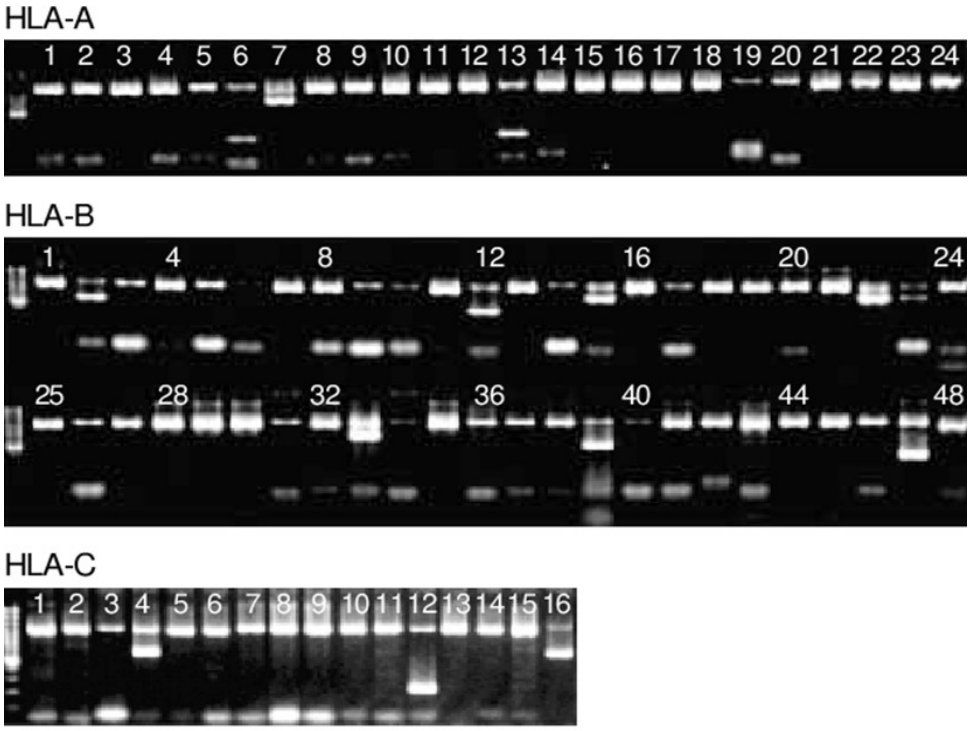
Metoda PCR-SSP (*engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer*) uključuje lančanu reakciju polimerazom kao i prethodna metoda, ali se temelji na komplementarnosti specifičnih početnica s jednim alelom ili grupom alela, što omogućuje izradu testa u niskoj (npr. HLA – A*02) i visokoj rezoluciji (npr. HLA – A*02:01). Ukoliko početnice nisu komplementarne sa izoliranim uzorkom DNA, neće doći do amplifikacije tog specifičnog dijela DNA. Ako su početnice komplementarne dijelu DNA (fragmentu), doći će do amplifikacije, što će kasnije biti vidljivo prilikom očitavanja rezultata testiranja. Ova metoda zahtjeva i izvođenje gel elektroforeze nakon amplifikacije kako bi se rezultati mogli očitati, dokumentirati i unijeti u određeni program. (4)



Slika 19. Shematski prikaz metode PCR-SSP

(Preuzeto sa : https://www.creative-biolabs.com/static/img/Sequence-specific-primer-PCR-SSP-Technology-2.png)

I kod ove metode potrebno je pripremiti reakcijsku smjesu u kojoj se nalaze određene količine Master MIX-a, Taq polimeraze, destilirane vode i izolirane pacijentove DNA. Sveukupno 10 µL reakcijske smjese se pipetira u jažice Olerup SSP® pločice. Svaka jažica (maleno udubljenje) u sebi ima dehidriranu otopinu specifičnih početnica. Pločica se zatim stavlja u Thermocycler namješten na OLERUP program gdje se zatim odvija amplifikacija. Nakon amplifikacije produkt PCR-SSP se zajedno sa nekakvom bojom (npr. etidij – bromidom) stavlja na gel elektroforezu. Nakon 15 minuta se uz pomoć UV svijetla očitava i fotografira rezultat. Gel elektroforeza razdvaja dijelove DNA prema njihovoj veličini – oni dijelovi koji su duži će putovati sporije po gelu, dok će oni kraći putovati brže. Uz uzorke se obavezno stavlja i negativna kontrola koja nam govori o kakvoći izvedenog testa. Ako je amplifikacija bila uspješna, na gelu je vidljiva u obliku svijetlećih pruga, a pozitivna reakcija kao dvostruka vrpca koja je zapravo produkt kontrole i produkt vezanja specifične početnice. Rezultati se unose u program za analizu u kojem se promatra prisustvo i odsustvo produkta na gelu, a najčešće korišten program je Helmberg SCORE. (4)



Slika 20. Primjer rezultata gel elektroforeze

(Preuzeto sa : https://d3i71xaburhd42.cloudfront.net/0fa4effd63780384b57f1440fe3b589128908fee/3-Figure1-1.png)

4. REZULTATI

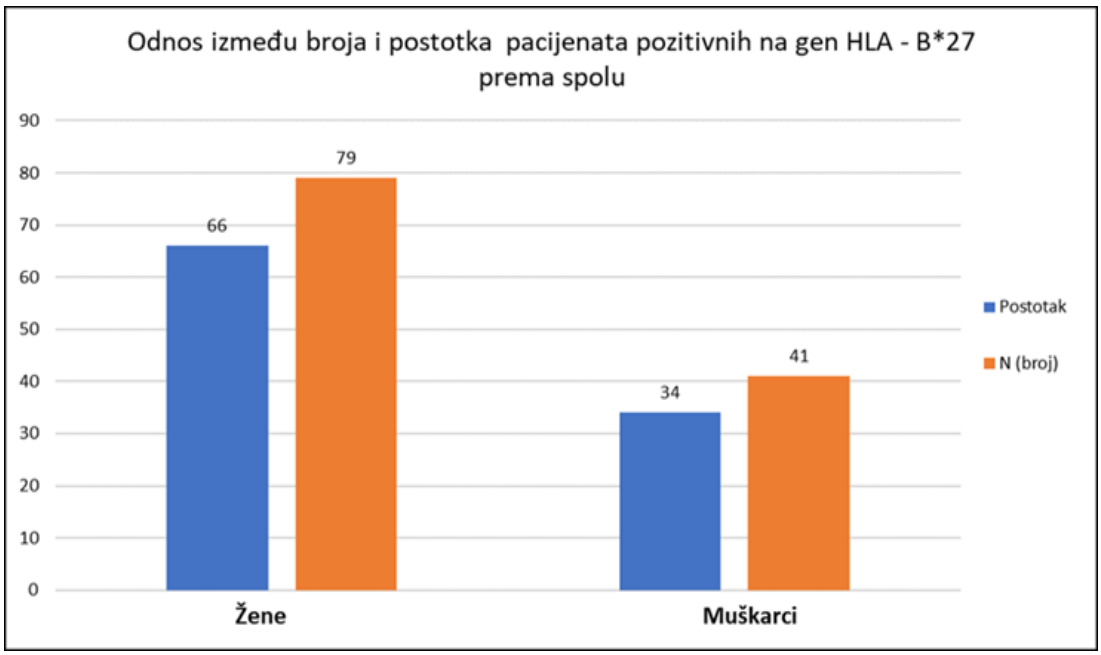
4.1. Raspodjela učestalosti određenih podtipova gena HLA – B*27

U slijedećoj tablici prikazani su broj pacijenata i postotak pacijenata koji nose određeni podtip gena HLA – B*27 (Tablica 4.).

Tablica 4. Broj i učestalost određenih podtipova gena HLA – B*27 među pacijentima

Alel	Broj pacijenata	Postotak
HLA-B*27:02	52	43%
HLA-B*27:05	46	38%
HLA-B*27:03	21	18%
HLA-B*27:08	1	1%

Od sveukupno 1233 pregledanih rezultata nesrodnih pacijenata kojima je napravljeno molekularno određivanje gena i alela HLA sustava u periodu od 2019. do 2021. godine, njih 120 je bilo pozitivno na prisustvo gena HLA – B*27, što čini 9,73% pacijenata od ukupnog broja pacijenata. Od 120 pozitivnih pacijenata, 41 je muškog (34%) a 79 (66%) je ženskog spola (Slika 21.).



