

Uloga antigena HLA razreda I i II i imunoloških čimbenika u patogenezi psorijaze

Kaštelan, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2000

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:179490>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET**

MARIJA KAŠTELAN

**ULOGA ANTIGENA HLA RAZREDA I i II
I IMUNOLOŠKIH ČIMBENIKA U PATOGENEZI PSORIJAZE**

**SVEUČILIŠNA KNJIŽNICA
RIJ E K A**



930030528

Doktorska disertacija

**Rijeka
1999.**

I AUTOR

Ime i prezime : Marija Kaštelan
Datum i mjesto rođenja.: 14. kolovoza 1965. Rijeka
Završeni fakultet : Medicinski fakultet Zagreb,1990
Posdiplomski studij: P M F Zagreb ,1996
Sadašnje zaposlenje: liječnik , dermatolog K.B.C. Rijeka

II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

Naslov rada: ULOGA ANTIGENA HLA RAZREDA I i II i IMUNOLOŠKIH
ČIMBENIKA U PATOGENEZI PSORIJAZE

Broj str.134,sl.10,tab.46, bibliografskih podataka:130
Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: K. B. C. Rebro, Zagreb,
K. B. C. Rijeka

Znanstevna disciplina: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO
Mentori: prof.dr.sc. Franjo Gruber
Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

III OCJENA I OBRANA

Datum prijave teme: 3 veljače 1996.
Datum predaje rad: 1. prosinca 1999.
Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 11. siječnja 2000.
Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo
prof.dr.sc. Daniel Rukavina,prof.dr.sc.Andelka Radojčić-Badovinac i prof.dr.sc.
Franjo Gruber
Datum obrane : 8. veljače 2000.
Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: I s t i

Ova doktorska disertacija izrađena je na Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Rijeka i Zavodu za tipizaciju tkiva Klinike za Urologiju Kliničkog bolničkog centra Rebro u Zagrebu.

Osobitu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr. sc. Franji Gruberu na stručnim savjetima i razumijevanju koju sam imala tijekom svih godina rada na Klinici.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Vesni Kerhin-Brkljačić na pomoći i podršci u izradi disertacije.

Mr.sc. Esmi Čečuk-Jeličić i dr.sc. Zorani Grubić najtoplije zahvaljujem na savjetima i pomoći u izvođenju eksperimentalnog dijela disertacije. Također zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za tipizaciju tkiva u Zagrebu, koji su mi na bilo koji način pomogli u izradi disertacije.

Hvala mom ocu akademiku Andriji Kaštelanu i majci dr.sc. Maji Kaštelan, što su me svojim znanstvenim dostignućima i entuzijazmom potakli da i sama uđem u svijet znanosti, te na savjetima i podršci koju sam imala tijekom izrade ove disertacije.

Na kraju, hvala mom suprugu, svekrvi i djeci na razumijevanju u trenucima kada je to bilo najpotrebnije.

SAŽETAK

Psorijaza je kronična bolest kože koju obilježava ubrzana proliferacija epidermisa izazvana vjerojatno imunološkom reakcijom na do sada još neotkriveni epidermalni, dermalni ili cirkulirajući imunogeni peptid. Iako etiopatogeneza bolesti nije u cijelosti poznata, povezanost s određenim antigenima sustava HLA ukazuje na moguću autoimunu etiologiju psorijaze.

U ovoj disertaciji istražena je učestalost antigena i gena razreda I i II sustava HLA u 118 bolesnika sa psorijazom. Geni lokusa HLA-Cw određeni su metodom ARMS-PCR, a geni HLA razreda II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1) metodom PCR-SSOP. Na osnovu anamnestičkih podataka 53 psorijatičara svrstano je u tip I bolesti (početak bolesti prije 30. godine života, pozitivna obiteljska anamneza), a njih 28 sačinjavalo je psorijatičare tipa II (početak bolesti nakon 40. godine života, negativna obiteljska anamneza).

Podložnost za psorijazu u hrvatskoj populaciji povezana je prvenstveno s alelom Cw*0602 (RR=3,84), koji je u korelaciji s godinama početka bolesti i s obiteljskom anamnezom psorijaze, kao i s alelima DRB1*0701 (RR=2,77), DQA1*0201 (RR=2,87) i DQB1*0201 (2,33). Visoko podložna haplotipska sveza za razvitak psorijaze je DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3,02). Alel Cw*0701 ima zaštitnu ulogu u razvitku bolesti u naših bolesnika (RR=0,44). U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom psorijaze podložni aleli su B13 (RR=5,16), B17 (RR=4,12), Cw*0602 (RR=5,72), DRB1*0701 (RR=3,38), DQA1*0201 (RR=3,44) i DQB1*0303 (RR=6,84), a u psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom otkrivena je povezanost jedino s alelom DQB1*0201 (RR=2,51).

Podložnost za tip I bolesti određena je nazočnošću alela B13 (RR=5,85), B17 (RR=4,34), DRB1*0701 (RR=3,86), DQA1*0201 (RR=3,98) i DQB1*0303 (RR=7,58), te haplotipa DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3,61). Visoko podložni konzervirani haplotip za psorijazu tipa I je Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3,61). Snižena učestalost alela DRB1*1601 (RR=0,18) i DQA1*0102 (RR=0,42), te haplotipska DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 (RR=0,21) u psorijatičara tipa I govori u prilog mogućoj zaštitnoj ulozi u razvoju tipa I bolesti. Podložni alel za tip II bolesti je Cw*0302/04 (RR=3,18).

Zaključno, rezultati istraživanja povezanosti psorijaze s genima sustava HLA u Hrvata ukazuju na primarnu ulogu gena Cw6 u podložnosti psorijazi, napose za tip I bolesti. Međutim, i određeni geni DR i DQ imaju također utjecaj na razvitak psorijaze u našoj populaciji.

SUMMARY

ROLE OF CLASS I AND II HLA ANTIGENS AND IMMUNOLOGICAL FACTORS IN THE PATHOGENESIS OF PSORIASIS

Psoriasis is a chronic hyperproliferative inflammatory disease induced probably by an immune response to as yet unidentified epidermal, dermal or circulating immunopeptides. Although the pathogenesis of psoriasis is still unclear, its association with distinct HLA antigens supports concept of possible autoimmune etiology.

In this study, the HLA class I and II genes polymorphism has been studied in 118 patients with chronic stable psoriasis. HLA-Cw genes were analyzed by ARMS-PCR method, while HLA class II genes were typed using PCR-SSOP method. Based on the anamnestic data 53 patients were grouped to type I psoriasis (age at onset less than 30 years, positive family history), and 28 were regarded as type II psoriatics (age at onset later than 40 years, negative family history).

Susceptibility to psoriasis in Croatian population appears to be primarily associated to Cw*0602 (RR=3.84), which has a strong positive correlation with family history and age at disease onset, as well as to DRB1*0701 (RR=2.77), DQA1*0201 (RR=2.87) and DQB1*0201 (2.33). Susceptibility haplotype for psoriasis is DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3.02). Allele Cw*0701 appears to have a protective role in our patients (RR=0.44). In patients with positive family history susceptibility alleles were B13 (RR=5.16), B17 (RR=4.12), Cw*0602 (RR=5.72), DRB1*0701 (RR=3.38), DQA1*0201 (RR=3.44) and DQB1*0303 (RR=6.84). Psoriatics with negative family history showed association only to DQB1*0201 (RR=2.51).

Psoriasis type I is associated to B13 (RR=5.85), B17 (RR=4.34), DRB1*0701 (RR=3.86), DQA1*0201 (RR=3.98) and DQB1*0303 (RR=7.58), as well to haplotype DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3.61). Susceptibility extended haplotype for type I disease is Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3.61). Decreased frequency of DRB1*1601 (RR=0.18) and DQA1*0102 (RR=0.42), as well as haplotype DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 (RR=0.21) in type I psoriatics stressed its possible protective role in type I disease. Psoriasis type II is associated to Cw*0302/04 (RR=3.18).

In conclusion, our results confirm the primary role of Cw6 gene in susceptibility to psoriasis, especially for type I disease. However, distinct DR and DQ genes also bear strong risk for psoriasis in Croats.

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI	1
1.1.1. GENI HLA RAZREDA I	2
1.1.2. GENI HLA RAZREDA II	3
1.1.2.1. Geni subregije DP	4
1.1.2.2. Geni subregije DQ	4
1.1.2.3. Geni subregije DR	4
1.1.3. GRAĐA I EKSPRESIJA MOLEKULA HLA RAZREDA I	5
1.1.4. GRAĐA I EKSPRESIJA MOLEKULA HLA RAZREDA II	6
1.1.5. POLIMORFIZAM SUSTAVA HLA	8
1.1.6. NERAVNOTEŽA UDRUŽIVANJA	9
1.1.7. NAZIVLJE SUSTAVA HLA	10
1.2. POVEZANOST SUSTAVA HLA I BOLESTI	10
1.2.1. MEHANIZMI POVEZANOSTI SUSTAVA HLA I AUTOIMUNIH BOLESTI	11
1.2.1.1. Predočavanje patogenog peptida molekulama HLA	11
1.2.1.2. Odabir repertoara limfocita T u timusu	12
1.2.1.3. HLA molekule kao izvor peptida	13
1.2.1.4. Superantigeni	13
1.2.1.5. Promjena vlastite molekule HLA	14
1.2.1.6. Hipoteza receptora u nastanku bolesti	14
1.2.1.7. Molekule HLA kao biljezi za rizični gen	15
1.2.1.8. Uloga drugih (ne-HLA) gena i čimbenika okoliša u nastanku autoagresivnih bolesti	15
1.3. PSORIJAZA	16

1.3.1. PSORIASIS VULGARIS	16
1.3.1.1. Klinička slika psorijaze	16
1.3.2. ETIOLOGIJA PSORIJAZE	18
1.3.2.1. Uloga genetskih čimbenika u patogenezi psorijaze	18
1.3.2.1.1. Uloga gena sustava HLA	19
1.3.2.1.2. Uloga drugih ne-HLA gena u nastanku psorijaze	21
1.3.2.1.3. Rizični gen za psorijazu	21
1.3.2.2. Imunološka zbivanja u psorijazi	23
1.3.3. LIJEČENJE PSORIJAZE	25
2. OBRAZLOŽENJE TEME	27
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. ISPITANICI	30
3.2. METODE RADA	30
3.2.1. ODREĐIVANJE ANTIGENA HLA TESTOM	
MIKROLIMFOCITOTOKSIČNOSTI	31
3.2.2. ODREĐIVANJE GENA SUSTAVA HLA RAZREDA II METODOM	
PCR-SSOP	31
3.2.2.1. Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi	32
3.2.2.2. Umnažanje ciljne sekvence lančanom reakcijom	
polimeraze (PCR)	33
3.2.2.3. Analiza umnoženog odsječka DNA	34

3.2.3. ODREĐIVANJE GENA HLA RAZREDA II OLIGONUKLEOTIDNIM PROBAMA	35
3.2.3.1. Blotiranje i denaturacija umnožene DNA	35
3.2.3.2. Hibridizacija, otkrivanje i očitavanje pozitivnih reakcija	36
3.2.4. TIPIZACIJA GENA HLA RAZREDA II POMOĆU SPECIFIČNIH OLIGONUKLEOTIDNIH PROBA	37
3.2.4.1. Određivanje alela DRB1	37
3.2.4.2. Određivanje alela DQA1, DQB1 i DPB1	38
3.2.4.3. Određivanje haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1	38
3.2.5. ODREĐIVANJE GENA HLA RAZREDA I LOKUSA Cw METODOM ARMS-PCR	39
3.2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	41
4. REZULTATI	43
4. POVEZANOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I i II SUSTAVA HLA SA PSORIJAZOM	43
4.1. RASPODJELA BOLESNIKA PREMA SPOLU I DOBI POČETKA PSORIJAZE	44
4.2. UČESTALOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I SUSTAVA HLA U BOLESNIKA SA PSORIJAZOM	45
4.2.1. UČESTALOST ANTIGENA HLA-A	45
4.2.2. UČESTALOST ANTIGENA HLA-B	46
4.2.3. UČESTALOST ALELA HLA-Cw	48

4.3. UČESTALOST GENA RAZREDA II SUSTAVA HLA U BOLESNIKA SA PSORIJAZOM	49
4.3.1. UČESTALOST ALELA LOKUSA DRB1	49
4.3.1.1. Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela lokusa DRB1	50
4.3.1.2. Rezultati podtipizacije alela lokusa DRB1	51
4.3.1.2.1. Učestalost podtipova skupine DRB1*01	51
4.3.1.2.2. Učestalost podtipova skupine DRB1*02	52
4.3.1.2.3. Učestalost podtipova skupine DRB1*04	53
4.3.1.2.4. Učestalost podtipova skupine Drw52	54
4.3.2. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DQ	58
4.2.2.1. Učestalost alela DQA1	58
4.2.2.2. Učestalost alela DQB1	59
4.3.3. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DPB1	61
4.3.4. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA GENA HLA U BOLESNIKA SA PSORIJAZOM	62
4.3.5. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA DRB1-DQA1-DQB1 U ISPITANIKA KOJI NOSE ALEL DRB1*0701	65
4.4. UČESTALOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I SUSTAVA HLA U BOLESNIKA S POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM ANAMNEZOM PSORIJAZE	66
4.4.1. UČESTALOST ANTIGENA HLA-A	66
4.4.2. UČESTALOST ANTIGENA HLA-B	67
4.4.3. UČESTALOST ALELA HLA-Cw	69

4.5. UČESTALOST GENA RAZREDA II HLA U BOLESNIKA S	
POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM ANAMNEZOM	71
4.5.1. UČESTALOST ALELA LOKUSA DRB1	71
4.5.1.1. Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela DRB1	71
4.5.1.2. Rezultati podtipizacije alela DRB1	73
4.5.2. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DQ	75
4.5.2.1. Učestalost alela DQA1	75
4.5.2.2. Učestalost alela DQB1	76
4.5.3. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DPB1	78
4.5.4. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA	
HLA-DRB1-DQA1-DQB1	80
4.5.5. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA HLA-DRB1-DQA1-DQB1	
U PSORIJATIČARA S POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM	
ANAMNEZOM KOJI NOSE ALEL DRB1*0701	83
4.6. UČESTALOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I SUSTAVA	
HLA U PSORIJATIČARA TIP A I I II	84
4.6.1. UČESTALOST ANTIGENA HLA-A	84
4.6.2. UČESTALOST ANTIGENA HLA-B	85
4.6.3. UČESTALOST GENA HLA-Cw	86
4.7. UČESTALOST GENA HLA RAZREDA II U	
PSORIJATIČARA TIP A I I II	89
4.7.1. UČESTALOST ALELA LOKUSA DRB1	89
4.7.1.1. Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela DRB1	89
4.7.1.2. Rezultati podtipizacije alela lokusa DRB1	91

4.7.2. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DQ	91
4.7.2.1. Učestalost alela DQA1	91
4.7.2.2. Učestalost alela DQB1	94
4.7.3. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DPB1	95
4.7.4. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA HLA-DRB1- -DQA1-DQB1 U PSORIJATIČARA TIPA I i II	97
4.7.5. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA HLA-DRB1- -DQA1-DQB1 U PSORIJATIČARA TIPA I i II KOJI NOSE ALEL DRB1*0701	99
4.8. UČESTALOST GENA HLA RAZREDA I i II I HAPLOTIPSKIH SVEZA DRB1-DQA1-DQB1 U PSORIJATIČARA S RANIM POČETKOM BOLESTI I ODSUTNOŠĆU OBITELJSKE ANAMNEZE	100
4.9. UČESTALOST ALELA Cw*0602 U PSORIJATIČARA S RANIM I KASNIM POČETKOM BOLESTI	101
4.10. UČESTALOST PRODUŽENOG HAPLOTIPA Cw*0602-B17- -DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 U PSORIJATIČARA	102
4.11. UČESTALOST PRODUŽENOG HAPLOTIPA Cw*0602-B17- -DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 U PSORIJATIČARA S POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM ANAMNEZOM	103
4.12. UČESTALOST PRODUŽENOG HAPLOTIPA Cw*0602-B17- -DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 U PSORIJATIČARA TIPA I i II	104
5. RASPRAVA	105
6. ZAKLJUČCI	117

7. LITERATURA

119

8. ŽIVOTOPIS

132

9. POPIS RADOVA

133

1. UVOD

Središnja zadaća imunološkog sustava je razlikovanje vlastitog od tuđeg radi održavanja integriteta vlastitog organizma i pokretanja učinkovitog imunološkog odgovora na tuđe antigene. Ključnu ulogu u tim procesima imaju molekule HLA (HLA-Human Leukocyte Antigen). Naime, specifični limfociti T svojim receptorom mogu prepoznati antigen jedino ako je vezan u obliku peptida za molekulu HLA vlastitog organizma i predočen na površini odgovarajuće predočne stanice (HLA spregnuto prepoznavanje).

Timus je središnji organ u kojem sazrijevaju limfociti T i gdje se stvara repertoar njihovih receptora (repertoar klonova) procesom rekombinacije gena zametne loze. Međutim, konačni repertoar receptora određuju antigeni HLA na epitelnim stanicama timusa, pa timus ne sadrži autoreaktivne stanice i svi klonovi prepoznaju tuđi antigen isključivo u sprezi s vlastitim antigenima HLA. Naime, u timusu se klonovi limfocita probiru mehanizmima pozitivne i negativne selekcije (30). Dakle, klonovi koji s visokim afinitetom prepoznaju vlastite peptide bivaju uklonjeni (negativna selekcija), a oni koji preostanu nakon probira prepoznavaju komplekse vlastitih antigena HLA i prerađenih tuđih antigena (pozitivna selekcija). Na taj se način uspostavlja imunološka nereaktivnost (tolerancija) na vlastite antigene. Budući da se opći repertoar klonova limfocita T probire putem vlastitih antigena HLA, upravo ti antigeni izravno određuju sve značajke imunološkog reagiranja. Antigeni HLA svakoj jedinki daju jedinstven antigenski identitet. Stoga poznavanje antigena HLA omogućuje identifikaciju jedinki, što se koristi u kliničkoj (presađivanje tkiva), antropološkoj (proučavanje populacija) i sudskomedicinskoj (identifikacija osoba) praksi.

1.1. GLAVNI SUSTAV TKIVNE SNOŠLJIVOSTI

Glavni sustav tkivne snošljivosti (MHC-Major Histocompatibility Complex) u čovjeka nazvan HLA, obuhvaća otprilike 4 milijuna parova baza DNA što čini 1% humanog genoma. Smješten je na pruzi 6p21.3 kraćeg kraka kromosoma 6 (23). Unutar ove regije nalazi se više od 200 različitih gena koji većinom sudjeluju u imunološkim zbivanjima prerade i

predočavanja antigena. Zgusnutost gena s preklapajućim funkcijama u ovoj regiji upućuje na selektivnu prednost takvog razmještaja tijekom evolucije. Osim temeljne uloge u imunološkim zbivanjima sustav HLA povezan je i s većinom autoagresivnih (autoimunih) bolesti (46, 113).

Humani MHC čine tri regije gena. Geni razreda I, na telomernom kraju sustava, kodiraju klasične transplantacijske antigene HLA-A, -B i -C. Regija gena razreda II, na suprotnom centromernom kraju, kodira molekule lokusa D: HLA-DP, -DQ i -DR. Između ove dvije regije smješteni su geni razreda III povezani s odvijanjem nekih imunoloških reakcija u organizmu (npr. neke komponente komplementa - C2 i C4, faktori nekroze tumora - TNF α i TNF β i drugi). Organizacija humanog sustava HLA prikazana je na slici 1.

U imunološkom smislu, glavni produkti ovog sustava su antigeni razreda I i II. Njihova temeljna uloga je regulacija imunološkog odgovora putem predočavanja antigena specifičnim limfocitima T. Molekule razreda I, nazočne na površini gotovo svih tjelesnih stanica, predočuju intracelularne antigene (npr. virusne peptide) citotoksičnim CD8+ limfocitima T. S druge strane, molekule HLA razreda II, nazočne samo na nekim stanicama, kao što su makrofagi, dendritičke stanice, limfociti B, predočuju ekstracelularne antigene (npr. bakterijske peptide) pomoćničkim CD4+ limfocitima T.

1.1.1. GENI HLA RAZREDA I

Regija gena HLA razreda I sadrži tri glavna funkcionalna lokusa, HLA-A, -B i -C. Svaki od njih kodira α lance klasičnih transplantacijskih antigena razreda I. Genetskim mapiranjem regija gena HLA-B smještena je centromerno, a regija gena HLA-A telomerno od regije HLA-C. Geni razreda I sadrže 8 egsona (kodirajuće sekvence) koji su razdvojeni različito dugim sekvencama introna (nekodirajuće sekvence). Karakterizira ih raznolikost slijeda parova baza isključivo unutar 2. i 3. egsona u pojedinom genu. Upravo ovi egzoni gena

razreda I kodiraju podjedinice koje oblikuju pukotinu za vezanje antigena u pojedinoj molekuli HLA. Stoga je različitost alelomorfnih gena HLA temelj varijabilnosti kemijskih površina veznih pukotina što omogućuje vezanje različitih skupina peptida.

Unutar ove regije nalaze se i nekласični geni HLA-E, -F i -G, koji pokazuju znatno niži stupanj polimorfizma u odnosu na klasične gene razreda I, sa samo nekoliko poznatih alela (13). Molekule HLA-G prisutne su isključivo na površini stanica placente i trofoblasta, te navodno imaju značajnu ulogu u preživljenju fetusa (75). Proteinski produkti gena HLA-E i -F nemaju za sada poznatu funkciju.

Regija gena razreda I sadrži još skupinu nefunkcionalnih gena odnosno pseudogena HLA-H, -J i -K, koji u kontrolnim regijama imaju štetne mutacije (73).

1.1.2. GENI HLA RAZREDA II

Ova regija gena zauzima područje veličine 800 kb i sadrži sve poznate A i B gene razreda II. Podijeljena je u 6 subregija, HLA-DM, -DN, -DO, -DP, -DQ i -DR. Subregije HLA-DM, -DN i -DO sadrže vjerojatno najstarije gene razreda II, međutim njihovi proteinski produkti do danas nisu utvrđeni na površini stanica (68).

Geni subregija -DP, -DQ i -DR sadrže osim aktivnih gena i pseudogene. Geni za α i β lanac kodiranih molekula čine parove, pa tako postoji par gena DRA i DRB, par gena DQA i DQB, te par gena DPA i DPB. Gen A građen je od 5 egsona, gen B od 6 egsona, osim na lokusu DQB koji sadrži 5 egsona. Svi geni razreda II, osim gena DRA i DPA1 izrazito su polimorfni (13). Razlike u redoslijedu parova baza nalaze se većinom unutar 2. egsona koji kodira aminokiseline vezne pukotine, pa to izravno utječe na raznolikost vezanih antigena.

Između lokusa DM i DQ, nalaze se dva gena TAP1 (Transporter Associated with Antigen Presenting) i TAP2, koji su uključeni u prijenos dijelova prerađenog antigena iz

citosola u endoplazmatsku mrežicu, gdje se prerađeni antigen veže s novostvorenom molekulom razreda I (115).

1.1.2.1. Geni subregije DP

Unutar ove subregije, geni DPA1 i DPB1 su funkcionalni par gena, dok su geni DPA2 i DPB2 nefunkcionalni pseudogeni sa štetnim mutacijama u kodirajućim sekvencama. Metodom sekvencioniranja DNA otkriveno je 38 različitih alela lokusa DPB1 i samo 8 različitih alela gena DPA1 (10). Za razliku od alela DQ, aleli DP ne pokazuju neravnotežu udruživanja s alelima DR, pa među njima postoji velik broj rekombinacija.

1.1.2.2. Geni subregije DQ

Subregija DQ sadrži dva para gena DQA i DQB. Par DQA1 i DQB1 aktivni su geni, dok su DQA2 i DQB2 pseudogeni. Do danas je metodom sekvencioniranja DNA otkriveno 18 različitih DQA1 i 31 različitih DQB1 alela. Aleli regije DQ nalaze se u neravnoteži udruživanja s alelima subregije DR, te je utvrđeno da pojedine etničke skupine karakteriziraju haplotipovi s točno određenim kombinacijama alela DQ i DR (70).

1.1.2.3. Geni subregije DR

Subregija DR sadrži jedan gen DRA, dok je broj gena i pseudogena DRB različit, ovisno o pojedinom haplotipu. Gen DRA pokazuje slab polimorfizam, dok su geni DRB izrazito polimorfni. Do sada je otkriveno 9 različitih gena DRB, među kojima su DRB1, DRB3, DRB4 i DRB5 aktivni geni, a DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 i DRB9 nefunkcionalni

pseudogeni. Svi haplotipovi sadrže gen DRB1, dok su ostali geni DRB nazočni samo na pojedinim haplotipovima.

1.1.3. GRAĐA I EKSPRESIJA MOLEKULA HLA RAZREDA I

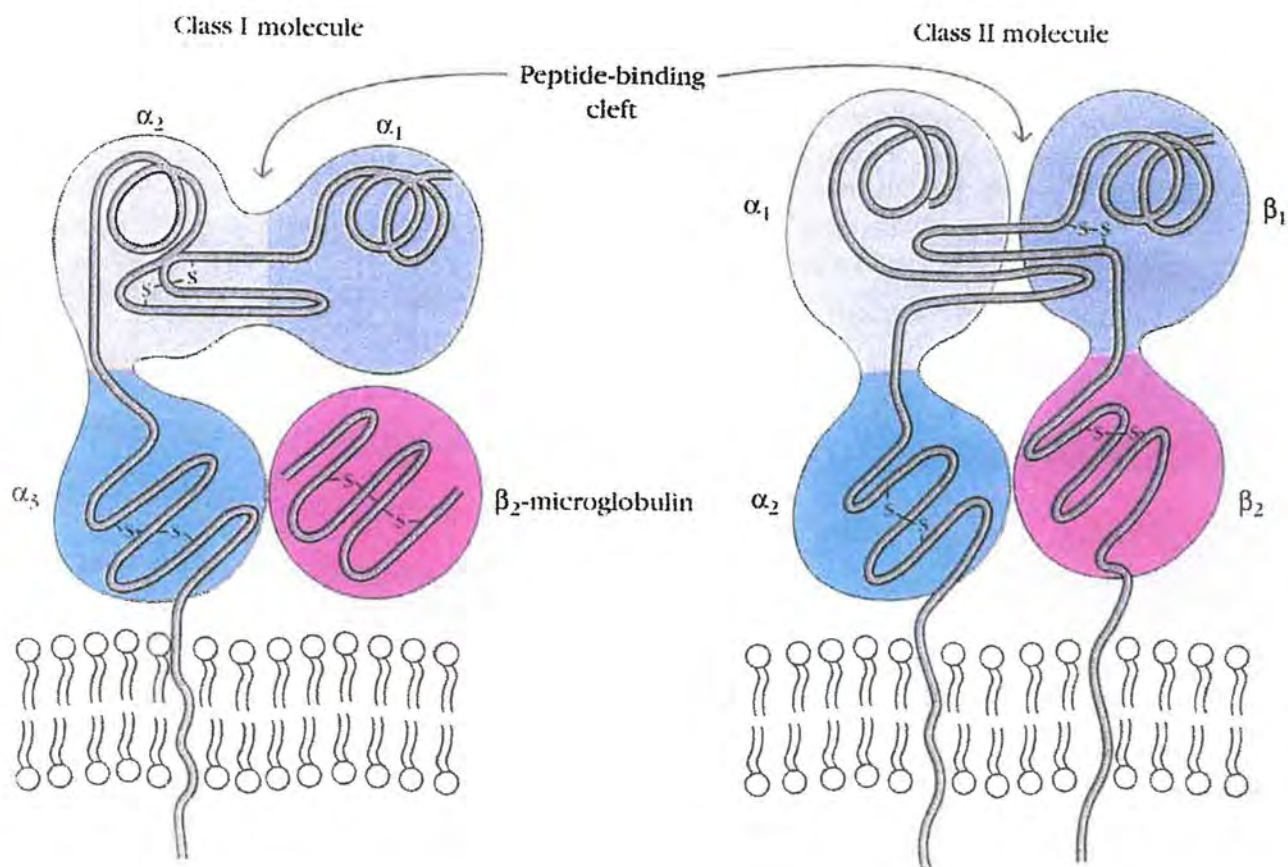
Molekule HLA razreda I su heterodimerni membranski glikoproteini, građeni od teškog α -lanca (44kDa) koji je nekovalentno vezan na monomorfni laki lanac β 2-mikroglobulina (12kDa). Teški lanac kodiraju geni HLA, a laki lanac kodira gen smješten na kromosomu 15. Molekula α -lanca građena je tako da 3/4 lanca i N-terminalni kraj strše izvan stanice; kroz staničnu membranu prolazi hidrofobni dio, a unutar stanice nalazi se karboksilni kraj lanca. Kristalografskim studijama građe molekula razreda I utvrđena su 4 različita dijela unutar pojedine molekule: dio koji veže peptid (antigen), dio koji slični imunoglobulinu, transmembranski i citoplazmatski dio (slika 2).

