

# Učestalost alelne varijante HLA-DRB1\*08 kod oboljelih od juvenilnog idiopatskog artritisa u populaciji istočne Hrvatske

---

Vuković, Stela

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:877392>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni preddiplomski studij Sestrinstvo**

**Stela Vuković**

**UČESTALOST ALELNE VARIJANTE  
HLA-DRB1\*08 KOD OBOLJELIH OD  
JUVENILNOG IDIOPATSKOG  
ARTRITISA U POPULACIJI ISTOČNE  
HRVATSKE**

**Završni rad**

**Osijek, 2016.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Sveučilišni preddiplomski studij Sestrinstvo**

**Stela Vuković**

**UČESTALOST ALELNE VARIJANTE  
HLA-DRB1\*08 KOD OBOLJELIH OD  
JUVENILNOG IDIOPATSKOG  
ARTRITISA U POPULACIJI ISTOČNE  
HRVATSKE**

**Završni rad**

**Osijek, 2016.**

Rad je ostvaren na Odjelu za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva, Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Saška Marczi

Rad sadrži 24 stranica, četiri (4) tabele i dvije (2) slike.

## ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Saški Marczi koja je pratila proces pisanja završnog rada i koja me je svojim znanjem savjetovala i usmjeravala k završetku studija. Zahvaljujem i svojoj obitelji koja mi je pružala podršku i omogućila školovanje te završetak studija.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Definicija juvenilnog idiopatskog artritisa (JIA) .....	1
1.2. Epidemiologija .....	1
1.3. Klasifikacija JIA .....	1
1.4. Etiologija i patogeneza JIA .....	2
1.5. Dijagnoza JIA .....	2
1.6. Liječenje JIA .....	2
1.7. HLA sustav .....	3
1.8. Povezanost sustava HLA s JIA .....	4
1.9. Podrška medicinske sestre kod reumatskih bolesti .....	5
2. CILJ 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. Tipizacija lokusa HLA-DRB1 metodom PCR-SSP .....	9
3.3.3. Predočavanje rezultata PCR-a pomoću agarozne gel elektroforeze .....	10
3.3.4. Analiza rezultata tipizacije metodom PCR-SSP i agarozne gel elektroforeze .....	12
3.3.5. Statističke metode .....	12
3.3.6. Analiza medicinske dokumentacije ispitanika .....	12
4. REZULTATI .....	13
4.1. Osobine ispitivane skupine oboljelih od JIA .....	13
4.2. Raspodjela alela HLA-DRB1*08 .....	14
4.3. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1*-DQB1* .....	16
5. RASPRAVA .....	17
6. ZAKLJUČAK .....	19
7. SAŽETAK .....	20
8. SUMMARY .....	21
9. LITERATURA .....	22
10. ŽIVOTOPIS .....	24

## POPIS KRATICA

JIA	juvenilni idiopatski artritis
ILAR	Međunarodna liga reumatoloških udruženja ( <i>engl. International League of Associations for Rheumatology</i> )
RF	reuma faktor
ANA	antinuklearna protutijela ( <i>engl. anti-nuclear antibody</i> )
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi ( <i>engl. non-steroidal antiinflammatory drugs</i> )
DMARD	antireumatski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti ( <i>engl. disease modifying antirheumatic drugs</i> )
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti ( <i>engl. Major Histocompatibility Complex</i> )
HLA	<i>engl. Human Leukocyte Antigen</i>
KBC	Klinički bolnički centar
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamin tetraoctena kiselina
PCR	lančana reakcija polimerazom ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
AF	učestalost alela ( <i>engl. allele frequency</i> )
OR	omjer izgleda ( <i>engl. odds ratio</i> )
HF	učestalost haplotipa ( <i>engl. haplotype frequency</i> )



## 1. UVOD

### 1.1. Definicija juvenilnog idiopatskog artritisa (JIA)

Juvenilni idiopatski artritis (JIA) najčešća je kronična reumatska bolest u dječjoj dobi vjerojatno uzrokovana genetskim i okolišnim čimbenicima. Drži se jednim od glavnih uzroka kratkotrajnog ili dugotrajnog invaliditeta te smanjene kvalitete života u djetinstvu (1). Kako bi dijagnoza JIA bila potvrđena kod pacijenata moraju biti prisutni simptomi bolnih i otečenih zglobova, ukočenost jednog ili više zglobova te sve to u trajanju dužem od šest tjedana (1). JIA-om se smatra pojava neke od navedenih manifestacija prije navršene 16. godine života, što JIA čini vrlo složenom bolešću. Utvrđeno je da djeca, kojima je u ranijoj dobi dijagnosticiran JIA, bolje psihosocijalno funkcioniraju. Njihovi roditelji mogu doživjeti sličan pozitivan ishod i manji psihološki pritisak od roditelja djece kod kojih je JIA kasnije dijagnosticiran, stoga treba usmjeriti više pozornosti na psihosocijalnu prilagodbu obitelji s djetetom kod kojeg je bolest dijagnosticirana u kasnijoj dobi (2).

### 1.2. Epidemiologija

Prisutnost ove bolesti možemo naći na svim kontinentima i u svim rasama. JIA je česta bolest, prisutna najčešće kod djece između 1. i 3. godine života, i to s većom incidencijom kod ženskog spola u odnosu na muški spol. Kako u Hrvatskoj nemamo još uvijek točnih podataka o učestalosti ove bolesti, oslanjamo se na podatke iz literature. Poznato je da kod 2,7% do 5,2% svih bolesnika oboljelih od reumatoidnog artritisa, bolest započinje u dječjoj dobi (3). Pojavnost JIA uvelike ovisi i o geografskom pložaju i iznosi od 1,3 do 22,6 slučaja na 100 000 djece (3). Zatim, dokazano je kako oboljeli od JIA imaju od 4 do 14 puta veću smrtnost od zdrave djece (3).

### 1.3. Klasifikacija JIA

Prema klasifikaciji *International League of Associations for Rheumatology* (ILAR) JIA se dijeli u sedam podskupina. Međusobno se te skupine razlikuju po broju zahvaćenih zglobova, izvanzglobnim manifestacijama, zahvaćenosti enteza, serološkim markerima (prisutnost ili odsutnost reumatoidnog (RF) faktora) te obiteljskoj anamnezi (1).

Klasifikacija JIA (ILAR):

1. sistemski
2. poliartikularni tip RF-negativan
3. poliartikularni tip RF-pozitivan
4. oligoartikularni tip – perzistirajući i prošireni

5. psorijatični artritis
6. entezitisu pridruženi artritis
7. nediferencirani artritis (ne uklapa se ni u jednu gornju kategoriju ili se uklapa u više gornjih kategorija).

#### **1.4. Etiologija i patogeneza JIA**

Etiologija JIA nije u potpunosti poznata ni razjašnjena. Uočena je povezanost ove bolesti s proživljenom traumom, stresom ili preboljenom virusnom ili bakterijskom infekcijom (npr. nakon preboljene Parvo B19 infekcije), te u sklopu imunodeficijencija. Vrlo slično reumatoidnom artritisu JIA je karakteriziran hiperplazijom sinoviocita, limfocitnim i makrofagnim upalnim infiltratima, aktivacijom neutrofila, prekomjernom ekspresijom proupalnih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-18), smanjenom ekspresijom TREG limfocita (T-regulatorne stanice-CD4+CD25+Foxp3+), odnosno protuupalnih citokina (IL-4, IL-10), poremećenom apoptozom upalnih i sinovijalnih stanica, pojačanom angiogenezom te u kasnijim fazama bolesti progresivnim oštećenjem zglobne hrskavice i osteoporozom okolnih kostiju (3).