Slika 21. Grafički prikaz odnosa pacijenata pozitivnih na gen HLA – B*27

Među HLA – B*27 pozitivnim pacijentima, aleli koji su se najčešće pojavili su HLA – B*27:02, koji je pronađen kod 52 ispitanika (43%) i HLA – B*27:05, koji je utvrđen kod 46 ispitanika (38%), što se poklapa sa istraživanjima koja zahvaćaju cijelu Hrvatsku i Europu. U našem ispitivanju smo utvrdili i povećani broj pacijenata s alelom HLA – B*27:03, kojeg je imao 21 ispitanik (18%), a alel HLA – B*27:08 je uočen kod jednog pacijenta, što odgovara postotku od 1% (Tablica 4.). Među muškim ispitanicima, zamjetno najčešći alel bio je HLA – B*27:02 sa učestalošću od 46%, a odmah nakon njega slijedi alel HLA-B*27:05 sa učestalošću od 39%. Na trećem mjestu po učestalosti je bio alel HLA – B*27:03 (15%), dok alel HLA – B*27:08 nije bio zamijećen. Slične rezultate pokazuju i ispitanici ženskog spola, kod kojih je HLA – B*27:02 bio najučestaliji alel (42%), zatim slijedi HLA – B*27:05 sa učestalošću od 38%. HLA – B*27:03 je bio duplo učestaliji kod žena nego kod muškaraca (19%), a alel HLA – B*27:08 je posjedovala jedna pacijentica, što je jednako učestalosti od 1% (Tablica 5.).

Tablica 5. Prikaz raspodijele učestalosti uočenih podtipova gena HLA – B*27 među pozitivnim pacijentima prema spolu

Spol pacijenata	Alel	Broj pacijenata	Postotak
Muško	HLA-B*27:02	19	46%
	HLA-B*27:05	16	39%
	HLA-B*27:03	6	15%
	HLA-B*27:08	/	/
Žensko	HLA-B*27:02	33	42%
	HLA-B*27:05	30	38%
	HLA-B*27:03	15	19%
	HLA-B*27:08	1	1%

Iz Tablice 5. je vidljivo kako je učestalost alela HLA-B*27:02 i HLA-B*27:05 podjednaka kod oba spola, a isto se može reći za inače rjeđe primijećen alel HLA-B*27:03, ali koji je kod naših ispitanika utvrđen češće nego što je to uobičajeno.

4.2. Raspodjela pacijenata prema njihovoj dobi

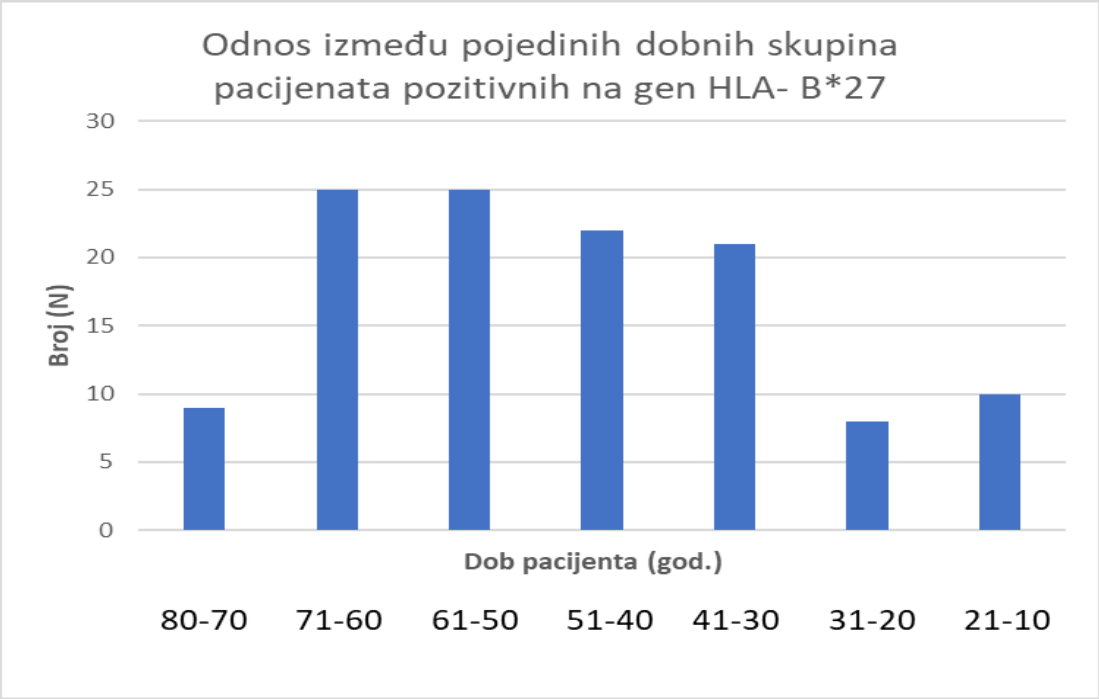
Kada promatramo pozitivne pacijente prema njihovoj starosti, prosječna dob pacijenta je 64 godine, a prema dobivenim rezultatima, sve pacijente možemo svrstati u 7 dobnih skupina, od kojih svaka ima raspon od 10 godina. Najviše ispitanika je bilo između 70 do 60 godina starosti (N=25) i 60 do 50 godina starosti (N=25), a 9 pacijenata je bilo dobi između 80 i 70 godina, što znači da je sveukupno 59 naših ispitanika (49,2%) starije životne dobi.

U malo nižoj stopi zamijetili smo ispitanika unutar skupina srednje životne dobi. Utvrdili smo da ispitanika koji su između 50 i 40 godina starosti imamo 22, a onih koji su unutar skupine od 40 do 30 godina starosti je bilo 21, što znači da je sveukupan broj ispitanika srednje dobi 43, a to odgovara postotku od 35,8%.

Najmanje ispitanika imamo u skupinama mlađe životne dobi, koje uključuju djecu, adolescente i osobe do 30 godina starosti. Ispitanika starosti 30 do 20 godina utvrdili smo 8, što je najmanji broj ispitanika unutar skupine u odnosu na sve ostale dobne skupine. Po redu druga najmanja utvrđena skupina ispitanika prema dobi je bila skupina najmlađih osoba, dobi između 20 i 10 godina, a njih smo utvrdili 10, a to znači da je sveukupan broj pacijenata koji se nalaze unutar skupina mlađe životne dobi bio 18, što odgovara postotku od 15% od sveukupnog broja pacijenata. Raspodjelu pacijenata prema dobnim skupinama možemo vidjeti u Tablici 6 i Slici 22.

Tablica 6. Prikaz raspodjele ispitanika prema dobnim skupinama

Starosna skupina		Broj pacijenata		Postotak (%)		Prosječna dob pacijenta
80-70 god.	Starija životna dob	25	59	20,8	49,1	64 godine
70-60 god.		25		20,8		
60-50 god.		9		7,5		
50-40 god.	Srednja dob	22	43	18,3	35,8	
40-30 god.		21		17,5		
30-20 god.	Mlađa dob	8	18	6,7	15	
20-10 god.		10		8,3		



Slika 22. Grafički prikaz raspodjele pacijenata prema dobnim skupinama

Na grafičkom prikazu raspodijele pacijenata prema dobnim skupinama (Slika 22.) jasno se može iščitati da je najviše pacijenata unutar srednje i starije životne dobi. S obzirom da su podaci testiranja obrađeni iz 2019 do 2021. godine, pacijenti su tada napravili tipizaciju, što nam govori i u kojoj dobi su od liječnika dobili uputu da naprave testiranje. Većina ih je, prema podacima, testiranje napravila kasnije u životu, u starijoj i srednjoj životnoj dobi, odnosno kada zbrojimo broj pacijenata srednje i starije životne dobi, imamo ukupno 102 pacijenta, što znači da se 85% pacijenata testiralo u kasnijem periodu života, dok je 18 pacijenata mlađe životne dobi, odnosno 15%, pristupilo testiranju ranije u životu.

