

# Molekularna tipizacija gena HLA razreda II u oboljelih od demijelinizacijskih bolesti na području istočne Hrvatske

---

Šarić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:384318>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Jelena Šarić**

**MOLEKULARNA TIPIZACIJA GENA  
HLA RAZREDA II U OBOLJELIH OD  
DEMIJELINIZACIJSKIH BOLESTI NA  
PODRUČJU ISTOČNE HRVATSKE**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Jelena Šarić**

**MOLEKULARNA TIPIZACIJA GENA  
HLA RAZREDA II U OBOLJELIH OD  
DEMIJELINIZACIJSKIH BOLESTI NA  
PODRUČJU ISTOČNE HRVATSKE**

**Završni rad**

**Osijek, 2017.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva, Kliničkog Zavoda za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Saška Marczy

Rad ima dvadeset i sedam (27) stranica, šest (6) tablica i dvije (2) slike.

*Posebna zahvala mentorici doc. dr. sc. Saški Marczy na savjetima, prenesenom znanju i pomoći pri pisanju rada.*

*Hvala mojim kolegicama Tei i Karli.*

*Zahvala mojoj obitelji na stalnoj podršci, ohrabrivanju i ljubavi.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Demijelinizacijske bolesti.....	1
1.2. Multipla skleroza.....	1
1.2.1. Osobitosti i klasifikacija multiple skleroze .....	1
1.2.2. Etiologija i patogeneza MS-a .....	2
1.3. HLA sustav.....	3
1.4. Povezanost MS-a i HLA sustava .....	5
1.5. Značaj istraživanja povezanosti sustava HLA s multiplom sklerozom i demijelinizacijskim bolestima .....	6
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	7
3. ISPITANICI I METODE.....	8
3.1. Ustroj istraživanja.....	8
3.2. Ispitanici.....	8
3.3. Metode.....	8
3.3.1. Izolacija DNA iz pune periferne krvi .....	8
3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA .....	9
3.3.3. Tipizacija lokusa HLA-DRB1 i HLA-DQB1 .....	10
3.3.4. Razdvajanje produkata PCR-a elektroforezom u agaroznom gelu .....	11
3.3.5. Analiza rezultata tipizacije metodom PCR-SSP i agarozne-gel elektroforeze .....	12
3.3.6. Statističke metode.....	13
4. REZULTATI.....	14
4.1. Osobine ispitivanih skupina bolesnika.....	14

4.2. Raspodjela alela HLA-DRB1* u oboljelih od MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti.....	14
4.3. Raspodjela alela HLA-DQB1* u skupinama oboljelih od MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti .....	16
4.4. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1*-DQB1* u skupinama oboljelih od MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti.....	18
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČAK.....	22
7. SAŽETAK.....	23
8. SUMMARY.....	24
9. LITERATURA.....	25
10. ŽIVOTOPIS.....	27



**POPIS KRATICA**

ADEM – akutni diseminirani encefalomijelitis

AF – učestalost alela (engl. *allele frequency*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiamin tetraoctena kiselina

EP – potaknuti potencijali

EBV – Epstein Barr virus

GWAS – engl. *genome-wide association studies*

HF – učestalost haplotipa (engl. *haplotype frequency*)

HLA – ljudski leukocitini antigen (engl. *Human Leukocyte Antigen*)

IMSGC – engl. *The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*

KBC – Klinički bolnički centar

LD – neravnoteža udruživanja (engl. *Linkage disequilibrium*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

MS – multipla skleroza (engl. *multiple sclerosis*)

MHC – glavni sustav tkivne podudaranosti (engl. *Major Histocopatibility Complex*)

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PCR-SSP – engl. *polymerase chain reaction-sequence-specific primer*

PPMS – primarno progresivna multipla skleroza

RRMS – relapsno-remitirajuća multipla skleroza

SDMSH – Savez društava multiple skleroze Hrvatske

SPMS – sekundarna progresivna multipla skleroza

## 1. UVOD

### 1.1. Demijelinizacijske bolesti

Demijelinizacijske su bolesti heterogena skupina bolesti koje uzrokuju upalu i selektivno oštećenje mijelina u središnjem živčanom sustavu, dok periferni živčani sustav u većini slučajeva ne zahvaćaju. Bolesti smanjuju provođenje signala i komunikaciju mozga s ostalim dijelovima tijela. Dijele se na upalne i neupalne. U upalne se ubrajaju multipla skleroza (MS), optički neuromijelitis, diseminirani encefalomijelitis (ADEM), neurosarkoidoza, neuroborelioza i demijelinizacijske bolesti u bolestima vezivnog tkiva. Neupalne demijelinizacijske bolesti mogu biti vaskularne, metaboličke i genetske bolesti (1). Specifični testovi za dijagnozu demijelinizacijskih bolesti ne postoje, a dijagnoza se postavlja na temelju prepoznavanja kliničkih pojava uzrokovanih oštećenjem središnjeg živčanog sustava. Dijagnosticiraju se uz pomoć niza postupaka koji uključuju nuklearnu magnetsku rezonanciju (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) mozga i kralježničke moždine, elektrofiziološke metode snimanja potaknutog potencijala, analizu cerebrospinalne tekućine, hematološku i biokemijsku analizu periferne krvi, molekularnu analizu faktora koagulacije, imunološke analize (1). Incidencija demijelinizacijskih bolesti ovisi o tipu bolesti, a liječenje je specifično za svakog pacijenata i simptom bolesti. Autoimuni mehanizmi, nasljedni metabolički poremećaji, virusi, toksini ili nedostatak vitamin B12 mogu utjecati na razvoj demijelinizacijske bolesti. Multipla skleroza najčešća je demijelinizacijska bolest (2).

### 1.2. Multipla skleroza

#### 1.2.1. Osobitosti i klasifikacija multiple skleroze

Multipla skleroza kronična je upalna autoimuna bolest središnjeg živčanog sustava koja se očituje gubitkom mijelina, gliozom, patološkim stanjima aksona i oligodendrocita, te progresivnom neurološkom disfunkcijom. Nepredvidiva je bolest, raznovrsnih manifestacija od benignog stanja do teških oštećenja. Javlja se kod osoba mlađe srednje dobi, između 20. i 45. godine života.

Osim životne dobi, na prevalenciju MS-a utječu i etnička pripadnost i geografski smještaj. Incidencija bolesti najveća je u sjevernoj Europi, sjevernim dijelovima SAD-a i Kanadi. Učestalija je kod populacije bijelaca. Učestalost je MS-a dva puta veća kod žena nego kod muškaraca, što ukazuje i na to da je spol dodatni čimbenik rizika obolijevanja od MS-a (3). Početni simptomi najčešće su vezani uz poremećaje osjeta, vida, rjeđe uz motorne ispade. Ostali simptomi koji se javljaju za vrijeme bolesti jesu slabost, utrnulost, gubitak koordinacije mišića, problemi s vidom, govorom i kontrolom mokraćnog mjehura. Postavljanje točne dijagnoze važno je zbog prikladne terapije. Postoje 4 klinička oblika MS-a: relapsno-remitirajući oblik (RRMS), primarno progresivni (PPMS), sekundarno progresivni oblik (SPMS) i benigni oblik. Oko 85 % bolesnika ima relapsno-remitirajući oblik, koji se javlja epizodno i može biti djelomičan ili potpun, a simptomi se nakon određenog vremena mogu povući, spontano ili primjenom lijekova. Većina pacijenata RRMS oblika ući će u progresivnu fazu s napadima ili bez napada, odnosno sekundarnu progresivnu multiplu sklerozu. Sekundarnu progresivnu MS karakterizira neurodegenerativni proces, odnosno oštećenje većeg broja živčanih vlakana i stanica. MS koja nema relapse, ali pokazuje tendenciju progresije, naziva se primarna progresivna multipla skleroza. Ako je 15 godina nakon prvih simptomima bolesti prisutan blagi oblik MS-a s minimalnim neurološkim oštećenjima, tada se radi o benignoj MS (4).