#### **1.5. Dijagnoza JIA**

Za postavljanje dijagnoze potrebna je detaljna laboratorijska i radiološka obrada, uključujući fizikalni pregled i obiteljsku anamnezu. Karakteristična pitanja, prisutna u anamnezi, koja ukazuju na pojavnost JIA su: bol, otekline, toplina, poremećena funkcija zglobova, postojanje jutarnje ukočenosti, povišena tjelesna temperatura itd. Kod oligoartikularnog i poliartikularnog tipa potrebno je učiniti dodatnu imunološku i radiološku obradu jer laboratorijski parametri mogu biti manje ili više poremećeni. Radiološkom obradom mogu se pronaći erozivne promjene na zglobovima, a u imunološkim testovima pozitivni reuma faktor (RF) i antinuklearno antitijelo (ANA). Negativni nalaz ANA i RF kod djece ipak su češći iako se na kraju, prema ostalim nalazima i kliničkoj slici, postavi dijagnoza JIA (4).

#### **1.6. Liječenje JIA**

Kako bi cilj suvremenog liječenja bio uspješan i ostvariv, važno je težiti i usmjeriti liječenje, ne samo na ublažavanje simptoma i smirivanje upalnog procesa, već i na postizanje potpune remisije bolesti. Primjena bioloških lijekova dovela je do značajnog napretka u liječenju bolesnika s rezistentnim oblicima JIA. Bez pravovremenog i adekvatnog liječenja bolest napreduje i rezultira

trajnim promjenama na zglobovima. Izbor terapije ovisi o nekoliko čimbenika: tipu JIA, stupnju aktivnosti bolesti, prognostičkim čimbenicima te dokazanoj učinkovitosti i mogućim nuspojavama pojedinih lijekova (1). Standardna terapija JIA uključuje nesteroidne antireumatike (NSAID), lijekove koji modificiraju bolest (DMARD – eng. *Disease modifying antirheumatic drugs*) kao što je metotreksat i kortikosteroidi koje bi sustavno trebalo davati vrlo restriktivno, a češće primjenjivati intraartikularno, osobito u oligoartritisu. Kako je došlo do napretka u poznavanju patogeneze JIA, dolazi i do napretka u samoj farmakoterapiji bolesti. Danas se teži ka tome da se spriječi kod djece razvoj nepopravljivih posljedica. Stoga, nužno je pristupiti liječenju oboljelih u pravo vrijeme sa što ranijom detekcijom dijagnoze. Glavni cilj liječenja JIA, prije nekoliko desetljeća, bio je ublažavanje boli i smirivanje upalnih simptoma. Biološki lijekovi omogućili su bolju kontrolu bolesti te postizanje potpune i trajne remisije. Prije ere bioloških lijekova više od 25% bolesnika s poliartritisom i gotovo 50% sa sustavnim oblikom JIA nakon pet godina od početka bolesti imalo je trajna funkcionalna ograničenja, a dvije trećine evidentne radiološke promjene na zglobovima. Biomarkeri koji nam ukazuju i pomažu u ranoj detekciji oštećenja, koji nam ukazuju na progresiju bolesti, koji nam omogućuju praćenje je li terapija uspješna te biomarkeri koji nam ukazuju na to koji bolesnik ima lošu prognozu i ishod liječenja su: specifične makromolekule ili fragmenti koji odražavaju metaboličku aktivnost kosti, hrskavice ili sinovijalne membrane. Iako su istraživanja identificirala pojedine simptome povezane s nepovoljnim ishodom na biološku terapiju, ni jedan biomarker nije se pokazao kao pouzdan čimbenik koji bi mogao pomoći pri odabiru bolesnika za određene biološke lijekove jer je poznavanje metabolizma i klirensa tih makromolekula još uvijek ograničeno (1). U današnje vrijeme svrha liječenja reumatskih bolesti nije samo suzbijanje boli, nego se nastoji zaustaviti i liječiti autoimunosna upala, očuvati normalan rasti i razvoj, spriječiti nastanak ireverzibilnih promjena i trajne invalidnosti. To sve uključuje suradnju i involviranost cijelog multidisciplinarnog tima (5).

### 1.7. HLA sustav

Glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex - MHC*) predstavlja važnu komponentu imunskog odgovora u svih sisavaca. U čovjeka je nazvan sustavom HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) jer su humani MHC antigeni prvo otkriveni na leukocitima. Sustav HLA najintenzivnije je istraživana regija u čovjeka tijekom posljednjih dvaju desetljeća (6). Geni sustava HLA nalaze se na 6. kromosomu, tj. na njegovom kratkom kraku i kodiraju sintezu proteina koji predočavaju atigene imunološki kompetentnim stanicama. Geni HLA eksprimiraju se kodominantno, tj. aleli nasljeđeni od obaju roditelja očituju se jednako. S obzirom na različite genske porodice, humana MCH regija podijeljena je u tri razreda:

- geni HLA razreda I smješteni su telomerično
- geni HLA razreda II nalaze se centromerično
- geni HLA razreda III smješteni su između njih

Geni HLA razreda I i II odgovorni su za sintezu antigena HLA, dok su geni HLA razreda III odgovorni za sintezu komponenti komplementa. U regiji se nalazi više od 200 gena. 28% ovih gena ima neku funkciju u imunom sustavu. Nazočnost na stanicama organizma ovisi o ulozi molekula HLA. Molekule HLA razreda I nalaze se na gotovo svim stanicama s jezgrom, s iznimkom endotela rožnice, egzokrinog dijela gušterače i neurona središnjeg živčanog sustava. Molekule razreda II nalaze se na površini antigen prezentirajućih stanica: makrofaga, monocita, limfocita B, dendritičnih stanica (6).

Sustav HLA najpolimorfiji je genski sustav u čovjeka. Određivanje polimorfizama HLA - tipizacija tkiva, provodi se na dvjema razinama, antigenskoj i genskoj. Antigeni HLA određuju se serološkom metodom, testom mikrolimfocitotoksičnosti, i daju uvid u polimorfizam na razini ekspresije na površini stanice. Metodama molekularne biologije koje se temelje na lančanoj reakciji polimerazom (PCR) utvrđuju se polimorfizmi na razini gena (6). Nazivlje polimorfizama HLA usklađeno je na način da se oznake antigena sastoje od oznake lokusa i identifikacijskog broja antigena (npr. HLA-B7), a oznake gena HLA od oznake lokusa zvjezdicom odvojene od identifikacijskog broja alela (HLA-B\*07). Molekularnim metodama određeni daljnji polimorfizmi unutar gena označavaju se dodatnim znamenkama (npr. HLA-B\*07:02:01).

Određivanje polimorfizama HLA imaju veliki značaj u kliničkoj praksi koji se očituje kako u transplataciji tkiva i organa tako i u tranfuzijskom liječenju, genetičkim istraživanjima, istraživanjima migracija stanovništva, forenzičkoj medicini, dijagnostici mnogih autoimunih bolesti i dokazivanju ili osporavanju očinstva.