4.3. Raspodjela pacijenata prema dijagnozi

Svjetska Zdravstvena Organizacija (engl. WHO, *World Health Organization*) je 1990. godine odobrila 10. reviziju Međunarodne klasifikacije bolesti i srodnih zdravstvenih problema (kratica – MKB-10), a počela se primjenjivati 1994. godine i primjenjuje se sve do danas. Kako bi smo adekvatno razvrstali pacijente prema skupinama bolesti i dijagnozama koje imaju, koristit ćemo šifre koje se koriste za klasifikaciju unutar MKB – 10 (Tablica 7.). Od 1. siječnja 2022. godine zamijenit će je 11. revizija (MKB-11). (20)

Tablica 7. Tablica klasifikacije bolesti prema MKB – 10

(preuzeto i obrađeno prema : https://mediately.co/hr/icd)

MKB ŠIFRA (KOD)	SKUPINA BOLESTI
A00-B99	Određene infekcijske i parazitske bolesti
C00-D48	Neoplazme
D50-D89	Bolesti krvi i krvotvornih organa i određeni poremećaji imunološkog sustava
E00-E90	Endokrine, nutricijske i metaboličke bolesti
F00-F99	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja
G00-G99	Bolesti živčanog sustava
H00-H59	Bolesti oka i adneksa
H60-H95	Bolesti uha i mastoidnih procesa
I00-I99	Bolesti cirkulacijskog (krvožilnog) sustava
J00-J99	Bolesti dišnog (respiracijskog) sustava
K00-K93	Bolesti probavnog sustava
L00-L99	Bolesti kože i potkožnog tkiva
M00-M99	Bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva
N00-N99	Bolesti genitalno-urinarnog sustava
O00-O99	Trudnoća i porođaj

P00-P96	Određena stanja porođajnog perioda (5 mj. prije i 1 mj. poslije)
Q00-Q99	Prirođene malformacije, deformacije i kromosomske abnormalnosti
R00-R99	Simptomi, znakovi i abnormalni klinički i laboratorijski nalazi, neklasificirani drugdje
S00-T98	Ozljede, trovanja i određene druge posljedice s vanjskim uzrokom
V01-Y98	Vanjski uzroci pobola i smrtnosti
Z00-Z99	Čimbenici s utjecajem na zdravstveni status i kontakt sa zdravstvenim ustanovama
U00-U99	Kodovi za posebne svrhe

Bolesti koje su povezane sa prisustvom gena HLA – B*27 i njegovim alelima nalaze se unutar skupina H00-H59 (Bolesti oka), L00-L99 (Bolesti kože i potkožnog tkiva) i M00-M99 (Bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva). Među našim ispitanicima, i kod ženskog i kod muškog spola, najviše ih je imalo neku dijagnozu iz skupine bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva, koje uključuju dijagnoze poput ankliozatnog spondilitisa, upalne spondilopatije, poliartroze, reumatoidnog artritisa i sl. Potrebno je naznačiti da unutar svake glavne skupine dijagnoza unutar MKB – 10 klasifikacije postoje podskupine, a unutar tih pod skupina svaki broj pridružen sa slovom ima svoje podvrste (npr. M13 posjeduje podvrste M13.0, M13.1, M13.8 i M13.9), te je svaka podvrsta zapravo zasebna bolest koja se nalazi unutar skupine.

Ukupno 5 naših pacijenata je imalo dijagnozu ankliozatnog spondilitisa (šifra M45, ne postoje podvrste), što odgovara postotku od 4,2% od ukupnog broja pacijenata pozitivnih na HLA – B*27. Od 5 pacijenata koji imaju dijagnozu M45, jedan je ženskog spola, a 4 muškog. Najčešća podskupina dijagnoza među oba spola bila je drugi artritis (šifra M13), u koju spadaju podvrste M13.0, M13.1, M13.8 i M13.9. Sveukupno 9 pacijenata muškog spola i 16 pacijenata ženskog spola je imalo neku dijagnozu iz skupine drugih artritisa (M13), što znači da je sveukupno 25 pacijenata sa dijagnozom iz podskupine M13, što odgovara postotku od 20,8% od ukupnog broja pozitivnih pacijenata, a to je ujedno i najviša stopa prisustva neke

dijagnoze među pozitivnim ispitanicima. Slijedeća skupina bolesti koja je pokazala višu stopu učestalosti je skupina ostalih reumatoidnih artritisa (šifra M06, podvrste : M06.0 – M06.4, M06.8 i M06.9). Među našim ispitanicima sveukupno njih 2 muškog spola je posjedovalo dijagnozu iz ove skupine, a kod ženskog spola je zamijećena kod 8 ispitanika, što znači da ukupno 10 naših pacijenata ima dijagnozu iz skupine bolesti M06, što odgovara postotku od 8,3%. Ostale dijagnoze iz skupina bolesti koje su povezane sa prisustvom gena HLA – B*27 su zamijećene jedanput, odnosno dvaput, a dijagnoze koje nemaju dokazanu povezanost sa prisustvom gena HLA – B*27 kod muškog spola su uočene kod jednog ispitanika, i kod 12 ispitanika ženskog spola, odnosno 13 dijagnoza koje smo uočili kod naših pacijenata nisu povezane sa prisustvom gena HLA – B*27, tj. ne spadaju ni u jednu od promatranih skupina bolesti, što je jednako postotku od 10,8% od ukupnog broja pozitivnih pacijenata. Kada uključimo i ostale dijagnoze iz skupine bolesti mišićno koštanog sustava i vezivnog tkiva koje su se pojavile jedanput ili dvaput, 19 pacijenata muškog i 37 pacijenata ženskog spola je posjedovalo neku od ostalih dijagnoza iz skupine bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva, što znači da je ukupno 56 naših pacijenata imalo neku od ostalih dijagnoza iz ove skupine bolesti, što odgovara postotku od 46,7% od ukupnog broja pacijenata.

Iz skupine bolesti kože i potkožnog tkiva (šifre L00-L99) najčešće smo zamijetili podskupinu L40 (Psorijaze), kao i neke druge dijagnoze unutar ove skupine bolesti, ali i dalje u znatno manjem broju nego dijagnoze iz skupine bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva. Sveukupno 8 pacijenata je imalo neku dijagnozu iz skupine bolesti kože i potkožnog tkiva, od kojih je 3 muškog spola, a 7 ženskog spola. Među muškim ispitanicima je dvoje imalo dijagnozu psorijaze (L40), a jedan je imao dijagnozu akutnog limfadenitisa (L04). Kod ženskih ispitanika 3 su imale neki oblik psorijaze (L40, L40.8), jedna je posjedovala dijagnozu L24 (iritantni kontaktni dermatitis) i jedna L85 (ostala epidermalna zadebljanja).

Iz skupine bolesti oka i andeksa smo zamijetili najmanje dijagnoza među našim ispitanicima. Među muškim ispitanicima smo utvrdili jednog pacijenta koji je imao dijagnozu konjunktivitisa (H10) i 2 koji su imali dijagnozu akutne upale šarenice i zrakastog tijela (H20). Među ženskim ispitanicima, samo je jedna osoba imala dijagnozu akutne upale šarenice i zrakastog tijela (H20), što znači da ukupno 4 pacijenta su imala nekakvu dijagnozu iz skupine bolesti oka, što odgovara postotku od 3,3% od ukupnog broja pacijenata pozitivnih na gen HLA – B*27.

Među ispitanicima koji su imali neku od dijagnoza iz skupine bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva najčešće je zamijećen podtip HLA – B*27:02, koji je bio prisutan kod 16 ispitanika muškog spola i 25 ispitanika ženskog spola, što znači da je sveukupno 41 ispitanik imao prisustvo podtipa HLA – B*27:02 zajedno sa nekom dijagnozom iz skupine bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva, a to je jednako postotku od 34,2%. Slijedeći najčešće primijećen podtip je bio HLA – B*27:05, kojeg je imalo 13 ispitanika muškog spola i 25 ispitanika ženskog spola, što znači da je sveukupno 38 ispitanika imalo podtip HLA – B*27:05 zajedno sa prisustvom neke bolesti mišićno-koštanog sustava, što je jednako postotku od 31,2%. Najmanje primijećen podtip je bio HLA – B*27:03, kojeg je imalo 5 ispitanika muškog i 10 ispitanika ženskog spola, što je ukupno 15 ispitanika kojima je ustanovljeno prisustvo podtipa HLA – B*27:03 a koji imaju neku dijagnozu iz skupine bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva, što je jednako postotku od 12,5%. Općenito među svim skupinama najmanje zamijećen i rijedak podtip, HLA – B*27:08 je bio prisutan kod jednog pacijenta ženskog spola koji je imao neku od dijagnoza iz ove skupine bolesti, što odgovara postotku od 0,8%.