### 1.2.2. Etiologija i patogeneza MS-a

Istraživanja pokazuju da su čimbenici koji združeno utječu na nastanak bolesti genetski, okolišni i imunološki. MS karakteriziraju lezije koje su uzrokovane staničnim imunološkim odgovorom usmjerenim protiv mijelinske ovojnice živčanih vlakana (4). Demijelinizirane regije nazivaju se plakovi, a najviše zahvaćaju bijelu tvar središnjeg živčanog sustava, ali mogu se pronaći i u sivoj tvari (2). Imunološki mehanizmi koji sudjeluju u nastanku i razvoju MS-a uključuju aktivaciju citotoksičnih limfocita T koji lučenjem citokina doprinose upalnoj reakciji, plazma stanice koje luče protutijela, čija je meta u organizmu još predmet istraživanja te interakciju između antigen prezentirajućih stanica i T limfocita (5).

Patogenezi pridonose i okolišni čimbenici u koje ubrajamo geografsku širinu, vitamin D, infekcije (*Epstein Barr virus*, EBV) i pušenje. Incidencija MS-a niža je kod ekvatorijalnih regija u odnosu na sjevernije ili južnije regije. Osobe s relativno velikim unosima ili visokim razinama vitamina D u krvi imaju manji rizik razvoja MS-a. Pušači cigareta izloženi su većem

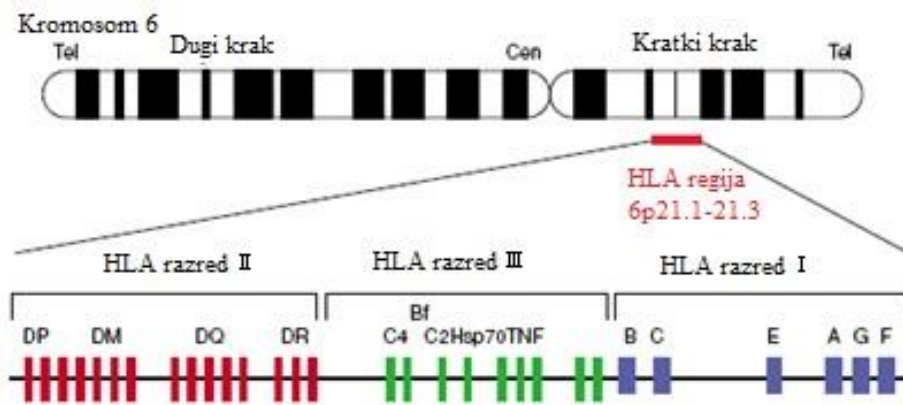
riziku za razvoj sekundarnog-progresivnog MS-a, povećanim atrofijama u mozgu te bržoj progresiji bolesti u odnosu na nepušače. Rizik se može smanjiti, ali tek nakon 5 godina nepušenja. Iako još nije dokazana povezanost EBV-a s MS-om, infektivna mononukleoza i visoki titar IgG protutijela za Epstein Barr nuklearni antigen (EBNA) pridonose razvoju rizika za MS (6).

Epidemiološke studije pokazuju da najveći udio rizika u obolijevanju od MS-a imaju genetski faktori. S razvojem MS-a prvenstveno su povezani geni sustava HLA (engl. *human leukocyte antigen*). Nađeno je da su pojedini HLA-haplotipovi povezani s povećanim rizikom obolijevanja među srođnicima bolesnika u odnosu na rizik obolijevanja u općoj populaciji. Najveću povezanost s MS-om pokazao je alel HLA-DRB1\*15, dok su se kao dodatni rizični čimbenici pokazali aleli HLA-DRB1\*03, HLA-DQB1\*02 (7, 8). Opsežnim studijama (engl. *genome-wide association studies*, GWAS) otkriveno je još 29 lokusa u genomu koji imaju manji doprinos genetskom riziku obolijevanja od MS-a (7).

### 1.3. HLA sustav

HLA je glavni sustav tkivne podudaranosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) koji je pronađen kod svih sisavaca, a kod čovjeka nazvan sustavom HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) jer su MHC antigeni prvo otkriveni na leukocitima. Geni HLA sustava nalaze se na kraćem kraku 6. kromosoma (6p21.3) te zauzimaju četiri milijuna parova baza (čini oko 1 % humanog genoma). Geni sustava HLA ekspimiraju se kodominatno, odnosno aleli naslijeđeni od obaju roditelja očituju se jednako. HLA sustav podijeljen je u 3 genske regije (Slika 1.)

- Regija gena HLA razreda I sadržava gene HLA-A, B, C → nalazi se na telomeričnom kraju HLA regije
- Regija gena HLA razreda II sadržava gene koji kodiraju HLA-D molekule (HLA-DR, DQ, DP) → nalazi se centromeričnom kraju
- Regija gena HLA razreda III sadržava veliki broj gena različitih funkcija → smještena je između prvih dviju regija



**Slika 1.** Shema organizacije HLA regije

(Slika preuzeta i prilagođena s web stranice (9).)

Molekule HLA razreda I i II sudjeluju u predočavanju antigena T-staničnim receptorima. Molekule HLA razreda I predočavaju intracelularne antigene CD8<sup>+</sup> citotoksičnim limfocitima T, dok molekule HLA razreda II predočuju ekstracelularne antigene CD4<sup>+</sup> pomoćničkim limfocitima T. Ovisno o ulogama molekula HLA proizlazi njihov smještaj na stanicama organizma. Molekule HLA razreda I nalaze se na gotovo svim stanicama s jezgrom, s iznimkom neurona središnjega živčanog sustava, egzokrinog dijela gušterače i endotela rožnice. Molekule HLA razreda II nalaze se na površini stanica koje predočuju antigen (antigen prezentirajuće stanice-makrofagi, monociti, limfociti B, dendritične stanice).

Molekule razreda I građene su od  $\alpha$  lanca koji je povezan nekovalentnim vezama s  $\beta 2$  mikroglobulinom, proteinom koji je kodiran izvan lokusa MHC-a. Mjesto vezanja proteina udubina je koju tvore amino-terminalne domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , dok se na dnu udubine vežu peptidni antigeni koji se prezentiraju. Rubna i vršna regija dodiruje receptore T-limfocita. Domena  $\alpha 3$  tvori vezno mjesto za koreceptor CD8. Molekule razreda II su heterodimerni transmembranski glikoproteini koji sadržavaju teški lanac ( $\alpha$ -lanac) i laki lanac ( $\beta$ -lanac). Domena  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  udaljene su od membrane te čine vezno mjesto za peptide, dok domene  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  bliže su membrani i služe kao potpora vezanja peptida (antigena). Molekule HLA razreda II mogu vezati duže peptide u odnosu na razred I, zbog otvorenije konfiguracije (10).

HLA sustav najpolimorfniji je genski sustav kod čovjeka, a određivanje polimorfizama moguće je provoditi na dvjema razinama, antigenskoj i genskoj. Većina polimorfizama koju

pronalazimo u genima razreda I i II pojavljuju se u eksonima koji kodiraju domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  za razred I te  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  za razred II (10). Antigeni HLA određuju se serološkim metodama – testom mikrolimfocitotoksičnosti koji daje uvid u polimorfizam na razini ekspresije na površini stanice, a metoda molekularne biologije temelji se na lančanoj reakciji polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Određivanje polimorfizama važno je kod transplantacije tkiva i organa, u genetičkim istraživanjima, u povezanosti autoimunih bolesti, transfuziji krvi ili kod dokazivanja očinstva (10).