Najvažniji dio molekule čini 180 izrazito polimorfnih aminokiselina α 1 i α 2 podjedinice koje zajedno oblikuju pukotinu za vezanje peptida (prerađeni dio tuđeg antigena). Pukotina je dimenzije $2.5 \times 1.0 \times 1.1 \mu\text{m}$ i može vezati peptidni ulomak veličine 9-11 aminokiselina. Varijabilnost aminokiselina koje tvore veznu pukotinu omogućuje vezanje raznolikih antigena. Pojedina molekula HLA ima samo jedno mjesto za vezanje antigena i odjednom može primiti samo jedan peptid (96).

Dio molekule sličan imunoglobulinu sadrži oko 90 aminokiselina podjedinice α 3 koja povezuje podjedinicu α 2 s transmembranskim dijelom molekule. Izrazito je konzerviran i nalik konstantnom dijelu imunoglobulina. Podjedinica α 3 veže molekulu CD8 na limfocitu T.

Transmembranska regija sadrži 25 hidrofobnih aminokiselina koje pokazuju visok stupanj nepromijenjivosti i učvršćuju molekulu za membranu stanice. Citoplazmatski

Slika 2. Shematski prikaz građe molekula HLA razreda I i II



karboksilni dio molekule razreda I građen je od 30 aminokiselina, koje omogućuju fosforilaciju protein-kinaze i prijenos signala u unutrašnjost stanice.

Laki β -lanac jednak je u svim antigenima HLA razreda I. Slijed aminokiselina u njemu konzerviran je tijekom evolucije i pokazuje izrazitu homologiju s konstantnom regijom imunoglobulina i membranskom domenom teškog lanca razreda I i II.

Antigeni razreda I nazočni su na gotovo svim tjelesnim stanicama, osim moždanih stanica, spermatacita u određenoj fazi diferencijacije i nekih stanica placente. To je u izravnoj vezi s njihovom ulogom predočavanja peptida citotoksičnim limfocitima T koji moraju prepoznati svaku tjelesnu stanicu i ubiti je, ako nosi tuđi antigen.

Nazočnost molekula HLA-C na površini stanica deset je puta niža od molekula -A i -B. Razlog tome prvenstveno je jača razgradnja mRNA molekule HLA-C (83). Međutim, različit stupanj njihove ekspresije upućuje i na njihove različite funkcije *in vivo*. Naime, dok molekule lokusa A i B prvenstveno predočuju peptide citotoksičnim limfocitima T, molekule C lokusa predočuju antigen populaciji prirodno ubilačkih stanica (NK-Natural Killer) koje ne zahtijevaju nazočnost tako velikog broja molekula na staničnoj površini (27).

Mnogi citokini mogu povećati ekspresiju antigena HLA razreda I na površini mnogih stanica, posebice IFN- γ , TNF i limfotoksin (80).

1.1.4. GRAĐA I EKSPRESIJA MOLEKULA HLA RAZREDA II

Molekule HLA razreda II su transmembranski glikoproteini građeni od nekovalentno vezanih lanaca α i β . Teški α lanac molekularne je težine 33-45 kDa, a laki β lanac 26-29 kDa. Za razliku od molekula razreda I, u molekula razreda II 2/3 i lakog i teškog lanca nalazi se izvan stanice, a vezna pukotina je otvorenije i šire konformacije. Kristalografskim studijama utvrđeno je da su molekule razreda II također građene od 4 različita dijela (65).

Svaki lanac sadrži dio koji veže peptid, dio koji sliči imunoglobulinu, transmembranski i citoplazmatski dio (slika 2).

Izvanstanični dijelovi α i β lanaca sadrže 4 podjedinice veličine 90 aminokiselina. Podjedinice $\alpha 1$ i $\beta 1$ zajedno oblikuju veznu pukotinu otvorenih krajeva, tako da vezani antigen strši izvan pukotine. Stoga, antigeni razreda II mogu vezati dulje peptide od 10-30 aminokiselina. Polimorfizam molekula razreda II vezan je uz raznolikost slijeda aminokiselina podjedinica $\alpha 1$ i $\beta 1$. Podjedinice $\alpha 2$ i $\beta 2$ čine dio molekule nalik konstantnom dijelu imunoglobulina i vrlo su slične u različitim antigenima razreda II. Sličnost u građi molekula HLA i imunoglobulina upućuje na njihovu zajedničku pripadnost imunoglobulinskoj superfamiliji. Molekula CD4 limfocita T veže se na podjedinicu $\beta 2$.

Transmembranski dio molekule čini 25 hidrofobnih aminokiselina, dok je broj aminokiselina citoplazmatske regije različit i još nedovoljno istražen.

Ekspresija molekula HLA razreda II ograničena je na stanice koje predočuju antigen limfocitima T CD4+, kao što su makrofagi, dendritičke stanice, monociti, limfociti B. To je izravno povezano s njihovom funkcijom pomaganja drugim limfatičkim stanicama tijekom imunološke reakcije. Međutim, kao i u antigena razreda I, neki citokini mogu pojačati ili smanjiti ekspresiju antigena razreda II na površini stanica. Tako IL-4 i IL-10 pojačavaju ekspresiju molekula razreda II, dok je IFN- γ snizuje. Za TNF je uočeno da pojačava njihovu ekspresiju na stanicama gušterače, što u nekim oblicima dijabetesa, čini se, pojačava autoimunu reakciju limfocita. Osim u autoimunim bolestima, poremećena regulacija ekspresije molekula razreda II uočena je i u nekim malignim tumorima, te u reakciji odbacivanja transplantata. Pretpostavlja se da poticanje ekspresije molekula razreda II na stanicama koje to inače ne pokazuju, može imati ulogu u patogenezi pojedinih autoimunih bolesti (15).

1.1.5. POLIMORFIZAM SUSTAVA HLA

Molekularni polimorfizam temeljna je odlika imunološkog sustava. Putem specifičnih interakcija s patogenim organizmom, imunološki sustav prepoznaje i uspješno se bori s infekcijom. Regija HLA razreda I i II predstavlja najraznolikiji sustav gena u čovjeka. Značenje visokog stupnja polimorfizma sustava HLA, kao i genetski mehanizmi koji su tijekom evolucije uspjeli održati takvu raznolikost alela, predmet su brojnih imunoloških i genetskih studija. Izrazita raznolikost molekula HLA evolucijski zacijelo predstavlja prednost u borbi protiv različitih uzročnika bolesti. Na razini jedinke, više antigena HLA daje gušći repertoar klonova limfocita, što smanjuje mogućnost da neki patogeni peptid pobjegne imunološkom sustavu. Na razini vrste, polimorfizam čini jedinke različitim što sprečava iskorjenjenje vrste patogenom koji joj postane antigenski sličan (51).

Najveća varijabilnost molekula razreda I i II nađena je unutar podjedinica koje oblikuju pukotinu za vezanje peptida, što pokazuje da je polimorfizam sustava HLA funkcionalno značajan i ima za posljedicu veliku raznolikost imunološkog odgovora (20). Populacijskim istraživanjima sustava HLA do sada je otkriveno 213 alelomorfnih gena razreda I i 256 alelomorfnih gena razreda II (13).

Visok stupanj polimorfizma sustava HLA može se objasniti postojanjem visoke stope mutacija unutar njega i/ili mehanizmom selekcije tijekom evolucije. Pretpostavka da unutar sustava HLA postoji veća učestalost mutacija nego u drugim sustavima gena nije potvrđena, štoviše utvrđeno je da je broj mutacija unutar sustava HLA manji (24). Stoga se smatra da je selekcija najvažniji čimbenik u nastanku polimorfizma sustava HLA. Naime, budući da zamjena samo nekoliko aminokiselina u području vezne pukotine može znatno izmijeniti vrstu vezanog peptida, održavanje hipervarijabilnosti u funkcionalno važnim dijelovima molekula tijekom evolucije, dokaz je da selekcija izravno putem različitih patogenih organizama (virusa, bakterija) održava raznolikost HLA.

Otkriće da alel HLA-B*5301 nosi smanjen rizik oboljenja od malarije u populaciji zapadne Afrike, dokaz je da selekcija određenih alela ima značajnu ulogu u nastanku polimorfizma HLA. Kliničke studije upućuju na važnu ulogu polimorfizma HLA i u patogenezi autoimunih bolesti (2). Naime, podložnost i/ili zaštita od velikog broja bolesti povezana je sa specifičnim alelima odnosno određenim kombinacijama alela. Tako je za dijabetes melitus ovisan o inzulinu (IDDM-Insulin Dependent Diabetes Mellitus) utvrđeno da podložnost bolesti nosi gen DR4 u kombinaciji s alelima DQB1*0302 i DRB1*0401, dok zaštitni učinak ima u kombinaciji s alelom DRB1*0403 (37).

1.1.6. NERAVNOTEŽA UDRUŽIVANJA

Neravnoteža udruživanja (linkage disequilibrium) je pojava da se različiti aleli dvaju ili više usko vezanih lokusa pojavljuju na istom haplotipu mnogo češće nego što se očekuje s obzirom na njihovu gensku frekvenciju. Tako, jaka neravnoteža udruživanja postoji između gena HLA-A1 i -B8 koji se pojavljuju u 27,5% odnosno 15,7% haplotipova bijele rase. Naime, očekivana frekvencija pojavljivanja ovih gena u zajedničkom haplotipu na temelju njihove genske frekvencije bila bi 4,3%, ali upravo zbog postojanja neravnoteže udruživanja, učestalost ovog haplotipa je dvostruko veća i iznosi 9,8%. Uočeno je da regije s visokom razinom neravnoteže udruživanja premoštavaju lokuse koji su u potpunoj ravnoteži jedan s drugim. Tako npr. jaka neravnoteža udruživanja postoji između lokusa DQ i DR, a vrlo slaba između regija DP i DQ, što ukazuje na nazočnost velikog broja rekombinacija između ta dva lokusa.

Populacijskim studijama utvrđeno je da se pojedini haplotipovi pojavljuju puno češće u populaciji nego ostali, što ukazuje na selektivnu prednost određenih kombinacija alela

tijekom evolucije. Pojedini haplotipovi protežu se od centromernog do telomernog kraja sustava i zauzimaju skoro 4 megabaze DNA (11). To su tzv. produljeni haplotipovi koji predstavljaju još jedan dokaz postojanja selekcije određenih haplotipskih kombinacija. Naime, pretpostavlja se da populacijske razlike u frekvenciji alela HLA razreda I i II imaju utjecaj na pojavu određenih autoimunih i infektivnih bolesti unutar različitih etničkih skupina.

1.1.7. NAZIVLJE SUSTAVA HLA

Današnji sustav nomenklature HLA temelji se na određivanju gena HLA metodama molekularne genetike. Prema tome pojedini alel je određen svojim genskim lokusom i četveroznamenkastim brojem. Prva dva broja označavaju serološku specifičnost, a zadnja dva broj alela unutar te specifičnosti. Tako npr. HLA-A*0205 označava peti alel lokusa HLA-A2. Geni razreda II uz oznaku za pojedini lokus imaju i oznaku za polimorfni lanac, i to A za α odnosno B za β lanac (npr. DQA1*0501 i DQB1*0201).

1.2. POVEZANOST SUSTAVA HLA I BOLESTI

Sposobnost razlikovanja vlastitog od tuđeg temeljna je odlika imunološkog sustava, koji treba reagirati na tuđe antigene, a istovremeno tolerirati često izrazito imunogenične vlastite peptide. Autoimunost je proces u kojem imunološki sustav reagira na vlastite peptide što ima za posljedicu nastanak bolesti. Sveukupno, autoimune bolesti zahvaćaju oko 5% svjetskog pučanstva. Iako je priroda pojedinih autoimunih bolesti različita, smatra se da je autoimuni odgovor posljedica sličnog imunološkog mehanizma, što daje nadu da će se u budućnosti sve autoimune bolesti moći liječiti specifičnom imunoterapijom.

Prvi radovi o povezanosti antigena HLA i bolesti ukazali su na udruženost Hodgkinovog limfoma s antigenima HLA-B5, B15, B18 i B35, akutne limfoblastične leukemije s HLA-A2 i ankilozantnog spondilitisa s HLA-B27 (19, 121). Daljnjim istraživanjima utvrđena je povezanost autoimunih bolesti s antigenima HLA razreda II, gotovo isključivo s antigenom DR. Do sada je opisano preko 40 različitih autoimunih bolesti udruženih s molekulama razreda II (reumatoidni artritis, dijabetes melitus ovisan o inzulinu, multipla skleroza itd. (113).

1.2.1. MEHANIZMI POVEZANOSTI SUSTAVA HLA I AUTOIMUNIH BOLESTI

Mehanizmi povezanosti sustava HLA i autoimunih bolesti nisu još u cijelosti poznati, no postoji nekoliko temeljnih hipoteza kojima se nastoji razjasniti patogeneza autoimunih bolesti.

1.2.1.1. Predočavanje patogenog peptida molekulama HLA

Velik broj hipoteza povezuje ulogu molekula HLA u podložnosti autoimunim bolestima s njihovom fiziološkom funkcijom u predočavanju tuđih i vlastitih peptida limfocitima T. Naime, molekule HLA vezat će peptid točno određene strukture, te će tako samo dio raspoloživih peptida biti predöčen limfocitima. Prema tome, antigeni HLA izravno određuju koji će peptidni epitop antigena predöčiti i na taj način reguliraju imunološku reakciju (25, 56).

Unutar sustava HLA postoji velika raznolikost alela, posebice u području vezne pukotine, što omogućuje vezanje različitih peptida. Smatra se da je tako izuzetna polimorfnost sustava HLA nastala kao rezultat selektivne prednosti, čime je smanjena mogućnost da neki patogeni peptid izbjegne vezanje s određenom molekulom HLA (97). Pretpostavlja se da povezanost sustava HLA i autoimunih bolesti proizlazi izravno iz razlika u odabiru peptida. Stoga, posjedovanje određenih alela može uzrokovati izuzetno jaku imunološku reakciju na pojedini patogen ili pak ona može izostati. Ta povezanost može varirati od vrlo jake preko neutralne, pa sve do negativne povezanosti. Ovakva hijerarhija povezanosti s molekulama HLA uočena je u reumatoidnom artritisu i IDDM. Tako npr. u IDDM alel DQB1*0302 nosi izrazitu podložnost bolesti, dok nazočnost drugih DR haplotipova smanjuje podložnost, ili čak djeluje zaštitno (88).

1.2.1.2. Odabir repertoara limfocita T u timusu

Repertoar limfocita T određuju molekule HLA epitelnih stanica u timusu. Klonovi koji ne prepoznaju vlastite molekule HLA, ili se pak za njih vežu prevelikom afinitetom, uklanjaju se mehanizmom apoptoze. Između ovih dviju krajnjih mogućnosti, različit stupanj aviditeta između molekula HLA i limfocita T omogućuje pozitivnu selekciju stanica i njihov odlazak na periferiju. Stoga, molekule HLA putem pozitivne selekcije, ili delecije unakrsno reaktivnih ili auto reaktivnih stanica specifičnih za određenu bolest, mogu izravno povećati ili smanjiti podložnost bolesti.

Stupanj ekspresije i gustoća raspodjele molekula HLA u timusu također pridonosi aviditetu interakcije između limfocitnog receptora i kompleksa peptid-HLA na predložnoj stanici. Homozigotnost na pojedinom lokusu udvostručuje površinsku ekspresiju molekula HLA što je dovoljno da izmijeni učinak pozitivnog odabira i pojača podložnost ili težinu bolesti (12). Tako je u reumatoidnom artritisu homozigotnost za DR4 alel povezana s težom

kliničkom slikom i ranijim početkom bolesti (101). Suprotno, nizak stupanj ekspresije pojedinih molekula HLA može omogućiti preživljenje određenih autoreaktivnih klonova, jer zbog slabog aviditeta nema negativne selekcije. To je uočeno u juvenilnom reumatoidnom artritisu (104).

1.2.1.3. HLA molekule kao izvor peptida

Antigeni HLA predočuju osim tuđih i mnoge vlastite peptide. Većina vlastitih peptida potječe od drugih molekula HLA (97). Stoga, molekule HLA ne reguliraju imunološku reakciju samo kao restriksijski čimbenik, nego i kao peptid koji se predočuje limfocitu T. U ovom modelu molekula HLA djeluje zaštitno kao izvor peptida koji se natječe za vezno mjesto s patogenim peptidom. Suprotno, vlastiti peptidi mogu djelovati u smjeru podložnost bolesti ako pokazuju sličnost u strukturi s patogenim peptidom. Naime, infekcija mikroorganizmom može ukinuti toleranciju na strukturno slične vlastite peptide i pokrenuti autoimunu reakciju. Modelom molekularne mimikrije objašnjava se povezanost ankilozantnog spondilitisa s antigenom HLA-B27. Pretpostavlja se da bolest nastaje zbog stvaranja unakrsnih protutijela na određeni dio molekule B27 i određeni bakterijski epitop. Naime, alel HLA-B*2705 ima na pozicijama 72-77 istu sekvencu aminokiselina kao i enzim bakterije *Klebsielle*. Unakrsna protutijela nađena su u krvi bolesnika s ankilozantnim spondilitisom (34).

1.2.1.4. Superantigeni

Superantigeni su proteini koji mogu istovremeno aktivirati velik broj limfocita T putem križnog vezanja njihovih receptora s molekulom HLA razreda II (najčešće DR) na predočnoj stanici (123). Proizvode ih neke bakterije i virusi. Pretpostavlja se da oni djeluju kao most

između konzervirane regije molekule HLA i određenog varijabilnog segmenta na receptoru limfocita T. Stimulacija superantigenima može ukinuti toleranciju na vlastiti antigen i najčešće uzrokuje deleciju klona limfocita. Na taj način izravno se mijenja repertoar limfocitnih receptora što može promijeniti podložnost za bolest (123).

1.2.1.5. Promjena vlastite molekule HLA

Mehanizmima centralne i periferne tolerancije održava se nereaktivnost T stanica na vlastite peptide. Međutim, promjena molekule HLA ili vlastitog peptida može ukinuti uspostavljenu toleranciju. Taj model predložen je za objašnjenje povezanosti nekih bolesti s molekulama HLA razreda I, npr. podložnost za ankilozantni spondilitis. Pretpostavlja se da sulfhidrilna skupina cisteina na poziciji 67 u molekuli B27 može biti oksidirana u nekim tkivima, što mijenja pukotinu za vezanje peptida (4). Mehanizam promjene vlastitog peptida predložen je i u patogenezi berilioze. To je granulomatozna bolest pluća koja nastaje nakon inhalacije berilija. Utvrđena je njena povezanost s alelima DPB1 koji na poziciji 69 imaju glutaminsku kiselinu, na koju se veže berilij i tako mijenja veznu pukotinu (98).

1.2.1.6. Hipoteza receptora u nastanku autoimune bolesti

U ovom modelu pretpostavlja se da mikroorganizmi prepoznaju specifičnu molekulu HLA koju potom koriste kao receptor za ulaz u stanicu. Tako je uočeno da Duffyev antigen na eritrocitima predstavlja receptor za *Plasmodium vivax*. Nigerijci koji nemaju taj antigen otporni su na tu vrstu malarije (85). Nedavno je otkriven još jedan eritrocitni antigen, globozid, koji kao stanični receptor omogućava infekciju *Parvovirusom B19* (21).

1.2.1.7. Molekule HLA kao biljezi za rizični gen

Sustav HLA, osim gena razreda I i II sadrži i gene koji kodiraju preko 70 različitih proteina. Pretpostavlja se da su u nekim bolestima aleli razreda I i II vjerojatno samo biljezi za pravi patogeni gen koji leži vrlo blizu na istom haplotipu HLA. Tako je povezanost HLA-B47 s kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom objašnjena delecijom gena za enzim 21-hidroksilazu udruženog s alelom B47 (78).

1.2.1.8. Uloga drugih ne-HLA gena i čimbenika okoliša u nastanku autoimune bolesti

Osim sustava HLA, u patogenezu autoimunih bolesti uključeni su i drugi genski sustavi. To su ponajprije geni razreda III koji kodiraju pojedine komponente komplementa, te TNF. Istraživanjima je utvrđeno da su razlike u stupnju ekspresije molekula HLA povezane s polimorfizmom alela za TNF što može znatno utjecati na podložnost bolesti (61). I za mnoge je druge genske sustave, kao za eritrocitni površinski antigen, alkalnu fosfatazu, različite imunoglobuline, uočena povezanost s autoimunim bolestima, iako općenito slabija nego za gene HLA (95).

Poznato je da se mnoge autoimune bolesti češće javljaju u žena, što ukazuje na utjecaj hormona u njihovoj patogenezi. Osim genetskih čimbenika, važnu ulogu imaju i čimbenici okoline, koji mogu izmijeniti ekspresiju bolesti. Tako je za povećanu incidenciju multiple skleroze u Australiji isključen genetski utjecaj, a utvrđena povezanost s čimbenicima okoliša na određenoj geografskoj širini (44). Za neke autoimune bolesti epidemiološkim studijama nađena je povezanost s bakterijskim i virusnim infekcijama, pojedinim lijekovima i toksinima. Uočeno je da se IDDM povremeno razvija nakon infekcije *Coxsackie* virusom, psorijaza nakon infekcije β -hemolitičkim streptokokom, ankilozantni spondilitis nakon infekcije s *Klebsiellom*, a multipla skleroza nakon ospica (72, 119, 128).

U mnogim autoimunim bolestima pronađena je povezanost s genetskim i okolišnim čimbenicima, što naglašava važnost njihovog međusobnog djelovanja i ispreplitanja u razvoju bolesti.

1.3. PSORIJAZA

1.3.1. PSORIASIS VULGARIS

Vulgarna psorijaza je kronična bolest kože obilježena pojavom upalnih, oštro ograničenih ploča različite veličine, prekrivenih srebrno-bijelim ljuskama. Osim kože, bolest zahvaća vlasište i nokte. Učestalost bolesti najveća je u sjevernoj Europi i Skandinavskim zemljama (3-4,5%), a najniža u Indijanaca sjeverne Amerike (0,5%) - (60). U Hrvatskoj od psorijaze boluje 1,5% stanovništva (7). Raspodjela među spolovima je podjednaka.

Na temelju kinetskih studija uočeno je da psorijatična koža pokazuje sklonost pojačanoj mitotskoj aktivnosti stanica temeljnog sloja epidermisa uslijed čega je ubrzana epidermopoeza, epidermis je proširen i prekriven zadebljalim nezrelim rožnatim slojem koji se ljušti. Put stanica kroz epidermis (turn over) je ubrzan, tako da stanice iz temeljnog u rožnati sloj putuju samo 3-4 dana u psorijatičnoj, a 28 dana u zdravoj koži (124).

1.3.1.1. Klinička slika psorijaze

Temeljna promjena u psorijazi je eritematozno, oštro ograničeno žarište prekriveno srebrno-bijelim ljuskama. Ljuske su suhe, mekinjaste, lako se mrve, a struganjem postaju vidljivije i čini se da ih je sve više (znak stearinske svijeće). Nastavi li se dalje sa struganjem i skine li se najdublje smještena ljuska, pojavljuje se točkasto krvarenje, jer se otvaraju

kapilare smještene u vršcima dermalnih papila (Auspitzov fenomen). Podraži li se koža bolesnika mehanički, na mjestu se podražaja, za 10-14 dana, pojavi psorijatična morfa (Kobnerov znak izomorfno podražaja).

Promjene su najčešće smještene na laktovima, koljenima, ekstenzornim stranama udova, te u vlasištu i lumbosakralnoj regiji. U nekih bolesnika promjene zahvaćaju samo dlanove i tabane (psoriasis palmoplantaris) ili pregibe udova i intertriginozna područja (psoriasis inversa). Prema veličini, promjene mogu biti veličine glavice pribadače (psoriasis punctata), veličine kapi (psoriasis guttata), veličine kovanog novca (psoriasis nummularis) ili su to velike psorijatične ploče (psoriasis in placibus). Središnjom regresijom psorijatičnih promjena nastaju prstenasti i circinarni oblici, a konfluiranjem promjena nastaje izgled kože nalik zemljopisnoj karti (psoriasis geographica). Na zahvaćenim noktima vide se punktiformne udubine (psoriasis punctata unguium), žućkaste mrlje, nokti su zadebljani i lomljivi. Osim noktiju, često je zahvaćena i koža zaslona nokta (paronychia psoriatica). Promjene na sluznici usne šupljine i jeziku vrlo su rijetke.

Tijek bolesti je kroničan s remisijama i egzacerbacijama. Prema tijeku bolesti razlikuju se tri oblika psorijaze: eruptivno-egzantematski oblik koji obično nastaje nakon akutne bakterijske ili virusne infekcije, karakteriziran je promjenama veličine kapi (psoriasis guttata), može se spontano povući ili prijeći u kroničnu psorijazu; kronično-stacionarni oblik, karakteriziran većim pločastim žarištima na laktovima, koljenima, lumbosakralnoj regiji i vlasištu; eksudativni oblik s proširenim numularnim žarištima prekrivenim žućkastim ljuskama, jako izraženom upalom i sklonošću prijelaza u eritrodermiju ili pustuloznu psorijazu.

Histološki, u epidermisu se vidi zadebljana rožnata naslaga sa staničnim jezgrama (parakeratoza), neutrofilni leukociti (Munro-ovi mikroapscesi), proširen trnast sloj stanica, izdužene epitelne prečke i između njih jako izdužene dermalne papile s proširenim kapilarama. Subepidermalno vidi se gust infiltrat limfocita i fibrohistiocita.

Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike, a potvrđuje histološki. U diferencijalnoj dijagnozi potrebno je isključiti seboroički dermatitis, ekcematoidni numularni dermatitis, pitirijasis rubra pilaris, te papuloskvamozni osip u sifilisa (16).

1.3.2. ETIOLOGIJA PSORIJAZE

Etiologija psorijaze nije u cijelosti poznata. Pretpostavlja se da bolest nastaje međusobnim ispreplitanjem genetskih i okolišnih čimbenika. Naime, za ekspresiju bolesti u genetski podložne osobe potrebni su različiti vanjski čimbenici (trauma, bakterijske i virusne infekcije, sunčevo svjetlo, rtg zrake), ili unutarnji čimbenici (lijekovi, hormoni stresa, virusni i bakterijski antigeni, trudnoća, endokrini i metabolički poremećaji).

1.3.2.1. Uloga genetskih čimbenika u patogenezi psorijaze

Spoznaje o nasljeđivanju psorijaze unutar pojedinih obitelji ukazale su na važnost genetskih čimbenika u patogenezi bolesti. Na temelju više obiteljskih studija predložen je u početku dominantan tip naslijeđivanja s penetracijom gena od 60% (1). Međutim, Lomholt i sur. su na temelju opsežnog istraživanja čitave populacije Faroe otoka u Danskoj predložili multifaktorijelno naslijeđivanje psorijaze s međudjelovanjem genetskih i okolišnih čimbenika u nastanku i tijeku bolesti (76). Takav obrazac naslijeđivanja predložili su i drugi istraživači (122). Brojne studije na jednojajčanim i dvojajčanim blizancima potvrdile su multifaktorijelni obrazac naslijeđivanja psorijaze i ukazale na povezanost genetskih čimbenika s tijekom i težinom bolesti. Naime, uočeno je da jednojajčani blizanci mnogo češće pokazuju sličan tijek bolesti i težinu kliničke slike, nego dvojajčani blizanci (32). Međutim, u samo 40-65% slučajeva oba jednojajčana blizanca imaju psorijazu, što ukazuje da osim genetskih, značajnu ulogu u patogenezi psorijaze imaju i čimbenici okoline. Na temelju ispitivanja

haplotipova HLA u obiteljima s više bolesnih osoba pretpostavljeno je da su najmanje jedan, a možda i više HLA-udruženih gena uključeni u nastanak psorijaze (105).