Što se tiče ispitanika koji su imali neku od dijagnoza iz skupine bolesti kože i potkožnog tkiva, najčešće je zamijećen ponovno podtip HLA – B*27:02, kojeg je imao jedan ispitanik muškog spola i 3 ženskog spola, što znači da je sveukupno 4 pacijenta imalo prisustvo podtipa HLA – B*27:02 zajedno sa nekom dijagnozom iz skupine bolesti kože i potkožnog tkiva, što je jednako postotku od 3,3% od ukupnog broja pacijenata koji su pozitivni na neki od podtipova gena HLA – B*27. Podtip HLA – B*27:05 je zamijećen kod 2 pacijenta muškog i jednog pacijenta ženskog spola, a koji su imali neku od dijagnoza iz ove skupine bolesti, što znači da sveukupno 3 ispitanika ima podtip HLA – B*27:05 zajedno sa nekom dijagnozom iz skupine bolesti kože i potkožnog tkiva, što je u postotku 2,5%. Podtip HLA – B*27:03 je zamijećen samo jedanput kod jednog ispitanika ženskog spola koji ima neku dijagnozu iz ove skupine, što je jednako postotku od 0,8% od ukupnog broja pacijenata.

Najmanje ispitanika je posjedovalo neku od dijagnoza iz skupine bolesti oka i andeksa, pa je tako i učestalost zamijećenih podtipova bila najmanja. Podtip HLA – B*27:02 je ustanovljen samo kod 2 muška ispitanika koji su imali neku dijagnozu iz ove skupine bolesti, što odgovara postotku od 1,7% od ukupnog broja pacijenata pozitivnih na neki podtip gena HLA – B*27. Podtip HLA – B*27:05 uočen je isto tako samo kod muškog spola, kod jednog ispitanika, što odgovara postotku od 0,8%. Općenito manje učestali podtip, HLA – B*27:03 smo zamijetili kod jednog pacijenta ženskog spola, dok ga nismo zamijetili kod

pacijenata muškog spola, što ponovno odgovara postoku od 0,8% od ukupnog broja pacijenata pozitivnih na neki od podtipova gena HLA – B*27.

Cijelu raspodjelu i odnos između pojedinih skupina bolesti i učestalosti pojedinih podtipova gena HLA – B*27 u odnosu na dijagnozu možemo vidjeti u Tablici 8. i Tablici 9.

Tablica 8. Raspodjela pacijenata prema dijagnozama iz odabranih skupina bolesti

Skupina bolesti	Šifra dijagnoze	Broj pacijenata (m/ž)	Broj pacijenata (m + ž)	Postotak (m + ž)
Bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva (M00-M99)	M13*	9/16	25	20,8%
	M06*	2/8	10	8,3%
	M45	4/1	5	4,2%
	Ostale dijagnoze**	19/37	56	46,7%
Bolesti kože i potkožnog tkiva (L00-L99)	L40	2/3	5	4,2%
	Ostale dijagnoze**	1/4	5	4,2%
Bolesti oka i andeksa (H00-H59)	H10 ili H20	3/1	4	3,3%
Ostale dijagnoze iz drugih skupina	/	1/12	13	10,8%

*Uključene su i podvrste dijagnoze ako su prisutne

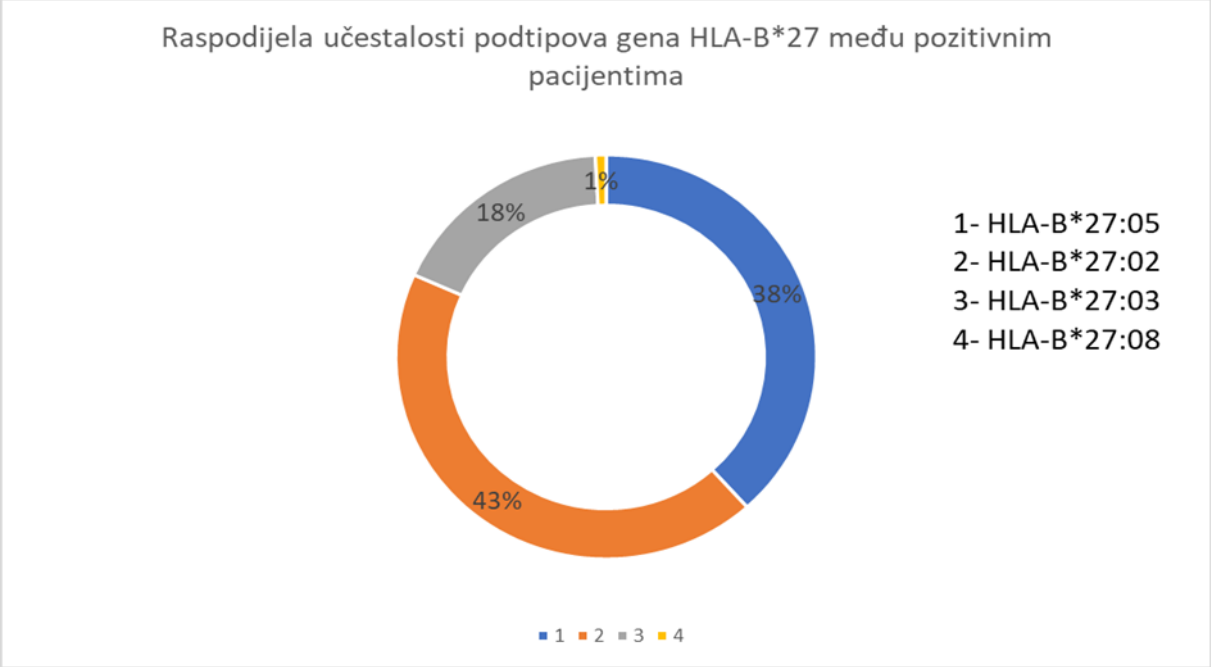
**Unutar skupine bolesti

Tablica 9. Raspodjela pacijenata prema učestalosti podtipova gena HLA – B*27 u odnosu na dijagnozu

Skupina bolesti	Podtip gena HLA – B*27	Broj pacijenata (m/ž)	Broj pacijenata (m+ ž)	Postotak (m +ž)
Bolesti mišićno-koštanog sustava i vezivnog tkiva (M00 – M99)	HLA-B*27:02	16/25	41	34,2%
	HLA-B*27:05	13/25	38	31,2%
	HLA-B*27:03	5/10	15	12,5%
	HLA-B*27:08	0/1	1	0,8%
Bolesti kože i potkožnog tkiva (L00-L99)	HLA-B*27:02	1/3	4	3,3%
	HLA-B*27:05	2/1	3	2,5%
	HLA-B*27:03	0/1	1	0,8%
	HLA-B*27:08	/	/	/
Bolesti oka i andeksa (H00-H59)	HLA-B*27:02	2/0	2	1,7%
	HLA-B*27:05	1/0	1	0,8%
	HLA-B*27:03	0/1	1	0,8%
	HLA-B*27:08	/	/	/