Nomenklatura HLA sustava sastoji se od oznake za lokus iza kojeg je identifikacijski broj antigena (npr. HLA-B7). Oznaka gena HLA sastoji se od oznake lokusa i identifikacijskog broja alela koji je zvjezdicom odvojen od lokusa (npr. HLA-B\*07). Kod HLA razreda II dodaje se i oznaka gena za polimorfni lanac (A za  $\alpha$ -lanac, a B za  $\beta$ -lanac) (10).

Unutar HLA sustava javlja se neravnoteža udruživanja alela (engl. *linkage disequilibrium*), što znači da određeni aleli u dvama ili više lokusa mogu se pronaći češće zajedno u odnosu na njihovu učestalost u općoj populaciji. Najsnažnije neravnoteže udruživanja uočene su kod bliskih lokusa HLA sustava (11).

Autoimune bolesti nastaju kao posljedica preosjetljivosti imunološkog sustava pojedinca na vlastite antigene. Za razvoj bolesti potrebna je interakcija između okolišnih i genetskih čimbenika koji utječu na pojavu, težinu i tijek bolesti. Većina autoimunih bolesti povezana je s HLA sustavom jer se bolesti češće javljaju kod osoba koje nose određene rizične gene HLA sustava, odnosno geni HLA sustava genetski su čimbenici za razvoj autoimunih bolesti (10).

#### **1.4. Povezanost HLA sustava s multiplom sklerozom**

Epidemiološke studije pomogle su u identifikaciji specifičnih alelnih varijanti lokusa HLA-DR i HLA-DQ povezanih s razvojem MS-a. Kao predisponirajući faktor rizika za razvoj MS-a pokazao se haplotip HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602. U populacijama Afrike i sjeverne Amerike utvrđeno je da alel DRB1\*1501 najviše doprinosi riziku za MS, a u populaciji Brazila rizični faktor bio je HLA-DQB1\*0602. U Kanadi je utvrđeno da DRB1\*1501 haplotipovi imaju povećanu učestalost u skupini oboljelih, te time povećavaju rizik od nastanka MS-a u odnosu na pojedinačne alele HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1. U većini studija utvrđeno je da HLA-DQA1\*0102 alel doprinosi riziku za MS, dok na području Sardinije i Kine uočena je niža prevalencija tog alela za MS. Alel DQB1\*0602 učestaliji je u

populacijama Europe kod oboljelih od MS-A u odnosu na populacije Azije i Bliskog istoka (12, 13) .

### **1.5. Značaj istraživanja povezanosti sustava HLA s multiplom sklerozom i demijelinizacijskim bolestima**

U svijetu je 2013. godine bilo 2,3 milijuna oboljelih od MS-A (14). Prema podacima Saveza društava multiple skleroze Hrvatske (SDMSH) i Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u Hrvatskoj je 2015. godine pod dijagnozom MS-a liječeno preko 6400 osoba unutar bolničkog sustava i sustava primarne zdravstvene zaštite. Od 2005. godine u bazi podataka SDMSH evidentirano je preko 2800 osoba oboljelih od MS-a (15). Važno je bolest uočiti na vrijeme te pratiti njezin klinički razvoj. S ciljem poboljšanja kvalitete života oboljelih provode se istraživanja mehanizama nastanka, tijeka i posljedica procesa demijelinizacije (3). Mnoga od njih pokazala su da je sklonost obolijevanju od MS-a povezana s određenim genima sustava HLA. Međutim, specifična uloga molekula HLA u patogenezi i heterogenosti MS-a još uvijek je predmetom istraživanja, prvenstveno zbog složenosti interakcija komponenti imunološkog sustava u kojima sudjeluju i molekule HLA. U ovom trenutku nema lijeka koji bi izliječio MS niti molekularnog biljega za ranu detekciju bolesti (8, 12). Terapija lijekovima koja se primjenjuje uključuje imunološki aktivne pripravke i citotoksične spojeve. Bolje razumijevanje uloge gena HLA u etiologiji i patogenezi MS-a i demijelinizacijskih bolesti općenito, može biti od velike pomoći u razvoju prediktivnih modela povezanosti gena i djelovanja terapeutika s ciljem razvoja novih strategija liječenja (3).

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Odrediti učestalost alelnih varijanti i haplotipova HLA razreda II u skupini oboljelih od demijelinizacijskih bolesti i podskupini oboljelih od MS-a u populaciji istočne Hrvatske.
2. Rezultate usporediti s ranije objavljenim podacima za kontrolnu zdravu populaciju Hrvatske u svrhu određivanja predisponirajućih faktora rizika za MS u populaciji istočne Hrvatske.



### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj istraživanja

Rad je organiziran kao retrospektivno istraživanje (16).

#### 3.2. Ispitanici

Skupina ispitanika sastojala se od ukupno 42 bolesnika od kojih 29 s uputnom dijagnozom demijelinizacijskih bolesti. Podskupina s potvrđenom dijagnozom multiple skleroze sastojala se od 13 oboljelih. Ispitanicima je molekularna tipizacija HLA učinjena u rutinskom dijagnostičkom programu u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek od 2007. do 2017. godine. Uzorci ispitanika bili su popraćeni liječničkom uputnicom i pri dolasku u laboratorij dobili su jedinstvenu oznaku.

Kontrolnu skupinu predstavljali su ranije objavljeni rezultati molekularne tipizacije HLA 210 zdravih nesrodnih ispitanika opće populacije Hrvatske (17).

Istraživanje je odobrilo etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek.

#### 3.3. Metode

##### 3.3.1. Izolacija DNA iz pune periferne krvi

Genomska DNA izolirana je iz 200 µL pune periferne krvi s antikoagulansom EDTA primjenom komercijalnog seta *High Pure PCR Template Preparation Kit* (RocheDiagnostics, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na svojstvu enzima proteinaze K koja pomoću pufera za razgradnju uzrokuje razgradnju proteina stanične i jezgrene membrane te omogućava vezanje slobodne DNA na sloj staklene mrežice u plastičnoj tubici.

**Materijal:** 200 µl pune periferne krvi s antikoagulansom EDTA, *High Pure PCR Template Preparation Kit*, izopropanol, apsolutni etanol, destilirana H<sub>2</sub>O, pufer za razgradnju proteina (6M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % triton X-100, pH 4,4 (25 °C)), pufer za uklanjanje inhibitora (5M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25 °C)), pufer za

ispiranje (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C)), elucijski pufer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (25 °C))

**Pribor:** mikropipete (20 µL, 200 µL, 1000 µL), nastavci (sterilni, nekoristeni), plastične tubice volumena 1,5 mL i 2,0 mL (sterilne, nekoristene), mikrocentrifuga (2000 – 14200 o/min) s regulacijom temperature (-20 do +40 °C), grijač/*shaker* za 20 x 2mL tubice, zamrzivač (-20 °C), hladnjak (+4°C), nitrilne zaštitne rukavice bez pudera.