1.3.2.1.1. Uloga gena sustava HLA u nastanku psorijaze

Kao i za mnoge druge bolesti, prvotne studije o povezanosti sustava HLA sa psorijazom ukazale su na povezanost s antigenima razreda I, HLA-B13 i HLA-B57 (66, 71). Vrlo rano uočena je značajno povišena učestalost antigena Cw6 u bolesnika sa psorijazom za koji je utvrđeno da nosi najviši rizik za nastanak bolesti, te da je povezan s ranijim početkom bolesti (18). Daljnja istraživanja ukazala su na jaku povezanost psorijaze s antigenom razreda II, HLA-DR7. Uočeno je da se u bolesnika DR7 mnogo češće udružuje s Cw6, što ukazuje da međudjelovanje najmanje dva HLA-udružena gena može povećati podložnost bolesti (79). Utvrđeno je da se aleli Cw6 i DR7 u 86% bolesnika prenose u cis položaju, što znači da se oba alela nalaze na istom kraku kromosoma i prenose u bloku na potomke (49). Poznato je da se Cw6 nalazi u jakoj neravnoteži udruživanja s antigenima B13, B17 i DR7. Stoga se smatra da je psorijaza prvenstveno povezana s Cw6, a povišena učestalost ostalih antigena posljedica je postojanja neravnoteže udruživanja između njih.

Analizom povezanosti antigena HLA razreda I s dobi početka bolesti utvrđeno je da se bolesnici mogu podijeliti u dvije skupine. U prvoj skupini bolesnika (tip I) uočeno je da psorijaza počinje u ranijoj životnoj dobi (prije 40 g.), da se nasljeđuje, te da je povezana sa značajno većom učestalošću antigena HLA-Cw6. U drugoj skupini bolesnika (tip II) psorijaza počinje u kasnijoj životnoj dobi (između 50-60 g.) i javlja se sporadično (48). Istraživanja povezanosti dobi početka bolesti i učestalosti psorijaze među braćom bolesnika ukazala su na 3-4 puta veći rizik obolijevanja braće, ako je bolest u probanda nastala prije 15 godine života (84).

Do sada provedena populacijska istraživanja u različitim etničkim skupinama ukazala su na povezanost različitih antigena razreda I (HLA-A2, -A24, -A30, -B13, -B27, -B57, -Cw2, -Cw6, -Cw7 i -Cw11) sa psorijazom (92, 93, 118). Međutim, za psorijazu tipa I najznačajniji su antigeni HLA-Cw6, -B57 i -B13. U populaciji sjeverno-američkih Indijanaca i Eskima s izrazito niskom učestalošću HLA-B57 psorijaza je izuzetno rijetka (60).

Molekularna istraživanja povezanosti alela razreda II sa psorijazom tipa I ukazala su na povećanu učestalost alela DRB1*0701 u bolesnika u usporedbi sa zdravom populacijom (103). Obiteljskim studijama utvrđena je povišena učestalost konzerviranog haplotipa EH 57.1 (Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303) u psorijatičara (102). Pretpostavlja se da konzervirani haplotipovi predstavljaju selektivnu prednost u borbi protiv različitih uzročnika bolesti tijekom evolucije. Povezanost psorijaze s konzerviranim haplotipovima ukazuje na ulogu gena HLA razreda I i II u patogenezi bolesti. Naime, uočeno je da aleli DRB1*0701 i DQB1*0303 povećavaju podložnost bolesti isključivo u nazočnosti Cw6 (64). Stoga se smatra da je podložnost bolesti jače povezana s krajem razreda I (Cw6-B57) nego s krajem razreda II (DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303) u konzerviranom haplotipu. Rizik za nastanak psorijaze tipa I u bolesnika koji nose taj haplotip 26 puta je veći nego u kontrolnoj skupini. Alel Cw6 sam, nosi jaču povezanost sa psorijazom nego cijeli konzervirani haplotip (59). U skupini psorijatičara tipa II nije nađena značajna povezanost niti s jednim antigenom HLA.

Slijedeći radovi ukazali su na ulogu alanina na poziciji 73 (Ala-73) u pojedinim alelima C lokusa. U psorijatičara je utvrđena povećana učestalost Ala-73 u regiji koja kodira $\alpha 1$ podjedinice molekula Cw6 i Cw7 (5). Smatra se da je ta aminokiselina bitna za oblikovanje vezne pukotine, a prema tome i za vezanje antigenog peptida. Stoga se pretpostavlja da Ala-73 nosi povećan rizik za nastanak psorijaze (58, 99). Međutim, daljnjim istraživanjima pokazano je da i mnogi drugi aleli C lokusa sadrže sekvencu Ala-73, te je stoga njena važnost u patogenezi psorijaze ograničena. U jednoj najnovijoj studiji nađena je gotovo

jednaka učestalost Ala-73 u bolesnika i kontroli, dok je značajna razlika u učestalosti Ala-73 uočena između muškaraca s psorijazom tipa I i tipa II (77).

Iako je povezanost psorijaze sa sustavom HLA nedvojbeno, ipak se samo u nekim osoba koje nose alele podložne za bolest ona i razvije. Stoga se pretpostavlja da osim gena HLA, neki drugi geni i pojedini čimbenici okoliša, imaju ulogu u patogenezi psorijaze, što je pokazano i za mnoge druge autoimune bolesti, kao IDDM, reumatoidni artritis, multipla skleroza i celijakiju (3, 17, 38, 50, 54).

1.3.2.1.2. Uloga drugih ne-HLA gena u nastanku psorijaze

Sustav MHC, osim gena HLA, sadrži i gene koji kodiraju neke komponente komplementa (C2, C4 i BF), TNF, te prijenosne molekule TAP1 i TAP2. Istraživanja povezanosti psorijaze s genima komplementa ukazala su na značajno povećanu učestalost alela C2*2, BF*S i C4*A6 u bolesnika nego u kontroli (31). Budući da se ti aleli nalaze u neravnoteži udruživanja s alelima HLA, njihova povećana učestalost vjerojatno je rezultat neravnoteže udruživanja.

Istraživanja povezanosti gena za TAP1 i TAP2 sa psorijazom ukazala su na povećanu učestalost alela TAP1*0101 u bolesnika, dok povezanost s alelima TAP2 nije utvrđena (53). Studije o ulozi gena za TNF α u patogenezi psorijaze pokazala su u bolesnika postojanje mutacije u promotorskoj regiji gena na poziciji -238, te se smatra da taj gen, ili neki drugi u neravnoteži udruživanja s njim, nosi povećanu podložnost za nastanak psorijaze (52).

1.3.2.1.3. Rizični gen za psorijazu

Posljednih godina, metodama molekularne genetike, otkriveni su brojni geni odgovorni za nastanak mnogih nasljednih bolesti. Isto tako nastoji se utvrditi i položaj gena za

psorijazu unutar ljudskog genoma. U neposrednoj blizini lokusa HLA-C otkriven je gen S uključen u proces diferencijacije keratinocita (130). Zbog jake povezanosti bolesti s Cw6 i izravne blizine novog gena S tome lokusu, pretpostavljeno je da on možda ima ulogu u patogenezi psorijaze. Razmišljalo se i o povezanosti s genima smještenim na dugom kraku kromosoma 1 koji su također uključeni u diferencijaciju epidermalnih stanica. Naime, uočena povećana ekspresija njihovih produkata u psorijatičnoj koži upućuje na moguću ulogu tih gena u podložnost bolesti (45).

Neke studije ukazale su na ulogu gena terminalnog kraja dugog kraka kromosoma 17 u patogenezi psorijaze (114). Međutim, u skoro svih ispitanih obitelji nije utvrđena povezanost s HLA-Cw6, a i mnogi drugi radovi nisu utvrdili povezanost psorijaze s genom na kromosomu 17 (14, 22, 86). Slijedeća grupa istraživača ukazala je na mogući smještaj patogenog gena na kromosomu 4q, 16q i 20p (87, 81). Zanimljivo je da ista regija na kromosomu 16q pokazuje povezanost s Kronovom bolešću, za koju se zna da je češća u psorijatičara nego u zdravoj populaciji (55, 74).

Ipak, većina istraživača ukazuje na značajnu udruženost patogenog gena s biljegom unutar sustava MHC koji obuhvaća otprilike 200 gena. Neke obiteljske studije pokazale su udruženost psorijaze s biljegom smještenim blizu TNF α između regija gena razreda I i II, dok su druge ukazale na izravnu udruženost s lokusom HLA-C (9, 116). Uočena je i visoka udruženost bolesti s pojedinim dijelovima konzerviranog haplotipa EH 57.1 (63). Kraj razreda I u tom haplotipu, bio je četiri puta češće nađen u bolesnih u usporedbi s zdravim članovima obitelji, što ukazuje da je podložni gen za psorijazu unutar sustava HLA smješten u neposrednoj blizini lokusa HLA-C.

Do sada su u bazi podataka OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) navedena tri genska lokusa za psorijazu: PSORS1 (kromosom 6p21), PSORS2 (kromosom 17q) i PSORS3 (kromosom 4q).

1.3.2.2. Imunološka zbivanja u psorijazi

Povezanost psorijaze s određenim antigenima HLA razreda I i II ukazuje da predočavanje peptida limfocitima T ima značajnu ulogu u patogenezi bolesti. Pretpostavlja se da je ubrzana proliferacija epidermisa u genetski podložne osobe izazvana imunološkom reakcijom na do sada još neotkriveni epidermalni, dermalni ili cirkulirajući imunogeni peptid (streptokokni antigen, retrovirusni protein, antigen rožnatog sloja, hormon stresa, unakrsno reaktivni epitop). Na temelju spoznaje da se psorijaza vrlo često javlja nakon infekcije β -hemolitičkim streptokokom, jedna grupa autora pretpostavila je da stvaranje psorijatičnog žarišta započinju limfociti T aktivirani streptokoknim egzotoksinom. Ti limfociti križno reagiraju s M-proteinom streptokoka i određenim keratinom veličine 50 ili 56 kDa u epidermisu osobe podložne psorijazi. Prema tome, superantigenom aktivirani limfociti T luče citokine koji potom potiču ekspresiju do tada skrivenih križno reaktivnih autoantigena u psorijatičnom epidermisu i aktiviraju autoreaktivne T-stanice (120). Tako autoreaktivne T-stanice koje su izbjegle deleciju pokreću i održavaju psorijatični proces.

Stoga se danas pretpostavlja da je psorijaza genetski poremećaj proliferacije keratinocita posredovan limfocitima T (119). Monoklonskim protutijelima utvrđeno je da upalni stanični infiltrat u aktivnom psorijatičnom žarištu sadrži pretežito CD4+, a u fazi regresije CD8+ limfocite T u neposrednoj blizini dendritičkih izdanaka Langerhansovih stanica (6, 119). U dermisu se nakupljaju dendritičke stanice koje uz Langerhansove stanice prerađeni antigen predočuju specifičnim limfocitima T. Oni se potom aktiviraju i luče citokine (interleukine IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ) koji potiču proliferaciju keratinocita. Aktivirani keratinociti također luče citokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α), te autokrino podržavaju vlastitu hiperproliferaciju. Istovremeno potiču ekspresiju adhezijskih molekula za limfocite T na endotelnim vaskularnim stanicama i drugim keratinocitima što dalje pojačava priljev limfocita u epidermis i krug se zatvara. U fazi poboljšanja psorijaze aktivirani CD8+ limfociti

luče citokine koji zaustavljaju bolesni proces. Nije poznato da li do inhibicije procesa dolazi na razini stanica koje predočuju antigen, keratinocita ili usmjeravanja limfocita T (40).

Slijedećim istraživanjima uočeno je da učinkovita antipsorijatična sredstva kože aktivnost i limfocita T i stanica koje predočuju antigen. Imunosupresivi u liječenju psorijaze, ciklosporin i FK506, selektivno inhibiraju stvaranje citokina CD4+ limfocita T, a za anti-CD4 monoklonska protutijela pokazano je da imaju jak antipsorijatični učinak. Nedavno je uočeno da klonovi limfocita T iz psorijatičnog žarišta potiču proliferaciju keratinocita *in vitro* (41). Na temelju svega navedenog zaljučeno je da središnju ulogu u patogenezi psorijaze imaju limfociti T.

Pojedini autori ukazuju na središnju ulogu keratinocita u patogenezi psorijaze. Naime, istraživanja pokazuju da je transkripcijska aktivnost nekoliko puta veća u epidermalnim nego u dermalnim stanicama psorijatičnog žarišta (90). Stoga je pretpostavljeno da se keratinociti nakon ekspresije vlastite genske mutacije aktiviraju i luče citokine koji djeluju autokrino potičući vlastitu proliferaciju, odnosno parakrino uzrokujući aktivaciju i nakupljanje T stanica, makrofaga, kao i brojne druge intracelularne metaboličke promjene. Genetska mutacija čini se zahvaća mehanizme regulacije rasta keratinocita što izaziva ili prekomjernu aktivaciju čimbenika koji potiču rast ($TGF\alpha$) ili inaktivaciju onih koji inhibiraju rast ($IFN-\gamma$) (109). Imunohistološke studije pokazale su da je početna promjena u psorijatičnom žarištu ekspresija čimbenika rasta $TGF\alpha$ na keratinocitima. Slijedi ekspresija ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) na keratinocitima, te ELAM-1 (Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1) i VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) na endotelnim stanicama, a tek potom nakupljanje leukocita i stvaranje upalnog infiltrata.

Nije poznato na koji način započinje psorijatični proces. Međutim, uočena snižena koncentracija IL-1 u psorijatičnom epidermisu, a istovremeno povišena koncentracija mRNA za IL-1 u epidermisu ukazuje da otpuštanje IL-1 iz keratinocita vjerojatno izaziva pojačanu ekspresiju ELAM-1 i započinjanje upalnog procesa (28). Keratinociti također luče IL-8 koji

djeluje kemotaktički na neutrofile i limfocite i usmjerava ih prema epidermisu. Smatra se da keratinociti imaju ključnu ulogu u zadržavanju limfocita unutar epidermisa putem povišene ekspresije adhezijske molekule ICAM-1 (33). Pojedini autori smatraju da psorijatični proces pokreću makrofagi koji lučenjem $TNF\alpha$ započinju kaskadu citokina potrebnih za nastanak psorijaze (90). Naime, za $TNF\alpha$ je pokazano da potiče ekspresiju adhezijskih molekula na keratinocitima i vaskularnim endotelnim stanicama, te lučenje IL-6 i IL-8 (91). IL-6, IFN- γ i $TNF\alpha$ izravno pojačavaju ekspresiju TGF- α na keratinocitima i tako ubrzavaju proliferaciju keratinocita. Smatra se da IFN- γ može i zaustaviti psorijatični proces. Međutim, uočeno je da psorijatični keratinociti imaju niži broj receptora za IFN- γ , a *in vitro* pokazuju snižen odgovor na stimulaciju s IFN- γ što ukazuje na smanjenu mogućnost zaustavljanja upalnog procesa u bolesnika (8).

Fiziološka mreža citokina nužna je za redovito obnavljanje epidermisa. Pretpostavlja se da patološki proces odgovoran za nastanak psorijaze uključuje međudjelovanje fiziološke i patofiziološke mreže citokina. Stoga, središnju ulogu u započinjanju i održavanju psorijatičnog procesa ima interakcija limfocita i keratinocita posredovana citokinima.

1.3.3. Liječenje psorijaze

Liječenje psorijaze provodi se općom i lokalnom terapijom. Lokalno se koriste mnoga keratolitička sredstva, katranski preparati, topički kortikosteroidi, analozi vitamina D₃. U liječenju psorijaze vrlo često se koristi fototerapija primjenom prirodnog svjetla (heliobalneo terapija) ili umjetnih izvora svjetla (PUVA i SUP terapija). U općoj terapiji, danas se u teškim oblicima psorijaze najviše primjenjuju retinoidi, a rjeđe kortikosteroidi i citostatici. Svi ti lijekovi utječu na pojedine dijelove imunološke reakcije. Ultraljubičasto zračenje koči djelovanje Langerhansovih stanica i ima citotoksičan učinak na keratinocite. Kortikosteroidi

izravno koči djelovanje svih vrsta stanica uključenih u psorijatični proces inhibicijom stvaranja citokina. Retinoidi utječu na diferencijaciju keratinocita mijenjajući njihov odgovor na limfokine. Ciklosporin koči lučenje IL-2 i IFN- γ iz CD4+ limfocita i tako zaustavlja psorijatični proces. Osim toga, remeti djelovanje Langerhansovih stanica i ima citostatički učinak na keratinocite. Iako svi ti lijekovi dovode do poboljšanja psorijaze, najučinkovitiji lijek biti će onaj koji će istovremeno djelovati na više vrsta stanica uključenih u patogenezu bolesti.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Za mnoge je bolesti, napose autoimune etiologije, pokazano da su povezane sa sustavom HLA (113). Do danas je opisano više od 40 različitih autoimunih bolesti udruženih s molekulama HLA. Autoimunost je proces u kojem imunološki sustav reagira na vlastita tkiva što ima za posljedicu nastanak bolesti. Spoznaje o temeljnoj ulozi molekula HLA u imunološkim zbivanjima prerade i predočavanja antigena limfocitima T ukazuju na njihovu moguću ulogu i u imunološkim reakcijama protiv vlastitih peptida.

Istraživanja povezanosti sustava HLA i autoimunih bolesti znatno su uznapredovala uvođenjem metoda molekularne genetike koje su omogućile ispitivanje uloge pojedinih alela i gena u patogenezi tih bolesti. Zbog izrazitog polimorfizma molekula HLA i različite raspodjele gena HLA u pojedinim etničkim skupinama, važno je provesti istraživanje na većem broju populacija, kako bi se dobio cjelovit odgovor o ulozi molekula HLA u nastanku pojedinih bolesti.

U Zavodu za tipizaciju tkiva u Zagrebu već se više godina rutinski koriste metode molekularne genetike u tipizaciji kako gena razreda II, tako i gena razreda I sustava HLA. Metoda PCR-SSOP (Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Oligonucleotide Probes) koristi se za precizno određivanje gena razreda II, dok se metodom ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction) određuju aleli razreda I sustava HLA. To su visokospecifične, egzaktne metode koje će se koristiti i u ovom istraživanju.

Psorijaza je kronična bolest kože koju obilježava ubrzana proliferacija epidermisa izazvana vjerojatno imunološkom reakcijom na do sada još neotkriveni epidermalni, dermalni ili cirkulirajući imunogeni peptid. Iako etiopatogeneza bolesti nije u cijelosti poznata, pretpostavlja se da psorijaza nastaje međusobnim ispreplitanjem genetskih i

okolišnih čimbenika. Spoznaje o nasljeđivanju psorijaze u pojedinim obiteljima ukazale su na važnost genetskih čimbenika u patogenezi bolesti. Na temelju ispitivanja haplotipova HLA u obiteljima s više bolesnih osoba pretpostavljeno je da su najmanje jedan, a možda i više, HLA - udruženih gena uključeni u nastanak psorijaze (47). Povezanost psorijaze s određenim antigenima HLA razreda I i II ukazuje da predočavanje peptida limfocitima T ima značajnu ulogu u patogenezi bolesti (120).

Molekularna istraživanja povezanosti gena sustava HLA sa psorijazom ukazala su na povišenu učestalost konzerviranog haplotipa EH57.1 (Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303) u bolesnika sa psorijazom tipa I koja se nasljeđuje i javlja u ranijoj životnoj dobi (102). Povezanost psorijaze s konzerviranim haplotipovima ukazuje na ulogu gena HLA razreda I i II u patogenezi bolesti, međutim, smatra se da je podložnost bolesti jače povezana s krajem razreda I (Cw6-B57) nego s krajem razreda II (DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303) konzerviranog haplotipa (102). Osim toga, istraživanja pokazuju da i sam gen Cw6 nosi jaču povezanost sa psorijazom nego cijeli konzervirani haplotip (59).

Cilj je ove disertacije utvrditi povezanost psorijaze s genima HLA razreda I i II na molekularnoj razini što će omogućiti stjecanje potpunijih spoznaja o imunopatogenezi te bolesti, te time omogućiti specifičnije liječenje bolesnika.

Istraživanje će se provesti na klinički definiranoj, homogenoj skupini bolesnika sa psorijazom i uključivat će slijedeće analize:

1. određivanje učestalosti antigena razreda I (HLA-A, HLA-B)
2. određivanje učestalosti gena razreda I (HLA-C)
3. određivanje učestalosti gena razreda II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1)

4. određivanje učestalosti haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1
5. određivanje učestalosti produženog haplotipa EH57.1 (Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201)
6. uspoređivanje dobivenih rezultata s rezultatima iz kontrolne skupine
7. uspoređivanje rezultata psorijatičara tipa I sa psorijatičarima tipa II
8. određivanje povezanosti antigena i gena HLA s obiteljskim pojavljivanjem psorijaze
9. određivanje relativnog rizika, te visoko rizičnih i protektivnih čimbenika u psorijazi

Dobiveni rezultati usporedit će se s rezultatima iz drugih populacija na temelju podataka iz literature. Ukazat će se, također, na potrebu molekularne tipizacije HLA, kao visoko specifičnog testa u dijagnostici psorijaze, kada to na temelju drugih parametara nije moguće. Ukratko, iz disertacije će proisteći cjelovita imunogenetska slika sustava HLA psorijatičara hrvatske populacije, što do sada nije bilo učinjeno, a druge populacije to već otprije imaju.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanje povezanosti gena sustava HLA razreda I i II sa psorijazom obuhvatilo je 118 nesrodnih bolesnika s vulgarnom psorijazom liječenih na Klinici za dermatovenerologiju, KBC Rijeka od 1996-1998. godine. Među bolesnicima su bile 42 žene i 76 muškaraca, srednje životne dobi od 45,08 godina (raspon: 16-76 g.). Dijagnoza je u svih bolesnika postavljena na temelju anamneze, kliničke slike, a u nekim slučajevima i histološkom pretragom bioptata promijenjene kože. U svakog bolesnika učinjena je odgovarajuća laboratorijska obrada: sedimentacija eritrocita, kompletna krvna slika, mokraća i sediment mokraće, urea, kreatinin, hepatogram i jetreni enzimi (γ GT, SGOT, SGPT), kolesterol, trigliceridi i elektroliti.

U kontrolnoj skupini, za lokuse HLA- A i B bilo je 139, a za lokus Cw 144 nesrodnih zdravih osoba (29). Za lokuse HLA- DRB1, DQ i DP, kontrolnu skupinu sačinjavala je 141 zdrava nesrodna osoba (42). Te kontrolne skupine predstavljaju reprezentativni uzorak hrvatske populacije.

Svim ispitanicima određeni su antigeni sustava HLA lokusa A, B, DR, kao i aleli lokusa Cw, te lokusa DRB1, DQA1, DQB1 i DPB1.

3.2. METODE RADA

Određivanje antigena i gena sustava HLA razreda I i II provedeno je u Zavodu za tipizaciju tkiva Klinike za Urologiju, KBC Rebro u Zagrebu.

3.2.1. ODREĐIVANJE ANTIGENA HLA TESTOM MIKROLIMFOCITOTOKSIČNOSTI

Antigeni sustava HLA lokusa A, B i DR određeni su testom mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT). Metoda se temelji na vidljivoj reakciji specifičnih protutijela HLA iz seruma s određenim antigenima HLA na limfocitima ispitanika (110). Za određivanje svakog antigena HLA korištena su najmanje dva specifična seruma radi veće pouzdanosti rezultata.

Iz uzorka periferne krvi ispitanika (10ml s 5% EDTA kao antikoagulansom) izdvoje se limfociti na gradijentu gustoće fikol-triozila centrifugiranjem od 20 minuta na 2500 rpm/min. U tipizacijske pločice sa specifičnim serumima doda se po 1 μ l suspenzije limfocita ispitanika (2000 stanica/ μ l). Nakon inkubacije od 30 minuta pri sobnoj temperaturi u svaku se rupicu doda komplement kunića. Slijedi inkubacija od 1 sata tijekom koje dolazi do reakcije antigen-protutijelo u onim rupicama u kojima se nalaze specifična protutijela usmjerena protiv antigena HLA ispitanika. Komplement seruma kunića veže se na kompleks antigen-protutijelo na membranama limfocita i uzrokuje njihovu lizu. Nakon što se sadržaj pločica dekantira istresanjem, na talog stanica doda se tripansko plavilo. Tripansko plavilo boji samo mrtve stanice, dok žive ostaju svijetle i nebojene što je vidljivo svjetlosnim mikroskopom.

Jačina citotoksične reakcije određuje se odnosom postotka mrtvih prema živim stanicama. Pri određivanju antigena HLA uzete su u obzir reakcije jačine 3 (60-70% mrtvih stanica) i 4 (80-100% mrtvih stanica), a samo izuzetno i reakcije jačine 2 (40-50% mrtvih stanica).

3.2.2. ODREĐIVANJE GENA SUSTAVA HLA RAZREDA II METODOM PCR-SSOP

Geni HLA razreda II određeni su metodom PCR-SSOP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide Probe). To je precizna metoda koja omogućava

istovremeno testiranje većeg broja ispitanika. Temelji se na određivanju alela HLA razreda II preko alel specifičnih proba ili proba specifičnih za nekoliko alela koji imaju zajednički jedan dio sekvence egsona 2. Izvodi se u nekoliko etapa, a budući da je detaljan protokol opisan drugdje u literaturi, ovdje ću prikazati samo sažetak postupka (42, 69).

3.2.2.1. Izolacija genomske DNA iz leukocita periferne krvi

Genomska DNA izolira se iz leukocita periferne krvi metodom izsoljavanja. Iz uzorka periferne krvi (10ml s 5% EDTA kao antikoagulansom u omjeru 9:1) izdvoje se limfociti na gradijentu gustoće fikol-triozila centrifugiranjem od 20 minuta na 2500 rpm/min. Limfociti se potom isperu dva puta u fiziološkoj otopini, a zatim se na talog limfocita doda 2 ml SE pufera (10mM TRIS pH 7.6, 2mM EDTA pH8, 75mM NaCl), 200 μ l 10% SDS i 20 μ l proteinaze K (20mg/ml). Nakon inkubacije preko noći na 37°C, limfociti se liziraju i oslobođena genomska DNA izlazi iz stanica.

Za uklanjanje proteina i pročišćavanje DNA koristi se zasićena otopina soli. U uzorak se doda 750 μ l 6M NaCl, dobro promiješa i centrifugira 10 minuta na 3500 rpm/min. Supernatant s DNA ponovo se centrifugira 10 minuta na 3500 rpm/min radi uklanjanja zaostalih proteina. Na tako dobiven supernatant doda se dvostruki volumen 100% etanola ohlađenog na -20°C radi precipitacije molekule DNA. Precipitirana molekula DNA hvata se kukicom, prebacuje u novu epruvetu s 70% etanolom da se ukloni zaostali NaCl. Nakon inkubacije od 15 minuta na +4 °C, sadržaj epruvete centrifugira se 5 minuta na 1200 rpm/min. Supernatant s etanolom se odlije, a istaložena DNA na dnu epruvete isušuje se stajanjem u vakuumu 30 minuta ili na sobnoj temperaturi 24 sata. Na talog posušene DNA doda se TE pufer (Tris 1mM, EDTA 0.1mM), te se tako otopljen DNA može čuvati kraće vrijeme na +4 °C ili dulji period na -80°C.

Koncentracija dobivene DNA i stupanj onečišćenja proteinima određuje se mjerenjem optičke gustoće otopine u spektrofotometru na valnim dužinama 260 i 280 nm. Na valnoj dužini 260 nm određuje se koncentracija nukleinskih kiselina u uzorku, tako da optička gustoća 1 odgovara 0.05 mg/ml dvolančane DNA. Omjer očitavanja na 260 i 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) ukazuje na onečišćenje uzorka proteinima. Čisti uzorci DNA imaju omjer 1.8-2.0, dok onečišćeni imaju značajno manju vrijednost tog omjera. Koncentracija DNA u ispitivanim uzorcima podešena je na radnu koncentraciju od 0.1 mg/ml.

3.2.2.2. Umnazanje ciljne sekvence lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Lančana reakcija sinteze DNA pomoću DNA polimeraze brza je metoda sinteze nukleinskih kiselina *in vitro* kojom se specifični odsječak DNA (tzv. ciljna DNA) umnaža u milijunskom broju kopija. Do umnažanja dolazi jedino u slučaju kada su početni *in vitro* sintetizirani odsječci oligonukleotida (tzv. primer ili klica) komplementarni s 5' i 3' krajem ciljne DNA. Klice (5' i 3') se sparuju sa suprotnim lancima ciljne DNA unutar koje se nalazi gen koji želimo umnožiti, a sinteza nove DNA odvija se u regiji između njih.