Osnovna uloga imunskog sustava je prepoznavanje vlastitog i razlikovanje vlastitog od stranog. Iz različitih razloga može doći do zatajenja ove funkcije, a proces u kojem organizam na vlastite antigene reagira kao na tuđe naziva se autoimunost. Istraživanja ukazuju na povezanost gena sustava HLA s razvojem brojnih autoimunih bolesti, npr. dijabetesa tipa 1, celijakije, ankilozantnog spondilitisa, reumatoidnog artritisa, psorijaze, psorijatičnog artritisa i dr. (7).

## **1. 8. Povezanost sustava HLA s JIA**

Do danas je utvrđen veći broj alelnih varijanti HLA razreda I i II čija je prisutnost predisponirajući faktor rizika za razvoj JIA. Sa sklonošću svim podtipovima JIA povezuje se HLA-A\*02 (6), dok su drugi HLA aleli pozitivno povezani samo sa specifičnom podskupinom JIA. Na primjer, alel HLA-DRB1\*08 povezuje se sa povećanom sklonošću oboljevanja od oligoartritisa i

RF- poliartritis, alel HLA-DRB1\*11 povezuje se s oligoartritisom i sistemskim JIA, dok se alel DRB1\*04 povezuje s RF+ poliartritisom i sistemskim JIA (7). Istraživanje provedeno na norveškim i poljskim pacijentima pokazalo je kako je na haplotipu DR8-DQ4 alel DRB1\*08 primarno povezan sa JIA. To istraživanje je isto tako prva demonstracija kako JIA u poljskoj populaciji ima sličnu povezanost HLA razreda II s onima pronađenim u populaciji Zapadne Europe i Sjevernoj Americi, naročito one sa DRB1\*08 alelom. Također, ova studija pacijenata oboljelih od JIA tih dviju populacija pokazuje kako je prisustvo DRB1\*08 alela primarno odgovorno za nastanak JIA (8). Nadalje, povezanost HLA-DRB1 alela sa pojavnošću JIA pokazana je i u studiji s mađarskim pacijentima (9).

### 1.9. Podrška medicinske sestre kod reumatskih bolesti

Svrha je ovog odlomka odrediti sve važne kompetencije medicinskih sestara koje su usko povezane s područjem reumatskih bolesti. Raznolikost razvoja reumatoloških bolesti i rad sestre u timu zahtjeva pokretanje cijelog multidisciplinarnog tima u kojem sestra ima važnu ulogu (10). Napretkom tehnologije i medicine od medicinske sestre očekuju se određena znanja i vještine da bi mogla što kvalitetnije provoditi zdravstvenu njegu oboljelih pacijenata, njihovih obitelji i zajednice. Zadaće medicinske sestre obuhvaćaju:

- zastupanje pacijentove želje za uključivanjem u grupe podrške
- uključivanje tehnologije i informatike u proces rada
- procijeniti reumatološke probleme bolesnika u/izvan bolničkom liječenju i pružati pomoć tamo gdje je potrebna
- zastupanje pacijentovih prava, autonomnosti i informiranosti
- pružanje podrške kod suočavanja sa stresnim situacijama kroz razne oblike edukacije
- korištenje standardiziranih simbola i terminologije u prikupljanju obiteljske povijesti i informacija
- prikupljanje osobnih podataka pacijenata, podataka o zdravlju, o okolišnim činiteljima, genetskom utjecaju i rizicima
- provođenje opsežne zdravstvene i tjelesne procjene koja zahtijeva znanje o reumatskim bolestima, okolišnim i genetičkim utjecajima i rizičnim faktorima
- razvijanje plana zdravstvene njege
- potpora medicinske sestre drugim članovima tima
- olakšavanje i objašnjavanje dobivenih i propisanih preporuka prema potrebama pacijenta

- promidžbu zdravlja/prevenciju bolesti
- interveniranje prema informacijama utemeljenim na znanju
- prilagođavanje tretmana/intervencija u skladu s pacijentovom dijagnozom
- evaluaciju ishoda uzimajući u obzir uspješnost primjenjene tehnologije, intervencija i tretmana.

Reumatske bolesti su višesustavne bolesti obilježene razdobljima pogoršanja i remisije, odnosno stagnacije simptoma. Nepredvidljivog su tijeka i vrlo važan uzrok invalidnosti u djece. Najčešća reumatološka bolest u djece je juvenilni idiopatski artritis koji je ujedno i jedna od najčešćih kroničnih dječjih bolesti. Rijetko dovodi do smrti, ali vrlo često ostavlja trajne posljedice u djece. Neke od ostalih reumatskih bolesti su akutna reumatska vrućica, sistemski lupuseritematodes, dermatomiozitis, progresivna sistemna skleroza te oblici vaskulitisa.

Na temelju prikupljenih podataka, promatranja i fizikalnog pregleda oboljelih od juvenilnog idiopatskog artritisa, mogu se pojaviti neke od sljedećih sestrinskih dijagnoza:

- bol povezan s juvenilnim idiopatskim artritismom
- nesаница uzrokovana boli
- zabrinutost zbog neizvjesnog ishoda bolesti
- smanjena mogućnost brige o sebi zbog osnovne bolesti (odnosi se na djecu koja su samostalna u obavljanju aktivnosti hranjenja, održavanja higijene, odijevanja i eliminacije)
- socijalna izolacija.

Proces sestrinske skrbi logičan je i sustavan pristup sveobuhvatnoj skrbi za pacijente. Tradicionalno se sestrinska skrb pružala rutinski i temeljila se pretežito na pretpostavkama o pacijentovim potrebama za zdravstvenom njegom. No proces sestrinske skrbi podrazumijeva uzimanje sestrinske anamneze i statusa na temelju kojeg se diagnosticiraju pacijentove stvarne potrebe. Sestrinske dijagnoze polazište su za planiranje i provođenje sestrinske skrbi, a sve je to praćeno trajnom sustavnom evaluacijom uspješnosti (11).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Odrediti učestalost alelne varijante HLA-DRB1\*08 u oboljelih od juvenilnog idiopatskog artritisa u populaciji istočne Hrvatske.
2. Usporediti alelnu frekvenciju HLA-DRB1\*08 u skupini ispitanika s ranije objavljenim podacima alelne frekvencije u kontrolnoj skupini kako bi se utvrdilo je li HLA-DRB1\*08 predisponirajući faktor rizika za razvoj JIA u populaciji istočne Hrvatske
3. U skupini oboljelih od JIA usporediti učestalost alela HLA-DRB1\*08 sa pojavnošću pridruženih autoimunih bolesti te s pojavom JIA ili drugih autoimunih bolesti u obiteljskoj anamnezi

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ustroj istraživanja

Rad je osmišljen kao retrospektivno istraživanje.

#### 3.2. Ispitanici

Rad obuhvaća skupinu ispitanika od 66 bolesnika (46 ženskog spola, 20 muškog spola) u dobi od 2 do 17 godina s postavljenom dijagnozom juvenilnog idiopatskog artritisa kojima je molekularna tipizacija HLA učinjena u rutinskoj dijagnostici u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva KBC-a Osijek u razdoblju od 2009. do 2015. godine. Uzorci krvi ispitanika bili su popraćeni liječničkom uputnicom i pri dolasku u laboratorij dobili su jedinstvenu oznaku.

Skupina pacijenata oboljelih od JIA podijeljena je s obzirom na broj zahvaćenih zglobova, oblik i vrijeme nastupa simptoma, pridružene znakove i trajanje simptoma bolesti, u dvije skupine: oligoartikularni tip (31 Ž, 17 M) i poliartikularni tip (14 Ž, 4 M). Nadalje, učinjena je dodatna raspodjela oligoartikularne skupine u dvije podskupine: monoartritis (22 Ž, 11 M) i oligoartritis (9 Ž, 6 M).