**Postupak:** U sterilnoj tubici volumena 1,5 mL pomiješa se 200 µL uzroka krvi, 200 µL pufera za razgradnju proteina i 40 µL vodene otopine proteinaze K. Inkubira se 10 minuta pri 72 °C te se doda 100 µL izopropanola, dobro se promiješa te se smjesa prebaci u tubicu sa staklenom mrežicom koja se nalazi smještena u kolektor tubici. Centrifugira se 1 min pri brzini 8000 x g. Tubica sa staklenom mrežicom prebaci se u novu kolektor tubicu, doda se 500 µL pufera za uklanjanje inhibitora i ponovi se centrifugiranje pri brzini 8000 x g 1 min. Zatim se ponovno zamijeni kolektor tubica novom te se doda 500 µL pufera za ispiranje i ponovi centrifugiranje (8000 x g 1min). Postupak ispiranja ponovi se još jednom. Ostatak pufera s mrežice uklanja se dodatno kratkim centrifugiranjem (10 s, 13000 x g). DNA se eluira dodatkom 200 µL prethodno zagrijanog (70 °C) elucijskog pufera u tubu sa staklenom mrežicom i potom centrifugiranjem na 8000 x g 1 min. DNA se prenese u obilježenu plastičnu sterilnu tubicu za čuvanje uzoraka volumena 2,0 mL. Svakom uzroku DNA pridružuje se jedinstvena oznaka. Uzorci DNA čuvaju se na -20 °C do analize.

#### 3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Za HLA tipizaciju metodom PCR-SSP potrebna je DNA visoke čistoće. Omjer A260/A280 trebao bi biti između 1,6 i 2,0. Koncentraciju uzoraka DNA potrebno je podesiti na 30 ng/µL

**Materijal:** Uzorci DNA, pufer u kojem su otopljeni DNA (elucijski pufer High Pure PCR Template Preparation seta)

**Pribor:** Uređaj SpectraMasx QuickDrop UV-Vis Spectrophotometer, mikropipeta volumena do 10 µL, nastavci (sterilni, nekoristeni), nitrilne zaštitne rukavice bez pudera.

**Postupak:** Mjerenja su izvršena u 2 µL dobivenog uzorka DNA. Vrijednosti mjerenja pufera u kojem su uzroci genomske DNA resuspendirani predstavljaju „blank“. Nakon mjerenja uređaj prikazuje vrijednosti apsorbancije pri valnim duljinama 260 nm, 280 nm i 230 nm, te se izračuna koncentracija DNA. Nakon mjerenja svakom uzorku DNA prilagođena koncentracija pomoću TE pufera na 30 ng/µL.

### 3.3.3. Tipizacija lokusa HLA-DRB1 i HLA-DQB1

Uzorci su tipizirani komercijalnim setovima Olerup DQ-DR SSP Combi Tray (Olerup, Stockholm, Švedska) prema uputama proizvođača. Metodom PCR-SSP (engl. *sequence-specific primers*) zbog prisutnosti specifičnih početnica u tubicama, tijekom PCR reakcije amplificiraju se različite alelne varijante. Svaki test sastoji se od 46 PCR tubica reakcija u kojima se nalaze liofilizirane početnice. U tubicama 1 – 14 nalaze se specifične kombinacije početnica za amplifikaciju HLA-DQB1 alela, a u tubicama od 15 – 45 su specifične kombinacije početnica za amplifikaciju HLA-DRB alela. Tubica 46 predstavlja negativnu kontrolu i u njoj ne dolazi do amplifikacije zbog toga što umjesto kalupa DNA sadržava PCR-grade vodu. U tubici 46 nalaze se parovi početnica za amplifikaciju HLA razreda I i II. U svim tubicama nalazi se i kontrolni par početnica za amplifikaciju pozitivne kontrole s ciljem provjere učinkovitosti reakcijske smjese koja se sastoji od PCR reakcijskog pufera s deoksiribonukleotidima dATP, dTTP, d-GTP, d-CTP, MgCl<sub>2</sub>, destilirana H<sub>2</sub>O, Taq polimeraza, uzorak DNA.

**Materijal:** Uzorak genomske DNA, Taq DNA polimeraza 5 jedinica/μL (Euroclone), Olerup SSP DQ-DR SSP Combi Tray kit (Olerup), H<sub>2</sub>O redestilirana, adhezivna folija

**Pribor:** PCR uređaj (VERITI Thermal Cycler, Applied Biosystems), kabinet za sterilan rad (Aura PCR, Bioair Euroclone Division), mikropipete (2,5 μL, 10 μL, 100 μL, 200 μL, 1000 μL), filter nastavci (nekoristeni, sterilni), plastične tubice 1,5 mL, centrifuga (HERAEUS Multifuge<sup>®</sup> 3s/3s-r), vortex uređaj, zamrzivač (-20 °C), nitrilne zaštitne rukavice bez pudera

**Postupak:** Nakon ispunjavanja radnog lista s identifikacijskim brojem, imenom i prezimenom pacijenta upisuje se Lot korištenog komercijalnog seta, priprema se reakcijska smjesa bez DNA koja se sastoji od 162 μL reakcijskog pufera s deoksiribonukleotidima i MgCl<sub>2</sub>, 4,3 μL Taq DNA polimeraze i 265,7 μL H<sub>2</sub>O. Kratko se vorteksira reakcijska smjesa te zatim centrifugira da se smjesa spusti na dno tubice. U tubicu 46 (negativna kontrola) stavi se 8 μL te smjese. Zatim se u reakcijsku smjesu doda 108 μL uzorka DNA te kratko vorteksira i centrifugira da se reakcijska smjesa spusti na dno tubice. U svaku tubicu Olerup DQ-DR SSP Combi Tray seta alikvotiramo po 10 μL DNA reakcijske smjese, osim u tubicu 46. Pokrijemo tubice adhezivnom folijom te ih smjestimo u PCR uređaj.