Za određivanje svih gena sustava HLA razreda II korišten je isti postupak umnažanja DNA, a jedina razlika bila je u odabiru klica. Priređena PCR mješavina (5 μ l DNA 0.1 μ g/ μ l, 10 μ l 10xPCR pufer {500mM KCl, 100mM TrisHCl pH8.4, 40mM MgCl₂, 0.6mg/ml BSA}, 2 μ l dNTP 1mM, 2 μ l klica 5' 20pmol, 2 μ l klica 3' 20pmol, 0.6 Taq polimeraza 3U, H₂O dodati do 100 μ l) razdijeli se u pojedinačne tubice u koje se potom doda DNA ispitivane osobe. Metoda PCR izvodi se u posebno konstruiranom stroju Bio-med Thermocycler 60 koji radi na principu vodene kupelji. Stoga se, radi sprečavanja hlapljenja, reakcije prekriju s 1-2 kapi mineralnog ulja. Standardna metoda PCR sastoji se od 30-35 uzastopnih ciklusa od kojih svaki ima po tri izmjene temperature:

1. Pri temperaturi od 94°C cijepa se (denaturira) dvolančana molekula DNA u pojedinačne lance.
2. Na temperaturi od 56-65°C sparuju se klice s komplementarnim DNA lancem. Temperatura sparivanja različita je za svaki pojedini par klica ovisno o sastavu nukleotida.
3. Kod temperature od 72-74°C dolazi do produživanja (ekstenzije) klica i sinteze komplementarnog lanca DNA uz pomoć enzima Taq-DNA polimeraze.

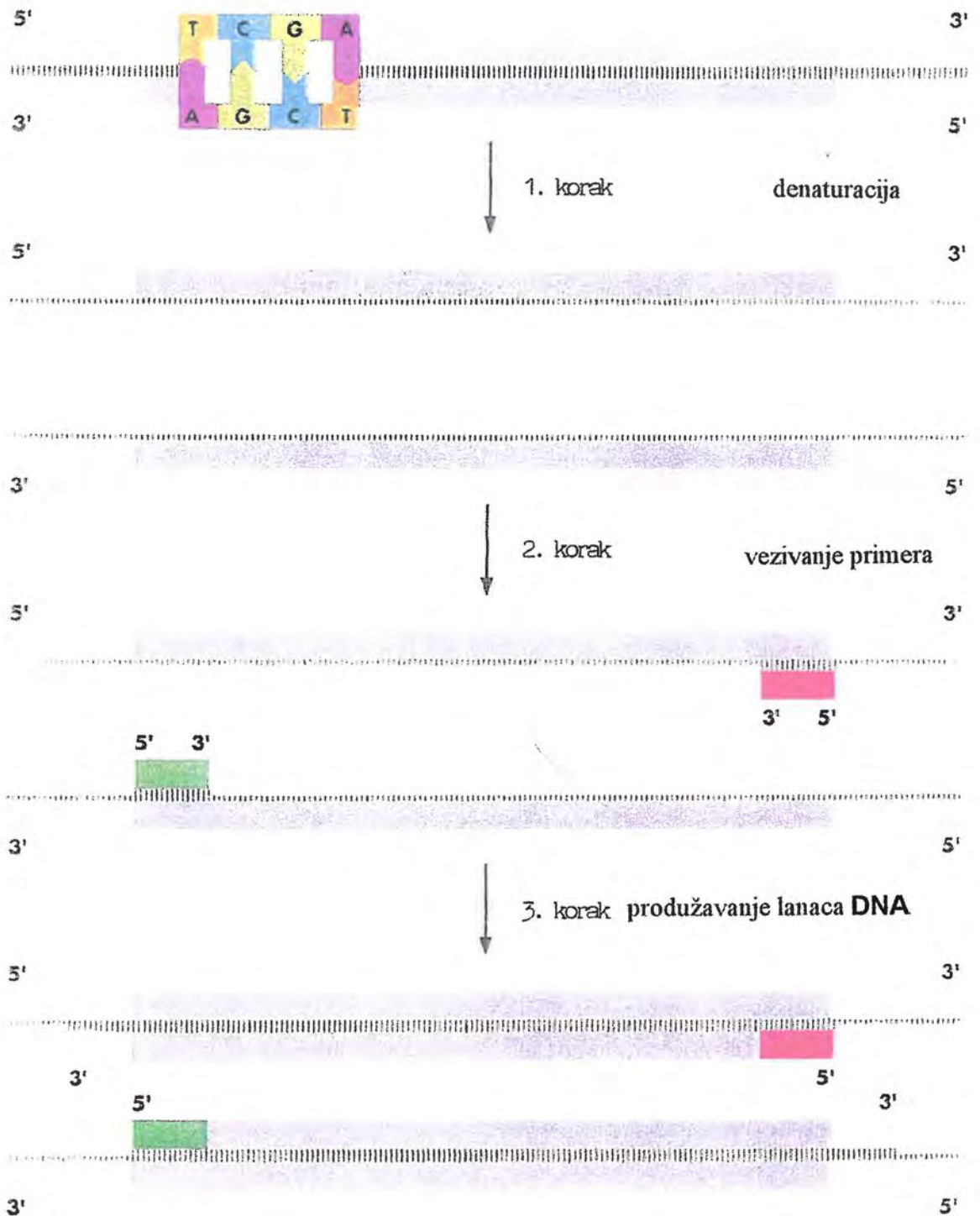
Svaki slijedeći ciklus udvostručava količinu ciljne DNA tako da eksponencijalno rastu dijelovi ciljne DNA (slika 3).

3.2.2.3. Analiza umnoženog odsječka DNA

Uspješnost umnažanja ciljne DNA provjerava se migracijom male količine uzorka na 2% agaroznom gelu. Postupnim zagrijavanjem otopi se 2g agaroze u 100ml destilirane H₂O, a zatim polagano hladi na sobnoj temperaturi do 60°C kada se dodaje etidijum bromid (koncentracije 0.5g/ml). Etidijum se ugrađuje između parova baza i čini DNA vidljivom pod ultraljubičastim svjetlom. Tekući gel nalije se na pločicu za elektroforezu i u njega se uroni češalj s zupcima radi dobivanja rupica za nanašanje uzoraka. Tako priređeni gel uroni se u kadu za elektroforezu u koju je ranije natočen migracijski pufer 1xTAE (50x TAE: 242gr TrisHCl, 100ml 0.5 EDTA pH8, 57.1ml ledene octene kiseline, destilirana voda do 1).

Po 5μl uzorka umnožene DNA iz svake PCR tubice pomiješa se s 2μl boje (bromphenil blue) koja brže migrira od DNA i stoga služi kao biljeg dužine migracije. Svaki se uzorak pomoću mikropipete nanese u pojedinu rupicu, a u posljednju se rupicu stavi kontrolni biljeg dužine 72-1353 parova baza (X174RF-DNA razgrađena Hae III enzimom, Biolabs) kojim se provjerava je li dužina ispitivanog odsječka gena dobra. Kada za elektroforezu uključiti se u strujni krug, tako da je početna voltaža 60-70V (dok uzorci ne izađu iz rupica), a potom 100-120V. Nakon završene migracije gel se izvadi iz pufera i na

Slika 3. Lančana reakcija polimerazom



UV stolicu provjeri se uspješnost umnažanja ciljane DNA. Uspješno umnožena DNA vidi se u obliku svijetleće pruge.

3.2.3. ODREĐIVANJE GENA HLA RAZREDA II OLIGONUKLEOTIDNIM PROBAMA

3.2.3.1. Blotiranje i denaturacija umnožene DNA

Za određivanje alela HLA razreda II potrebno je umnožene uzorke DNA pričvrstiti na najlonsku membranu metodom blotiranja pomoću dot-blot (eng. dot-točka) uređaja. Uređaj radi na principu vakuuma, te usisava i pričvršćuje DNA u obliku točkica na membranu.

Prije nanašanja DNA na hibridizacijsku membranu, uzorke treba denaturirati, tako da se u tubicu s 100 μ l denaturacijskog pufera (0.4M NaOH, 10mM EDTA) doda 5-8 μ l umnožene DNA, promiješa i ostavi na sobnoj temperaturi 10 minuta. Na taj način prekinu se vodikove veze i dobiju se jednolančani komplementarni lanci DNA. Budući da se za određivanje alela pojedinih lokusa koristi velik broj specifičnih oligonukleotidnih proba, svaka se membrana radi u 4 kopije, a za denaturaciju se dodaje po 400 μ l denaturacijskog pufera i 20-32 μ l DNA.

Najlonske membrane (Amersham, nylon N⁺) izrežu se na veličinu 7.5x12cm (za 96 uzoraka), obilježe u lijevom gornjem uglu, te ostave 10 minuta u destiliranoj vodi. Plan membrana napisan je ranije, tako da se točno zna na kojem se mjestu nalazi pojedini uzorak. Membrane se postavljaju na dot-blot uređaj, svaka rupica isperuje se s 100ml H₂O, a potom se u svaku nanese po 100ml denaturirane DNA. Rupice se isperu s 100ml 5xSSPE (20xSSPE: 175.3g/l, 26.6g/L, 7.4g/l, pH7.4), a zatim se membrane skinu s dot-blot uređaja i stave 5-10 minuta na UV stolicu kako bi DNA bila što bolje pričvršćena na membranu. Tako priređene membrane čuvaju se do korištenja u puferu za ispiranje (1xSSPE, 0.1% SDS).

3.2.3.2. Hibridizacija, otkrivanje i očitavanje pozitivnih reakcija

Hibridizacija je postupak u kojem se uzorci DNA dovode u kontakt s oligonukleotidnim probama. Membrane treba prije same hibridizacije predhibridizirati u 3M TMCI puferu pola sata na temperaturi od 58°C. Za jednu je membranu potrebno 5ml pufera u koji je dodano 25µl sperme haringe (koncentracije 20mg/ml).

Potom se membrane stave u plastične vrećice u koje se doda 5-10ml 3M TMCI (3M TMCI, 50mM TrisHCl pH7.5, 1mM EDTA, 0.5% SDS) i 1pmol/µl specifične probe. Vrećice se zatvore (zaleme) i ostave 1-1.5 sat u vodenoj kupelji na temperaturi od 50-55 °C. Temperatura pri kojoj dolazi do sparivanja DNA s odgovarajućim probama specifična je za svaki pojedini lokus.

Nakon hibridizacije, membrane se dvaput ispiru u puferu za ispiranje, potom se ponovo stavljaju u plastične vrećice s 3M TMCI puferom i ispiru 15 minuta na kritičnoj temperaturi za svaku pojedinu probu radi uklanjanja nespecifičnih hibridizacija. Zatim se membrane opet ispiru dvaputa po 5 minuta u puferu za ispiranje, te inkubiraju 20 minuta sa streptavidinom (2mg/ml) i to 1µl HRP-SA (horse radish peroxidase-streptavidin) na 10ml pufera za ispiranje. Potom se otopina izlije, a membrane se ispiru dvaputa po 5 minuta u puferu za ispiranje. Pred zadnje ispiranje, membrane se ostave 5 minuta u puferu B (1M Urea, 0.1M NaCl, 5% Triton X-100, 1% Dextranulphate).

Specifične hibridizacije (pozitivne reakcije) otkrivaju se inkubacijom membrana u kemiluminiscentnoj kemikaliji ECL (Amersham cat nr. RPN 2105), tako da se svaka membrana inkubira 1minutu u otopini 10ml kemikalije "1" i 10ml kemikalije "2". Posušene membrane stavljaju se u rentgen kazetu s filmom i eksponiraju 10-60 sekundi. Na mjestima pozitivnih reakcija vide se na rentgen filmu crne točke. Jačina signala određuje se prema kontrolnim uzorcima DNA (pozitivne i negativne kontrole) i obilježava brojevima od 2-8: 2

(vrlo slab signal), 4 (slab signal), 6 (pozitivan signal), 8 (vrlo jak signal). Svi signali, s istom jačinom signala kao pozitivna kontrola, uzeti su u obzir kao pozitivna reakcija (slika 4).

Nakon hibridizacije, membrane se kuhaju 10 minuta u 0.5% otopini SDS-a da se skinu probe vezane na ispitivane uzorke. Tako skuhane membrane mogu se ponovno koristiti za slijedeće hibridizacije.

3.2.4. TIPIZACIJA GENA HLA RAZREDA II POMOĆU SPECIFIČNIH OLIGONUKLEOTIDNIH PROBA

Za svaki od ispitivanih lokusa HLA razreda II korišteni su različiti setovi proba prema protokolu XI Međunarodnog radnog sastanka (XI International Histocompatibility Workshop). Probe su imale takav slijed baza koji je omogućio određivanje svih, do tada poznatih alela pojedinog lokusa (42).

3.2.4.1. Određivanje alela DRB1

Lokus DRB1 najpolimorfiji je lokus razreda II sustava HLA s više od 100 različitih alela. Našim setom proba moglo se odrediti 65 od 83 poznata alela u trenutku ispitivanja.

Tipizacija alela DRB1 izvodi se u dvije etape. Najprije se određuje šira specifičnost, odnosno generička tipizacija alela DRB1 da se utvrdi kojoj skupini alel pripada. Ta tipizacija odgovara serološkoj tipizaciji antigena HLA-DR. Potom se određuje uža specifičnost, odnosno subtipizacija alela DRB1.

Za određivanje alela DRB1 korišten je set od 18 proba koji omogućava određivanje 12 alela šire specifičnosti. Za alele DRB1*07, *0901 i *1001 nije provedena daljnja subtipizacija, budući da je bio poznat samo jedan podtip za svaki od ova tri alela.

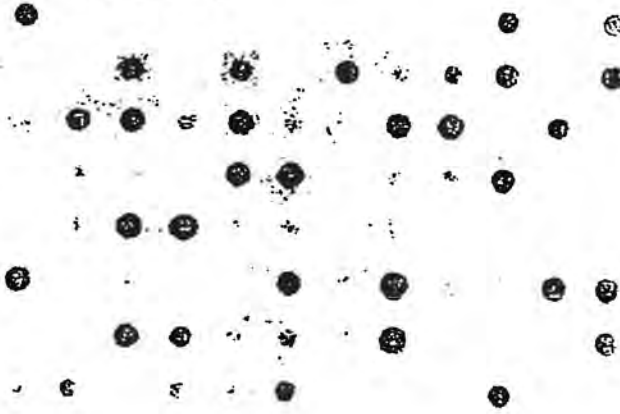
Slika 4. Izgled filma s membranama na kojima su uzorci DNA testirani za alele lokusa DPB1

SPECIFIČNOSTI

I-3 | 5504 | 0301, 0601, 0901, 1401, 1701



I-4 | 6502 |



II-3 | 5504 | 58°C



II-4 | 6502 |



K1 K2 K3 K4 K5

K - kontrola

K1 (DPB1*0101 + 0301)

K2 (DPB1*0601)

K3 (DPB1*0202 + 0901)

K4 (DPB1*1401 + 201)

K5 (DPB1*0401)

H = 53°C (temperatura
hibridizacije)

Cw = 58°C (temperatur
kritičnog is)

Tri različita alela DRB1*01 (*0101, *0102, *0103) određena su setom koji sadrži 5 proba. Za subtipizaciju alela DRB1*02 (15+16) korišten je set od 7 proba kojim je moguće odrediti 3 alela DRB1*15 i 2 alela DRB1*16.

Set za određivanje alela DRB1*04 sadrži 13 proba kojima se može razlučiti 12 različitih alela (od DRB1*0401 do *0412). Probe su sintetizirane na temelju razlika između alela ove skupine koje se nalaze u drugoj i trećoj hipervarijabilnoj regiji drugog egsona.

Skupina gena DR52 obuhvaća najveći broj alela DRB1 (*03, *11, *12, *13, *14 i *08), te je stoga broj proba za njihovu tipizaciju najveći i sadrži 22 različite probe. Ovim setom proba mogu se odrediti 2 alela DRB1*03, 5 alela DRB1*08, 4 alela DRB1*11, 5 alela DRB1*13 i 8 alela DRB1*14.

3.2.4.2. Određivanje alela DQA1, DQB1 i DPB1

Aleli lokusa DQA1, DQB1 i DPB1 određeni su na isti način kao i aleli lokusa DRB1. Za određivanje alela DQA1 korišten je set od 13 proba kojim se može razlučiti 8 različitih alela.

Na lokusu DQB1 bilo je moguće setom od 20 proba odrediti 19 različitih alela.

Aleli lokusa DPB1 tipizirani su setom od 19 proba koji omogućava određivanje 19 različitih alela ovog lokusa.

3.2.4.3. Određivanje haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1

Haplotipske sveze određene su na temelju podataka o neravnoteži udruživanja alela DRB1, DQA1 i DQB1 u hrvatskoj populaciji i ostalim populacijama bijele rase. Naime, svaku populaciju obilježava određen broj klasičnih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 što omogućava da se gotovo uvijek mogu odrediti DRB1-DQA1-DQB1 haplotipovi pojedine

osobe. Popis najčešćih klasičnih haplotipova u hrvatskoj populaciji objavljen je u literaturi (42).

Budući da se aleli lokusa DPB1 ne nalaze u neravnoteži udruživanja s alelima lokusa DR i DQ, bez obiteljskih istraživanja ne mogu se sa sigurnošću odrediti DRB1-DQA1-DQB1-DPB1 haplotipovi pojedine osobe.

3.2.5. ODREĐIVANJE GENA HLA RAZREDA I LOKUSA C METODOM

ARMS-PCR

Geni sustava HLA razreda I lokusa C određeni su metodom ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain reaction). To je brza metoda za otkrivanje točkastih mutacija i izmjena parova baza unutar DNA (89). Temelji se na određivanju alela HLA razreda I pomoću parova primera specifičnih za jedan alel ili skupinu alela. Za razliku od metode PCR-SSOP, u ove se metode hibridizacija (kontakt uzorka i specifičnog primera) odvija za vrijeme amplifikacije DNA u thermocycleru. Dobiveni PCR produkt analizira se elektroforezom, te je tako za otprilike 2 sata i 30 minuta poznato koji alel razreda I pripada ispitivanoj osobi.

Genomska DNA iz leukocita periferne krvi izolirana je već ranije opisanom metodom izoliranja. Za određivanje alela lokusa C korišten je set od 23 para specifičnih primera (69).

Pozitivna kontrola bio je primer dužine 1070 pb.

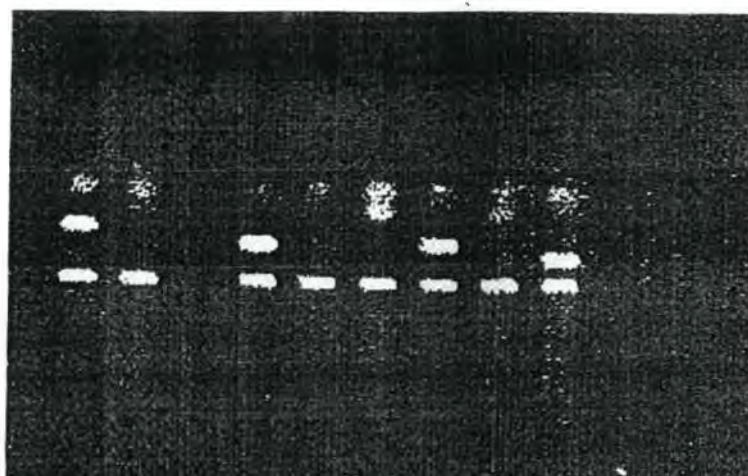
Po 5 μ l svakog primera razdijeli se u tubice u koje se potom doda po 8 μ l prethodno priređene PCR mješavine (vidi str. 32). Za svaku reakciju potrebno je 3 μ l PCR mješavine, 2 μ l DNA ispitanika i 0.08 μ l Taq polimeraze, a za svaku slijedeću reakciju količina se udvostručava. Tako pripremljene reakcije prekrivaju se s 1-2 kapi parafinskog ulja i stavljaju

u Bio-med thermocycler. U tom se stroju, kao što je ranije opisano, izmjenom točno određenih temperatura odvijaju procesi denaturacije, sparivanja i produljivanja ciljane DNA. PCR program sastoji se od početnog denaturacijskog ciklusa pri temperaturi od 96°C koji traje 1 minutu, slijedi 30 uzastopnih ciklusa sparivanja i hibridizacije, te na kraju 10 minutna ekstenzija lanca pri temperaturi od 72°C.

Analiza umnoženog produkta PCR izvodi se na 2% agaroznom gelu (vidi ranije). U svaku tubicu s amplificiranom DNA, dodaje se po 5 μ l boje (bromphenil blue) i dobro promiješa. Po 10 μ l uzorka iz svake tubice nanosi se mikropipetom u pojedinu rupicu prethodno pripremljenog gela. Elektroforeza traje 20-25 minuta pri struji jačine 100-120V.

Nakon završene migracije, gel se prebacuje na UV stolić, gdje se očitavaju rezultati prema poznatoj shemi. Uspješna amplifikacija (pozitivan rezultat) vidi se u obliku svijetleće pruge (slika 5). Takva specifična amplifikacija u jednoj traci znači da taj uzorak DNA sadrži alel ili skupinu alela koji su određeni poznatim parom primera.

Slika 5. Prikaz uspješne amplifikacije DNA metodom ARMS-PCR



1 2 3 4 5 6 7 8 9

pruga		specifičnost
1	+	Cw*01
2	-	Cw*02/1701
3	0	Cw*03
4	+	Cw*06
5	-	Cw*05
6	-	Cw*07
7	+	Cw*02/06
8	-	Cw*1203
9	+	Cw*06/1602

3.2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Učestalost pojavljivanja pojedinih alela (haplotipova) u ispitivanim skupinama izračunata je iz omjera broja otkrivenih alela i ukupnog broja ispitivanih alela.

Uspoređivanje učestalosti alela i statistička značajnost otkrivenih razlika između skupine bolesnika i zdrave kontrole određena je χ^2 testom iz tablice kontingencije 2x2.

$$\chi^2 = (ad-bc)^2 N / (a+b)(c+d)(a+c)(b+d) \quad N - \text{broj osoba}$$

	alel +	alel -
bolesnici	a	b
kontrola	c	d

+ alel nazočan; - alel odsutan

P vrijednost korigirana je po Yates-u ukupnim brojem alela nađenim na pojedinom lokusu. Ako uvjeti χ^2 testa nisu bili ispunjeni (jedan ili više očekivanih brojeva bio je manji od 5), korišten je Fisher-ov egzaktni test (39).

Nivo statističke značajnosti označen je uz p vrijednost s jednom, dvije ili tri zvjezdice. Ako je $p < 0.05$, smatra se da postoji statistički značajna razlika između dvije skupine ispitanika koja nije slučajna i ponovit će se barem s 95% vjerojatnosti u svakom slijedećem ispitivanju. Uz $p < 0.01$ postoji visoko statistički značajna razlika između ispitivanih varijabli s vjerojatnošću ponavljanja od najmanje 99%. Kada je $p < 0.001$ postoji vrlo visoka statistička značajnost uz vjerojatnost ponavljanja od najmanje 99.9%.

Jačina povezanosti bolesti i pojedinog alela (haplotipa) HLA određena je izračunavanjem relativnog rizika (RR) po Woolfu (125). Ukoliko je jedna od vrijednosti iznosila 0 korištena je modificirana formula po Haldane-u (43). Relativni rizik naveden je samo u onim slučajevima kad je razlika između ispitivanih skupina bila statistički značajna.

$$RR = ad / bc \quad (\text{Woolf})$$

$$RR = (2a+1)(2d+1) / (2b+1)(2c+1) \quad (\text{Haldane})$$

Ako je vrijednost RR blizu 1 smatra se da ne postoji povezanost alela HLA i bolesti. RR veći od 1 ukazuje na pozitivnu povezanost alela HLA i bolesti, a RR manji od 1 ukazuje na negativnu povezanost alela HLA i bolesti. Što je odstupanje od 1 veće bilo na pozitivnu, bilo na negativnu stranu, to je povezanost alela HLA s bolešću jača.

4. REZULTATI

4. POVEZANOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I I II SUSTAVA HLA SA PSORIJAZOM

Istraživanje povezanosti antigena i gena razreda I i II sustava HLA i psorijaze provedeno je u skupini od 118 nesrodnih bolesnika. Istražena je učestalost antigena i gena HLA razreda I, te gena i haplotipskih sveza razreda II sustava HLA. Rezultati istraživanja su uspoređeni s kontrolnom skupinom ispitanika koja predstavlja reprezentativni uzorak hrvatske populacije.

Na temelju anamnestičkih podataka bolesnici s psorijazom podijeljeni su u dvije skupine. Bolesnici s anamnestičkim podatkom o nazočnosti psorijaze u bližeg člana obitelji (otac, majka, braća, prvi rođaci) čine skupinu s pozitivnom obiteljskom anamnezom, a bolesnici bez anamnestičkih podataka o pojavi bolesti u obitelji čine skupinu s negativnom obiteljskom anamnezom. U obje je skupine također istražena učestalost antigena, gena i haplotipova razreda I i II sustava HLA.

Populacijskim istraživanjima povezanosti antigena i gena HLA s dobi pojavljivanja psorijaze utvrđeno je da se psorijatičari mogu podijeliti u dvije skupine. U prvoj skupini (tip I psorijaza) uočeno je da bolest počinje u ranijoj životnoj dobi (prije 30 godine života) i da se nasljeđuje, a u drugoj skupini (tip II psorijaza) bolest započinje u kasnijoj životnoj dobi (između 50-60 godine života) i javlja se sporadično. Međutim, neki bolesnici ne mogu se razvrstati niti u jednu od navedenih skupina, pa čine skupinu koju obilježava rani nastup bolesti (prije 30 godine života), ali bez anamnestičkih podataka o obiteljskom javljanju psorijaze. U sve tri skupine bolesnika istražena je učestalost antigena i gena razreda I i II HLA, a rezultati su uspoređeni međusobno, kao i s kontrolnom skupinom ispitanika.

U daljnjem tekstu rezultati istraživanja prikazani su za svaku skupinu bolesnika zasebno. Oni antigeni i aleli koji nisu definirani (neodređeni ili homozigotni) označeni su u svim tablicama kao x.

4.1. RASPODJELA BOLESNIKA PREMA SPOLU I DOBI POČETKA PSORIJAZE

Rezultati raspodjele bolesnika prema spolu i dobi početka psorijaze prikazani su u tablici 1. Ispitivanje je provedeno u 76 bolesnika muškog i 42 bolesnice ženskog spola. U istraživanih bolesnika uočene su 2 skupine ovisno o dobi početka psorijaze. U većine psorijatičara utvrđen je rani nastup bolesti, dok je samo u manjeg broja bolesnika psorijaza nastupila u kasnijoj životnoj dobi.

Dakle, u 74% muškaraca i čak u 80% žena bolest je započela prije 40 godine života. Samo 19% žena i 26% muškaraca oboljeli su nakon 40 godine života. Rani oblik bolesti javlja se u muškaraca oko 22. godine života, a u žena nešto ranije, oko 18. godine života. U bolesnika s kasnim nastupom psorijaze nije otkrivena razlika u pojavi bolesti između muškaraca i žena.

Tablica 1. Raspodjela bolesnika prema spolu i dobi početka psorijaze

SPOL	POČETAK BOLESTI					
	0 - 40 godina			> 40 godina		
	N	%	srednja dob (godine)	N	%	srednja dob (godine)
muški	57	(74,03)	21,73	20	(25,97)	52,35
ženski	34	(80,95)	17,91	8	(19,05)	53,87

N - broj bolesnika

4.2. UČESTALOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I SUSTAVA HLA U BOLESNIKA SA PSORIJAZOM

Istraživanje povezanosti antigena i gena HLA razreda I sa psorijazom provedeno je u skupini od 118 nesrodnih bolesnika i 139 zdravih nesrodnih ispitanika. U svih njih određena je učestalost antigena lokusa HLA-A i -B, te alela lokusa HLA-C.

4.2.1. UČESTALOST ANTIGENA HLA-A

Rezultati tipizacije antigena HLA-A u bolesnika s psorijazom i kontrolnih ispitanika prikazani su u tablici 2. Od 11 testiranih antigena lokusa HLA-A, i u bolesnika i u zdravih ispitanika otkriveno je svih 11 antigena.

U obje skupine najčešći antigen je A2 (58,47% u bolesnika, 43,17% u kontroli). Ta razlika je statistički značajna, ali se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p. U bolesnika slijedi po zastupljenosti antigen A1 (33,40%), a učestalost svih ostalih antigena niža je u bolesnika nego u zdravih ispitanika.

U kontrolnoj skupini drugi po učestalosti su antigeni A1 i A3 (nazočni u 24,46% ispitanika), a potom slijedi A9 s učestalošću 23,02%. Zastupljenost svih ostalih antigena manja je od 15%.