5. RASPRAVA

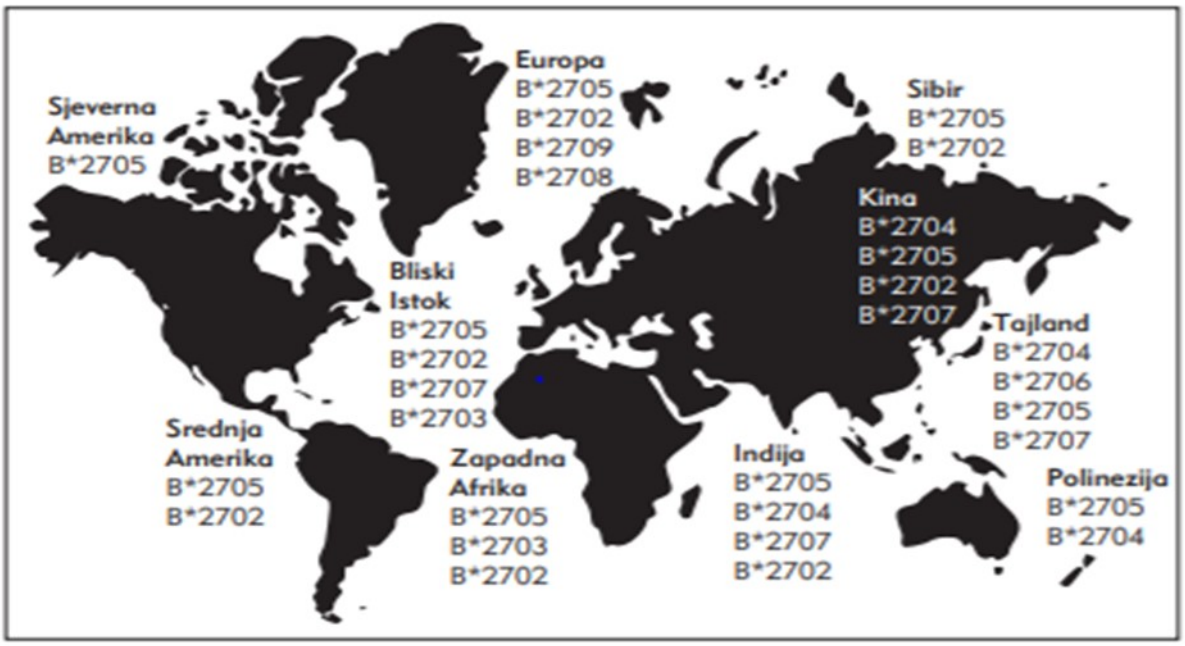
Glavni cilj ovoga rada bio je prikazati učestalost dva najčešća podtipa gena HLA – B*27 kod nesrodnih pacijenata sa područja Splitsko – dalmatinske županije. Rezultati su pokazali kako je alel HLA – B*27:02 najčešći, sa učestalošću od 43%, a odmah nakon njega slijedi alel HLA – B*27:05, sa učestalošću od 38% među našim ispitanicima, koji su u mnogim istraživanjima pokazali povezanost sa bolestima, pogotovo spondiloartropatijama (3). Međutim, samo 4,2% naših ispitanika koji su bili pozitivni na neki od alela HLA – B*27 gena su razvili ankliozatni spondilitis, iako je vjerojatnost za razvoj ankliozatnog spondilitisa kod osoba pozitivnih na gen HLA – B*27 veća od 90%, a za neke druge spondiloartropatije se kreće u rasponu od 40% do 75%, što potvrđuje tvrdnju da ako osoba posjeduje gen HLA – B*27 ne znači da će razviti bolest povezanu sa prisustvom tog gena unutar njihovog haplotipa. Inače manje učestali alel unutar hrvatske i svjetske populacije, HLA – B*27:03, se kod naših pacijenata pojavio sa stopom učestalosti od 18%, a drugi vrlo rijedak alel HLA – B*27:08 zamijećen je kod jednog ispitanika (1%). (Slika 23.)



Slika 23. Grafički prikaz učestalosti utvrđenih podtipova gena HLA – B*27 kod pozitivnih pacijenata

Prethodno je navedeno kako je prisustvo gena HLA – B*27 povezano sa nastankom preko 100 različitih bolesti, a kod nekih populacija se počeo koristiti kao glavni marker za ankliozatni spondilitis i druge povezane nedefinirane spondiloartropatije (21). Međutim, mnoga druga istraživanja provedena na manjem broju pacijenata pozitivnih na neki od alela HLA – B*27 nisu usuglašena, u smislu da neka potvrđuju povezanost alela HLA – B*27:02, HLA – B*27:05, HLA – B*27:03 i mnogih drugih sa nastankom bolesti, odnosno prisustvom AS-a i SpA (22,23,24), dok druga opovrgavaju povezanost gena HLA – B*27 i njegovih alela sa nastankom bolesti, uz dokaze kako se prije za neke alele za koje se mislilo da su zaštitni sada utvrdilo kako su i oni prisutni kod osoba koje imaju neku od spondiloartropatija, npr. alel HLA – B*27:06 (25,26). Poznato je da se aleli međusobno razlikuju u slijedu aminokiselina, a te razlike imaju utjecaja na specifičnost vezanja pojedinih peptida, odnosno na same funkcionalne i kemijske značajke molekule HLA – B*27, što bi za pretpostavku dalo da će različiti oblici alela imati različiti stupanj učestalosti i povezanosti sa nastankom bolesti, međutim istraživanja govore suprotno.(3) Uzorci ispitanika koji su uzeti iz pojedinih dijelova svijeta i analizirani uključuju mali broj ispitanika, stoga bez obzira na dosadašnje rezultate istraživanja potrebno je provesti ih još više na većem broju bolesnika, obuhvatiti više populacija i još dodatno ustanoviti samu povezanost gena HLA – B*27 i njegovih podtipova sa nastankom bolesti, kao i drugih gena unutar HLA sustava i povezanost ne-HLA gena sa bolestima. Isto tako, potrebno je provesti više istraživanja koja se bave bolesnicima koji ne posjeduju gen HLA – B*27, a imaju manifestaciju bolesti koja je povezana sa njegovom prisutnošću.

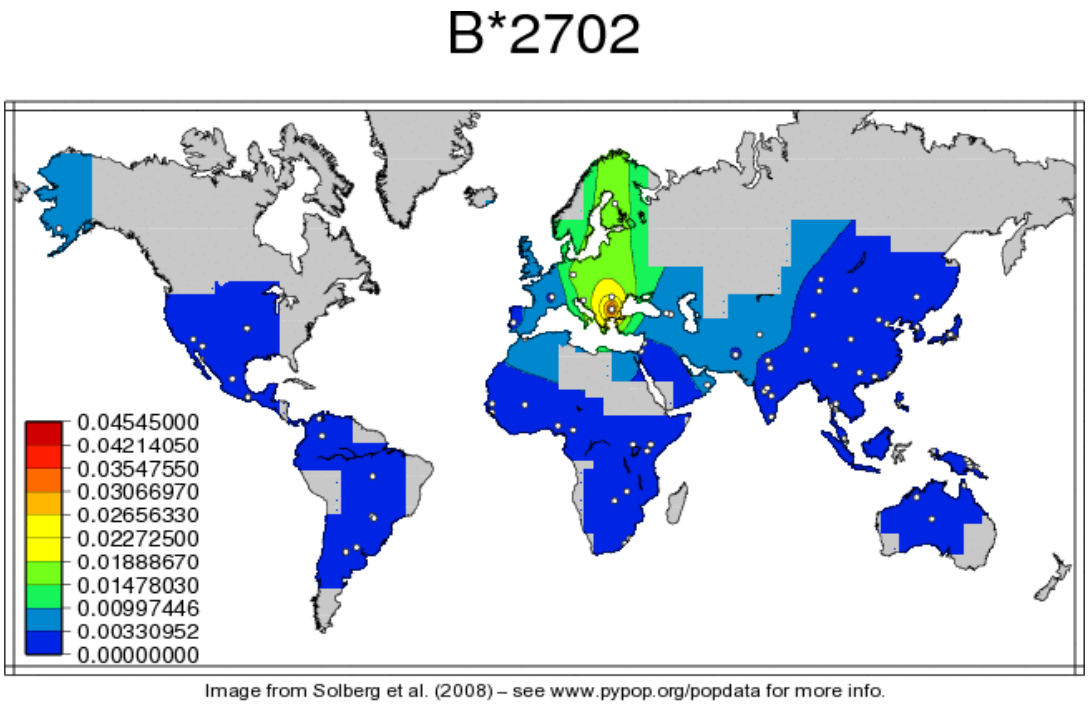
Na slici 24. nalazi se prikaz karte svijeta sa najčešćim zamijećenim alelima gena HLA – B*27 u određenim regijama i kontinentima, gdje je vidljivo da su u Europi aleli HLA-B*27:05 i HLA-B*27:02 najzastupljeniji aleli, kao i u ostatku svijeta. Iz slike karte svijeta je isto tako vidljivo da je učestalost alela HLA-B*27:03 i HLA-B*27:08 znatno manja u odnosu na prethodna dva. Alel HLA-B*27:03 je najčešći među populacijama Bliskog Istoka i Zapadne Afrike, dok je HLA-B*27:08 za sada zamijećen najviše na području Europe (Slika 24.) (3)