Parametri PCR programa

1. 1 ciklus 94 °C, 2 min, denaturacija

2. 2 ciklus 94 °C, 10 s, denaturacija

65 °C, 60 s, vezanje početnica na kalup DNA i umnožavanje odsječka DNA

3. 20 ciklusa 94 °C, 10 s, denaturacija

61 °C, 50 s, vezanje početnica na kalup DNA

72 °C, 30 s, umnožavanje odsječka DNA

4. neprekidno RT

### 3.3.4. Razdvajanje produkata PCR-a elektroforezom u agaroznom gelu

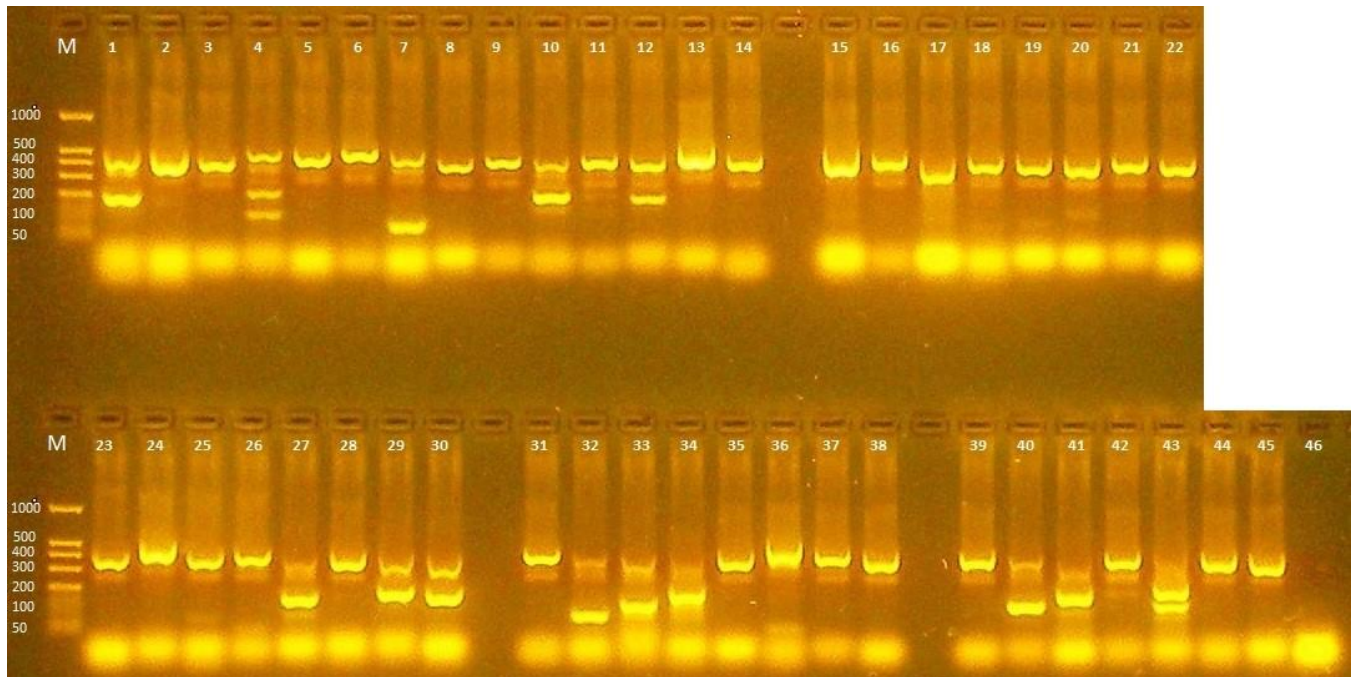
Očitavanje rezultata produkta PCR-SSP metode izvodi se agaroznom gel elektroforezom. Agarozna gel elektroforeza metoda je u kojoj se razdvajaju fragmenti DNA, kroz polimernu strukturu agaroze pod utjecajem istosmjerne struje. Brzina i učinkovitost elektroforeze ovisi o veličini fragmenata, koncentraciji agaroze, naponu struje i puferu u kojem se odvija. Fragmenti DNA koje razdvajamo većinom su bezbojni, te zbog toga dodajemo bojilo.

**Materijali:** Agaroz (Roche Diagnostics ), DNA marker 50 – 1000 pb (Olerup), GelRed boja za bojanje nukleinskih kiselina u agaroznom gelu (Olerup), pufer 1x TAE .

**Pribor:** sustav za elektroforezu VG-SYS wide Vari-Gel System (SCIE-PLAS), transformator za elektroforezu PowerPac Basix (BIORAD), UV transiluminator ImageQuant100 (Life Sciences), mikropipeta (10 µL), filter nastavci (nekoristeni, sterilni), analitička vaga (Melter Toledo), mikrovalna pećnica, menzura (250 mL), staklena čaša (10 mL), staklena okrugla tikvica (250 ml), zamrzivač(-20 °C ), hladnjak (+4 °C), nitrilne zaštitne rukavice

**Postupak:** U tikvici otopimo 2,64 g agaroze u 132 mL pufera 1xTAE. Otopinu agaroze stavimo u mikrovalnu pećnicu te zagrijavamo do vrenja. Tikvicu sa zagrijanom agarozom ohladimo pod mlazom vode do približno 60 °C. U ohlađenu tekućinu agaroze dodamo 80 µL GelRed boje. Tako pripremljenu otopinu agaroze s bojom izlijemo u ranije pripremljeni kalup u kojem se nalaze postavljeni češljevi za oblikovanje jažica. Nakon polimerizacije agaroznog gela u trajanju od 20 – 30 minuta izvade se češljevi te se gel uroni u jedinicu za elektroforezu napunjenu 1 x TAE puferom. Zatim se pipetira ukupna količina (10 µL) svake reakcijske smjese PCR tubica komercijalnog seta u jažice. U prvu jažicu svakog reda stavljamo DNA marker, smjesu točno određenog broja fragmenata DNA poznatih veličina, pomoću kojeg

određujemo veličinu umnoženih fragmenata DNA u reakcijskoj smjesi. Agarozni gel vožen je 25 minuta pod jakosti struje 150 mA i napona 160 V. Rezultate razdvajanja PCR produkata na gelu uočavamo u obliku vrpce koje su predočene UV transiluminatorom jer boja GelRed pobuđena UV svjetlom fluorescira kada je vezana na molekule DNA. Svaki gel je fotografiran, te svaka fotografija označena i arhivirana.



**Slika 2.** Rezultati agarozne gel elektroforeze molekularne tipizacije lokusa HLA-DQB1 (jažice 1 – 14) i lokusa HLA-DRB1 (jažice 15 – 45) rađene metodom PCR-SSP. N = negativna kontrola. Marker (M) predstavlja ljestvičasti raspored odsječaka DNA veličina 50, 100, 200, 300, 400, 500 i 1000 pb.

### 3.3.5. Analiza rezultata tipizacije metodom PCR-SSP i agarozne gel-elektroforeze

Rezultati agarozne gel elektroforeze analizirani su pomoću računalnog programa Helmberg SCORE. Svi su HLA-DRB i –DQB1 aleli interpretirani u skladu s HLA Nomenklaturom (18).

### 3.3.6. Statističke metode

Učestalost alela i haplotipova HLA-DRB1 i HLA-DQB1 kod ispitanika određena je direktnim brojanjem. Ako je osoba imala samo jedan alel na testiranom lokusu HLA pretpostavljeno je da je ispitanik homozigot za taj alel. Usporedba učestalosti alela HLA-DRB1 i HLA-DQB1 između ispitanika i kontrolne skupine učinjena je pomoću tablice 2 x 2 i Fisherovog egzaktnog testa pomoću statističkog programa STATISTICA 12 te izražena omjerom izgleda (engl. *odds ratio*, OR). Statistički značajna razlika između MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu smatrana je ona kod koje *P* vrijednost bila manja od 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Osobine ispitivanih skupina bolesnika

Provedenim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 42 bolesnika, 13 oboljelih od MS-a i 29 oboljelih od ostalih demijelinizacijskih bolesti. Učinjena im je molekularna tipizacija tkiva u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva od 2007. do 2017. godine. Skupina oboljelih od MS-a sastojala se od 6 muškaraca i 7 žena, a skupina ostalih demijelinizacijskih bolesti od 11 muškaraca i 18 žena. Dob ispitanika prilikom molekularne tipizacije HLA (Tablica 1.) u prosjeku je za 14 godina niža u skupini MS ( $34 \pm 9$ ) u odnosu na skupinu ostalih demijelinizacijskih bolesti ( $48 \pm 12$ ).

**Tablica 1.** Prikaz ispitivanih skupina bolesnika prema dobi i spolu

	Multipla skleroza	Ostale demijelinizacijske bolesti
Broj ispitanika	13	29
Dob (godine $\pm$ SD)	$34 \pm 9$	$48 \pm 12$
Omjer broja ispitanika prema spolu Ž : M	1,17 : 1	1,63 : 1
Dob (godine $\pm$ SD) Ž : M	$32 \pm 12$ : $35 \pm 7$	$49 \pm 14$ : $47 \pm 10$

### 4.2. Raspodjela alela HLA-DRB1\* kod oboljelih od MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti

U Tablici 2. prikazana je raspodjela alelnih varijanti lokusa HLA-DRB1\* kod pacijenata oboljelih od MS-a i u kontrolnoj skupini. Može se uočiti značajnije povećanje učestalosti alela HLA-DRB1\*15 u odnosu na kontrolnu skupinu (OR = 2,11) te nešto manje povećanje učestalosti alelnih varijanti HLA-DRB1\*08 (OR = 2,02), -DRB1\*03 (OR = 1,85), -DRB1\*01 (OR = 1,62) .