Tablica 2. Učestalost antigena HLA-A u bolesnika sa psorijazom

HLA-A	BOLESNICI (N=118)		KONTROLA (N=139)		p
	n	%	n	%	
1	40	33,40	34	24,46	NS
2	69	58,47	60	43,17	0,02
3	20	16,95	34	24,46	NS
9	26	22,03	32	23,02	NS
10	1	0,85	6	4,32	NS
11	9	7,63	19	13,67	NS
19	14	11,86	15	10,79	NS
25	1	0,85	7	5,04	NS
26	11	9,32	15	10,79	NS
28	8	6,78	20	14,39	NS
29	1	0,85	1	0,72	NS
x	37	31,36	36	25,90	NS

N - broj istraživanih osoba ; n - broj osoba s otkrivenim antigenom

vrijednost p je korigirana brojem određivanih antigena HLA-A (11)

() - statistički značajna nekorrigirana vrijednost p; NS - bez statističke značajnosti

4.2.2. UČESTALOST ANTIGENA HLA-B

Rezultati tipizacije antigena HLA-B u bolesnika sa psorijazom i kontrolnih ispitanika prikazani su u tablici 3. Od ukupno 19 određivanih antigena lokusa HLA-B, svi su otkriveni i u bolesnika i u zdravih osoba.

Najučestaliji antigen u psorijatičara je antigen B17 (21,05%). Njegova je učestalost u usporedbi s zdravim ispitanicima značajno povišena ($p=0,024$), ali ta se značajnost gubi kad se vrijednost p pomnoži s brojem testiranih antigena - 19 (korigirani p).

Tablica 3. Učestalost antigena HLA-B u bolesnika sa psorijazom

HLA - B	BOLESNICI (N=114)		KONTROLA (N=139)		p
	n	%	n	%	
5	10	8,77	28	20,14	(0,019)
7	8	7,02	26	18,71	(0,012)
8	20	17,54	19	13,67	NS
12	16	14,04	28	20,14	NS
13	22	19,30	9	6,48	(0,0037)
14	5	4,39	2	1,44	NS
15	5	4,39	12	8,63	NS
16	7	6,14	1	0,72	NS
17	24	21,05	14	10,08	(0,024)
18	14	12,28	22	15,83	NS
21	9	7,89	2	1,44	(0,028)
22	2	1,75	5	3,60	NS
27	6	5,26	14	10,08	NS
35	22	19,30	33	23,74	NS
37	9	7,89	2	1,44	(0,028)
38	2	1,75	11	7,91	NS
39	5	4,39	6	4,32	NS
40	7	6,14	9	6,48	NS
41	1	0,88	3	2,16	NS
x	41	35,96	32	23,02	NS

N - broj istraživanih osoba ; n - broj osoba s otkrivenim antigenom
vrijednost p je korigirana brojem određivanih antigena HLA-B (19)

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p; NS - bez statističke značajnosti

I učestalosti antigena B13 i B37 također su statistički značajno povišene ($p=0,0037$ odnosno $p=0,028$), ali te se razlike gube kad se p korigira s brojem testiranih antigena. Isti je slučaj s antigenom B21. Kad je riječ o antigenima B5 i B7, njihovo značajno sniženje

(nekorigirani p) tumačimo povišenjem već ranije navedenih antigena (zakon genske ravnoteže).

4.2.3. UČESTALOST ALELA HLA-Cw

Tablica 4. Učestalost alela HLA-C u bolesnika sa psorijazom

Cw*	BOLESNICI (N=236)		KONTROLA (N=288)		p	RR
	n	%	n	%		
0102/03	5	2,12	12	4,17	NS	-
0202	25	10,59	23	7,99	NS	-
0302/04	27	11,44	25	8,68	NS	-
0401	27	11,44	59	20,49	(0,008)	-
0501	9	3,81	27	9,38	(0,019)	-
0602	69	29,24	28	9,72	<0,00001	3,84
0701	21	8,90	52	18,06	0,003	0,44
0801/02	2	0,85	8	2,78	NS	-
1202/04	7	2,97	20	6,94	NS	-
1301	2	0,85	8	2,78	NS	-
1402	1	0,42	5	1,74	NS	-
1502	0	0	2	0,69	NS	-
1601/02	0	0	2	0,69	NS	-
1701/02	2	0,85	6	2,09	NS	-
1801	0	0	0	0	NS	-
x	39	16,53	11	3,82	-	-

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela
 vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela Cw (15); ako je i nakon korekcije
 vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p
 () - statistički značajna nekorigirana vrijednost p
 RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

Ispitivanje učestalosti alela lokusa HLA-C provedeno je u 118 bolesnika i u 144 zdrave osobe. Rezultati tipizacije alela HLA-Cw prikazani su u tablici 4. Od 15 alela, koliko ih je bilo

moguće odrediti korištenim setom proba, u bolesnika je otkriveno 12 različitih alela, dok je u zdravih ispitanika nađeno 14 različitih alela HLA-Cw.

Najčešći alel u bolesnika je Cw*0602 (29,24%), a ujedno i jedini s učestalošću većom od 20%. Povećana učestalost alela *0602 visoko je statistički značajna u usporedbi sa zdravom populacijom ($p < 10^{-4}$). Slijedeći po zastupljenosti su aleli *0302 i *0401 s učestalošću 11,44%, *0202 (10,59%), te *0701 (8,90%). Snižena učestalost alela *0701 u psorijatičara statistički je značajna u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p = 0,003$). Bez korekcije vrijednosti p , statistički je značajno niža i učestalost alela *0401 i *0501 u psorijatičara nego u zdravih ispitanika.

U kontrolnoj skupini najčešći alel, a ujedno i jedini s učestalošću većom od 20%, je Cw*0401 (20,49%). Drugi po zastupljenosti je alel *0701 (18,06%), a učestalost svih ostalih alela manja je od 10%.

4.3. UČESTALOST GENA RAZREDA II SUSTAVA HLA U BOLESNIKA SA PSORIJAZOM

Istraživanje povezanosti gena HLA razreda II sa psorijazom provedeno je u skupini od 118 nesrodnih bolesnika. Rezultati istraživanja uspoređeni su s kontrolnom skupinom koja se sastojala od 141 nesrodne zdrave osobe.

4.3.1. UČESTALOST ALELA LOKUSA DRB1

Ispitivanje učestalosti alela lokusa DRB1 u bolesnika sa psorijazom uključivalo je tipizaciju šire specifičnosti za alele DRB1*01-14, te tipizaciju užih specifičnosti za gene skupine DR1, DR2, DR4 i DRw52 (DR3, DR8, DR11, DR12, DR13 i DR14).

4.3.1.1. Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela lokusa DRB1

Tablica 5. Učestalost alela DRB1 u bolesnika sa psorijazom

DRB1	BOLESNICI (N=224)		KONTROLA (N=282)		p	RR
	n	%	n	%		
01	22	9,82	25	8,87	NS	-
02	37	16,52	63	22,34	NS	-
03	19	8,48	19	6,74	NS	-
04	15	6,70	29	10,28	NS	-
11	32	14,29	44	15,60	NS	-
12	2	0,89	5	1,77	NS	-
13	24	10,71	36	12,77	NS	-
14	4	1,79	12	4,26	NS	-
07	51	22,77	27	9,57	0,00008	2,77
08	4	1,79	9	3,19	NS	-
09	0	0	1	0,36	NS	-
10	6	2,68	5	1,77	NS	-
x	8	3,57	7	2,48	NS	-

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela
 vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DRB1 (12); ako je i nakon korekcije
 vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p
 RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela lokusa DRB1 u bolesnika sa psorijazom u
 usporedbi s kontrolnim ispitanicima prikazani su u tablici 5.

Iz tablice je vidljivo da je najučestaliji alel DRB1 u psorijatičara alel DRB1*07
 (22,77%). Povećana učestalost tog alela u usporedbi s kontrolnom skupinom je visoko
 statistički značajna ($p = 0,00008$). To je ujedno i jedini alel lokusa DRB1 za koji je nađena
 statistički značajna razlika u učestalosti u odnosu na zdravu populaciju.

4.3.1.2. Rezultati podtipizacije alela lokusa DRB1

Rezultati tipizacije užih specifičnosti odnosno podtipizacije gena skupine DR1, DR2, DR4 i Drw52 u bolesnika sa psorijazom u usporedbi s kontrolnom skupinom prikazani su u tablici 13, a relativne učestalosti podtipova za svaku pojedinu skupinu alela prikazane su u tablicama 6-12.

4.3.1.2.1. Učestalost podtipova skupine DRB1*01

Tablica 6. Učestalost podtipova skupine DRB1*01 u DRB1*01 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1*	BOLESNICI (N=22)		KONTROLA (N=25)	
	n	%	n	%
0101	22	100	23	92,0
0102	0	0	2	8,0

N - ukupan broj istraživanih alela

n - broj otkrivenih alela

Podtipizacijom skupine DRB1*01 utvrdili smo u svih 22 bolesnika, nositelja tog alela, samo podtip DRB1*0101, koji prevladava i u kontroli (92,0%). Podtip DRB1*0102 nije otkriven niti u jednog bolesnika, a u kontrolnoj skupini nađen je u 8% ispitanika. Rezultati su prikazani u tablici 6.

Razlike u učestalosti obaju podtipova u bolesnika u usporedbi s kontrolom nisu statistički značajne (tablica 13).

4.3.1.2.2. Učestalost podtipova skupine DRB1*02

Podtipizacija alela skupine DRB1*02 pokazala je da bolesnici nose dva različita podtipa alela DRB1*15 (*1501 i *1502), te dva različita podtipa alela DRB1*16 (*1601 i *1602).

Tablica 7. Učestalost podtipova skupine DRB1*02 u DRB1*02 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1*	BOLESNICI (N=37)		KONTROLA (N=63)	
	n	%	n	%
1501	19	51,35	24	38,09
1502	2	5,41	4	6,35
1503	0	0	2	3,17
1601	13	35,14	28	44,44
1602	3	8,11	5	7,94

N - ukupan broj istraživanih alela

n - broj otkrivenih alela

Zdrave osobe imaju tri različita podtipa alela DRB1*15 (*1501-*1503) i dva podtipa alela DRB1*16 (*1601 i *1602). Naime, alel *1503 nađen je samo u kontrolnih ispitanika, ali ne i u bolesnika s psorijazom (tablica 7).

U obje skupine najveću relativnu učestalost imaju aleli *1501 i *1601 koji čine oko 80% otkrivenih alela ove skupine. U bolesnika je relativna učestalost alela *1501 veća nego učestalost alela *1601 (51,35% prema 35,14%), dok je u kontrolnoj skupini situacija obrnuta, te je relativna zastupljenost alela *1501 manja nego alela *1601 (38,1% prema 44,4%).

Analiza podtipova alela DRB1*02 u cjelokupnom uzorku pokazuje smanjenu učestalost svih podtipova u bolesnika u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti (tablica 13).

4.3.1.2.3. Učestalost podtipova skupine DRB1*04

U 15 bolesnika koji nose alel DRB1*04 otkriveno je 6 različitih podtipova (*0401-*0403 i *0405 - *0407) od 12 mogućih te skupine (tablica 8). I u 29 zdravih nositelja tog alela također je nađeno 6 različitih podtipova (*0401-*0405 i *0407). Alel *0406 otkriven je samo u bolesnika, ali bez statistički značajno veće relativne učestalosti u usporedbi s kontrolom. Alel *0404 nađen je samo u zdravih ispitanika, ali s niskom relativnom zastupljenošću (3,5%).

Najvišu relativnu učestalost u zdravih osoba ima alel *0401 (37,8%), dok je u bolesnika taj alel najrjeđi (6,67%). Smanjena relativna učestalost alela *0401 u bolesnika statistički je značajna u usporedbi s kontrolom ($p=0,027$). Relativna učestalost alela *0402 podjednaka je u obje ispitivane skupine, dok je zastupljenost alela *0403, *0405 i *0406 veća u bolesnika nego u kontrolnih ispitanika, ali bez statistički značajne razlike.

Tablica 8. Učestalost podtipova skupine DRB1*04 u DRB1*04 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1*	BOLESNICI (N=15)		KONTROLA (N=29)		p
	n	%	n	%	
0401	1	6,67	11	37,93	0,027
0402	4	26,67	7	24,14	NS
0403	5	33,33	7	24,14	NS
0404	0	0	1	3,45	NS
0405	2	13,33	1	3,45	NS
0406	2	13,33	0	0	NS
0407	1	6,67	2	6,90	NS

N - ukupan broj istraživanih alela
n - broj otkrivenih alela

Analiza podtipova alela DRB1*04 u cjelokupnom uzorku bolesnika i kontrolnih ispitanika pokazuje da smanjena učestalost alela *0401 u bolesnika (0,45%) u usporedbi s kontrolnom skupinom (3,90%) nije statistički značajna (tablica 13).

4.3.1.2.4. Učestalost podtipova skupine Drw52

Podtipizacijom skupine Drw52 određeni su podtipovi alela DRB1*03, *05 (*11 i *12), *06 (*13 i *14) i *08. Rezultati tipizacije prikazani su u tablicama 9 - 12.

Podtipizacijom alela DRB1*03 otkriven je u bolesnika samo jedan podtip *0301, koji je najčešći i u kontrolnoj skupini (tablica 9). Samo jedna zdrava osoba nositelj je podtipa *0302.

Tablica 9. Učestalost podtipova skupine DRB1*03 u DRB1*03 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1*	BOLESNICI (N=19)		KONTROLA (N=19)	
	n	%	n	%
0301	19	100	18	94,74
0302	0	0	1	5,26

N - ukupan broj istraživanih alela

n - broj otkrivenih alela

Subtipizacijom alela DRB1*08 nađena su 2 različita podtipa u bolesnika, *0801 i *0802 s jednakom relativnom zastupljenošću (tablica 10). Niti u jednog bolesnika nisu otkriveni aleli *0803 i *0804 koji su ujedno najrjeđi i u kontrolnih ispitanika. U zdravih osoba najveću relativnu učestalost ima podtip *0801 (78,0%), dok alel *0802 ne nosi niti jedan zdravi ispitanik.

Tablica 10. Učestalost podtipova skupine DRB1*08 u DRB1*08 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1*	BOLESNICI (N=4)		KONTROLA (N=9)	
	n	%	n	%
0801	2	50,0	7	77,78
0802	2	50,0	0	0
0803	0	0	1	11,11
0804	0	0	1	11,11

N - ukupan broj istraživanih alela
n - broj otkrivenih alela

Podtipizacijom alela DRB1*05 otkrivena su i u bolesnika i u kontroli 4 različita podtipa (tablica 11). U bolesnika je relativno najzastupljeniji alel *1101 (52,94%), slijedi *1104 (38,24%), dok je u zdravoj populaciji situacija obrnuta: relativno najučestaliji alel je *1104 (43,0%), a na drugom je mjestu *1101(35,0%).

Relativne učestalosti podtipova DRB1*03, *08, *11 i *12 ne pokazuju statistički značajnu razliku između bolesnika i kontrole (tablice 9-11).

Tablica 11. Učestalost podtipova skupine DRB1*11 i *12 u DRB1*11 i *12 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1*	BOLESNICI (N=34)		KONTROLA (N=49)	
	n	%	n	%
1101	18	52,94	17	34,69
1102	1	2,41	6	12,24
1104	13	38,24	21	42,86
1201	2	5,89	5	10,20

N - ukupan broj istraživanih alela
n - broj otkrivenih alela

Podtipizacijom alela DRB1*06 otkrivena su u bolesnika 3 različita podtipa DRB1*13 (*1301-*1303), te jedan podtip DRB1*14 (*1401). Rezultati su prikazani u tablici 12. U bolesnika najvišu relativnu učestalost pokazuje alel *1301 (62,07%), što je statistički značajno u usporedbi s kontrolom ($p=0,018$). Ostali podtipovi alela DRB1*13 i *14 ne pokazuju statistički značajno odstupanje u odnosu na zdrave osobe.

Tablica 12. Učestalost podtipova skupine DRB1*13 i *14 u DRB1*13 i *14 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1*	BOLESNICI (N=28)		KONTROLA (N=48)	
	n	%	n	%
1301	17	62,07	16	33,33
1302	4	13,8	12	25,0
1303	3	10,34	5	10,42
1304	0	0	1	2,08
1305	0	0	2	4,16
1401	4	13,8	12	25,0

N - ukupan broj istraživanih alela
n - broj otkrivenih alela

Ispitivanjem učestalosti pojedinih podtipova skupine Drw52 u svih bolesnika i kontrolnih ispitanika nije utvrđeno statistički značajno odstupanje niti za jedan od istraživanih alela (tablica 13).

Tablica 13. Učestalost alela DRB1 u bolesnika sa psorijazom - rezultati
podtipizacije gena skupine DRB1*01, DRB1*02, DRB1*04 i DRw52

DRB1*	BOLESNICI (N=224)		KONTROLA (N=282)		p
	n	%	n	%	
0101	22	9,82	23	8,16	NS
1501	19	8,48	24	8,51	NS
1502	2	0,89	4	1,42	NS
1601	13	5,80	28	9,93	NS
1602	3	1,34	5	1,77	NS
0301	19	8,48	18	6,38	NS
0401	1	0,45	11	3,90	NS
0402	4	1,79	7	2,45	NS
0403	5	2,23	7	2,45	NS
0405	2	0,89	1	0,36	NS
0406	2	0,89	0	0	NS
0407	1	0,45	2	0,71	NS
1101	18	8,04	17	6,03	NS
1102	1	0,45	6	2,13	NS
1104	13	5,80	21	7,44	NS
1201	2	0,89	5	1,77	NS
1301	17	7,59	16	5,67	NS
1302	4	1,79	12	4,26	NS
1303	3	1,34	5	1,77	NS
1401	4	1,79	12	4,26	NS
0801	2	0,89	7	2,45	NS
0802	2	0,89	0	0	NS

N - ukupan broj istraživanih alela

n - broj otkrivenih alela

4.3.2. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DQ

Ispitivanje učestalosti gena lokusa DQ uključuje određivanje alela DQA1 i DQB1.

4.3.2.1. Učestalost alela DQA1

Rezultati tipizacije alela DQA1 prikazani su u tablici 14. Od 8 testiranih alela lokusa DQA1, u bolesnika jedino nije otkriven alel DQA1*0601, koji je i u zdravoj populaciji najrjeđi (0,7%).

Tablica 14. Učestalost alela DQA1 u bolesnika sa psorijazom

DQA1*	BOLESNICI (N=226)		KONTROLA (N=282)		p	RR
	n	%	n	%		
0101	33	14,60	41	14,54	NS	-
0102	46	20,35	73	25,88	NS	-
0103	10	4,42	18	6,38	NS	-
0201	51	22,57	26	9,22	0,00005	2,87
0301	16	7,08	28	9,93	NS	-
0401	5	2,21	6	2,13	NS	-
0501	56	24,78	70	24,28	NS	-
0601	0	0	2	0,71	NS	-
x	9	3,98	18	6,38	NS	-

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela
vrijednost p korigirana je brojem istraživanih alela DQA1 (8); ako je i nakon korekcije
vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorrigirana vrijednost p
RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

Najučestaliji alel u psorijatičara je DQA1*0501 (24,78%), a potom slijede aleli *0201 (22,57%), *0102 (20,35%) i *0101 (14,60%). Povećana učestalost alela DQA1*0201 u bolesnika visoko je statistički značajna u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p=0,00005$).

U zdravoj populaciji najčešći aleli su DQA1*0102 (25,88%) i *0501 (24,28%), a ujedno i jedini s učestalošću većom od 20%. Alel *0101 nazočan je u 14,54% zdravih osoba, a učestalost svih ostalih alela manja je od 10%.

4.3.2.2. Učestalost alela DQB1

Rezultati ispitivanja učestalosti alela DQB1 u bolesnika sa psorijazom i kontrolnih ispitanika prikazani su u tablici 15.

Od 15 određivanih alela u bolesnika nisu otkrivena samo dva, DQB1*0601 i *0402, koji su i u zdravoj populaciji najrjeđi i nazočni u samo 1% osoba. Alel *0504 nije nađen u kontrolnoj skupini, a izuzetno je rijedak i u psorijatičara (0,44%).

U bolesnika je alel DQB1*0201 najzastupljeniji (26,55%) i ta povećana učestalost je u usporedbi sa zdravom populacijom visoko statistički značajna ($p=0,0006$). Po zastupljenosti slijede aleli *0301 (17,26%) i *0501(12,39%), dok je učestalost svih ostalih alela manja od 10%. Bez korekcije p vrijednosti, statistički značajno veću učestalost pokazuje alel DQB1*0303.

U kontrolnoj skupini najčešći je alel DQB1*0301 (23,53%), a ujedno i jedini s učestalošću većom od 20%. Potom slijede aleli *0201 (13,44%), *0501 (12,18%) i *0502 (10,92%), a učestalost svih ostalih alela manja je do 10%.

Tablica 15. Učestalost alela DQB1 u bolesnika s psorijazom i kontrolnih ispitanika

DQB1*	BOLESNICI (N=226)		KONTROLA (N=238)		p	RR
	n	%	n	%		
0501	28	12,39	29	12,18	NS	-
0502	19	8,41	16	10,92	NS	-
0503	4	1,77	12	5,04	NS	-
0504	1	0,44	0	0	NS	-
0601	0	0	3	1,26	NS	-
0602	18	7,96	21	8,82	NS	-
0603	13	5,75	16	6,72	NS	-
0604	5	2,21	9	3,79	NS	-
0605	1	0,44	0	0,0	NS	-
0201	60	26,55	32	13,44	0,0006	2,33
0301	39	17,26	56	23,53	NS	-
0302	14	6,19	9	3,78	NS	-
0303	11	4,87	3	1,26	(0,0456)	-
0401	5	2,21	2	0,84	NS	-
0402	0	0	2	0,84	NS	-
X	8	3,54	18	7,56	NS	-

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela
 vrijednost p korigirana je brojem istraživanih alela DQB1 (15); ako je i nakon korekcije
 vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p
 () - statistički značajna nekorigirana vrijednost p
 RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

4.3.3. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DPB1

Tablica 16. Učestalost alela DPB1 u bolesnika sa psorijazom

DPB1*	BOLESNICI (N=226)		KONTROLA (N=282)		p
	n	%	n	%	
0101	7	4,17	9	4,13	NS
0201	21	12,5	27	12,39	NS
0202	2	1,19	3	1,38	NS
0301	16	9,52	19	8,72	NS
0401	51	30,36	92	42,20	(0,016)
0402	25	14,88	27	12,39	NS
0501	0	0	2	0,92	NS
0601	3	1,79	2	0,92	NS
0801	1	0,60	0	0	NS
0901	7	4,17	3	1,38	NS
1001	3	1,79	6	2,75	NS
1101	1	0,60	2	0,92	NS
1301	2	1,19	2	0,92	NS
1401	3	1,79	4	1,83	NS
1501	0	0	3	1,38	NS
1601	0	0	1	0,46	NS
1701	2	1,19	1	0,46	NS
1801	1	0,60	2	0,92	NS
x	23	13,69	13	5,96	NS

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela
vrijednost p korigirana je brojem istraživanih alela DPB1 (18)

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

Rezultati tipizacije alela DPB1 prikazani su u tablici 16. Od 18 određivanih alela, u bolesnika je otkriveno 15, a u kontrolnoj skupini 17 različitih alela.

Najčešći alel u obje skupine je DPB1*0401 koji je otkriven u 30% bolesnika i u 42% zdravih osoba. Smanjena učestalost tog alela u psorijatičara u odnosu na kontrolu statistički je značajna samo bez korekcije vrijednosti p.

U bolesnika po zastupljenosti slijede aleli DPB1*0402 (14,88%), *0201 (12,5%) i *0301 (9,52%). Učestalost svih ostalih alela DPB1 manja je od 5%.

U kontrolnih ispitanika su s jednakom učestalošću nazočni aleli DPB1*0402 i *0201 (12,39%), potom slijedi alel *0301 (8,72%), a zastupljenost svih ostalih alela manja je od 5%.

4.3.4. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA GENA HLA U BOLESNIKA SA PSORIJAZOM

To ispitivanje uključivalo je određivanje učestalosti trilokusnih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u bolesnika sa psorijazom i kontrolnih ispitanika. Haplotipske sveze određene su deduktivno temeljem podataka o neravnoteži udruživanja alela ova tri lokusa kao i podataka o najčešćim haplotipskim svezama u hrvatskoj populaciji. Rezultati su prikazani u tablici 17. U bolesnika je otkriveno 38 različitih haplotipskih sveza, od kojih je 15 nazočno samo jedanput. U zdravih ispitanika nađena su 53 različita haplotipa, od čega ih je 28 otkriveno samo jedanput.

Tablica 17. Učestalost haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u bolesnika sa psorijazom

DRB1-DQA1-DQB1	BOLESNICI (N=216)		KONTROLA (N=236)		p
	n	%	n	%	
0101-0101-0501	22	10,19	21	8,90	NS
1501-0102-0502	2	0,93	2	0,85	NS
1501-0102-0602	16	7,41	21	8,90	NS
1502-0102-0502	1	0,46	2	0,85	NS
1502-0102-0504	1	0,46	0	0	NS
1601-0101-0502	1	0,46	0	0	NS
1601-0102-0502	11	5,09	22	9,32	NS
1601-0102-0602	1	0,46	0	0	NS
1602-0102-0502	3	1,39	2	0,85	NS
0301-0501-0201	17	7,87	18	7,63	NS
0301-0501-0303	1	0,46	0	0	NS
0401-0301-0302	1	0,46	3	1,27	NS
0402-0301-0301	1	0,46	0	0	NS
0402-0301-0302	3	1,39	4	1,70	NS
0403-0301-0302	5	2,31	3	1,27	NS
0405-0301-0302	2	0,93	0	0	NS
0406-0301-0302	2	0,93	0	0,0	NS
0407-0301-0302	1	0,46	1	0,42	NS
1101-0501-0301	18	8,33	16	6,78	NS
1102-0501-0301	1	0,46	5	2,12	NS
1104-0501-0301	13	6,02	18	7,63	NS
1201-0501-0301	2	0,93	3	1,27	NS
1301-0102-0602	1	0,46	1	1,42	NS
1301-0102-0603	3	1,39	0	0	NS
1301-0102-0604	1	0,46	2	0,85	NS
1301-0102-0605	1	0,46	0	0	NS
1301-0103-0603	10	4,63	13	5,51	NS

Nastavak tablice 17

1301-0401-0401	1	0,46	0	0	NS
1302-0102-0604	4	1,85	7	2,97	NS
1303-0501-0301	5	2,31	3	1,27	NS
1401-0101-0503	2	0,93	8	3,40	NS
1403-0101-0503	1	0,46	0	0,0	NS
1406-0101-0503	1	0,46	0	0,0	NS
					0,0003
0701-0201-0201	41	18,98	17	7,20	RR=3,02
0701-0201-0303	10	4,63	3	1,27	NS
0801-0401-0401	2	0,93	2	0,85	NS
0802-0401-0401	2	0,93	0	0,0	NS
1001-0101-0501	6	2,77	5	2,12	NS

N - ukupan broj istraživanih haplotipskih sveza; n - broj otkrivenih haplotipskih sveza
vrijednost p je korigirana brojem haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u populaciji (53);
ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena
nekorrigirana vrijednost p

RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

Najčešća haplotipska sveza u psorijatičara je produženi haplotip DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (18,98%). To je ujedno i jedini haplotip čija je učestalost statistički značajno veća u bolesnika nego u zdravoj populaciji ($p=0,0003$). Slijedeći po zastupljenosti je haplotip DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501 (10,19%), no njegova povećana učestalost u usporedbi s kontrolom ne doseže statističku značajnost. Učestalost preostalih haplotipskih sveza u bolesnika manja je od 10%. Smanjena učestalost haplotipa DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 u bolesnika (5,09% vs 9,32%) u odnosu na kontrolu nije statistički značajna.

U kontrolnoj skupini najčešći haplotipovi su DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 (9,32%), te DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501 i DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 nazočni u 9% zdravih ispitanika.

4.3.5. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA DRB1-DQA1-DQB1 U ISPITANIKI KOJI

NOSE ALEL DRB1*0701

Ispitivanja učestalosti alela lokusa DRB1 u naših bolesnika pokazala su visoko statistički značajno veću učestalost alela DRB1*0701 u psorijatičara nego u zdravih ispitanika (tablica 5). Alel DRB1*0701 je kao visoko rizičan gen za pojavu psorijaze također otkriven i u drugim populacijama. Populacijskim istraživanjima utvrđeno je da se alel DRB1*0701 nalazi u neravnoteži udruživanja s alelima DQA1*0201, te DQB1*0201 i DQB1*0303. Stoga je u bolesnika i kontrolnih ispitanika koji nose alel DRB1*0701 provedeno ispitivanje učestalosti trilokusnih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 (tablica 18).