Slika 24. Raspodjela alela HLA – B*27 u svijetu

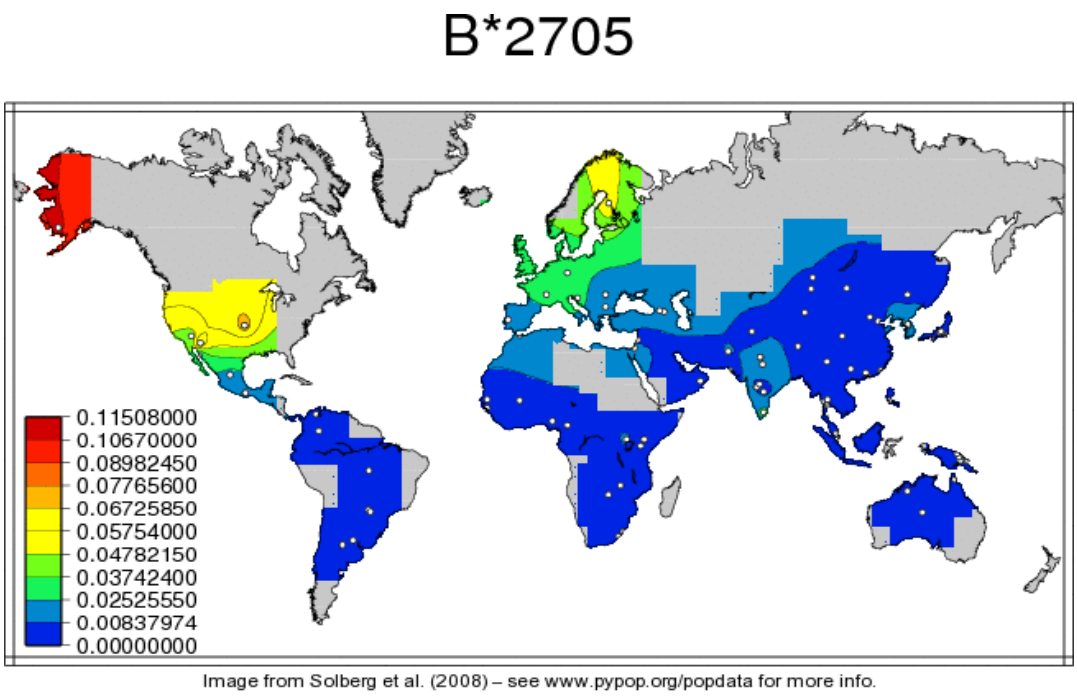
(Preuzeto sa : (3))

U usporedbi sa slikom 23., na slijedećim slikama karte svijeta možemo vidjeti učestalost pojedinih podtipova koje smo ustanovili kod naših pacijenata u smislu njihove rasprostranjenosti i učestalosti u regijama cijelog svijeta (Slika 25. – Slika 28.). Ako usporedimo rezultate o učestalosti pojedinih podtipova koje smo dobili analizom podataka iz našeg istraživanja sa učestalosti pojedinih podtipova prema slikama 25. – 28. , vidljivo je kako je učestalost podtipa HLA – B*27:02 najviša u predjelu Europe u kojem se geografski nalazi i Hrvatska (Slika 25.), dok je učestalost podtipa HLA – B*27:05 nešto manja u Europi ali je najviša na području Sjeverne Amerike, odakle se pretpostavlja da je ovaj podtip lagano migrirao do Srednje Amerike i kasnije do Europe (Slika 26.). Podtip HLA – B*27:03 pokazuje ponovno najvišu učestalost u predjelima Sjeverne Amerike, a iznimno malu učestalost u predjelima Srednje Amerike i sjevernog dijela Europe (Slika 27.). Najrjeđi alel kojeg smo zamijetili kod jednog našeg pacijenta, HLA – B*27:08, pokazuje isto tako malu rasprostranjenost po svijetu, a u najvišoj stopi je zabilježen u populaciji Španjolske i nekim dijelovima Afrike, dok je u Europi vrlo slabo rasprostranjen ili skoro nikako nije zamijećen (Slika 28.)



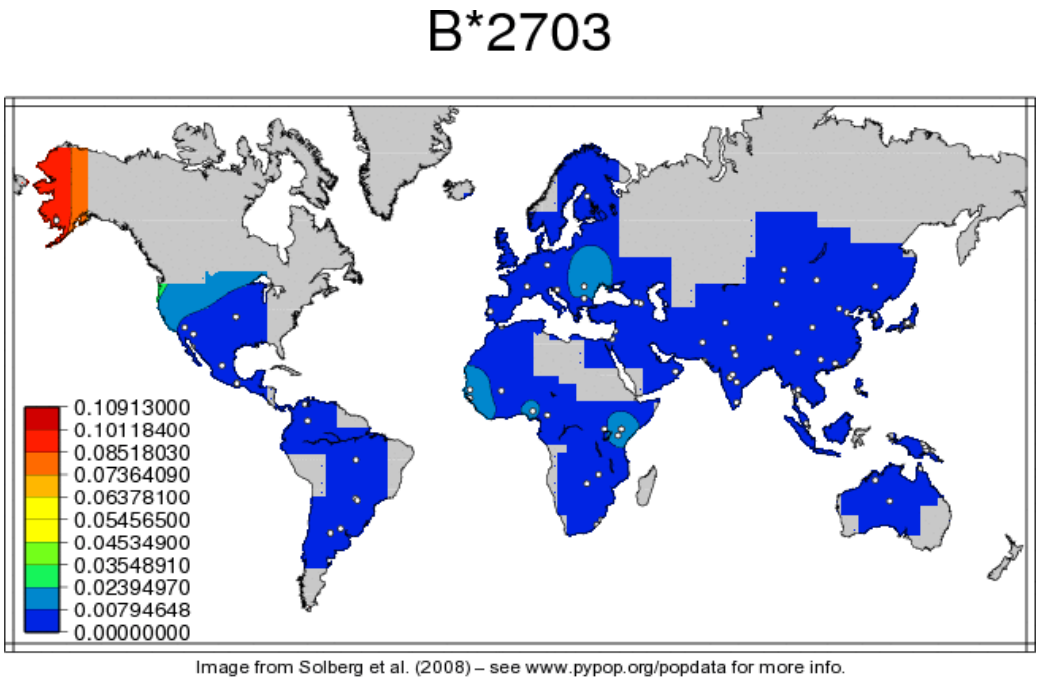
Slika 25. Učestalost podtipa HLA – B*27:02 u svijetu

(Preuzeto sa : (27))



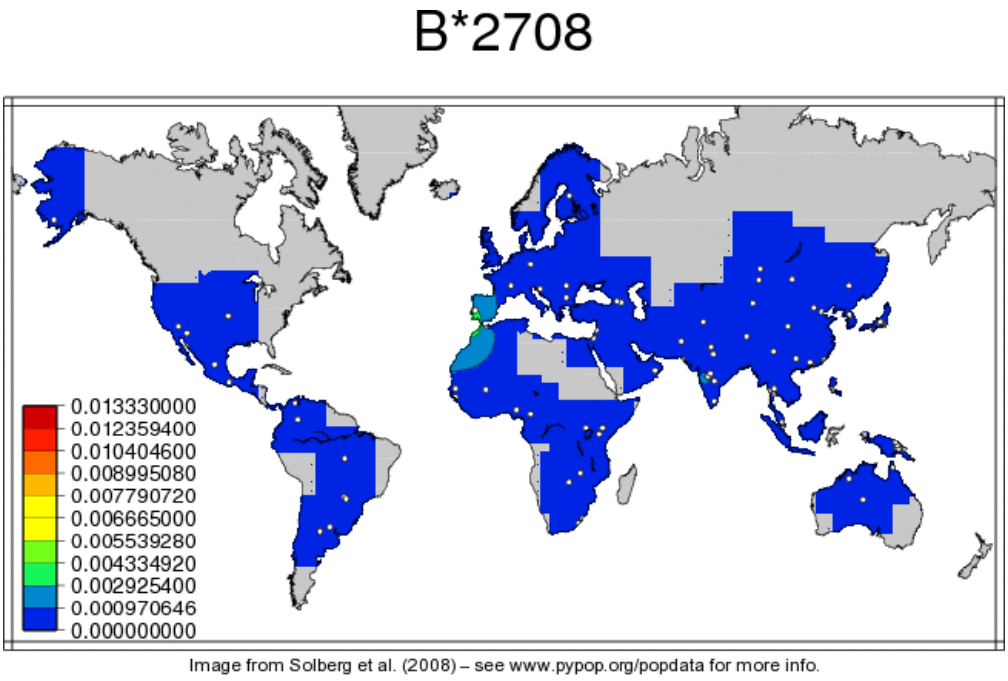
Slika 26. Učestalost podtipa HLA – B*27:05 u svijetu