**Tablica 2.** Odnos učestalosti alela HLA-DRB1 u skupini oboljelih od multiple skleroze u odnosu na kontrolnu skupinu prikazan kao omjer izgleda OR

HLA-DRB1	Multipla skleroza N = 13, n = 26					Kontrolna skupina N = 210, n = 420	
	N	AF (%)	OR	95 % CI	P	N	AF (%)
*01	5	20,8	1,62	0,46 – 4,54	0,368	50	11,9
*03	4	16,7	1,85	0,44 – 5,76	0,288	35	8,3
*04	1	4,2	0,39	0,01 – 2,53	0,498	41	9,7
*07	1	4,2	0,49	0,01 – 3,19	0,711	33	7,8
*08	2	8,3	2,02	0,21 – 9,34	0,297	16	3,9
*10	0	0,0	0,00	0,00 – 25,47	1,000	4	1,0
*11	2	8,3	0,50	0,06 – 2,07	0,562	65	15,5
*12	0	0,0	0,00	0,00 – 14,43	1,000	6	1,4
*13	3	12,5	0,88	0,17 – 3,02	1,000	55	13,0
*14	0	0,0	0,00	0,00 – 4,18	0,614	17	4,0
*15	6	25,0	2,11	0,67 – 5,59	0,130	46	11,0
*16	2	8,3	0,62	0,07 – 2,61	0,756	52	12,4

(AF = učestalost alela (engl. *allele frequency*), 95 % CI = interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*), N = broj ispitanika, n = broja alela.)

U skupini oboljelih od ostalih demijelinizacijskih bolesti (Tablica 3.) uočava se povećanje učestalosti alela HLA-DRB1\*15 (OR = 1,73) u odnosu na kontrolnu skupinu. Veću učestalost u odnosu na kontrolu imaju i HLA-DRB1\*04 (OR = 1,24) i -DRB1\*11 (OR = 1,23).



**Tablica 3.** Odnos učestalosti alela HLA-DRB1 u skupini oboljelih od ostalih demijelinizacijskih bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu prikazan kao omjer izgleda OR-a s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti

HLA-DRB1	Ostale demijelinizacijske bolesti N = 29, n = 58					Kontrolna skupina N = 210, n = 420	
	N	AF (%)	OD	95 % CI	P	N	AF (%)
*01	7	12,1	1,01	0,37 – 2,39	1,000	50	11,9
*03	4	6,9	0,83	0,21 – 2,44	1,000	35	8,3
*04	7	12,1	1,24	0,45 – 2,96	0,644	41	9,7
*07	4	6,9	0,88	0,22 – 2,60	1,000	33	7,8
*08	0	0,0	0,00	0,00 – 1,94	0,237	16	3,9
*10	0	0,0	0,00	0,00 – 11,19	1,000	4	1,0
*11	11	19,0	1,23	0,55 – 2,52	0,575	65	15,5
*12	0	0,0	0,00	0,00 – 6,31	1,000	6	1,4
*13	2	3,4	0,26	0,03 – 1,05	0,072	55	13,0
*14	3	5,2	1,28	0,23 – 4,62	0,725	17	4,0
*15	11	19,0	1,73	0,76 – 3,63	0,142	46	11,0
*16	9	15,5	1,25	0,52 – 2,74	0,539	52	12,4

Ni u jednoj od skupina oboljelih odstupanje učestalosti alela HLA-DRB1 u odnosu na kontrolnu skupinu nije bilo statistički značajno.

#### 4.3 Raspodjela alela HLA-DQB1\* u skupinama oboljelih od MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti

U Tablici 4. prikazana je raspodjela HLA-DQB1 alela kod pacijenata oboljelih od MS-a i u kontrolnoj skupini. Učestalost alelnih varijanti HLA-DQB1\*04 (OR = 2,15), HLA-DQB1\*06 (OR = 1,55) i HLA-DQB1\*02 (OR = 1,22) veća je u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Tablica 4.** Odnos učestalosti alela HLA-DQB1 u skupini oboljelih od MS-a u odnosu na kontrolnu skupinu prikazan kao omjer izgleda OR-a s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti

HLA-DQB1	Multipla skleroza N = 13, n = 26					Kontrolna skupina N = 210, n = 420	
	N	AF (%)	OR	95 % CI	P	N	AF (%)
*02	5	19,2	1,22	0,35 – 3,39	0,599	66	15,7
*03 (DQ7)	3	11,5	0,52	0,10 – 1,76	0,451	93	22,1
*03 (DQ8)	0	0,0	0,00	0,00 – 3,50	0,618	20	4,8
*03 (DQ9)	0	0,0			-	-	-
*04	2	7,7	2,15	0,23 – 10,05	0,275	15	3,6
*05	7	26,9	0,94	0,34 – 2,30	1,000	120	28,5
*06	9	34,6	1,55	0,62 – 3,54	0,268	94	22,4

U skupinama oboljelih od ostalih demijelinizacijskih bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 5.) povećana je učestalost alela HLA-DQB1\*03(DQ8) (OR = 2,17) i -DQB1\*05 (OR = 1,15).

**Tablica 5.** Odnos učestalosti alela HLA-DQB1 u skupini oboljelih od ostalih demijelinizacijskih bolesti u odnosu na kontrolnu skupinu prikazan kao omjer izgleda OR-a s 95 %-tnim intervalom pouzdanosti

HLA-DQB1	Ostale demijelinizacijske bolesti N = 29, n = 58					Kontrolna skupina N = 210, n = 420	
	N	AF (%)	OR	95 % CI	P	N	AF (%)
*02	7	12,1	0,77	0,28 – 1,79	0,697	66	15,7
*03 (DQ7)	12	20,7	0,93	0,44 – 1,85	1,000	93	22,1
*03 (DQ8)	6	10,3	2,17	0,68 – 5,90	0,124	20	4,8
*03 (DQ9)	1	1,7			-	-	-
*04	1	1,7	0,48	0,01 – 3,26	0,707	15	3,6
*05	19	32,8	1,15	0,62 – 2,04	0,662	120	28,5
*06	12	20,7	0,92	0,43 – 1,83	1,000	94	22,4

Ni u jednoj od ispitivanih skupina oboljelih od multiple skleroze ili od ostalih demijelinizacijskih bolesti odstupanje učestalosti određenih alela u odnosu na kontrolnu skupinu nije bilo statistički značajno.

#### 4.4. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1\*-DQB1\* u skupinama oboljelih od MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti

Analizom učestalosti haplotipova HLA-DRB1\*-DQB1\* kod oboljelih od MS-a i drugih demijelinizacijskih bolesti (Tablica 6.) uočena je prisutnost 14 različitih haplotipova. U objema skupinama oboljelih najučestaliji je haplotip HLA-DRB1\*-15\*-DQB1\*06 (23,1 % i 18,9 %). Haplotipovi HLA-DRB1\*11-DQB1\*3(DQ7) i HLA-DRB1\*16-DQB1\*05 učestaliji su u skupini ostalih demijelinizacijskih bolesti s haplotipnom frekvencijom od 18,9 % i 15,5 % u odnosu na skupinu bolesnika oboljelih od multiple skleroze (haplotipnih frekvencija 7,7 %)

**Tablica 6.** Učestalost haplotipova HLA-DRB1\*-DQB1\* u skupini oboljelih od multiple skleroze i skupini oboljelih od drugih demijelinizacijskih bolesti

Haplotip HLA-DRB1*-DQB1*	HF (%)	
	Multipla skleroza (N = 13, n = 26)	Druge demijelinizacijske bolesti (N = 29, n = 58)
*01 - *05	19,2	12,1
*03 - *02	15,4	6,9
*04 - *03(DQ7)	3,8	-
*04 - *03(DQ8)	-	10,3
*04 - *04	-	1,7
*07 - *02	3,8	5,2
*07 - *03(DQ9)	-	1,7
*08 - *04	7,7	-
*11 - *03(DQ7)	7,7	<b>18,9</b>
*13- *03(DQ7)	-	1,7