Tablica 18. Učestalost haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u DRB1*0701 pozitivnih bolesnika sa psorijazom

DRB1-DQA1-DQB1	BOLESNICI (N=51)		KONTROLA (N=20)	
	n	%	n	%
0701-0201-0201	41	80,39	17	85
0701-0201-0303	10	19,61	3	15

N - ukupan broj istraživanih haplotipskih sveza

n - broj otkrivenih haplotipskih sveza

Istraživane haplotipske sveze otkrivene su u 51 bolesnika i u 20 kontrolnih ispitanika. U obje skupine alel DRB1*0701 nalazi se u neravnoteži udruživanja s alelom *0201 na lokusu DQA1, a na lokusu DQB1 s alelima *0201 ili *0303. U DRB1*0701 pozitivnih bolesnika, njih 80,39% nosi na lokusu DQB1 alel *0201, a samo 19,61% ima alel *0303. Slična je situacija i u kontrolnoj skupini ispitanika, u kojoj ih 85% nosi alel *0201, a 15% alel *0303.

4.4. UČESTALOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I SUSTAVA HLA U PSORIJATIČARA S POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM ANAMNEZOM PSORIJAZE

Na temelju anamnestičkih podataka bolesnici su podijeljeni u dvije skupine. Psorijatičari s anamnestičkim podatkom o nazočnosti bolesti u bližeg člana obitelji (otac, majka, braća, prvi rođaci) čine skupinu s pozitivnom obiteljskom anamnezom psorijaze (u daljnjem tekstu Psorijaza+ ili P+), a psorijatičari bez anamnestičkih podataka o bolesti u obitelji čine skupinu s negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze (u daljnjem tekstu Psorijaza- ili P-).

U obje skupine istražena učestalost antigena i gena HLA razreda I, a rezultati istraživanja uspoređeni su međusobno, kao i s kontrolnom skupinom koju je sačinjavalo 139 zdravih ispitanika.

4.4.1. UČESTALOST ANTIGENA HLA-A

Istraživanje učestalosti antigena HLA-A provedeno je u 53 psorijatičara s pozitivnom i 60 bolesnika s negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze. Rezultati tipizacije prikazani su u tablici 19.

U obje skupine najčešći antigen je A2 (62,07% P+, 55,0% P-), a u usporedbi sa zdravim osobama razlika je statistički značajna samo za psorijatičare s pozitivnom obiteljskom anamnezom ($p=0,02$). Međutim, ta se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p brojem istraživanih antigena. U bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom po zastupljenosti slijede antigeni A1 (34,48%), A9 (25,86%) i A3 (20,69%), dok je učestalost svih ostalih antigena manja od 10%.

U skupini s negativnom obiteljskom anamnezom drugi po učestalosti je antigen A1 (33,33%), a zastupljenost svih ostalih antigena manja je od 20%. Niti za jedan antigen nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti između ove dvije skupine bolesnika.

Tablica 19. Učestalost antigena HLA-A u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze*

HLA - A	PSORIJAZA + (N=58)		PSORIJAZA - (N=60)		p
	n	%	n	%	
1	20	34,48	20	33,33	NS
2	36	62,07	33	55,0	0,02
3	12	20,69	8	13,33	NS
9	15	25,86	11	18,33	NS
10	0	0	1	1,67	NS
11	4	6,90	5	8,33	NS
19	6	10,34	8	13,33	NS
25	0	0	1	1,67	NS
26	4	6,90	7	11,67	NS
28	3	5,17	5	8,33	NS
x	16	27,59	21	35,0	NS

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 2

N - broj istraživanih osoba; n - broj osoba s otkrivenim antigenom

p - P+ vs kontrola; vrijednost p je korigirana brojem određivanih antigena HLA-A (10)

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

4.4.2. UČESTALOST ANTIGENA HLA-B

Ispitivanje učestalosti antigena HLA-B provedeno je u 57 psorijatičara s pozitivnom i 57 psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze. Rezultati tipizacije prikazani su u tablici 20.

Tablica 20. Učestalost antigena HLA-B u psorijatičara s pozitivnom i negativnom

obiteljskom anamnezom psorijaze*

HLA - B	PSORIJAZA + (N=57)		PSORIJAZA - (N=57)		p*	p**	p***
	n	%	n	%			
5	5	8,78	5	8,78	(0,04)	NS	NS
7	6	10,53	2	3,51	NS	(0,01)	NS
8	8	14,04	12	21,05	NS	NS	NS
12	7	12,28	9	15,79	NS	NS	NS
13	15	26,32	7	12,28	0,0003 RR=5,16	NS	NS
14	2	3,51	3	5,26	NS	NS	NS
15	2	3,51	3	5,26	NS	NS	NS
17	18	31,58	6	10,53	0,0005 RR=4,12	NS	(0,01)
18	6	10,53	8	14,04	NS	NS	NS
21	5	8,78	4	7,02	(0,03)	NS	NS
22	0	0,0	2	3,51	NS	NS	NS
27	3	5,26	3	5,26	NS	NS	NS
35	9	15,79	13	22,81	NS	NS	NS
37	4	7,02	5	8,78	NS	(0,03)	NS
38	0	0	2	3,51	NS	NS	NS
39	1	1,75	4	7,02	NS	NS	NS
40	2	3,51	5	8,78	NS	NS	NS
41	1	1,75	0	0	NS	NS	NS
x	20	35,09	21	36,84	NS	NS	NS

kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 3; N - broj istraživanih osoba ; n - broj osoba s otkrivenim antigenom ; p- P+ vs kontrola; p**- P- vs kontrola, p***- P+ vs P-
vrijednost p je korigirana brojem određivanih antigena HLA-B (18); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p
() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p
RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

U skupini s pozitivnom obiteljskom anamnezom najčešći antigen je B17 (31,58%) što je visoko statistički značajno u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p=0,0005$), dok je u odnosu na bolesnike s negativnom obiteljskom anamnezom razlika statistički značajna samo bez korekcije vrijednosti p . Slijedeći po učestalosti u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom je antigen B13 (26,32%) što je također statistički značajno veća učestalost u usporedbi s kontrolom ($p=0,0003$). Učestalost svih ostalih antigena manja je od 15%. Statistički značajno povećana učestalost antigena B21 u bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom u odnosu na zdrave ispitanike ($p=0,03$) gubi se nakon korekcije vrijednosti p . Statistički značajno niža učestalost u bolesnika nego u kontroli otkrivena je za antigen B5, ali također samo bez korekcije vrijednosti p .

U skupini s negativnom obiteljskom anamnezom najčešći antigen je B35 (22,81%), slijedi B8 (21,05%), dok je učestalost svih ostalih antigena manja od 15%. Bez korekcije vrijednosti p statistički je značajno veća učestalost antigena B37 u bolesnika nego u kontroli. Smanjena učestalost antigena -B7 u bolesnika s negativnom obiteljskom anamnezom u usporedbi s kontrolom također je statistički značajna samo bez korekcije vrijednosti p .

4.4.3. UČESTALOST ALELA HLA-Cw

Tipizacija alela lokusa HLA-C provedena je u 59 psorijatičara s pozitivnom i 59 psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze (tablica 21). Od 15 određivanih alela, u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom otkriveno je 10 različitih alela, a u skupini s negativnom obiteljskom anamnezom 11 različitih alela HLA-Cw.

U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom najčešći alel je Cw*0602 (38,14%) što je visoko statistički značajno u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p<0,00001$), dok je u odnosu na psorijatičare s negativnom obiteljskom anamnezom razlika statistički

značajna samo bez korekcije vrijednosti p. Po zastupljenosti slijede aleli *0701 (12,71%), *0401 (11,02%) i *0202 (10,17%), dok je učestalost svih ostalih alela manja od 10%. Smanjena učestalost alela *0401 u bolesnika u odnosu na kontrolu statistički je značajna samo bez korekcije vrijednosti p.

Tablica 21. Učestalost alela Cw u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze*

Cw*	PSORIJAZA + (N=118)		PSORIJAZA - (N=118)		p*	p**	p***
	n	%	n	%			
0102/03	1	0,85	4	3,39	NS	NS	NS
0202	12	10,17	13	11,02	NS	NS	NS
0302/04	9	7,63	18	15,25	NS	NS	NS
0401	13	11,02	14	11,86	(0,03)	NS	NS
0501	6	5,08	3	2,54	NS	(0,02)	NS
0602	45	38,14	24	20,34	<0,00001 RR=5,72	(0,006)	(0,004)
0701	15	12,71	6	5,08	NS	0,001	NS
0801/02	1	0,85	1	0,85	NS	NS	NS
1202/04	2	1,69	5	4,24	NS	NS	NS
1301	0	0	2	1,69	NS	NS	NS
1402	1	0,85	0	0	NS	NS	NS
1502	0	0	0	0	NS	NS	NS
1601/02	0	0	0	0	NS	NS	NS
1701/02	0	0	2	1,69	NS	NS	NS
1801	0	0	0	0	NS	NS	NS
x	13	11,02	26	22,09	-	-	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 4; N - ukupan broj istraživanih alela
n - broj otkrivenih alela; p* - P+ vs kontrola; p** - P- vs kontrola; p*** - P+ vs P-
vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela Cw (15); ako je i nakon korekcije
vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p
() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

I u skupini s negativnom obiteljskom anamnezom najčešći alel je Cw*0602 (20,34%), što je statistički značajno u usporedbi s kontrolom, ali samo bez korekcije vrijednosti p. Po učestalosti slijede aleli *0302 (15,25%), *0401 (11,86%) i *0202 (11,02%), dok je učestalost svih ostalih alela manja od 5%. Smanjena učestalost alela *0701 u psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom u usporedbi s kontrolom statistički je značajna ($p=0,001$). Bez korekcije vrijednosti p statistički je značajno rjeđe u bolesnika otkriven i alel Cw*0501.

4.5. UČESTALOST GENA RAZREDA II HLA U PSORIJATIČARA S POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM ANAMNEZOM PSORIJAZE

Učestalost gena razreda II sustava HLA istražena je u 55 psorijatičara s pozitivnom i 57 psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze.

4.5.1. UČESTALOST ALELA LOKUSA DRB1

Aleli lokusa DRB1 određeni su ponajprije tipizacijom širih specifičnosti, a potom je uslijedila podtipizacija za alele skupina DR1, DR2, DR4 i Drw52.

4.5.1.1. Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela DRB1

Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela DRB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom prikazani su u tablici 22. U skupini s pozitivnom obiteljskom anamnezom otkriveno je 9 različitih, a u psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom 10 različitih alela DRB1.

U obje skupine najučestaliji alel je DRB1*07, nazočan u 26,37% bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom i 19,30% bolesnika s negativnom obiteljskom anamnezom. Razlika u učestalosti tog alela između dvije skupine bolesnika nije statistički značajna. Međutim, razlika je visoko statistički značajna kada se usporede psorijatičari s pozitivnom obiteljskom anamnezom i kontrolni ispitanici ($p=0,00004$). Povećana učestalost alela *07 u skupini s negativnom obiteljskom anamnezom u odnosu na kontrolu statistički je značajna samo bez korekcije vrijednosti p .

Tablica 22. Učestalost alela DRB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze*

DRB1	PSORIJAZA + (N=110)		PSORIJAZA – (N=114)		p *	p**	RR
	n	%	n	%			
01	12	10,91	10	8,87	NS	NS	-
02	15	13,46	22	19,30	NS	NS	-
03	7	6,36	12	10,53	NS	NS	-
04	8	7,27	7	6,14	NS	NS	-
11	17	15,45	15	13,16	NS	NS	-
12	0	0	2	1,75	NS	NS	-
13	9	8,18	15	13,16	NS	NS	-
14	0	0	4	3,51	NS	NS	-
07	29	26,37	22	19,30	0,00004	(0,0127)	3,38
08	4	3,64	0	0	NS	NS	-
09	0	0	0	0	NS	NS	-
10	5	4,55	1	0,88	NS	NS	-
x	4	3,64	4	3,51	NS	NS	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 5

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p* - P+ vs kontrola; p** - P- vs kontrola; NS - bez statističke značajnosti

vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DRB1 (12); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p

U skupini s pozitivnom obiteljskom anamnezom po zastupljenosti slijede aleli DRB1*11 (15,45%), *02 (13,46%) i *01 (10,91%). Učestalost svih ostalih alela manja je od 10%.

U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom jednaku učestalost imaju aleli DRB1*07 i *02 (19,30%), te aleli DRB1*13 i *11 (13,16%) koji su drugi po zastupljenosti u toj skupini. Svi ostali aleli otkriveni su s učestalošću manjom od 10%.

4.5.1.2. Rezultati podtipizacije alela DRB1

Rezultati podtipizacije alela skupine DR1, DR2, DR4 i Drw52 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom prikazani su u tablici 23.

U skupini s pozitivnom obiteljskom anamnezom najčešći alel je DRB1*0101, jedini podtip alela DRB1*01, a ujedno i jedini s učestalošću većom od 10%. U skupini s negativnom obiteljskom anamnezom najzastupljeniji alel je DRB1*0301 i jedini s učestalošću iznad 10%. Svi ostali aleli u obje skupine nazočni su u manje od 10% bolesnika.

Niti za jedan alel razlike u učestalosti ne dosežu statističku značajnost kada se skupine usporede međusobno odnosno s kontrolom.

Tablica 23. Učestalost alela DRB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze - rezultati podtipizacije skupine DRB1*01, DRB1*02, DRB1*04 i DRw52

DRB1*	PSORIJAZA + (N=110)		PSORIJAZA - (N=114)	
	n	%	n	%
0101	12	10,91	10	8,77
1501	9	8,18	10	8,77
1502	1	0,91	1	0,88
1601	4	3,64	9	7,89
1602	1	0,91	2	1,75
0301	7	6,36	12	10,53
0401	0	0	1	0,88
0402	3	2,73	1	0,88
0403	3	2,73	2	1,75
0405	2	1,82	0	0
0406	0	0	2	1,75
0407	0	0	1	0,88
1101	8	7,27	10	8,77
1102	1	0,91	0	0
1104	8	7,27	5	4,39
1201	0	0	2	1,75
1301	7	6,36	10	8,77
1302	0	0	4	3,51
1303	2	1,82	1	0,88
1401	0	0	1	0,88
1403	0	0	1	0,88
1406	0	0	2	1,75
0801	2	1,82	0	0
0802	2	1,82	0	0

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

4.5.2. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DQ

Određivanje učestalosti alela lokusa DQ uključuje tipizaciju alela DQA1 i DQB1

4.5.2.1. Učestalost alela DQA1

Tablica 24. Učestalost alela DQA1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze*

DQA1*	PSORIJAZA + (N=112)		PSORIJAZA - (N=114)		p *	p**
	n	%	n	%		
0101	17	15,18	16	14,04	NS	NS
0102	17	15,18	29	25,44	(0,032)	NS
0103	5	4,46	5	4,39	NS	NS
0201	29	25,89	22	19,30	0,00003 RR=3,44	(0,009)
1301	9	8,04	7	6,14	NS	NS
0401	4	3,57	1	0,88	NS	NS
0501	26	23,21	30	26,32	NS	NS
0601	0	0	0	0	NS	NS
x	5	4,46	4	3,51	-	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 14

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p* - P+ vs kontrola; p** - P- vs kontrola

vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DQA1 (8); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

RR - relativni rizik, NS - bez statističke značajnosti

Rezultati tipizacije alela DQA1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom prikazani su u tablici 24. U obje skupine bolesnika, od 8 određivanih alela DQA1, nije otkriven jedino alel DQA1*0601 koji je najrjeđi i u kontrolnih ispitanika (0,7%).

U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom najzastupljeniji alel je DQA1*0201 (25,89%). To odstupanje statistički je značajno u usporedbi s kontrolom ($p=0,00003$). Drugi po učestalosti je alel *0501 (23,21%), slijede aleli *0101 i *0102 s učestalošću od 15,18%, dok su svi ostali aleli nazočni u manje od 10% ispitanika. Snižena učestalost alela *0102 u odnosu na kontrolu statistički je značajna samo bez korekcije vrijednosti p .

U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom najčešći alel je DQA1*0501 (26,32%), potom slijedi *0102 (25,44%), *0201 (19,30%), te *0101 (14,04%). Statistički značajno veću učestalost u usporedbi s kontrolom pokazuje alel *0201, ali samo bez korekcije vrijednosti p .

4.5.2.2. Učestalost alela DQB1

Od 14 određivanih alela DQB1, u obje skupine bolesnika nije otkriven jedino alel DQB1*0402 (tablica 25). U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom nisu također nađeni niti aleli *0503, *0504, *0604 i *0605.

U obje skupine najčešći alel je DQB1*0201 (25,0% u Psorijaza+, 28,07% u Psorijaza-). U usporedbi s kontrolom razlika je statistički značajna za skupinu psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom ($p=0,0015$), dok je za skupinu psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom odstupanje statistički značajno samo bez korekcije vrijednosti p .

Tablica 25. Učestalost alela DQB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom

obiteljskom anamnezom psorijaze*

DQB1*	PSORIJAZA + (N=112)		PSORIJAZA - (N=114)		p *	p**	p***
	n	%	n	%			
0501	17	15,18	11	9,65	NS	NS	NS
0502	8	7,14	11	9,65	NS	NS	NS
0503	0	0	4	3,51	(0,035)	NS	NS
0504	0	0	1	0,88	NS	NS	NS
0602	17	15,18	11	9,65	NS	NS	NS
0603	17	15,18	6	5,26	(0,019)	NS	(0,025)
0604	0	0	5	4,39	NS	NS	NS
0605	0	0	1	0,88	NS	NS	NS
0201	28	25,0	32	28,07	(0,012)	0,0015 RR=2,51	NS
0301	21	18,75	18	15,79	NS	NS	NS
0302	7	15,18	7	6,14	NS	NS	NS
0303	9	8,04	2	1,75	0,003 RR=6,84	NS	NS
0401	4	3,57	1	0,88	NS	NS	NS
0402	0	0	0	0	NS	NS	NS
x	4	3,57	4	3,51	-	-	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 14

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p* - P+ vs kontrola; p** - P- vs kontrola; p***- P+ vs P-

vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DQB1 (14); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom drugi po zastupljenosti je alel *0301 (18,75%), a potom s jednakom učestalošću slijede aleli *0501, *0602 i *0603 (15,18%). Statistički značajno veću učestalost u odnosu na kontrolu pokazuje alel *0303

($p=0,003$). Bez korekcije vrijednosti p , statistički značajno manju učestalost ima alel *0503, a statistički značajno veću alel *0603 kada se uspoređi s kontrolnom skupinom.

U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom uz alel *0201, još jedino alel *0301 pokazuje nešto veću učestalost (15,79%), a svi ostali aleli DQB1 imaju učestalost manju od 10%.

Ako međusobno usporedimo skupine s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom jedina uočena statistički značajna razlika je povećana učestalost alela *0603 u bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom, međutim značajnost se gubi nakon korekcije vrijednosti p .

4.5.3. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DPB1

Rezultati tipizacije alela DPB1 u bolesnika s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom prikazani su u tablici 26.

Od 18 određivanih alela, u bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom otkriveno je 11 različitih alela, a u skupini s negativnom obiteljskom anamnezom 12 različitih alela. Najčešći alel u obje skupine je *0401 s učestalošću oko 30%, dok svi ostali aleli imaju učestalost manju od 20%. U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom po zastupljenosti slijede aleli *0402 (15,38%), *0201 (11,54%) i *0301 (10,26%), dok su ostali aleli nazočni samo sporadično. I u drugoj skupini bolesnika situacija je slična, te su aleli *0402 (14,44%), *0201 (13,33%) i *0301 (8,89%) nešto češći, dok su preostali aleli nazočni u manje od 5% bolesnika.

Usporedbom istraživanih skupina bolesnika s kontrolom, odnosno međusobno, nisu nađene statistički značajne razlike u učestalosti alela DPB1.

Tablica 26. Učestalost alela DPB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze

DPB1*	PSORIJAZA + (N=78)		PSORIJAZA - (N=90)	
	n	%	n	%
0101	4	5,13	3	3,33
0201	9	11,54	12	13,33
0202	2	2,56	0	0
0301	8	10,26	8	8,89
0401	23	29,49	28	31,11
0402	12	15,38	13	14,44
0501	0	0	0	0
0601	0	0	3	3,33
0801	0	0	1	1,11
0901	5	6,41	2	2,22
1001	2	2,56	1	1,11
1101	1	1,28	0	0
1301	2	2,56	0	0
1401	0	0	3	3,33
1501	0	0	0	0
1601	0	0	0	0
1701	1	1,28	1	1,11
1801	0	0	1	1,11
x	9	11,54	14	15,56

N - ukupan broj istraživanih alela

n - broj otkrivenih alela

4.5.4. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA HLA-DRB1-DQA1-DQB1 U

PSORIJATIČARA S POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM ANAMNEZOM

Učestalost trilokusnih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom prikazana je u tablici 27

U bolesnika s pozitivnom obiteljskom anamnezom otkrivena su 23 različita haplotipa, od kojih 5 samo jedanput. U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom nađena je 31 različita haplotipska sveza, od čega ih je 16 otkriveno samo jedanput.

U obje skupine najčešći haplotip je DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 nazočan u oko 19% bolesnika. Odstupanje je statistički značajno za obje skupine bolesnika u usporedbi s kontrolom, ali samo bez korekcije vrijednosti p.

U skupini s pozitivnom obiteljskom anamnezom po zastupljenosti slijedi sveza DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501 (11,32%), a potom haplotipovi DRB1*1101-DQA1*0501-DQB1*0301, DRB1*1104 -DQA1*0501-DQB1*0301 i DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 s učestalošću 7,55%. Bez korekcije vrijednosti p, statistički je značajno veća učestalost haplotipske sveze DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom psorijaze nego u kontroli.

Tablica 27. Učestalost haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze*

DRB1-DQA1-DQB1	PSORIJAZA+		PSORIJAZA-		p	p*
	(N=106)		(N=110)			
	n	%	n	%		
0101-0101-0501	12	11,32	10	9,09	NS	NS
1501-0102-0502	2	1,89	1	0,91	NS	NS
1501-0102-0602	7	6,60	9	8,18	NS	NS
1502-0102-0502	1	0,94	0	0	NS	NS
1502-0102-0504	0	0	1	0,91	NS	NS
1601-0101-0502	0	0	1	0,91	NS	NS
1601-0102-0502	4	3,77	7	6,36	NS	NS
1601-0102-0602	0	0	1	0,91	NS	NS
1602-0102-0502	1	0,94	2	1,82	NS	NS
0301-0501-0201	6	5,66	12	10,91	NS	NS
0301-0501-0303	1	0,94	0	0	NS	NS
0401-0301-0302	0	0	1	0,91	NS	NS
0402-0301-0301	1	0,94	0	0	NS	NS
0402-0301-0302	2	1,89	1	0,91	NS	NS
0403-0301-0302	3	2,83	2	1,82	NS	NS
0405-0301-0302	2	1,89	0	0	NS	NS
0406-0301-0302	0	0	2	1,82	NS	NS
0407-0301-0302	0	0	1	0,91	NS	NS
1101-0501-0301	8	7,55	10	9,09	NS	NS
1102-0501-0301	1	0,94	0	0	NS	NS
1104-0501-0301	8	7,55	5	4,55	NS	NS
1201-0501-0301	0	0	2	1,82	NS	NS
1301-0102-0602	0	0	1	0,91	NS	NS
1301-0102-0603	2	1,89	1	0,91	NS	NS
1301-0102-0604	0	0	1	0,91	NS	NS
1301-0102-0605	0	0	1	0,91	NS	NS
1301-0103-0603	5	4,72	5	4,55	NS	NS

Nastavak tablice 27.

1301-0401-0401	0	0	1	0,91	NS	NS
1302-0102-0604	0	0	4	3,64	NS	NS
1303-0501-0301	2	1,89	1	0,91	NS	NS
1401-0101-0503	0	0	2	1,82	NS	NS
1403-0101-0503	0	0	1	0,91	NS	NS
1406-0101-0503	0	0	1	0,91	NS	NS
0701-0201-0201	21	19,81	20	18,18	(0,001)	(0,003)
0701-0201-0303	8	7,55	2	1,82	(0,006)	NS
0801-0401-0401	2	1,89	0	0	NS	NS
0802-0401-0401	2	1,89	0	0	NS	NS
1001-0101-0501	5	4,72	1	0,91	NS	NS

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 17

N - ukupan broj istraživanih haplotipskih sveza; n - broj otkrivenih haplotipskih sveza

p - P+ vs kontrola; p* - P- vs kontrola

vrijednost p je korigirana brojem haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u populaciji (53); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorrigirana vrijednost p; NS - bez statističke značajnosti;

U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom drugi po zastupljenosti je haplotip DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 (10,91%), slijede DRB1*1101-DQA1*0501-DQB1*0301 i DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501 s učestalošću 9,09%, a potom DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 (8,18%) i DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 (6,36%). Učestalost svih ostalih haplotipova manja je od 5%.

4.5.5. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA HLA-DRB1-DQA1-DQB1 U

PSORIJATIČARA S POZITIVNOM I NEGATIVNOM OBITELJSKOM ANAMNEZOM KOJI NOSE ALEL DRB1*0701

Rezultati učestalosti haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom koji nose alel DRB1*0701 prikazani su u tablici 28.

Tablica 28. Učestalost haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom nositelja alela DRB1*0701

DRB1-DQA1-DQB1	PSORIJAZA + (N=29)		PSORIJAZA – (N=22)	
	n	%	n	%
0701-0201-0201	21	72,41	20	90,91
0701-0201-0303	8	27,59	2	9,1

N - ukupan broj istraživanih haplotipskih sveza

n - broj otkrivenih haplotipskih sveza

U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom istraženo je 29, a u psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom 22 haplotipa. U skupini s pozitivnom obiteljskom anamnezom 72,41% bolesnika nosi haplotip DRB1*0701-DAQ1*0201-DQB1*0201, dok njih 27,59% ima haplotip DRB1*0701-DAQ1*0201-DQB1*0303. U bolesnika s negativnom obiteljskom anamnezom, u njih 90,91% otkriven je haplotip DRB1*0701-DAQ1*0201-DQB1*0201, a u 9,1% haplotip DRB1*0701-DAQ1*0201-DQB1*0303. Razlike u učestalosti haplotipskih sveza između istraživanih skupina bolesnika, te u usporedbi s kontrolom nisu statistički značajne.

4.6. UČESTALOST ANTIGENA I GENA RAZREDA I SUSTAVA HLA U

PSORIJATIČARA TIP A I I II

Bolesnici su grupirani u skupine na temelju anamnestičkih podataka o obiteljskom pojavljivanju psorijaze, te o dobi početka bolesti. Psorijatičari s pozitivnom obiteljskom anamnezom i početkom bolesti prije 30 godine života čine skupinu psorijaza tipa I, a bolesnici bez obiteljske anamneze o psorijazi u kojih je bolest započela nakon 40 godine života čine skupinu psorijaza tipa II.

4.6.1. UČESTALOST ANTIGENA HLA-A

Istraživanje učestalosti antigena HLA-A provedeno je u 53 psorijatičara tipa I i 28 psorijatičara tipa II (tablica 29).

U psorijatičara tipa I najzastupljeniji alel je A2 (60,38%), što je statistički značajno više nego u zdravih ispitanika, ali ta se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p. Po učestalosti slijede antigeni A1 (37,74%), A9 (24,53%) i A3 (20,75%), a zastupljenost svih ostalih antigena manja je od 15%.

U skupini psorijatičara tipa II redoslijed antigena po učestalosti sličan je kao u bolesnika tip I. Najčešći antigen je A2 (57,14%), a potom slijede A1 (35,71%) i A9 (17,86%). Učestalost svih antigena HLA-A, osim A11 i A28, veća je u psorijatičara tipa I nego u onih tipa II, međutim razlike nisu statistički značajne.

Tablica 29. Učestalost antigena HLA-A u psorijatičara tipa I i II*

HLA - A	PSORIJAZA tipa I (N=53)		PSORIJAZA tipa II (N=28)		p
	n	%	n	%	
1	20	37,74	10	35,71	NS
2	32	60,38	16	57,14	(0,04)
3	11	20,75	3	10,71	NS
9	13	24,53	5	17,86	NS
10	0	0	0	0	NS
11	3	5,67	2	7,14	NS
19	6	11,32	4	14,29	NS
25	0	0	0	0	NS
26	4	7,55	3	10,71	NS
28	3	5,67	4	14,29	NS
x	14	26,42	9	32,14	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 2

N - ukupan broj istraživanih antigena; n - broj otkrivenih antigena

p*- tip I vs kontrola; vrijednost p je korigirana brojem određivanih antigena HLA-A (10)

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

4.6.2. UČESTALOST ANTIGENA HLA-B

Rezultati tipizacije antigena HLA-B u psorijatičara tipa I i II prikazani su u tablici 30. Ispitivanje je provedeno u 52 bolesnika sa psorijazom tipa I i 28 bolesnika sa psorijazom tipa II.