Kontrolnu skupinu u radu predstavljali su ranije objavljeni rezultati molekularne tipizacije HLA 210 zdravih nesrodnih ispitanika iz opće populacije Hrvatske (12).

Istraživanje je provedeno u periodu od veljače do lipnja 2016. godine.

#### 3.3. Metode

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

Genomska DNA izolirana je iz 200  $\mu$ L pune periferne krvi s antikoagulansom EDTA primjenom komercijalnog seta *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača. Metoda se temelji na svojstvu enzima proteinaze K koji, uz pomoć pufera za razgradnju, razgrađuje proteine stanične i jezgrine membrane omogućavajući tako da se slobodna DNA veže na sloj staklene mrežice u plastičnoj tubici.

**Materijal:** 200  $\mu$ L pune periferne krvi s antikoagulansom EDTA, *High Pure PCR Template Preparation Kit*, izopropanol, apsolutni etanol, destilirana H<sub>2</sub>O.

**Pribor:** mikropipete (2 – 20  $\mu$ L, 20 – 200  $\mu$ L, 200 – 1000  $\mu$ L), nastavci (sterilni, nekorišteni), plastične tubice volumena 1,5 mL i 2,0 mL (sterilne, nekorištene), mikrocentrifuga (2000 – 14200 o/min) s regulacijom temperature (od -20 do +40 °C), grijač/shaker *Thermo Shaker TS-100* sa zamjenjivim blokom za 20x2 mL tubice, zamrzivač (-20 °C), hladnjak (+4 °C).

**Postupak:** u sterilnoj tubici volumena 1,5 mL pomiješa se 200  $\mu$ L uzorka krvi, 200  $\mu$ L pufera za



razgradnju proteina (6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% triton X-100 (v/v), pH 4,4 (25 °C)) i 40 µL vodene otopine proteinaze K. Nakon 10 min inkubacije na 72 °C doda se 100 µL izopropanola, dobro se promiješa te se smjesa prebaci u tubicu sa staklenom mrežicom koja se nalazi smještena u kolektor tubici. Nakon centrifugiranja u trajanju od jedne minute pri brzini 8000 x g tubica sa staklenom mrežicom prebaci se u novu kolektor tubicu, doda se 500 µL pufera za uklanjanje inhibitora (5M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25 °C)) i ponovi se centrifugiranje pri brzini 8000 x g tijekom jedne minute. Tada se ponovno zamijeni kolektor tubica novom te se doda 500 µL pufera za ispiranje (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C)) i ponovi centrifugiranje (8000 x g, jedna minuta). Postupak ispiranja ponovi se još jednom. Ostatak pufera s mrežice uklanja se dodatno kratkim centrifugiranjem (10 sekundi, 13000 x g). DNA se eluira dodatkom 200 µL prethodno zagrijanog (70 °C) elucijskog pufera (10 mM Tris-HCl, pH 8,5 (25 °C)) u tubu sa staklenom mrežicom i potom centrifugiranjem na 8000 x g tijekom jedne minute. DNA se prenese u obilježenu plasičnu sterilnu tubicu za čuvanje uzoraka volumena 2,0 mL. Svakom uzorku DNA pridružena je jedinstvena oznaka. Uzorci DNA čuvaju se na -20 °C do analize.

### 3.3.2. Tipizacija lokusa HLA-DRB1 metodom PCR-SSP

Uzorci su tipizirani komercijalnim setovima niske rezolucije *DQ-DR SSP Combi Tray* (Olerup, Stockholm, Švedska) prema uputama proizvođača. Metodom PCR-SSP (eng. *sequence-specific primers*) određuje se polimorfizam ciljanih regija gena. Za tipizaciju određenog lokusa svake osobe istovremeno se radi više različitih PCR-SSP reakcija (tubica) koje se prenose u identičnim uvjetima. Svaka reakcija sadrži početnice za umnožavanje *housekeeping* gena (pozitivna kontrola) te početnice koje se podudaraju s ciljnim slijedom određenog polimorfizma ispitivanog gena. Početnice se nalaze prealikvotirane u tubicama komercijalnog seta. Za tipizaciju lokusa DRB1 i DQB1 za jednu osobu upotrebljava se jedan *Combi Tray* set koji se sastoji od 32 PCR tubice. U svakoj tubici ispituje se prisutnost jednog ili skupine alela. Sastojci reakcijske smjese u tubicama su sljedeći:

- parovi početnica (15-25 pb) komplementarni specifičnom slijedu baza u DNA
- kontrolni par početnica za provjeru učinkovitosti reakcije (pozitivna kontrola)
- PCR reakcijski pufer s deoksiribonukleotidima (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) i MgCl<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>O (redistirana, sterilna)
- Taq DNA polimeraza
- uzorak DNA.

**Materijal:** Olerup SSP® DQ-DR SSP *Combi Tray kit* (Olerup), Taq DNA polimeraza, 5 units/ $\mu$ L (Euroclone), H<sub>2</sub>O redestilirana (Aqua pro injectione, sterilna), DNA uzoraka.

**Pribor:** PCR uređaj (VERITI *Thermal Cycler, Applied Biosystems*), kabinet za sterilni rad (LKB DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-AR), mikropipete (2.5  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L), filter nastavci (sterilni, nekorišteni), plastične tubice 1,5 mL, Centrifuga (HERAEUS Multifuge® 3S/3S-R), zamrzivač (-20 °C).

**Postupak:** nakon što se u obrazac/radni list upiše datum testiranja te identifikacijski broj, prezime i ime pacijenta, upisuje se Lot korištenog komercijalnog seta i izračun za mastermiks reakcijske smjese. Testirani mastermiks reakcijske smjese za svaki uzorak mora sadržavati točno određene volumene sljedećih kemikalija: 177,1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 108  $\mu$ L reakcijskog pufera s deoksiribonukleotidima, 2,9  $\mu$ L Taq DNA polimeraze i 72  $\mu$ L DNA uzorka. Mastermiks reakcijske smjese se vorteksira 5 sekundi te se pomoću *pulse-spin* centrifuge spusti na dno tubice. Tada se u svaku reakcijsku tubicu prenese po 8  $\mu$ L mastermiksa, osim u posljednju tubicu br. 32 (negativna kontrola) gdje se stavlja mastermiks bez Taq DNA polimeraze. Tubice se zatvore samoljepivom folijom, centrifugiraju (jednu minutu na 1000 o/min) te se postave u PCR uređaj.