## 4.REZULTATI

*13 - *06	11,5	1,7
*14 - *05	-	5,2
*15 - *06	<b>23,1</b>	<b>18,9</b>
*16 - *05	7,7	<b>15,5</b>

HF = učestalost haplotipa(engl. *haplotype frequency*), N = broj ispitanika, n = broj alela

## 5. RASPRAVA

Otkrićem povezanosti HLA sustava s MS-om omogućen je napredak u razumijevanju i istraživanju patogeneze bolesti te razvoju lijekova. U ovom istraživanju analizirani su rezultati molekularne HLA tipizacije oboljelih od MS-a i ostalih demijelinizacijskih bolesti na području istočne Hrvatske. Broj tipiziranih žena u skupini MS-a bio je 1,17 puta veći, a u skupini ostalih demijelinizacijskih bolesti 1,63 puta veći u odnosu na broj tipiziranih muškaraca. Prema literaturnim podacima pojavnost MS-a kod žena je dva puta veća nego kod muškaraca (19). Životna dob testiranih oboljelih od MS-a bila je  $34 \pm 9$  godina, što je u skladu s podacima da se MS većinom javlja između 20. i 45. godine života (20). Kontrolna skupina u ovom istraživanju sastojala se od 210 nesrodnih zdravih pojedinaca iz različitih područja Hrvatske (17). Analizom učestalosti alela HLA-DRB1\* kod oboljelih od MS-a uočeno je da je frekvencija alelne varijante HLA-DRB1\*15 značajnije povećana u skupini MS-a (25 %) u odnosu na kontrolnu skupinu (11 %) te iako ta razlika nije statistički značajna ( $P = 0,13$ ), ukazuje na snažnu pozitivnu povezanost alela HLA-DRB1\*15 s MS-om ( $OR = 2,11$ ) u populaciji istočne Hrvatske. Povećana učestalost u skupini MS-a u odnosu na kontrolnu skupinu uočena je i za alele HLA-DRB1\*08 ( $OR = 2,02$ ), -DRB1\*03 ( $OR = 1,85$ ) i -DRB1\*01 ( $OR = 1,62$ ). Nadalje, možemo uočiti da mogući doprinos riziku razvoja demijelinizacijskih bolesti u istraživanoj populaciji imaju aleli HLA-DRB1\*15 ( $OR = 1,73$ ), te u manjoj mjeri HLA-DRB1\*04 ( $OR = 1,24$ ) i -DRB1\*11 ( $OR = 1,23$ ). Za gene HLA-DQB1\* u skupini MS-a analiza je pokazala pozitivnu povezanost alelne varijante HLA-DQB1\*04 ( $OR = 2,15$ ) i -DQB1\*02 ( $OR = 1,22$ ), a za ostale demijelinizacijske bolesti susceptibilni alel HLA-DQB1\*03(DQ8) ( $OR = 2,17$ ) i manje susceptibilan -DQB1\*05 ( $OR = 1,15$ ). Rezultati ovog istraživanja pokazuju snažnu pozitivnu povezanost haplotipa HLA-DRB1\*15-DQB1\*06 s MS-om (HF 23,1 %). U skupini ostalih demijelinizirajućih bolesti najveću su učestalost imali haplotipovi HLA-DRB1\*15-DQB1\*06 (18,9 %), -DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) (18,9 %) i -DRB1\*16-DQB1\*05 (15,5 %).

Pozitivna povezanost alela HLA-DRB1\*15 s MS-om ističe se u istraživanjima brojnih populacija: Litva, Španjolska, Turska, Australija, Sardinija, Irska, Japan (8). Iako nekoliko studija ne podupire HLA-DRB1\*15 kao susceptibilni alel za MS (8), opsežna studija (GWAS) provedena od strane 23 istraživačke skupine (engl. *The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*, IMSSGC) u 15 država koja je obuhvatila 9772 ispitanika europskog podrijetla potvrđuje HLA-DRB1\*15:01 kao alelnu varijantu s najvećim udjelom u genetskoj podlozi MS-a (7). Za alel HLA-DRB1\*01, koji se u našoj skupini MS-a pokazao kao rizični

alel, literaturni podatci kontradiktorni su (8). Naši rezultati pozitivne korelacije HLA-DRB1\*08 s MS-om u skladu su s istraživanjem u Litvi. Alel HLA-DRB1\*03 koji se u našoj populaciji pokazao kao susceptibilan za MS u Francuskoj populaciji pokazuje povezanost s MS-om i optičkim neuromijelitisom, a i IMSGC studija pronalazi snažnu povezanost tog alela s MS-om (8). Slično našim rezultatima za povezanost HLA-DQB1\*02 i MS, studija IMSGC navodi pozitivnu povezanost te alelne varijante s MS-om no kao posljedicu neravnoteže udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD) s alelom HLA-DRB1\*03. Lima T. F. R. i sur. u preglednom članku prikazuju rezultate brojnih istraživanja među kojima se haplotip HLA-DRB1\*15:01-DQB1\*06:02 ističe kao odgovoran za povećani rizik obolijevanja od MS-a u populacijama sjeverne Europe i mediteranskim populacijama (8). U skladu s time je i rezultat ovoga istraživanja koji ukazuje na povezanost haplotipa HLA-DRB1\*15-DQB1\*06 s MS-om u populaciji istočne Hrvatske.

## 6. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem i dobivenim rezultatima učestalosti alelnih varijanti HLA-DRB1 i HLA-DQB1 oboljelih od multiple skleroze i demijelinizacijskih bolesti u populaciji istočne Hrvatske utvrđeno je:

1) Učestalost alelnih varijanti HLA-DRB1\*01, -DRB1\*03, -DRB1\*08 i -DRB1\*15 za multiplu sklerozu, te HLA-DRB1\*04, -DRB1\*11 i -DRB1\*15 za demijelinizacijske bolesti povećana je kod oboljelih u odnosu na kontrolnu skupinu.

2) Učestalost alelnih varijanti HLA-DQB1\*02\* i -DQB1\*04 za multiplu sklerozu te HLA-DQB1\*03(DQ8) i -DQB1\*05 za druge demijelinizacijske bolesti veća je kod oboljelih u odnosu na kontrolnu skupinu.

3) Najučestaliji haplotip u skupini oboljelih od MS-a je HLA-DRB1\*15-DQB1\*06, dok su u skupini ostalih demijelinizacijskih bolesti najzastupljeniji i podjednako učestali haplotipovi HLA-DRB1\*15-DQB1\*06, HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) i HLA-DRB1\*16-DQB1\*05.

Podatci dobiveni ovim istraživanjem u skladu su s ostalim istraživanjima povezanosti HLA razreda II s multiplom sklerozom.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti učestalost alelnih varijanti i haplotipova HLA-DRB1 i HLA-DQB1 u skupini oboljelih od demijelinizacijskih bolesti i podskupini oboljelih od MS-a u populaciji istočne Hrvatske, te rezultate usporediti s ranije objavljenim podacima za kontrolnu zdravu populaciju Hrvatske s ciljem određivanja predisponirajućih rizičnih čimbenika za MS u populaciji istočne Hrvatske.

**Ispitanici i metode:** Skupina ispitanika sastojala se od 29 bolesnika s uputnom dijagnozom demijelinizacijskih bolesti te podskupina od 13 oboljelih s potvrđenom dijagnozom multiple skleroze. Ispitanicima je iz pune krv izolirana DNA pomoću komercijalnog seta, a uzroci su tipizirani PCR-SSP metodom.