U psorijatičara tipa I najčešći antigen je B17 (32,69%) što je statistički visoko značajno u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p=0,0003$), a u odnosu na psorijatičare tipa II razlika je statistički značajna samo bez korekcije vrijednosti p. Slijedeći po učestalosti je antigen B13

(28,85%), a zastupljenost svih preostalih antigena manja je od 15%. Povećana učestalost antigena B13 u psorijatičara tipa I statistički je visoko značajna u usporedbi s kontrolom ($p=0,00009$), dok se u odnosu na psorijatičare tipa II značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p .

U skupini tipa II najčešći antigeni su B8 (25,0%) i B35 (21,43%), a to su ujedno i jedini antigeni s učestalošću većom od 20%.

4.6.3. UČESTALOST ALELA HLA-Cw

Rezultati tipizacije alela HLA-Cw u bolesnika sa psorijazom tipa I i II prikazani su u tablici 31. Ispitivanje učestalosti alela Cw provedeno je u 54 psorijatičara tipa I i 28 psorijatičara tipa II.

Od 15 određivanih alela lokusa Cw, u bolesnika s psorijazom tipa I otkriveno je 10 različitih alela. Najveću učestalost pokazuje alel Cw*0602 (39,81%), što je visoko statistički značajno u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($p<0,00001$), a također i u odnosu na psorijatičare tipa II ($p=0,00003$). Slijedeći po zastupljenosti su aleli *0701 (12,04%), *0202 (11,11%) i *0401 (10,19%), a učestalost svih ostalih alela u ovoj skupini psorijatičara manja je od 5%. Smanjena učestalost alela *0401 u psorijatičara tipa I u usporedbi s kontrolom statistički je značajna bez korekcije vrijednosti p . Niža zastupljenost alela *0301 u psorijatičara tipa I u odnosu na psorijatičare tipa II također je statistički značajna, ali opet samo bez korekcije vrijednosti p .

Tablica 30. Učestalost antigena HLA-B u psorijatičara tipa I i II*

HLA - B	PSORIJAZA tip I (N=52)		PSORIJAZA tip II (N=28)		p*	p**
	n	%	n	%		
5	5	9,62	4	14,28	NS	NS
7	5	9,62	1	3,57	NS	NS
8	8	15,38	7	25,0	NS	NS
12	7	13,46	5	17,86	NS	NS
13	15	28,85	1	3,57	0,00009 RR=5,85	(0,007)
14	2	3,85	1	3,57	NS	NS
15	2	3,85	3	10,71	NS	NS
17	17	32,69	1	3,57	0,0003 RR=4,34	(0,003)
18	4	7,69	3	10,71	NS	NS
21	4	7,69	0	0	NS	NS
22	0	0	1	3,57	NS	NS
27	3	5,77	1	3,57	NS	NS
35	7	13,46	6	21,43	NS	NS
37	4	7,69	2	7,14	NS	NS
38	0	0	0	0	NS	NS
39	1	1,92	4	14,28	NS	NS
40	2	3,85	2	7,14	NS	NS
x	18	34,62	14	50,0	NS	NS

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 3

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p* - tip I vs kontrola; p** - tip I vs tip II

vrijednost p je korigirana brojem određivanih antigena HLA-B (19); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorrigirana vrijednost p

() - statistički značajna nekorrigirana vrijednost p
RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

Tablica 31. Učestalost alela Cw u psorijatičara tipa I i II*

Cw*	PV tip I (N=108)		PV tip II (N=56)		p*	p**	p***
	n	%	n	%			
0102/03	1	0,93	3	5,56	NS	NS	NS
0202	12	11,11	7	12,96	NS	NS	NS
0302/04	7	6,48	13	24,07	NS	0,003 RR=3,1 8	(0,04)
0401	11	10,19	7	12,96	(0,02)	NS	NS
0501	5	4,63	1	1,85	NS	NS	NS
0602	43	39,81	4	5,56	<0,00001 RR=6,14	NS	0,00003 RR=9,26
0701	13	12,04	3	3,70	NS	(0,03)	NS
0801/02	1	0,93	0	0	NS	NS	NS
1202/04	2	1,85	4	7,41	NS	NS	NS
1301	0	0,0	1	1,85	NS	NS	NS
1402	1	0,93	0	0	NS	NS	NS
1502	0	0	0	0	NS	NS	NS
1601/02	0	0	0	0	NS	NS	NS
1701/02	0	0	0	0	NS	NS	NS
x	12	11,11	13	24,07	-	-	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 4

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p* - tip I vs kontrola; p** - tip II vs kontrola; p*** - tip I vs tip II

vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela Cw (15); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

U skupini psorijatičara tipa II otkriveno je 9 različitih alela Cw. Najzastupljeniji alel je *0302 (24,07%), a to je ujedno i jedini s učestalošću većom od 20%. Razlika je statistički značajna u usporedbi s kontrolom (p=0,003), a u odnosu na psorijatičare tipa I značajnost

se gubi nakon korekcije vrijednosti p. Slijedeći po zastupljenosti su aleli *0202 i *0401 s učestalošću 12,96%, a učestalost ostalih alela manja je od 10%.

Smanjena učestalost alela *0602 u psorijatičara tipa II statistički je visoko značajna u usporedbi sa psorijatičarima tipa I ($p=0,00003$).

4.7. UČESTALOST GENA HLA RAZREDA II U PSORIJATIČARA TIP A I I II

Istraživanje učestalosti gena HLA razreda II provedeno je u skupini od 50 psorijatičara tipa I i 27 psorijatičara tipa II.

4.7.1. UČESTALOST ALELA LOKUSA DRB1

To ispitivanje uključuje tipizaciju šire specifičnosti alela DRB1, te užih specifičnosti gena skupine DR1, DR2, DR4 i Drw52.

4.7.1.1. Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela DRB1

Rezultati tipizacije šire specifičnosti alela DRB1 u psorijatičara tipa I i II prikazani su u tablici 32.

U skupini psorijatičara tip I najučestaliji alel je DRB1*07 (29,0%), što je statistički značajno češće nego u zdravih ispitanika ($p<0,00001$). U usporedbi sa skupinom psorijatičara tipa II, tip I pokazuje statistički značajno veću učestalost alela *07, ali ta se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p. Statistički značajno nižu učestalost u

psorijatičara tipa I ima alel *02, kako u odnosu na kontrolu, tako i u usporedbi s tipom II, ali opet samo bez korekcije vrijednosti p.

Tablica 32. Učestalost alela DRB1 u psorijatičara tipa I i II*

DRB1*	PSORIJAZA tip I (N=100)		PSORIJAZA tip II (N=54)		p *	p**	p***
	n	%	n	%			
01	12	12,0	6	11,11	NS	NS	NS
02	12	12,0	14	25,93	(0,036)	NS	(0,04)
03	6	6,0	7	12,96	NS	NS	NS
04	7	7,0	3	5,56	NS	NS	NS
11	13	13,0	9	16,67	NS	NS	NS
12	0	0	1	1,85	NS	NS	NS
13	8	8,0	6	11,11	NS	NS	NS
14	0	0	2	3,70	NS	NS	NS
07	29	29,0	5	9,26	0,00001 RR=3,86	NS	(0,009)
08	4	4,0	0	0	NS	NS	NS
09	0	0	0	0	NS	NS	NS
10	5	5,0	0	0	NS	NS	NS
x	4	4,0	1	1,85	-	-	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 5

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p* - tipl vs kontrola; p** - tipll vs kontrola; p*** - tipl vs tipll

vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DRB1 (12); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

U psorijatičara tipa II nisu nađeni aleli *08, *09 i *10, koji su najrjeđi i u skupini tipa I.

Najčešći alel u skupini tipa II je DRB1*02 (25,93%), a slijede aleli *11 (16,67%), *03 (12,96%), te *01 i *11 s učestalošću 11,11%. Povećana učestalost alela *02 u psorijatičara tipa II u usporedbi s tipom I statistički je značajna samo bez korekcije vrijednosti p.

4.7.1.2. Rezultati podtipizacije alela lokusa DRB1

Rezultati podtipizacije gena skupine DR1, DR2, DR4 i Drw52 u psorijatičara tipa I i II prikazani su u tablici 33.

Ovo istraživanje pokazalo je da razlike u učestalosti pojedinih podtipova između istraživanih skupina bolesnika ne dosežu statističku značajnost. Razlike u učestalosti pojedinih podtipova u bolesnika u usporedbi s kontrolom također nisu statistički značajne, osim za alel *1601 koji je statistički značajno rjeđi u psorijatičara tipa I nego u zdravih ispitanika, ali samo bez korekcije vrijednosti p.

4.7.2. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DQ

Ovo istraživanje uključuje tipizaciju alela lokusa DQA1 i DQB1.

4.7.2.1. Učestalost alela lokusa DQA1

Rezultati tipizacije alela DQA1 u psorijatičara tipa I i II prikazani su u tablici 34. U obje skupine bolesnika nije otkriven alel DQA1*0601, a u skupini tipa II niti alel *0401.

U skupini psorijatičara tipa I najzastupljeniji alel je *0201 (28,43%). Povećana učestalost tog alela visoko je statistički značajna u usporedbi s kontrolom ($p=0,00001$), dok se u odnosu na psorijatičare tipa II značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p. Alel *0102 statistički je značajno rjeđi u psorijatičara tipa I nego u skupini tipa II ($p=0,002$), a u usporedbi sa zdravim ispitanicima razlika je statistički značajna samo bez korekcije vrijednosti p.

Tablica 33. Učestalost alela DRB1 u psorijatičara tipa I i II - rezultati podtipizacije

skupine DRB1*01, DRB1*02, DRB1*04 i DRw52*

DRB1*	PSORIJAZA tip I (N=100)		PSORIJAZA tip II (N=54)		p*
	n	%	n	%	
0101	12	12,0	6	11,11	NS
1501	8	8,0	8	14,81	NS
1502	1	1,0	1	1,85	NS
1601	2	2,0	4	7,41	(0,02)
1602	1	1,0	1	1,85	NS
0301	6	6,0	7	12,96	NS
0401	0	0	0	0	NS
0402	3	3,0	1	1,85	NS
0403	3	3,0	1	1,85	NS
0405	1	1,0	0	0	NS
0406	0	0	1	1,85	NS
0407	0	0	0	0	NS
1101	7	7,0	7	12,96	NS
1104	6	6,0	2	3,70	NS
1201	0	0	1	1,85	NS
1301	6	6,0	4	7,41	NS
1302	0	0	2	3,70	NS
1303	2	2,0	0	0	NS
1401	0	0	1	1,85	NS
1403	0	0	1	1,85	NS
0801	2	2,0	0	0	NS
0802	2	2,0	0	0	NS

kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 13; N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela; p- tip I vs kontrola; vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DRB1 (42);

() - statistički značajna nekorrigirana vrijednost p;

NS-bez statističke značajnosti

U psorijatičara tipa II najzastupljeniji aleli su *0102 (35,19%) i *0501 (31,48%), a svi ostali aleli imaju učestalost manju od 15%.

Tablica 34. Učestalost alela DQA1 u psorijatičara tipa I i II*

DQA1*	PSORIJAZA tip I (N=102)		PSORIJAZA tip II (N=54)		p *	p**	p***
	n	%	n	%			
0101	17	16,67	8	12,96	NS	NS	NS
0102	13	12,75	19	35,19	(0,009)	NS	0,002 RR=0,27
0103	5	4,90	1	1,85	NS	NS	NS
0201	29	28,43	6	11,11	0,00001 RR=3,91	NS	(0,02)
0301	8	7,84	4	7,41	NS	NS	NS
0401	4	3,92	0	0	NS	NS	NS
0501	21	20,59	17	31,48	NS	NS	NS
0601	0	0	0	0	NS	NS	NS
x	5	4,90	1	1,85	-	-	-

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 14

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p*- tipI vs kontrola; p**- tipII vs kontrola; p***- tipI vs tipII

vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DQA1 (8); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

4.7.2.2. Učestalost alela lokusa DQB1

Rezultati tipizacije alela DQB1 u psorijatičara tipa I i II prikazani su u tablici 35.

Tablica 35. Učestalost alela DQB1 u psorijatičara tipa I i II*

DQB1*	PSORIJAZA tip I (N=102)		PSORIJAZA tip II (N=54)		p *	p**
	n	%	n	%		
0501	17	16,67	6	11,11	NS	NS
0502	6	5,88	6	11,11	NS	NS
0503	0	0	2	3,70	NS	NS
0504	0	0	1	1,85	NS	NS
0601	0	0	0	0	NS	NS
0602	6	5,88	8	12,96	NS	NS
0603	6	5,88	2	3,70	NS	NS
0604	0	0	3	5,56	NS	NS
0605	0	0	0	0	NS	NS
0201	27	26,47	11	20,37	(0,006)	NS
0301	17	16,67	10	18,52	NS	NS
0302	6	5,88	3	5,56	NS	NS
0303	9	8,82	1	1,85	0,0016 RR=7,58	NS
0401	4	3,92	0	0	NS	NS
0402	0	0	0	0	NS	NS
x	4	3,92	1	1,85	NS	NS

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 15

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p*- tipI vs kontrola; p**- tipII vs kontrola

vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DQB1 (15); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p

() - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

Najčešći alel u psorijatičara tipa I je *0201 (26,47%). U usporedbi sa zdravom populacijom razlika je visoko statistički značajna, međutim ta se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p. U skupini tipa I po zastupljenosti slijede aleli *0501 i *0301 s učestalošću 16,67%, dok preostali aleli imaju učestalost manju od 10%. Jedini alel DQB1 sa statistički značajno većom učestalošću u psorijatičara tipa I nego u kontrolnoj skupini je alel *0303 ($p=0,0016$).

U psorijatičara tipa II jedino alel *0201 ima učestalost veću od 20%, a zastupljenost svih ostalih alela manja je od te vrijednosti.

4.7.3. UČESTALOST ALELA LOKUSA HLA-DPB1

Rezultati tipizacije alela DPB1 u psorijatičara tipa I i II prikazani su u tablici 36. Od 18 mogućih alela, u psorijatičara tipa I otkriveno je 10 različitih alela DPB1, a u skupini tipa II 11 različitih alela.

Aleli *0501, *1501 i *1601 nisu otkriveni niti u jednoj skupini bolesnika, aleli *0601, *0801, *1401, *1701 i *1801 nađeni su jedino u psorijatičara tipa II, a aleli *0202, *1101 i *1301 samo u psorijatičara tipa I.

U obje skupine najčešći alel je DPB1*0401 (31,43% tip I odnosno 28,26% tip II). Potom slijedi *0402 s učestalošću od oko 15,0% u obje skupine bolesnika, te alel *0201 (12,86% tip I odnosno 15,22% tip II). Bez korekcije vrijednosti p, statistički je značajno veća učestalost alela *0901 u psorijatičara tipa I u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

Tablica 36. Učestalost alela DPB1 u psorijatičara tipa I i II*

DPB1*	PSORIJAZA tip I (N=70)		PSORIJAZA tip II (N=46)		p*
	n	%	n	%	
0101	4	5,71	2	4,35	NS
0201	9	12,86	7	15,22	NS
0202	2	2,86	0	0	NS
0301	6	8,57	2	4,35	NS
0401	22	31,43	13	28,26	NS
0402	10	14,29	7	15,22	NS
0501	0	0	0	0	NS
0601	0	0	2	4,35	NS
0801	0	0	1	2,17	NS
0901	5	7,14	1	2,17	(0,03)
1001	1	1,43	0	0	NS
1101	1	1,43	0	0	NS
1301	2	2,86	0	0	NS
1401	0	0	2	4,35	NS
1501	0	0	0	0	NS
1601	0	0	0	0	NS
1701	0	0	1	2,17	NS
1801	0	0	1	2,17	NS
x	8	11,43	7	15,22	NS

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 16

N - ukupan broj istraživanih alela; n - broj otkrivenih alela

p*- tip I vs kontrola; vrijednost p je korigirana brojem određivanih alela DPB1 (18); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p; () - statistički značajna nekorigirana vrijednost p

NS – bez statističke značajnosti

4.7.4. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA HLA-DRB1-DQA1-DQB1 U

PSORIJATIČARA TIPA I i II

Učestalost trilokusnih haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara tipa I i II prikazana je u tablici 37. U psorijatičara tipa I otkrivena su 22 različita haplotipa, od čega ih je 6 nađeno samo jedanput. U psorijatičara tipa II nađene su također 22 različite haplotipske sveze, od kojih je 14 ih otkriveno samo jedanput.

U skupini psorijatičara tipa I najčešći haplotip je DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (21,88%), a to je ujedno i jedini s učestalošću većom od 20%. Povećana učestalost tog haplotipa statistički je značajna u usporedbi sa zdravom populacijom ($p=0,0003$). Statistički je značajno viša i učestalost haplotipske sveze DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 u psorijatičara tipa I u odnosu na kontrolu, međutim ta se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p . Smanjena učestalost haplotipa DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 u psorijatičara tipa I u usporedbi sa zdravim ispitanicima statistički je značajna, ali opet samo bez korekcije vrijednosti p brojem haplotipova u populaciji.

U skupini psorijatičara tipa II najčešći haplotipovi su DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 i DRB1*1101-DQA1*0501-DQB1*0301 s učestalošću 13,21%. Povećana učestalost tih haplotipskih sveza nije statistički značajna ni u usporedbi s kontrolom niti u odnosu na psorijatičare tipa I.

Tablica 37. Učestalost haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara tipa I i II*

DRB1-DQA1-DQB1	PSORIJAZA tip I (N=96)		PSORIJAZA tip II (N=53)		p	p ¹
	n	%	n	%		
0101-0101-0501	12	12,5	6	11,32	NS	NS
1501-0102-0502	2	2,08	1	1,89	NS	NS
1501-0102-0602	6	6,25	7	13,21	NS	NS
1502-0102-0502	1	1,45	0	0	NS	NS
1502-0102-0504	0	0	1	1,89	NS	NS
1601-0101-0502	0	0	0	0	NS	NS
1601-0102-0502	2	2,08	4	7,54	(0,03)	NS
1601-0102-0602	0	0	0	0	NS	NS
1602-0102-0502	1	1,45	1	1,89	NS	NS
0301-0501-0201	5	5,21	7	13,21	NS	NS
0301-0501-0303	1	1,45	0	0	NS	NS
0401-0301-0302	0	0	0	0	NS	NS
0402-0301-0301	1	1,45	0	0	NS	NS
0402-0301-0302	2	2,08	1	1,89	NS	NS
0403-0301-0302	3	3,13	1	1,89	NS	NS
0405-0301-0302	1	1,45	0	0	NS	NS
0406-0301-0302	0	0	1	1,89	NS	NS
0407-0301-0302	0	0	0	0	NS	NS
1101-0501-0301	7	7,29	7	13,21	NS	NS
1102-0501-0301	0	0	0	0	NS	NS
1104-0501-0301	6	6,25	2	3,77	NS	NS
1201-0501-0301	0	0	1	1,89	NS	NS
1301-0102-0602	0	0	1	1,89	NS	NS
1301-0102-0603	1	1,45	1	1,89	NS	NS
1301-0102-0604	0	0	1	1,89	NS	NS
1301-0102-0605	0	0	0	0	NS	NS
1301-0103-0603	5	5,21	1	1,89	NS	NS
1301-0401-0401	0	0	0	0	NS	NS

Nastavak tablice 37.

1302-0102-0604	0	0	2	3,77	NS	NS
1303-0501-0301	2	2,08	0	0	NS	NS
1401-0101-0503	0	0	1	1,89	NS	NS
1403-0101-0503	0	0	1	1,89	NS	NS
1406-0101-0503	0	0	0	0	NS	NS
0701-0201-0201	21	21,88	4	7,54	0,0003 RR=3,61	(0,04)
0701-0201-0303	8	8,33	1	1,89	(0,003)	NS
0801-0401-0401	2	2,08	0	0	NS	NS
0802-0401-0401	2	2,08	0	0	NS	NS
1001-0101-0501	5	5,21	0	0	NS	NS

*kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 17

N - ukupan broj istraživanih haplotipskih sveza; n - broj otkrivenih haplotipskih sveza

p - tip I vs kontrola; p* - tip III vs kontrola; p¹ - tip I vs tip II; p² - tip II vs tip III

vrijednost p je korigirana brojem haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u populaciji (53); ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorrigirana vrijednost p; RR - relativni rizik; NS - bez statističke značajnosti

4.7.5. UČESTALOST HAPLOTIPSKIH SVEZA HLA-DRB1-DQA1-DQB1 U

PSORIJATIČARA TIPA I I II KOJI NOSE ALEL DRB1*0701

Rezultati ispitivanja učestalosti haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara tipa I i II koji nose alel DRB1*07 prikazani su u tablici 38.

Istraživane haplotipske sveze otkrivene su u 29 psorijatičara tipa I i u 5 psorijatičara tipa II. U obje skupine prevladava haplotip DRB1*0701-DAQ1*0201-DQB1*0201, s nazočnošću od 72,41% tipu I i 80,0% u tipu II. Drugi haplotip DRB1*0701-DAQ1*0201-DQB1*0303 nazočan je u mnogo manjem broju ispitanika: u tipu I bolesti 27,59%, a u tipu II 20,0% bolesnika ima taj haplotip. Razlike između istraživanih skupina bolesnika, te u usporedbi sa zdravim ispitanicima nisu statistički značajne.

Tablica 38. Učestalost haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara tipa I i II koji nose alel DRB1*07

DRB1-DQA1-DQB1	PSORIJAZA tip I (N=29)		PSORIJAZA tip II (N=5)	
	n	%	n	%
0701-0201-0201	21	72,41	4	80,0
0701-0201-0303	8	27,59	1	20,0

N - ukupan broj istraživanih haplotipskih sveza

n - broj otkrivenih haplotipskih sveza

4.8. UČESTALOST GENA HLA RAZREDA I i II i HAPLOTIPSKIH SVEZA DRB1- DQA1-DQB1 U PSORIJATIČARA S RANIM POČETKOM BOLESTI I ODSUTNOŠĆU OBITELJSKE ANAMNEZE PSORIJAZE

Analizom povezanosti gena sustava HLA s dobi početka bolesti utvrđeno je da se psorijatičari mogu podijeliti u dvije skupine, tj. tip I i tip II bolesti. Neki bolesnici, međutim, ne mogu se svrstati niti u jednu od navedenih skupina.

Tablica 39. prikazuje učestalost samo onih gena i haplotipa koji pokazuju statistički značajno višu učestalost u usporedbi s kontrolom. Dakle, kao što je iz tablice vidljivo, psorijatičari s početkom bolesti prije 30. godine života i odsutnošću obiteljske anamneze imaju značajno veću učestalost alela: Cw*0602 ($p < 10^{-4}$), DRB1*0701 ($p = 0,0004$), DQA1*0201 ($p = 0,0002$) i DQB1*0201 ($p = 0,0003$), i haplotipa DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 ($p = 0,00002$).

Tablica 39. Učestalost gena HLA i haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u psorijatičara s ranim početkom bolesti i negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze

HLA	BOLESNICI		KONTROLA		p	RR
	n	%	n	%		
Cw*0602	20	33,33	28	9,72	0,00001	4,64
DRB1*0701	16	27,59	27	9,57	0,0004	3,60
DQA1*0201	16	27,59	26	9,22	0,0002	3,75
DQB1*0201	20	33,33	32	13,44	0,0003	3,39
DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201	16	27,59	17	7,20	0,00002	5,29

n - broj otkrivenih gena i haplotipskih sveza

vrijednost p je korigirana brojem istraživanih gena i haplotipskih sveza DRB1-DQA1-DQB1 u populaciji; ako je i nakon korekcije vrijednost p ostala statistički značajna, u tablici je navedena nekorigirana vrijednost p; RR - relativni rizik

4.9. Učestalost alela Cw*0602 u psorijatičara s ranim i kasnim početkom psorijaze

Od 118 psorijatičara, njih 69 (58,47%) nosi alela Cw*0602, a njih 49 (41,53%) ima neki drugi alel Cw (tablica 40). Iz tablice je vidljivo da je čak u 63 (91,30%) psorijatičara koji nose alel Cw*0602 bolest započela u ranoj životnoj dobi, odnosno prije 30 godine života, dok je samo u njih 6 (8,7%) psorijaza započela iza 40 godine života. Jačina povezanosti izražena vrijednošću relativnog rizika iznosi čak 43,5 za psorijatičare koji nose alel Cw*0602 i oboljevaju prije 30. godine života.

U skupini psorijatičara koji nemaju alel Cw*0602 bio je gotovo jednak broj bolesnika koji oboljeva prije 30. odnosno nakon 40. godine života.

Tablica 40. Učestalost alela Cw*0602 u bolesnika s ranim i kasnim početkom psorijaze

Bolesnici (N=118)	Godine (< 30 g.)		Godine (> 40 g.)	
	N	%	N	%
Cw*0602 nazočan (N=69)	63	(91,30)	6	(8,7)
Cw*0602 ne nazočan (N=49)	22	(44,89)	27	(53,10)
RR	43,5		0,39	

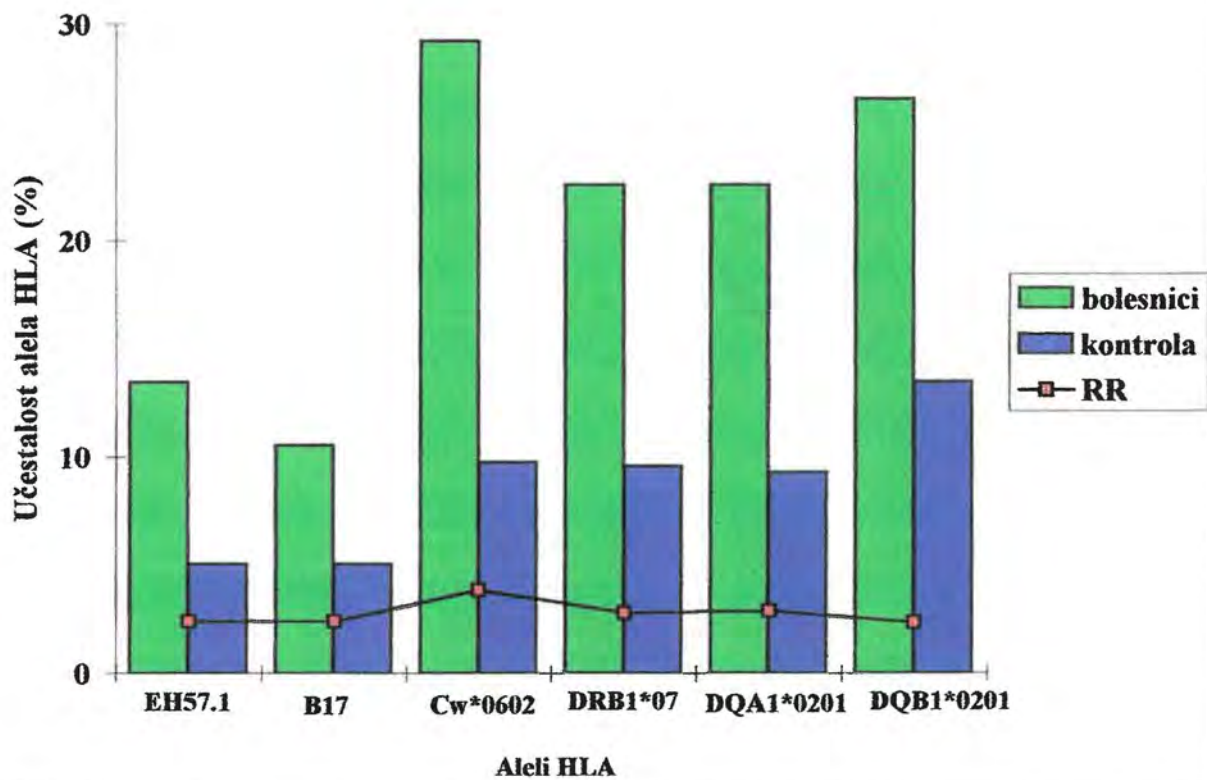
N - broj bolesnika; RR - relativni rizik kontrolne vrijednosti prikazane su u tablici 4

4.10. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara i kontrolnih ispitanika

Populacijska istraživanja otkrila su da psorijatičari tipa I imaju povišenu učestalost visoko konzerviranog haplotipa EH-57.1, tj. Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 (30a). Povezanost psorijaze s konzerviranim haplotipom pokazuje da u patogenezi bolesti ključnu ulogu imaju i geni razreda I i razreda II. Stoga smo i u naših bolesnika odredili učestalost konzerviranog haplotipa EH57.1, odnosno pojedinih alela unutar tog haplotipa. Budući da je u naših bolesnika statistički značajno povećana učestalost alela DQB1*0201 umjesto DQB1*0303, te haplotipa DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201, visoko rizični produženi haplotip glasi: Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (slika 6).