Tablica 1. Uvjeti PCR reakcije

stupanj	broj ciklusa	temperatura (°C)	trajanje (min)	
1	1	94	2:00	denaturacija
2	10	94	0:10	denaturacija
		65	1:00	komplementarno vezanje početnica na kalup DNA (eng. <i>annealing</i> ) i sinteza komplementarnog lanca DNA (eng. <i>extension</i> )
3	20	94	0:10	denaturacija
		61	0:50	komplementarno vezanje početnica na kalup DNA (eng. <i>annealing</i> )
		72	0:30	sinteza komplementarnog lanca DNA (eng. <i>extension</i> )
4	1	RT 4	HOLD (< 8h) HOLD (> 8h)	

### 3.3.3. Predočavanje rezultata PCR-a pomoću agarozne gel elektroforeze

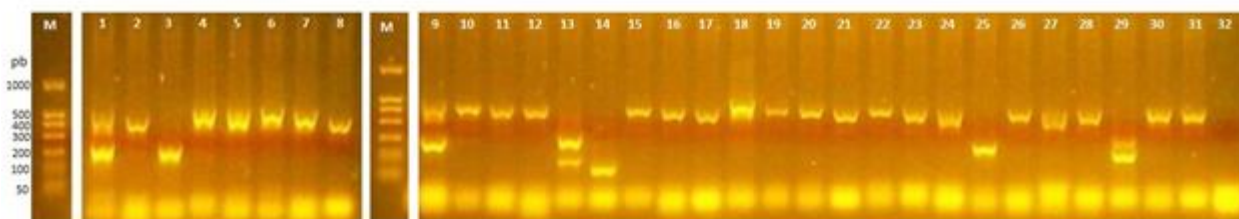
Specifični odsječci DNA umnoženi metodom PCR-SSP mogu se, ovisno o njihovoj veličini, razdvojiti metodom agarozne gel elektroforeze. Agarozna gel elektroforeza temelji se na svojstvu stvaranja kompleksne umrežene strukture gela u kojoj negativno nabijeni fragmenti DNA pod

djelovanjem istosmjerne struje putuju prema elektrodi suprotnog naboja – anodi. Manji fragmenti DNA putuju brže i dalje od većih fragmenata DNA. Molekule DNA razdvojene na temelju razlike u veličini uočavaju se pomoću boje za bojanje nukleinskih kiselina.

**Materijal:** Agarozna (Roche), DNA marker 50-1000 pb (Olerup), GelRed boja za bojanje nukleinskih kiselina u agaroznom gelu (Olerup), pufer 1xTAE, *loading* pufer.

**Pribor:** sustav za elektroforezu VG-SYS *wide Vari-Gel System* (SCIE-PLAS), transformator za elektroforezu *PowerPac Basic* (BIORAD), UV transiluminator *ImageQuant100* (*Life Sciences*), mikropipeta (10  $\mu$ L), filter nastavci (sterilni, nekoristeni), analitička vaga (*Metler Toledo*), mikrovalna pećnica, staklena okrugla tikvica (250 mL), staklena čašica (10 mL), menzura (250 mL), zamrzivač (-20 °C), hladnjak (+4 °C).

**Postupak:** za pripremu 2% agaroznog gela u tikvici se otopi 2,64 g agaroze u 132 mL pufera 1xTAE. Otopina agaroze zagrije se u mikrovalnoj pećnici do vrenja. Tikvica sa zagrijanom agarozom potom se ohladi pod mlazom vode do približno 60 °C. U ohlađenu još tekuću agarozu doda se 80  $\mu$ L GelRed boje. Tako pripremljena otopina agaroze izlije se u ranije pripremljeni kalup s postavljenim češljevima za oblikovanje jažica. Nakon polimerizacije agaroznog gela u trajanju od 20 do 30 minuta izvade se češljevi i gel se uroni u jedinicu za elektroforezu napunjenu 1xTAE puferom. U jažice gela redom se pipetira ukupna količina (10  $\mu$ L) svake reakcijske smjese PCR tubica komercijalnog seta. U prvu jažicu svakog reda na gelu stavlja se DNA marker. DNA marker smjesa je točno određenog broja fragmenata DNA poznatih veličina na temelju kojih se određuje veličina umnoženih fragmenata DNA u reakcijskim smjesama. Agarozna gel elektroforeza vožena je 25 minuta uz parametre jakosti struje 150 mA i napona 160 V. Pozitivne PCR reakcije koje se na gelu uočavaju u obliku vrpce predočene su pomoću UV transiluminatora. Uočavanje se temelji na svojstvu boje GelRed da pobuđena UV svjetlom fluorescira kada se veže na molekule DNA. Svaki je gel fotografiran, a svaka je fotografija označena i arhivirana.



Slika 1: Gel agarozne elektroforeze molekularne tipizacije alela HLA-DQB1 i HLA-DRB1 pomoću Olerup SSP kita

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

Rezultati molekularne tipizacije HLA analizirani su pomoću specijaliziranog računalnog programa *Helmberg SCORE*.

### 3.3.5. Statističke metode

Učestalost alela HLA-DRB1\*08 u skupini ispitanika određena je direktnim brojanjem. U slučaju da je osoba imala samo jedan alel na testiranom lokusu HLA pretpostavljeno je da je osoba mogući homozigot za taj alel.

Usporedba učestalosti alela HLA-DRB1\*08 između skupine ispitanika i kontrolne skupine učinjena je pomoću tablice 2x2 i Fischerovog egzaktnog testa te izražena omjerom izgleda (*engl. odds ratio, OR*). Određena je razina statističke značajnosti  $p < 0,05$ . Podaci su statistički obrađeni pomoću programa STATISTICA 12 i Microsoft Excel 2007.

### 3.3.6. Analiza medicinske dokumentacije ispitanika

U Klinici za pedijatriju KBC-a Osijek retrospektivno je analizirana dokumentacija ispitanika, uz suglasnost predstojnika Klinike, te uz odobrenje Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek. Iz medicinske su dokumentacije izdvojeni podaci o dobi pacijenata kod postavljanja dijagnoze, o pridruženim autoimunim bolestima i dodatnim dijagnozama, te o pojavi JIA ili drugih autoimunih bolesti u obiteljskoj anamnezi.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Osobine ispitivane skupine oboljelih od JIA

Provedenim ispitivanjem obuhvaćeno je ukupno 66 pacijenata oboljelih od juvenilnog idiopatskog artritisa kojima je učinjena molekularna tipizacija HLA u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i tipizaciju tkiva u periodu od 2009. do 2015. godine. Istraživana skupina sastojala se od 45 ženske djece (68,2 %) i 21 muškog djeteta (31,8 %). Učestalost pojedinih podtipova JIA u ispitivanom uzorku oboljelih, odnos broja djevojčica i dječaka u svakom od podtipova, te dob djeteta pri postavljanju dijagnoze prikazani su u Tablici 2. Može se uočiti da je u ispitivanoj skupini juvenilni idiopatski artritis općenito učestaliji u djevojčica te da je razlika u odnosu broja Ž:M izraženija u skupini poliartikularnog tipa u odnosu na oligoartikularni tip JIA.

**Tablica 2.** Osobine skupine bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom ovisno o tipu bolesti

	oligoartikularni tip (monoartritis / oligoartritis)	poliartritis
raspodjela podtipova u JIA skupini	72,7 % (50,0 % / 22,7 %)	27,3 %
spol (Ž : M)	1,8 : 1 (2 : 1 / 1,5 : 1)	3,5 : 1
dob pri postavljanju dijagnoze (mean±SD)	između 2. i 17. godine (2.-17. / 2.-16.) 10,6±4,9 (10,7±5,2 / 10,5±4,7)	između 2. i 17. godine 13,2±4,2
pridružene autoimune bolesti i dodatne dijagnoze	u podskupini monoartritis: – anemija (1) – sinovitis (1) – metatarzalgija (1) – Raynaudov sindrom (4) – akutni pijelonefritis (1) – alergijski i dijetetski gastroenteritis i kolitis (1) – juvenilni reumatoidni artritis (5) – „trigger finger“(1) – digitus detendens (1) – sinovitis, tenosinovitis (1) – mladalačka osteohondroza lisne i goljenične kosti (1) – hondromalacija patele (3) – ostale reaktivne artropatije (1)	– Raynaudov sindrom (4) – funkcionalni poremećaj crijeva nespecificiran (1) – hipotireoza (1) – hondromalacija patele (1) – juvenilni dermatomiozitis (1) – mezenhimopatija in obs. (1) – miozitis (1) – hemiplegija nespecificirana (1) – alergijski gastroenteritis i kolitis (1)