(Preuzeto sa : (27))



Slika 27. Učestalost podtipa HLA – B*27:03 u svijetu

(Preuzeto sa : (27))



Slika 28. Učestalost podtipa HLA – B*27:08 u svijetu

(Preuzeto sa : (27))

Kada promatramo raspodjelu pojedinih zamijećenih alela gena HLA – B*27 prema spolu, učestalosti se ne razlikuju mnogo od onih zajedničkih kada se promatraju oba spola zajedno. Među muškim ispitanicima, zamjetno najčešći alel bio je HLA – B*27:02 sa učestalošću od 46%, a odmah nakon njega slijedi alel HLA-B*27:05 sa učestalošću od 39%. Na trećem mjestu po učestalosti je bio alel HLA – B*27:03 (15%), dok alel HLA – B*27:08 nije bio zamijećen kod muškog spola. Slične rezultate pokazuju i ispitanici ženskog spola, kod kojih je HLA – B*27:02 bio najučestaliji alel (42%), zatim slijedi HLA – B*27:05 sa učestalošću od 38%. HLA – B*27:03 je bio učestaliji kod žena nego kod muškaraca (19%), a alel HLA – B*27:08 je utvrđen kod jednog pacijenta ženskog spola, što odgovara učestalosti od 1%, što je poprilično realna učestalost za ovaj rijedak alel. Razvitak bolesti koja je povezana sa prisustvom gena HLA – B*27 je češća kod muškaraca nego kod žena, a isto tako i kod djece muškog spola nego kod djece ženskog spola, međutim ne za svaku bolest (28,29).

Otkrića vezana za sustav HLA i njegovom povezanošću sa brojnim bolestima pokazala su njegovu veliku važnost u ranoj i adekvatnoj dijagnostici bolesti, genetici, transplantaciji organa i krvotvornih matičnih stanica, kao i o važnosti poznavanja patoloških mehanizama u pozadini autoimunih bolesti. Isto tako, važnost poznavanja sustava HLA leži i u populacijskim istraživanjima i rasprostranjenosti i učestalosti određenih podtipova gena sustava HLA pomoću kojih se mogu pratiti kretanja ljudske populacije tokom niza godina u prošlosti. Budući da mnogo ljudi pati od bolesti povezanih sa genom HLA – B*27, iako je podrobno opisan i istražen, to još nije dovoljno da bi smo mogli kompletno razumjeti mehanizme pomoću kojih on uzrokuje nastanak preko 100 različitih bolesti te su potrebna mnoga druga istraživanja u svrhu spoznaje o njegovom patološkom djelovanju na ljudski organizam. Isto tako, rana dijagnostika i tipizacija u ranijoj životnoj dobi bi omogućila bolju analizu nastanka pojedinih podtipova alela i rasprostranjenosti među populacijama, a isto tako bi omogućila pojedincima koji posjeduju ovaj gen adekvatnu terapiju na vrijeme i točnu dijagnozu, što bi rezultiralo boljim tokom liječenja. Za primjer možemo uzeti ankliozatni spondilitis koji se najčešće javlja kod pojedinaca između njihove 20. i 40. godine života, a slično se može reći i za razne oblike artritisa, koji se javljaju najčešće između 25. i 50. godine života, iako se mogu javiti u bilo kojoj životnoj dobi. Među našim pacijentima najviše je bilo onih starije i srednje životne dobi, koji su između 70. i 40. godine života napravili testiranje, odnosno molekularnu HLA tipizaciju, i većina njih je imala i dijagnoze koje su povezane sa prisustvom gena HLA – B*27.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanje učestalosti dva najčešća podtipa gena HLA – B*27 kod ispitanika sa prebivalištem na području Splitsko – dalmatinske županije pokazalo je kako su najviše zamijećeni podtip HLA – B*27:02, sa učestalošću od 43%, i podtip HLA – B*27:05, sa učestalošću od 38%. Veću učestalost je pokazao i alel HLA – B*27:03 (18%), a alel HLA – B*27:08 uočen je jedanput (1%).

Pojedine učestalosti ustanovljenih podtipova kod ispitanika se poklapaju sa učestalostima tih podtipova na razini svjetske populacije, gdje je alel HLA – B*27:02 najučestaliji globalno, kao i na samom području Europe. Isto vrijedi i za alel HLA – B*27:05 koji je nešto manje učestao, ali je i dalje najčešći na području Europe. Alel HLA – B*27:03 pokazao je veću učestalost u našem uzorku ispitanika, iako nije toliko učestao na području Europe, a najveću učestalost pokazuje u predjelima Sjeverne Amerike. Rijedak alel HLA – B*27:08 u našem uzorku ispitanika uočen je jedanput, jer je njegova globalna rasprostranjenost je iznimno mala, a najčešći je u predjelima Španjolske i dijelova Afrike, dok je na području centralne i sjeverne Europe slabo zastupljen.

Ispitanici kojima je napravljeno molekularno testiranje gena HLA sustava su uglavnom bili između 40 i 70 godina starosti (medijan dobi: 64 godine, raspon 10 do 79 godina) prilikom pristupanja testiranju.

Dijagnoze koje su se najčešće javljale kod pozitivnih pacijenata spadale su u skupinu bolesti mišićno – koštanog sustava i vezivnog tkiva, u koju spadaju bolesti kao što su ankliozatni spondilitis i mnoge vrste artritisa, sa učestalošću od 20,8% za artritise i artropatije, 8,3% za ostale reumatoidne artritise, 4,2% za ankliozatni spondilitis i 46,7% za ostale dijagnoze iz ove skupine bolesti. Dijagnoze koje su unutar skupine bolesti kože i potkožnog tkiva su se javljale sa učestalostima manjima od 10% za pojedinu bolest. Najmanje je zamijećeno dijagnoza iz skupine bolesti oka i andeksa, sa učestalošću od 3,3%. Ostalih nepovezanih dijagnoza je bilo među pacijentima sa učestalošću od 10,8%.

7. LITERATURA

1. Immunopaedia.org.za. [Internet] History of MHC 1901 – 1970. Dostupno na poveznici : https://www.immunopaedia.org.za/immunology/historical-fun-facts/history-of-mhc-1901-1970/

2. R. Žunec, Z. Grubić, S. Ballen. Važnost imunogenetike u transplantaciji organa. Medix, 2011. (92/93, 208-213)

3. Z. Grubić. Gen HLA – B*27: Polimorfizam, evolucija, raspodjela i povezanost sa spondiloartropatijama. Reumatizam, 2006. (53, 5-10)

4. E. Čečuk – Jeličić, S. Jaman. Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti. (Skripta za studente OZS-a, odsjek medicinsko laboratorijske dijagnostike, 2013.)

5. E. Fejzić, I. Emimović, J. Karamehić, A. Šahović, S. Šišić, D. Suljević. Association Between Human Leukocyte Antigen-B*27 and Pathogenesis in Seronegative Spondyloarthropathies in Federation of Bosnia and Herzegovina. Arch Rheumatol 2019; 34(2):166-175.

6. Z. Grubić, R. Žunec, K. Štingl, D. Sviličić, V. Kerhin-Brkljačić. Haplotipske veze dva najčešća podtipa gena HLA – B*27 u hrvatskoj populaciji. Reumatizam 2008. (55, 5-9)

7. L. Lamot, M. Vidović, M. Perica, L. Tambić Bukovac, M. Harjaček. Genetska podloga različitih oblika spondiloartritisa. Reumatizam 2014. (61, 23-31)

8. Thorsby E. (2009): A short history of HLA. Tissue antigens, 74 (2): 101-116.

9. Bowness P., Zaccai N., Bird L., Jones Y. E. (1999): HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. Expert Reviews in Molecular Medicine 16: 1-10.