**Rezultati:** Značajnija razlika učestalosti HLA-DRB1\* alela kod oboljelih od MS-a u odnosu na kontrolnu skupinu uočena je kod alelnih varijanti HLA-DRB1\*15 (OR = 2,11), HLA-DRB1\*08 (OR = 2,02), -DRB1\*03 (OR = 1,85) i -DRB1\*01 (OR = 1,62). U skupini demijelinizacijskih bolesti najučestaliji su aleli HLA-DRB1\*15 (OR = 1,73) te u manjoj mjeri HLA-DRB1\*04 (OR = 1,24) i -DRB1\*11 (OR = 1,23). Za gene HLA-DQB1\* u skupini MS-a učestale su varijante HLA-DQB1\*04 (OR = 2,15) i -DQB1\*02 (OR = 1,22), a za ostale demijelinizacijske bolesti aleli HLA-DQB1\*03(DQ8) (OR = 2,17) i -DQB1\*05 (OR = 1,15). Najučestaliji haplotip među pacijentima oboljelima od MS-a je HLA-DRB1\*15-DQB1\*06, a u skupini ostalih demijelinizacijskih bolesti haplotipovi HLA-DRB1\*15-DQB1\*06, DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) i -DRB1\*16-DQB1\*05.

**Zaključak:** Povećana učestalost alelnih varijanti HLA-DRB1 i HLA-DQB1 i lokusa HLA-DRB1 I HLA-DQB1 za multiplu sklerozu i ostale demijelinizacijske bolesti u populaciji istočne Hrvatske u skladu je s literaturnim podacima o povezanosti HLA razreda II i MS-a.

**Ključne riječi:** multipla skleroza, demijelinizacijske bolesti, HLA razred II



## 8. SUMMARY

**Research Objective:** The aim of this study was to determine the frequency of allelic variants and haplotypes HLA-DRB1 and HLA-DQB1 in a group of patients suffering from demyelinating diseases and a subgroup of MS patients within the population of Eastern Croatia. The results were then compared to previously published data obtained for healthy control subjects from Croatian population, in order to determine predisposing risk factors for MS in the population of Eastern Croatia.

**Subjects and Methods:** The group of subjects consisted of 29 unrelated patients with a referral diagnosis of a demyelinating disease and the subgroup consisted of 13 patients with a confirmed diagnosis of multiple sclerosis. Subjects' DNA was isolated from whole blood using a commercial kit, and samples were HLA typed by means of PCR-SSP method.

**Results:** A significant difference was observed in the frequency of HLA-DRB1\* alleles in the subgroup of MS patients compared to the control group, with regard to allelic variants HLA-DRB1\*15 (OR=2.11), HLA-DRB1\*08 (OR=2.02), -DRB1\*03 (OR=1.85) and -DRB1\*01 (OR = 1.62). The most significant difference between the group of patients suffering from demyelinating diseases and the control group, was observed for alleles HLA-DRB1\*15 (OR=1.73), and to a lesser extent HLA-DRB1\*04 (OR=1.24) and -DRB1\*11 (OR=1.23). As for HLA-DQB1\* genes, in the MS group, the most common allelic variants were HLA-DQB1\*04 (OR=2.15) and -DQB1\*02 (OR=1.22), whereas in the group of other demyelinating diseases, the most common alleles were HLA-DQB1\*03(DQ8) (OR = 2.17) and -DQB1\*05 (OR = 1.15). Among patients diagnosed with MS, the most common haplotype was HLA-DRB1\*15-DQB1\*06, and among patients diagnosed with other demyelinating diseases, haplotypes HLA-DRB1\*15-DQB1\*06, DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) and -DRB1\*16-DQB1\*05.

**Conclusion:** The results of the study show an increased frequency of specific HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles and HLA-DRB1 and HLA-DQB1 loci for MS and other demyelinating diseases in the population of Eastern Croatia, which is in line with literature data on correlation between the HLA class II and MS.

**Key words:** multiple sclerosis, demyelinating diseases, HLA class II

**9.LITERATURA**

- (1) Dežmalj-Grbelja L, Čović-Negovetić R i Demarin V. Differential diagnosis and diagnostic algorithm of demyelinating diseases. *Acta Clin Croat.* 2009;48:345-348.
- (2) Haberland C. *Clinical Neuropathology: Text and color Atlas.* 5. izd. New York: Demos Medical Publishing; 2007.
- (3) Oksenberg JR i Barcellos LF. Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes & Immunity.* 2005;6:375-387.
- (4) Murray TJ. Diagnosis and Treatment of Multiple sclerosis. *BMJ.* 2006;332(7540):525-527.
- (5) Loma I, Heyman R, Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Curr Neuropharmacol.* 2011;9(3):409-416.
- (6) Gorman CO, Lucas R, Taylor Bruce. Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis:A Review with Focus on Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13:11718-11752.
- (7) The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, i sur. Genetic risk and primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 2012;476(7359):214-219.
- (8) Lima TFR, Braga VLL, Silva JTD, Simplicio GN, Abreu SAdO, Rodrigues Barros R i sur. The HLA-DRB1 Allels Effects on Multiple Sclerosis a Systematic Review. *iMedPub Journals.* 2015;8:1755-7682.
- (9) Genoma Excellence in genetic testing. The HLA complex. Dostupno na adresi: <http://www.preimplantationgeneticdiagnosis.it/the-hla-complex.htm>. Datum pristupa: 1.8.2017.
- (10) Sertić J i sur. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika.* 2.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- (11) Ivančević Ž, Rumbolt Z, Bergovec M, Silobrčić V, Bruketa D. *Harrison-principi interne medicine.* 2. izd. Split: Placebo d.o.o.; 2002.

- (12) Schmidt H, Williamson D, Koch AA. HLA-DR15 Haplotype and Multiple Sclerosis: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2007;165:1097-1109.
- (13) Alcina A, Abad Grau MdM, Fedetz M, Izquierdo G, Lucas M, Fernandet O, i sur. Multiple Sclerosis Risk Variant HLA-DRB1\*1501 Associates with High Expression of DRB1 Gene in Different Human Populations. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e33972.
- (14) Multiple Sclerosis International Federation. Atlas of MS 2013. Dostupno na adresi: <http://www.atlasofms.org/>. Datum pristupa: 1.9.2017.
- (15) Savez društva multiple skleroze Hrvatska. Najčešća pitanja oboljelih od MS-a. Dostupno na adresi: <http://sdmsh.hr/web/>. Datum pristupa 1.8.2017.
- (16) Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- (17) Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur. J. Immunogenet.* 2000;27:47-51.
- (18) Marsh SGE, Albert ED, Domer WF, Bontrop RE, Dupton B, Erlich HA, i sur. Nomenclature for factors of HLA system, 2010. *Tissue Antigens.* 2010;75:291-455.
- (19) Materljan E, Sepčić J. Epidemiology of multiple sclerosis in Croatia. *Clin Neurol Neurosurg.* 2002;104:192-1984.
- (20) Crnić-Martinović M, Grahovac B, Vidan Jeras B, Ristić S, Sepčić J, Peterlin B, i sur. HLA class II polymorphism in autochthonous population of Gorski Kotar, Croatia. *Coll. Antropol.* 31. 2007;3:315-319.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Jelena Šarić

**Datum rođenja:** 28. 1. 1996.

**Mjesto rođenja:** Vinkovci

### **Obrazovanje:**

2002. – 2010. Osnovna škola Zrinskih, Nuštar

2010. – 2014. Opća Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2014. – 2017. Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

**Kontakt:** saricjelena286@gmail.com