	u podskupini oligoartritis: – astma (1) – sistemska bolest vezivnog tkiva u promatranju (1) – akutni bronhitis nespecificirani (1) – pectus infundibuliforme (1)	– ostale postinfektivne artropatije (1) – sistemska bolest vezivnog tkiva (1)
pojava JIA ili druge autoimune bolesti u obiteljskoj anamnezi	u podskupini monoartritis: – kolitis i ankilozantni spondilitis (majka) (1) – urički artritis (1) – giht (otac), alergijski bronhitis (braća) (1) – reumatoidni artritis (baka po majci) (1) – otok i bolovi u šakama (otac) (1)  u podskupini oligoartritis: – sakroileitis, endoproteza desnog kuka (majka), reumatoidni artritis (prabaka s majčine strane), astma (brat), retinopatija (drugi brat) (1) – psorijaza (sestra) (1) – reumatoidni artritis (sestra) (1)	– dijabetes (djed po majci), dijabetes i astma (baka po majci) (1) – JIA (sestra) (1) – reumatoidni artritis (baka i djed po majci) (1)

u zagradi naznačen broj pacijenata

Analizom medicinske dokumentacije ispitanika u Klinici za pedijatriju KBC-a Osijek uočeno je prisustvo više bolesti pridruženih juvenilnom idiopatskom artritisu (Tablica 2.) među kojima je najzastupljeniji Raynaudov sindrom, prisutan u 4 pacijenta (12,1 %) u podskupini monoartikularnog tipa i kod 4 pacijenta (22,2 %) podskupine poliartikularnog tipa.

U ukupnoj skupini oboljelih od JIA kod 11 pacijenata (16,7 %) uočena je pojava JIA ili druge autoimune bolesti u obitelji (u podskupini monoartritisa 15,2 %, u podskupini oligoartritis 20,0%, u podskupini poliartritis 16,7 %).

Nadalje, uočeno je da 63,6 % oboljelih od JIA koji u obiteljskoj anamnezi imaju neku autoimunu bolest također boluju i od neke pridružene autoimune bolesti.

#### 4.2. Raspodjela alela HLA-DRB1\*08

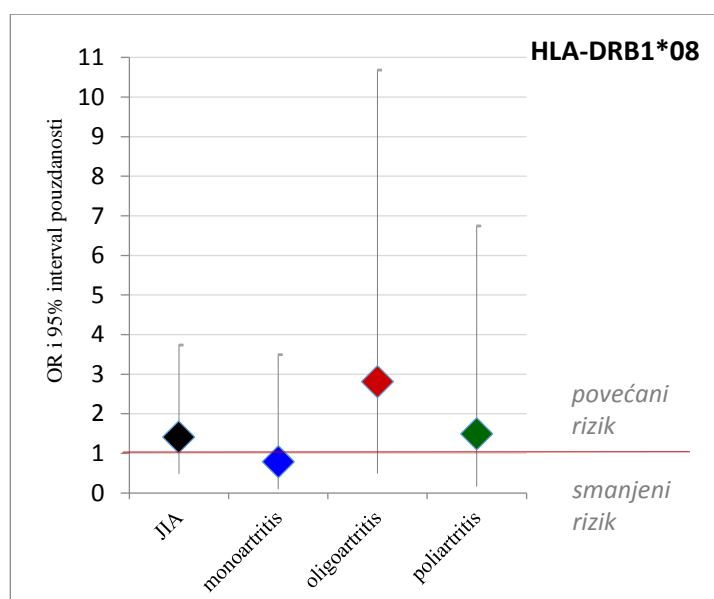
Analizom učestalosti alelne varijante HLA-DRB1\*08 u skupini JIA i podskupinama, u podskupini oligoartritisa uočeno je značajnije povećanje učestalosti alela HLA-DRB1\*08 u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 3.). Ni u jednoj od ispitivanih skupina oboljelih odstupanje učestalosti alela DRB1\*08 u odnosu na kontrolnu skupinu nije bilo statistički značajno.

**Tablica 3:** Učestalost alela HLA-DRB1\*08 u skupini oboljelih od JIA, podskupinama oboljelih, i u kontrolnoj skupini

DRB1*08	JIA N=66	monoartritis N=33	oligoartritis N=15	poliartritis N=18	kontrolna skupina N=210
n	7	2	3	2	16
AF	5,3 %	3,0 %	10,0 %	5,6 %	3,9 %
p	0,457	1,000	0,125	0,645	

N = broj pacijenata/kontrola, n = broj alela, AF = učestalost alela (*engl.* allele frequency)

Prikaže li se odnos učestalosti HLA-DRB1\*08 u ispitivanim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu kao omjer izgleda (OR) (Slika 2.) možemo uočiti značajnije povišen OR u podskupini oligoartritisa. OR je nešto niži no još uvijek veći od 1 u ukupnoj skupini JIA, te podskupini poliartritisa. Kod monoartritisa OR je manji od 1.



**Slika 2.** Omjer izgleda (OR) i 95% interval pouzdanosti alela HLA-DRB1\*08 u skupini JIA i podskupinama u odnosu na kontrolnu skupinu

### 4.3. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1\*-DQB1\*

U analiziranim uzorcima pacijenata koji boluju od JIA tipizirani su lokusi HLA-DRB1 i HLA-DQB1. Uočeno je 16 različitih haplotipova (Tablica 4.). U svim podskupinama najučestaliji je haplotip DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7). Alel HLA-DRB1\*08 u analiziranim se uzorcima nalazi u sastavu dvaju haplotipova. Haplotip DRB1\*08-DQB1\*03(DQ8) zastupljen je u skupini monoartritisa (3,0%) i oligoartritisa (3,3%). Haplotip DRB1\*08-DQB1\*04 prisutan je u skupini oligoartritisa (6,7%) i poliartritisa (5,5%). Udio od 57,1 % alela HLA-DRB1\*08 prisutnih u ukupnoj skupini JIA pacijenata u populaciji istočne Hrvatske nalazi se u sastavu haplotipa HLA-DRB1\*08-DQB1\*04.

**Tablica 4.** Učestalost haplotipova HLA-DRB1\*-DQB1\* u skupini JIA i podskupinama

haplotip DRB1 - DQB1	HF (%)		
	monoartritis (N=33, n=66)	oligoartritis (N=15, n=30)	poliartritis (N=18, n=36)
*01 - *05	12,1	6,7	8,3
*03 - *02	12,1	6,7	13,9
*04 - *03(DQ7)	4,5	0,0	2,8
*04 - *03(DQ8)	9,1	6,7	2,8
*04 - *04	1,5	0,0	0,0
*07 - *02	7,6	0,0	2,8
*07 - *03(DQ9)	3,0	0,0	0,0
*08 - *03(DQ8)	3,0	3,3	0,0
*08 - *04	0,0	6,7	5,5
*11 - *03(DQ7)	19,7	13,3	19,4
*12 - *03(DQ7)	3,0	0,0	0,0
*13 - *06	7,6	13,3	16,7
*14 - *05	3,0	0,0	5,5
*14 - *06	0,0	0,0	2,8
*15 - *06	10,6	30,0	5,5
*16 - *05	3,0	13,3	13,9

HF = učestalost haplotipa (*engl.* haplotype frequency), N = broj pacijenata, n = broj haplotipova

Analizirajući dobivene rezultate molekularne tipizacije HLA oboljelih od JIA i rezultate analize medicinske dokumentacije pacijenata nije uočena korelacija između učestalosti HLA-DRB1\*08 i pridruženih autoimunih bolesti, te pojave drugih autoimunih bolesti u obiteljskoj anamnezi.