10. http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html

11. Dausset J. (1980): The challenge of the early days of human histocompatibility. Immunogenetics, 10 (1): 1-5

12. S.C.L. Gough, M.J. Simmonds. The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. Curr Genomics. 2007 Nov; 8(7): 453–465.

13. http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html

14. A. Calin. The Relationship Between Genetics and Environment in the Pathogenesis of Rheumatic Diseases. 1979. Western Journal of Medicine 131(3):205-18.

15. S. J. Powis, R. A. Colbert. HLA – B27 : The Story Continues to Unfold. Arthritis and Rheumatology, Vol. 68, No. 5, 2016. : 1057-1059.

16. K. Mesić. Povezanost gena HLA – B*27 s razvojem spondiloartropatija u populaciji istočne Hrvatske. 2017. (Diplomski rad)

17. Matazaraki V, Kumar V, Wijmenga C, Zhernakova A. The MHC locus and gentic susceptibility to autoimmune and infectious disease. Genome Biol. 2017;18-76.

18. D. Štimac. Istraživanje haplotipova HLA-B27 u bolesnika sa spondiloartropatijama u hrvatskoj populaciji. 2010. (Diplomski rad)

19. I.Andreis, D.Batinić, F. Čulo, D. Grčević, V.L. Škudar, M.Marušić, M. Taradi, D. Višnjić. Imunologija. Medicinska Naklada Zagreb, 2010.

20. https://hr.wikipedia.org/wiki/MKB-10

21. Wu X, Wang G, Zhang L, Xu H. Genetics of Ankylosing Spondylitis-Focusing on the Ethnic Difference Between East Asia and Europe. Front Genet. 2021 Jun 14;12:671682. doi: 10.3389/fgene.2021.671682. PMID: 34194471; PMCID: PMC8236852.

22. Bowness P, Zaccai N, Bird L, Jones EY. HLAB27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. Expert Reviews in Molecular Medicine (1999;45:1-10).

23. Sudarsono D, Hadi S, Mardjuadi A. i sur. Evidence that HLA-B*2706 is not protective against spondyloarthropathy. Journal of Rheumatology (1999;26(7):1634-1537)

24. McMichael A, Bowness P. HLA-B27: natural function and pathogenetic role in spondyloarthritis. Arthritis Research 2002;4(3):S153-S158.

25. Brown MA, Jepson A, Young A, Whittle HC, Greenwood BM, Wordsworth BP. Ankylosing spondylitis in West Africans-evidence for a non-HLA-B27 protective effect. Annals of Rheumatic Diseases 1997;56(1):68-70.

26. Wang G, Kim TH, Li Z, Cortes A, Kim K, Bang SY, Leo P, Brown MA, Xu H. MHC associations of ankylosing spondylitis in East Asians are complex and involve non-HLA-B27 HLA contributions. Arthritis Res Ther. 2020 Apr 9;22(1):74. doi: 10.1186/s13075-020-02148-5. PMID: 32272966; PMCID: PMC7146985.

27. http://pypop.org/popdata/2008/byfreq-B.php.html

28. Rumsey DG, Lougee A, Matsouaka R, Collier DH, Schanberg LE, Schenfeld J, Shiff NJ, Stoll ML, Stryker S, Weiss PF, Beukelman T; Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance Registry Investigators. Juvenile Spondyloarthritis in the Childhood Arthritis and Rheumatology Research Alliance Registry: High Biologic Use, Low Prevalence of HLA-B27, and Equal Sex Representation in Sacroiliitis. Arthritis Care Res (Hoboken). 2021 Jul;73(7):940-946. doi: 10.1002/acr.24537. PMID: 33331139.

29. http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-misica-kostiju-i-vezivnog-tkiva/bolesti-zglobova/ankilozni-spondilitis

30. Owen D. Solberg, Steven J. Mack, Alex K. Lancaster, Richard M. Single, Yingssu Tsai, Alicia Sanchez-Mazas, Glenys Thomson. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: A meta-analytic review of 497 population studies, Human Immunology, Vol. 69, Issue 7, 2008; 443-464

8. ŽIVOTOPIS

OSNOVNI PODACI

Ime i prezime: Ivana Pejić

Adresa: Rikarda Katalinića Jeretova 3, 21000 Split

Država: Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Narodnost: hrvatica

Telefon: 099/272 – 2907

E-mail: thetapeinsnosticky@gmail.com

Datum i mjesto rođenja : 24.06.1996. , Split, RH

OBRAZOVANJE

2003. – 2011. Osnovna škola "Plokite", Split

2011. – 2015. Prirodoslovno tehnička škola Split

2015. – 2016. Kemijsko tehnološki fakultet Split, smjer Kemija

2017. – danas Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, smjer Medicinsko laboratorijska dijagnostika

RADNO ISKUSTVO

2013. – 2014, 2015. – 2017. Rad u ugostiteljstvu

2018. – danas Rad u KBC Split

JEZIK

Hrvatski jezik (materinji jezik) – u govoru i pismu

Engleski jezik – u govoru i pismu

POPIS TABLICA

Tablica 1. Povezanost nekih bolesti sa genima sustava HLA 20
Tablica 2. Učestalost prisustva gena HLA – B*27 kod povezanih bolesti 22
Tablica 3. Interpretacija rezultata serološkog testiranja 28
Tablica 4. Broj i učestalost određenih podtipova gena HLA – B*27 među pacijentima 36
Tablica 5. Prikaz raspodijele učestalosti uočenih podtipova gena HLA – B*27 među pozitivnim pacijentima prema spolu 38
Tablica 6. Prikaz raspodjele ispitanika prema dobnim skupinama 40
Tablica 7. Tablica klasifikacije bolesti prema MKB – 10 42
Tablica 8. Raspodjela pacijenata prema dijagnozama iz odabranih skupina bolesti 46
Tablica 9. Raspodjela pacijenata prema učestalosti podtipova gena HLA – B*27 u odnosu na dijagnozu 47

POPIS ILUSTRACIJA

Slika 1. Otkriće antigena II 1
Slika 2. Tablica koja prikazuje rani sustav H2 2
Slika 3. Grafikon prikazuje broj imenovanih alela sustava HLA od 1987. do 2021. g. 7
Slika 4. Prvi dio tablice koja prikazuje sveukupni broj otkrivenih gena i alela sustava HLA i HLA razred I 8
Slika 5. Drugi dio tablice koja prikazuje gene HLA razreda II i ostale nesvrstane gene 9
Slika 6. Križno – reaktivne skupine HLA lokusa A (a) i HLA lokusa B (b) 11
Slika 7. Položaj HLA lokusa na kromosomu 6 12
Slika 8. Prikaz građe molekula HLA razreda I (lijevo) i razreda II (desno) 15
Slika 9. Nomenklatura sustava HLA 17
Slika 10. Princip nasljeđivanja gena HLA 18
Slika 11. Pretpostavljena evolucija podtipova (alela) gena HLA – B*27 21
Slika 12. Princip testa mikrolimfocitotoksičnosti 27
Slika 13. Test mikrolimfocitotoksičnosti pod mikroskopom 29

Slika 14. Primjer rezultata serološke tipizacije 29
Slika 15. Shematski prikaz izolacije DNA iz uzorka krvi pomoću NucleoSpin Blood komercijalnog kita sa kolonama 30
Slika 16. Shematski prikaz procesa amplifikacije DNA metodom PCR 32
Slika 17. Princip metode PCR – SSO 32
Slika 18. Primjer rezultata metode PCR-SSO u programu Match It DNA 33
Slika 19. Shematski prikaz metode PCR-SSP 34
Slika 20. Primjer rezultata gel elektroforeze 35
Slika 21. Grafički prikaz odnosa pacijenata pozitivnih na gen HLA – B*27 37
Slika 22. Grafički prikaz raspodjele pacijenata prema dobnim skupinama 41
Slika 23. Grafički prikaz učestalosti utvrđenih podtipova gena HLA – B*27 kod pozitivnih pacijenata 48
Slika 24. Raspodjela alela HLA – B*27 u svijetu 50
Slika 25. Učestalost podtipa HLA – B*27:02 u svijetu 51
Slika 26. Učestalost podtipa HLA – B*27:05 u svijetu 51
Slika 27. Učestalost podtipa HLA – B*27:03 u svijetu 52
Slika 28. Učestalost podtipa HLA – B*27:08 u svijetu 52