## 5. RASPRAVA

Sve od otkrića povezanosti sustava HLA s juvenilnim idiopatskim artritismom, kompleks gena HLA važna je tema brojnim istraživačima u otkrivanju uloge HLA gena u patogenezi JIA. Općenito su istraživanja u području molekularne biologije omogućila napredak u razumijevanju patogeneze reumatskih bolesti, a time omogućila i razvoj novih terapijskih preparata (bioloških lijekova) kojima je cilj djelovanja autoimuni upalni proces.

U ovom istraživanju analizirani su rezultati molekularne tipizacije HLA oboljelih od JIA na području istočne Hrvatske, te je analizirana medicinska dokumentacija ispitanika.

Pojavnost JIA s obzirom na spol u ispitivanoj ukupnoj skupini JIA približno je dva puta češća u djevojčica što je u skladu s literaturnim podacima (4).

Brojna istraživanja ukazuju na povećanu prevalenciju pridruženih autoimunih bolesti u oboljelih od JIA. Nadalje, navodi se i da su u obiteljima s djecom koja boluju od JIA češće i druge autoimune bolesti (13). U skladu s time je rezultat analize ovog istraživanja koji upućuje na povezanost JIA, pridruženih autoimunih bolesti i pozitivne obiteljske anamneze autoimunih bolesti.

Kontrolna skupina ovoga rada uključuje 210 nesrodnih zdravih pojedinaca iz različitih područja Hrvatske (12). Alelna frekvencija HLA-DRB1\*08 kontrolne skupine u iznosu od 3,9% manja je u odnosu na alelnu frekvenciju ispitivane skupine oboljelih od JIA (5,03%), te u odnosu na AF=10,0% u podskupini oligoartritisa. Iako razlika AF između kontrolne i ispitivanih skupina nije statistički značajna ona ukazuje na mogući doprinos alela HLA-DRB1\*08 riziku od razvoja JIA, a osobito riziku od razvoja oligoartikularnog tipa JIA u populaciji istočne Hrvatske.

Istraživanje provedeno na norveškim i poljskim pacijentima dovelo je do istog zaključka. Uočeno je da DRB1\*08 doprinosi većem riziku za razvoj JIA (8).

Istraživanje Pazar B. i sur. prikazuje HLA- DRB1\*08, ujedno i DRB1\*01, kao znatno češće zastupljeni alel kod JIA (9). Nadalje, u istom istraživanju uočeno je da u podskupinama po ILAR kriteriju alel HLA-DRB1\*08 pokazuje snažnu povezanost s podskupinom oligoartritisa (9).

Herlin M. i sur. u svom istraživanju prikazuju rezultate dviju velikih studija koje su istraživale povezanost između HLA alela/haplotipova i JIA u Velikoj Britaniji i SAD-u koji potvrđuju povezanost JIA s HLA-DRB1\*08 kao rizičnim alelom. I u tim se istraživanjima pokazala veća učestalost tog alela i kod oligoartritisa što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju (14). U istom radu navodi se snažna pozitivna povezanost haplotipa HLA-DRB1\*08-

DQB1\*04 s oligoartikularnim oblikom JIA što je potpuno u skladu s rezultatima u ovog istraživanja u kojem je uočeno da se 57,1% alela DRB1\*08 prisutnog u pacijenata oligoartikularne podskupine nalazi u sastavu navedenog haplotipa.

Istraživanja pokazuju da je u obiteljima pacijenata koji boluju od JIA povećana prevalencija autoimunih bolesti, osobito upalnih artropatija i dijabetesa tipa 1 (15). U ovom istraživanju uočena prisutnost reumatoidnog artritisa, psorijaze, JIA, retinopatije, sakroileitisa, dijabetesa tipa 1, kolitisa i ankilozantnog spondilitisa u obiteljima oboljelih od JIA potvrđuju navedene studije.

Nadalje, primijećeno je da je kod pacijenata koji boluju od JIA povećana prevalencija autoimunog tiroiditisa, hipotireoze, celijakije i dijabetesa tipa 1 (16). U istraživanoj skupini oboljelih od JIA nije primijećena pojava dijabetesa tipa 1, no uočene su hipotireoza, miozitis, dermatomiozitis, mezenhimopatija, poremećaji crijeva, sistemska bolest vezivnog tkiva, Raynaudov sindrom i dr.

Pozitivna korelacija između učestalosti HLA-DRB1\*08 i pridruženih autoimunih bolesti, te pojave drugih autoimunih bolesti u obiteljskoj anamnezi u ovom istraživanju nije uočena. Istraživanje koje će uključivati više JIA pacijenata, time i veće podskupine JIA potrebno je za preciznu procjenu povezanosti alela HLA-DRB1\*08 s JIA u populaciji istočne Hrvatske te za procjenu povezanosti općenito gena sustava HLA s autoimunim bolestima pridruženima JIA i za procjenu prevalencije drugih autoimunih bolesti u obiteljima oboljelih od JIA (17).

Razvojem i rastom dostupnosti različitih biomarkera za potvrđivanje bolesti, razvojem tehnologije i novih analitičkih strategija stvara se mogućnost suodnosa molekularne biologije s ishodima bolesti. Molekularni dijagnostički “alat” dostupan je kliničaru kao pomoć u postavljanju dijagnoze i odabiru odgovarajuće terapije. Time se osigurava bolji ishod bolesti za pacijenta oboljelog od JIA (18).

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata o učestalosti alelene varijante HLA-DRB1\*08 u oboljelih od JIA u populaciji istočne Hrvatske, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Alel HLA-DRB1\*08 učestaliji je u oboljelih od juvenilnog idiopatskog artritisa u populaciji istočne Hrvatske u odnosu na kontrolnu skupinu
2. Učestalost alela HLA-DRB1\*08 veća je u podskupini oligoartikularnog tipa JIA u odnosu na podskupinu poliartritisa i monoartritisa
3. U sastavu haplotipa HLA-DRB1\*08-DQB1\*04 nalazi se 57,1 % alela HLA-DRB1\*08 prisutnih u ukupnoj skupini JIA pacijenata u populaciji istočne Hrvatske
4. U ispitivanoj skupini JIA pacijenata i ispitivanim podskupinama nije uočena povezanost između učestalosti HLA-DRB1\*08 i pridruženih autoimunih bolesti, te pojave drugih autoimunih bolesti u obiteljskoj anamnezi.

Može se zaključiti da alel HLA-DRB1\*08, koji je u izvješćima različitih provedenih istraživanja povezanosti s JIA, uočen kao rizični, s povećanom učestalošću prisutan i u populaciji oboljelih od juvenilnog idiopatskog artritisa na području istočne Hrvatske.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Odrediti učestalost alelne varijante HLA-DRB1\*08 u oboljelih od juvenilnog idiopatskog artritisa (JIA) u populaciji istočne Hrvatske; usporediti alelnu frekvenciju HLA-DRB1\*08 u skupini ispitanika s ranije objavljenim podatkom alelne frekvencije u kontrolnoj skupini. U skupini oboljelih od JIA usporediti učestalost alela HLA-DRB1\*08 sa pojavnošću pridruženih autoimunih bolesti te s pojavom JIA ili drugih autoimunih bolesti u obiteljskoj anamnezi.

**Ispitanici i metode:** Rad obuhvaća skupinu ispitanika od 66 bolesnika (46 ženskog spola, 20 muškog spola) s postavljenom dijagnozom JIA kojima je molekularna tipizacija HLA učinjena u rutinskoj dijagnostici KBC-a Osijek. Kontrolnu skupinu predstavljali su ranije objavljeni rezultati molekularne tipizacije HLA 210 zdravih nesrodnih ispitanika iz opće populacije Hrvatske.

**Rezultati:** Alel HLA-DRB1\*08 s povišenom je učestalošću (AF = 5,3%) bio zastupljen u oboljelih od JIA u odnosu na kontrolnu skupinu (AF = 3,9%). U podskupini oboljelih od oligoartritisa također je zabilježena povećana učestalost alela HLA-DRB1\*08 (AF = 10,0%) kako u odnosu na kontrolnu skupinu tako i u odnosu na ostale JIA podskupine. Ni jedan od dobijenih rezultata nije dostigao statistički značajnu razinu.

**Zaključak:** Povećana učestalost alela HLA-DRB1\*08 u oboljelih od JIA u populaciji istočne Hrvatske, te povećana učestalost tog alela u podskupini oligoartritisa u skladu je s literaturnim podacima o pozitivnoj povezanosti JIA, te oligoartikularnog oblika JIA, s alelom HLA-DRB1\*08. U ispitivanoj skupini JIA pacijenata i ispitivanim podskupinama nije uočena povezanost između HLA-DRB1\*08 i pridruženih autoimunih bolesti, te pojave drugih autoimunih bolesti u obiteljskoj anamnezi.

**KLJUČNE RIJEČI:** HLA-DRB1\*08, juvenilni idiopatski artritis

## 8. SUMMARY

### Frequency of the HLA-DRB1\*08 in JIA population of Eastern Croatia

**Objectives:** Determine the HLA-DRB1\*08 allele frequency in the population of Eastern Croatia suffering from juvenile idiopathic arthritis (JIA). Afterwards, compare the HLA-DRB1\*08 allele frequency of the research subjects with the previously published allele frequency (AF) data in the control group. Compare the frequency of HLA-DRB1\*08 with presence of JIA associated autoimmune diseases and with family history of autoimmunity.

**Patients and methods:** The research subject group consisted of 66 patients (46 female, 20 male) diagnosed with JIA. Their molecular HLA typing was performed during routine diagnostics at the University Hospital Osijek. Previously published results of molecular HLA typing of 210 healthy, unrelated individuals from the general population of Croatia were the control group in this research.

**Results:** The final results show that the appearance of the DRB1\*08 allele in patients suffering from JIA was found. The increased frequency of HLA-DRB1\*08 allele was found in JIA patients cohort (AF = 5,3%) vs control group (AF = 3,9%). After stratification of JIA group into subgroups (oligoarthritis, monoarthritis, polyarthritis), the largest AF of 10% was recorded in the oligoarthritis subgroup. None of the results had a significant statistical impact.

**Conclusion:** The increased frequency of HLA-DRB1\*08 allele in JIA cohort of Eastern Croatia population and increased frequency in olygoarticular JIA subgroup are in accordance with research results indicating HLA-DRB1\*08 association to JIA susceptibility in other populations. In the research subject group and the control group, a connection among HLA-DRB1\*08 and associated autoimmune diseases as well as the appereance of other autoimmune diseases in the family anamnesis was not found.

**KEY WORDS:** allele HLA-DRB1\*08, juvenile idiopathic arthritis

**9. LITERATURA**

1. Tambić Bukovac L, Vidović M, Lamot L, Perica M, Harajček M. Smjernice za primjenu biološke terapije u djece s juvenilnim idiopatskim artritism (JIA). *Reumatizam*. 2013; 60(1):57-66.
2. Toupin AK, Cavallo S, Ehrmann Feldman D. Children with juvenile idiopathic arthritis: are health outcomes better for those diagnosed younger? *Child: care, health and development*. 2012; 39(3):442-448.
3. Harajček M. Reumatske bolesti u djece-per aspera ad astra. *Reumatizam*. 2007; 54(2):11-23.
4. Vidović M, Kelečić J. Tjelesna aktivnost djece s reumatskim bolestima. *Hrvat. Športskomed. Vjesn*. 2008; 23:66-74.
5. Jelušić M, Malčić I. i sur. *Pedijatrijska reumatologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
6. Sertić J. i sur. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika*. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
7. Prahalad S, Glass DN. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric Rheumatology*. 2008; 6:1-16.
8. Smerdel A, Polski R, FlatØ B, Musiej-Nowakowska E, Thorsby E, Førre Ø. Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is primarily associated with HLA-DR8 but not DQ4 on the DR8-DQ4 haplotype. *Ann Rheum Dis*. 2002; 61:354-357.
9. Pazàr B, Gergely P, Nagy ZB, Gombos T, Pozsonyi E, Rajczy K, i sur. Role of HLA-DRB1 and PTPN22 genes in susceptibility to juvenile idiopathic arthritis in Hungarian patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2008; 26:1146-1152.
10. Rimac B. Kompetencije medicinskih sestara u reumatologiji. *Reumatizam*. 2011; 58:200.
11. Fučkar G. *Uvod u sestrinske dijagnoze*. 1.izd. Zagreb: Hrvatska udruga za sestrinsku edukaciju; 1996.
12. 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. *European Journal of Immunogenetics*. 2000; 27:47-51.
13. Khani M, Ziaee V, Moradinejad M-H, Parvaneh N. The effect of positive history of autoimmunity in juvenile idiopathic arthritis characteristics; a case control study. *Iran J Pediatr*. 2013; 23(5):569-673.
14. Herlin M, Peterson MB, Herlin T. Update on genetic susceptibility and pathogenesis in juvenile idiopathic arthritis. *EMJ Rheumatol*. 2014; 1:73-83.
15. Prahalad S, McCracken CE, POnder LA, Angeles-Han ST, Rouster Stevens KA, Vogler LB, i

- sur. Familial autoimmunity in the childhood arthritis and rheumatology research alliance registry. *Pediatric Rheumatology* 2016; 14-14.
16. Stagi S, Giani G, Simonini G, Falcini F. Thyroid function, autoimmune thyroiditis and celiac disease in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology*. 2005; 44:517-520.
17. Marzi S, Tokić S, Štefanić M, Turjak N, Glavaš-Obrovac LJ. Association of HLA polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis in Eastern Croatian population. *Tissue Antigens. Oral Presentations and Posters* 85(5) John Wiley & Sons Ltd. 2015; 336-336.
18. Hollenbach JA, Thompson SD, Bugawan TL, Ryan M, Sudman M, Marion M, i sur. Juvenile Idiopathic Arthritis and HLA Class I and Class II Interactions and Age-at-Onset Effects. *Arthritis & Rheumatism*. 2010; 62:1781-1791.

## 10. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Stela Vuković

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 17. travnja 1993. god. u Osijeku

ADRESA: Vijenac Murse 5, 31000 Osijek

KONTAKT: vukovicstela@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

2012 – 2015: Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni preddiplomski studij Sestrinstvo

2008 – 2012: I. gimnazija, Osijek

2000 – 2008: Osnovna škola Jagoda Truhelka, Osijek