Kao što je vidljivo iz slike 6, povišena učestalost produženog haplotipa Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 u naših bolesnika nije statistički značajna u usporedbi sa zdravom populacijom (12,17% vs 4,95). Međutim, značajno je viša učestalost kraja razreda II produženog haplotipa, tj. DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201, u usporedbi s kontrolom (18,98% vs 7,20%; $p=0,0003$). Isto tako, i svi aleli razreda II produženog

Slika 6. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara i kontrolnih ispitanika



haplotipa, statistički su značajno povišeni u usporedbi s kontrolom (DRB1*07- 22,57% vs 9,57%, $p=0,00008$; DQA1*0201- 22,57% vs 9,25%, $p=0,00005$; DQB1*0201- 26,55% vs 13,44%, $p=0,0006$)

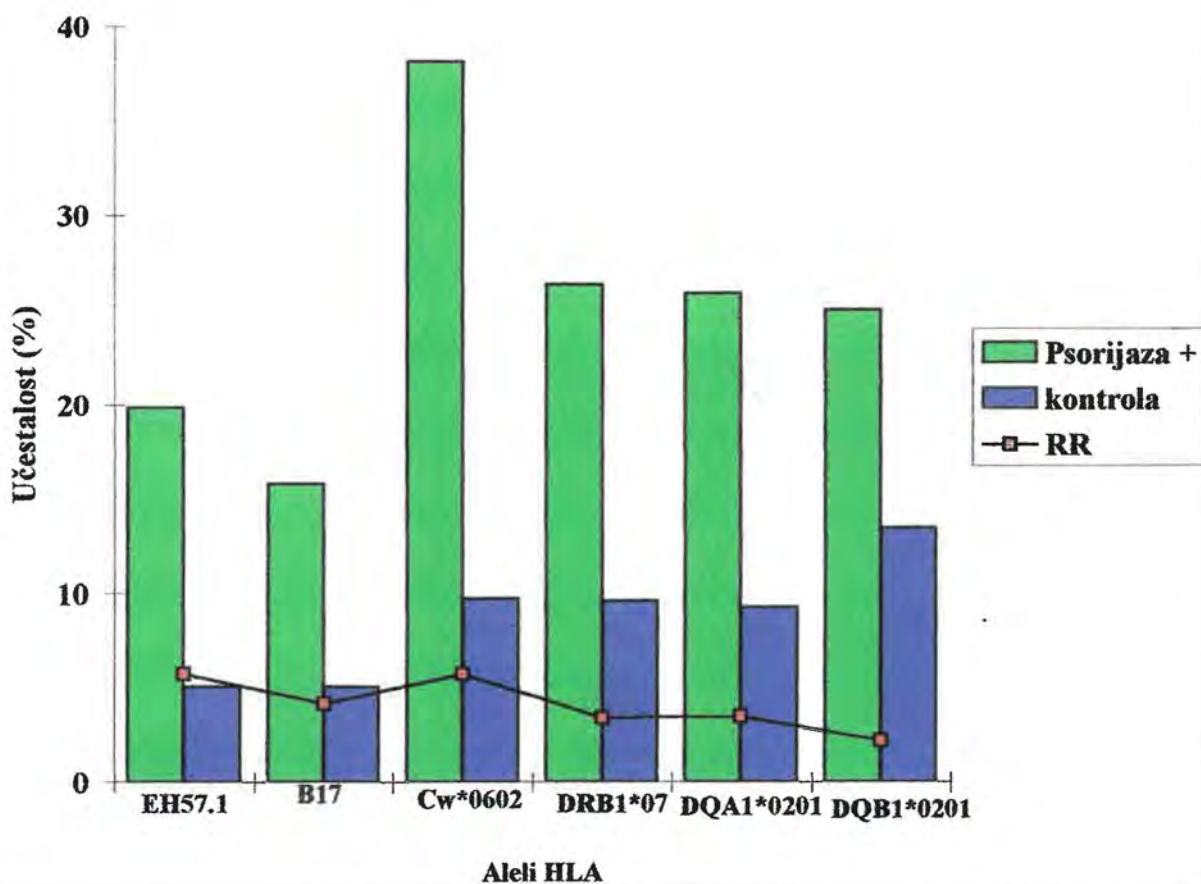
Među alelima razreda I unutar produženog haplotipa, statistički značajno veću učestalost u bolesnika pokazuje jedino alel Cw*0602 (29,24 vs 9,72; $p<0,00001$), dok je povišena učestalost antigena B17 statistički značajna samo prije korekcije vrijednosti p (10,53% vs 5,04%).

4.11. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara s pozitivnom i negativnom obiteljskom anamnezom

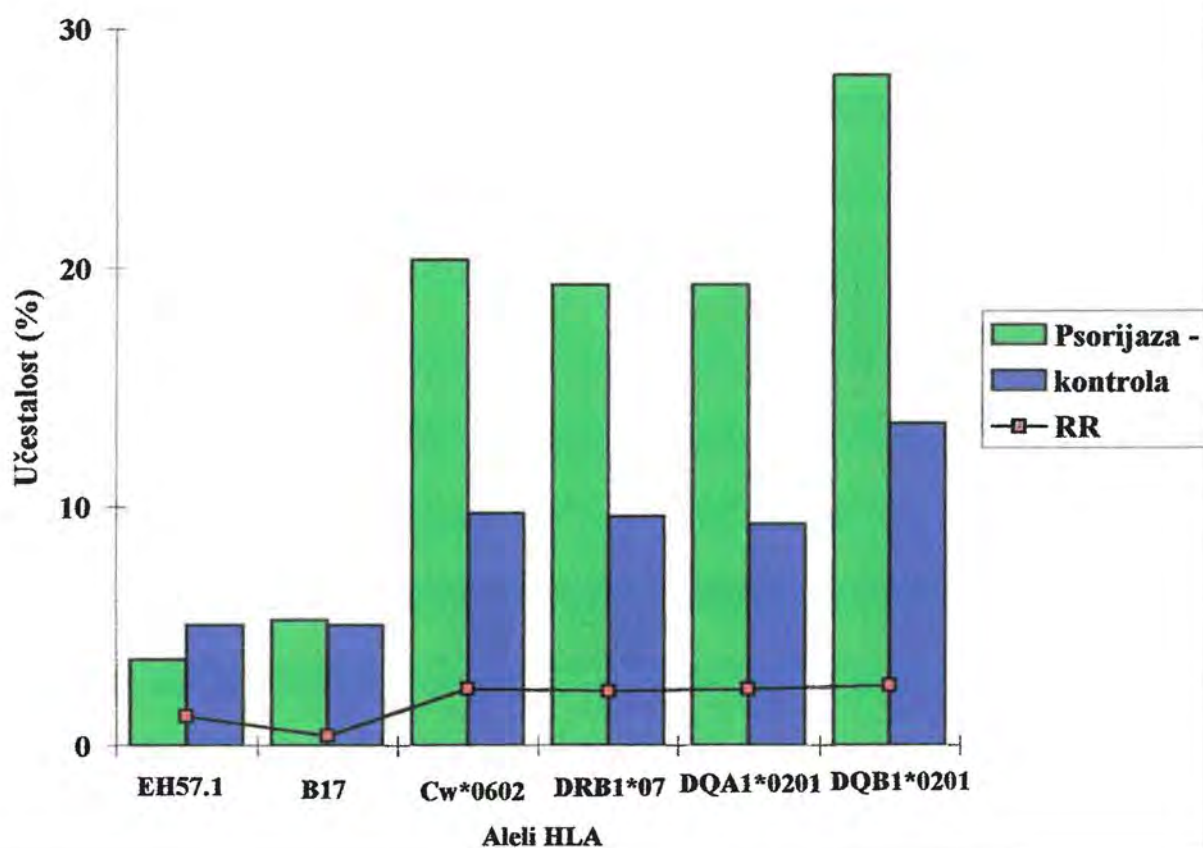
U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom učestalost produženog haplotipa Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 statistički je značajno povišena u usporedbi s kontrolom (21,05% vs 4,95%; $p=0,004$) - (slika 7). Međutim, statistički značajno povišena učestalost kraja razreda II produženog haplotipa, tj. DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 gubi se nakon korekcije vrijednosti p (19,81% vs 7,20%). Svi aleli razreda I i II unutar produženog haplotipa, osim alela DQB1*0201, imaju statistički značajno višu učestalost u usporedbi s kontrolom.

U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom učestalost produženog haplotipa gotovo je ista kao u kontrolnoj skupini (3,44% vs 4,95%) - (slika 8). Povišena učestalost pojedinih alela razreda II (DRB1*07 i DQA1*0201) u produženom haplotipu statistički je značajna samo bez korekcije vrijednosti p. Međutim, povišena učestalost alela DQB1*0201 u istih bolesnika (28,07% vs 13,44%) statistički je značajna i nakon korekcije vrijednosti p ($p=0,001$)

Slika 7. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom i kontrolnih ispitanika



Slika 8. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom i kontrolnih ispitanika



Među alelima razreda I produženog haplotipa, statistički je značajno povišen jedino alel Cw*0602 (20,34% vs 9,72%), i to samo bez korekcije vrijednosti p. Učestalost antigena B17 istovjetna je u bolesnika kao i u kontrolnih ispitanika (5,26% vs 5,04%).

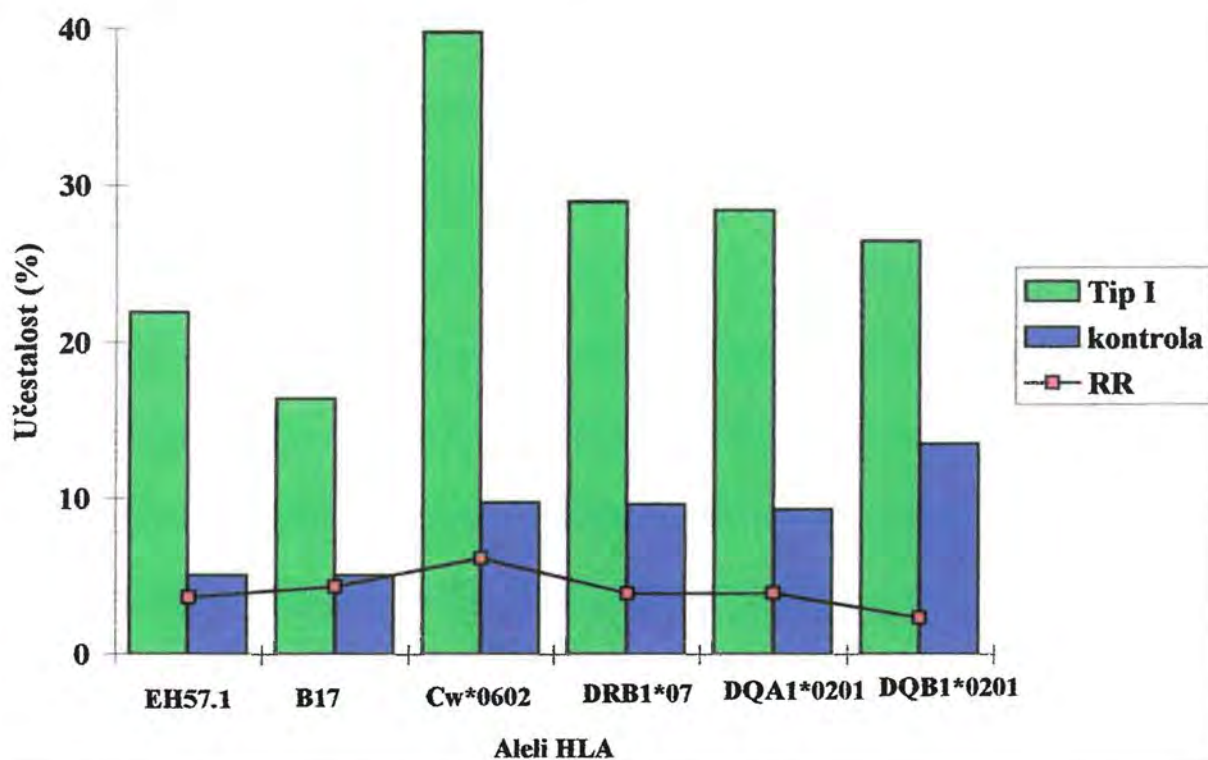
4.12. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara tipa I i II

U psorijatičara tipa I otkrivena je statistički značajno povišena učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 (23,08% vs 4,95%; $p=0,002$), kao i kraja razreda II haplotipa, DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201, u usporedbi s kontrolnom skupinom (21,88% vs 7,20%; $p=0,0003$) - (slika 9). Isto je tako statistički značajno viša učestalost pojedinih alela razreda II koji čine produženi haplotip (DRB1*07- 29,0% vs 9,57%; $p<0,00001$, DQA1*0201- 28,43% vs 9,25%; $p<0,00001$). Statistički značajno povišena učestalost alela DQB1*0201 (26,47% vs 13,44%) gubi se nakon korekcije vrijednosti p. Međutim, učestalost alela DQB1*0303 je statistički značajno povišena u psorijatičara tipa I u odnosu na kontrolu (8,82% vs 1,26%; $p=0,0016$), dok je povišena zastupljenost haplotipa DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0303 u istih bolesnika (8,33% vs 1,27%) statistički značajna samo bez korekcije vrijednosti p.

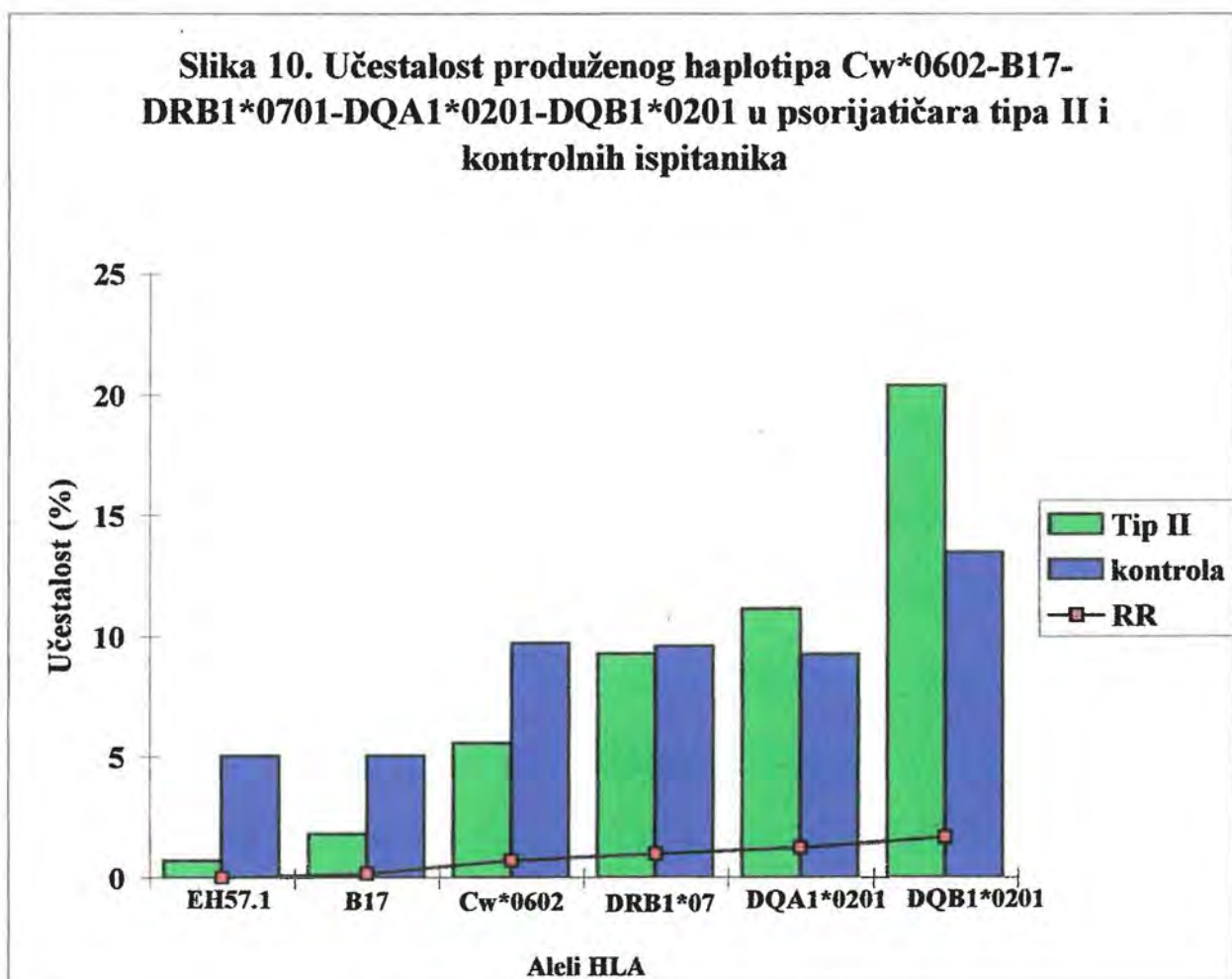
I oba alela razreda I produženog haplotipa pokazuju statistički visoko značajno povišenu učestalost u usporedbi sa zdravim ispitanicima (Cw*0602- 39,21% vs 9,72%, $p<0,00001$, B17- 16,35% vs 5,04; $p=0,0003$).

U psorijatičara tipa II nije otkriven niti jedan nositelj produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 (slika 10). Kraj razreda II produženog haplotipa, DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201, ima isti broj bolesnika i zdravih osoba (7,54% vs 7,20%).

Slika 9. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara tipa I i kontrolnih ispitanika



Slika 10. Učestalost produženog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 u psorijatičara tipa II i kontrolnih ispitanika



5. RASPRAVA

Temeljna zadaća imunološkog sustava je pokretanje učinkovitog imunološkog odgovora na tuđe antigene i uspostavljanje imunološke nereaktivnosti, tj. tolerancije, na vlastite antigene. Međutim, ako imunološki sustav reagira na vlastite antigene, nastaje autoagresivna bolest.

Spoznaje o temeljnoj ulozi molekula HLA u imunološkim zbivanjima prerade i predočavanja antigena imunološkom sustavu ukazuje na njihovu moguću ulogu u imunološkim reakcijama protiv vlastitih antigena. Naime, sve brojniji su dokazi da je nastanak različitih autoimunih bolesti rezultat istovjetnih imunoloških mehanizama (126).

Na temelju dosadašnjih spoznaja pretpostavlja se da psorijaza nastaje međusobnim ispreplitanjem genetskih i okolišnih čimbenika. Sve je više dokaza o ključnoj ulozi imunološkog sustava u patogenezi bolesti, na što ukazuje jaka povezanost s pojedinim genima sustava HLA, nazočnost aktiviranih limfocita T u dermalnom infiltratu, te učinkovitost immunosupresivnih sredstava u liječenju psorijaze. Međutim, za sada nije jasno da li psorijaza nastaje kao rezultat imunološke reakcije na neki do sada neotkriveni epidermalni, dermalni ili cirkulirajući imunogeni peptid (npr. β hemolitički streptokok), uslijed aktivacije autoreaktivnih limfocita T ili se pak radi o poremećaju na nekim drugim razinama imunološkog odgovora (94).

Sustav HLA nedvojbeno je jedan od važnijih, ako ne i najvažniji genetski čimbenik u razvoju psorijaze. Povezanost psorijaze s genima sustava HLA ukazuje da predočavanje peptida limfocitima T ima značajnu ulogu u patogenezi bolesti. Naime, geni HLA izravno određuju koji će peptidni epitop antigena biti predočen imunološkom sustavu čime izravno reguliraju imunološku reakciju (56).

Danas važeća teorija predmnijeva primarnu ulogu gena HLA-Cw*0602 u nastanku psorijaze, napose za tip I bolesti. To je ujedno i jedina bolest za koju je utvrđena povezanost s genima lokusa HLA-C sustava HLA. Do sada provedenim populacijskim istraživanjima otkrivena je jaka povezanost psorijaze i s alelima B13, B57 i DRB1*07 (47)

Međutim, danas se smatra da je povišena učestalost tih gena rezultat postojanja neravnoteže udruživanja između njih i alela Cw6. Utvrđeno je također da se aleli Cw6 i DR7 u 86% bolesnika prenose u cis položaju, što znači da se oba alela nalaze na istom kraku kromosoma i prenose u bloku na potomke (49).

Značenje gena HLA-Cw potvrdila su istraživanja Asahina i sur. koji su u psorijatičara utvrdili povećanu učestalost aminokiseline alanin na poziciji 73 (Ala-73) u $\alpha 1$ domenama molekula Cw6 i Cw7 (5). Smatra se da je ta aminokiselina bitna za oblikovanje vezne pukotine, a prema tome i za vezanje antigenog peptida (58, 99).

Obiteljske studije povezanosti psorijaze s genima HLA ukazale su na povišenu učestalost visoko konzerviranog haplotipa EH-57.1 (Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303) u psorijatičara, što upućuje na ulogu gena HLA razreda I, kao i razreda II u patogenezi bolesti (102). Naime, uočeno je da aleli DRB1*0701 i DQB1*0303 povećavaju podložnost bolesti isključivo u nazočnosti Cw6 (64). Stoga se smatra da je podložnost bolesti jače povezana s krajem razreda I (Cw6-B57) nego s krajem razreda II (DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303) u konzerviranom haplotipu. Međutim, alel Cw6 sam, nosi jaču povezanost s psorijazom nego cijeli konzervirani haplotip (59).

Iz svega navedenog, vidljivo je da su istraživanja povezanosti sustava HLA i autoimunih bolesti uznapredovala uvođenjem metoda molekularne genetike koje su omogućile istraživanje uloge pojedinih alela i gena u patogenezi tih bolesti. Za razliku od seroloških metoda, metode molekularne genetike su preciznije, broj neotkrivenih alela znatno je manji, a dobiveni rezultati pružaju izravan uvid u genetsku osnovicu bolesti.

U hrvatskoj je populaciji do sada povezanost sustava HLA sa psorijazom istražena samo serološkim metodama (62). U ovoj je disertaciji po prvi puta u Hrvatskoj istražena povezanost psorijaze sa sustavom HLA metodama molekularne genetike čime je pružen uvid u cjelovitu imunogenetsku sliku sustava HLA psorijatičara hrvatske populacije. Rad je plod suradnje riječke Klinike za kožne i spolne bolesti i Zavoda za tipizaciju tkiva, KBC

Rebro u Zagrebu, gdje se metode molekularne genetike rutinski koriste u dijagnostici nekih autoimunih bolesti. Metoda PCR-SSOP koristi se za precizno određivanje gena razreda II, a metodom ARMS-PCR određuju se aleli razreda I sustava HLA. To su visokospecifične, egzaktne metode koje su korištene i u ovom istraživanju.

U 118 psorijatičara, liječenih na Klinici za kožne i spolne bolesti, KBC Rijeka, provedena je tipizacija antigena i gena razreda I i II sustava HLA, a rezultati su uspoređeni s kontrolom, kao i s rezultatima svjetskih istraživanja.

Rezultati istraživanja polimorfizma gena HLA razreda I u psorijatičara hrvatske populacije ukazuju prvenstveno na ulogu alela Cw*0602 u podložnosti za bolest. Budući da je ovaj alel i u zdravoj populaciji relativno čest, vrijednost relativnog rizika je niska i iznosi 3.84. Zaštitna uloga otkrivena je za alel Cw*0701 koji je sa sniženom učestalošću nazočan u naših bolesnika (RR=0,44), što do sada nije referirano u literaturi. Međutim, u židovskih je psorijatičara, oprečno našim rezultatima, otkrivena povišena učestalost alela Cw7, što ukazuje da je psorijaza u različitim populacijama vezana uz različite gene. Nadalje, u tih je bolesnika pronađena također značajno povišena učestalost alela Cw6, ali ne i ostalih alela razreda I (99).

Za sve ostale alele lokusa HLA- A, B i Cw za koje je u ovom istraživanju nađena razlika u učestalosti između psorijatičara i zdravih ispitanika, značajnost se gubi nakon korekcije vrijednosti p. Međutim, treba naglasiti da je u ovom radu vrijednost p uvijek dodatno korigirana i brojem istraživanih alela, što je vrlo strog statistički model, stoga i nekorrigirana vrijednost p svakako ima svoje značenje. Tako je u naših psorijatičara na lokusu HLA-A otkrivena povišena učestalost A2, a na lokusu HLA-B povišena je učestalost antigena B13 i B17. Riječ je o antigenima koji se nalaze u jakoj neravnoteži udruživanja s alelom Cw*0602 što je i uzrok njihove povišene učestalosti. Sniženu pak učestalost antigena B5 i B7 tumačimo povišenjem već ranije spomenutih antigena (zakon genske ravnoteže). Na lokusu Cw također je otkrivena snižena učestalost alela *0401 i *0501 što

govori u prilog mogućoj zaštitnoj ulozi tih molekula. Međutim, te je rezultate potrebno potvrditi na još većem broju ispitanika.

I u drugim istraživanim populacijama pronađena je povišena učestalost alela Cw6, B13 i B17. Tako su Tiilikainen i sur. (111) u populaciji finskih psorijatičara otkrili značajno povišenu nazočnost Cw6 u 72,7% bolesnika s gutatnom i 45,9% s vulgarnom psorijazom, te zaključili da su geni lokusa HLA-Cw važniji za razvitak gutatnog nego vulgarnog oblika psorijaze. Međutim, Nini i sur. (92) pronašli su u talijanskih psorijatičara povećanu učestalost Cw6 i B17 u svim oblicima bolesti. O'Donell i sur. (93) su u populaciji irskih psorijatičara otkrili povišenu učestalost antigena B17, B13 i B27, te sniženu učestalost B12 i B18. U poljskih je psorijatičara uočeno da su teži oblici bolesti bili povezani s antigenom B57, a blaži oblici s antigenom B13 (118). U grčkih bolesnika nađena je povišena učestalost antigena B13, B16 i Cw6, a snižena učestalost B14 (35). Iz navedenog je vidljivo da je psorijaza povezana s različitim antigenima razreda I u različitim populacijama, međutim, zajednička im je jaka povezanost s alelom Cw6, te antigenima B13 i B57. Također, treba naglasiti da je u populacijama s vrlo niskom učestalošću antigena B57, kao što su američki indijanci i Eskimi, psorijaza izuzetno rijetka (60).

Rezultati istraživanja polimorfizma gena HLA razreda II u naših psorijatičara pokazuju da je na lokusu DRB1 visoko podložni alel DRB1*07, a jačina povezanosti iznosi 2,77. Vrijednost relativnog rizika i ovog je puta relativno niska, jer je i u zdravoj populaciji taj alel vrlo čest. Povišena učestalost DR7 u psorijatičara potvrđena je i u brojnim drugim studijama (112, 117). Tako su Sakkas i sur. (100) pokazali da je HLA-DR7 važan čimbenik podložnosti ne samo za psorijazu, nego i za psorijatični artritis.

Na lokusu DQ (tablice 14 i 15) podložnost za bolest otkrivena je u nositelja alela DQA1*0201 (RR=2,87) i alela DQB1*0201 (RR=2,33). Povećana učestalost alela DQB1*0303 koja je uočena u drugim etničkim skupinama, u naših se bolesnika gubi nakon korekcije vrijednosti p (103). Oba alela DQ nalaze se u neravnoteži udruživanja s alelom

DRB1*07, te svi zajedno tvore visoko konzervirani haplotip psorijatičara bijele rase DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201. Analiza učestalosti haplotipskih sveza u hrvatskih psorijatičara pokazala je da je upravo taj haplotip značajno češći u bolesnika nego u zdravih osoba (RR=3,02). Na lokusu DQB1 produženog haplotipa, u naših je bolesnika mnogo češće alel *0201 nego alel *0303 (80% vs 20%). Ovaj rezultat moguće je objasniti nakon analize rezultata kontrolne skupine. Naime, i u zdravih ispitanika, njih 85% nosi na lokusu DQB1 produženog haplotipa alel *0201, a njih samo 15% alel *0303 (tablica 18). To je u skladu s istraživanjem Yunisa i sur. (129) koji su u bijeloj rasi otkrili dva haplotipa DRB1-DQB1, DRB1*0701-DQB1*0303 i DRB1*0701-DQB1*0201, od kojih je potonji mnogo češći. Suprotno tome, Schmidt-Egenolf i sur. (103) su u njemačkih psorijatičara otkrili značajno povišenu učestalost rjeđeg haplotipa DRB1*0701-DQB1*0303.

Populacijska istraživanja o pojavljivanju psorijaze u pojedinim obiteljima ukazuju na važnu ulogu genetskih čimbenika u nastanku psorijaze. Stoga smo na temelju anamnestičkih podataka o nazočnosti odnosno odsutnosti bolesti u obitelji, bolesnike grupirali u dvije skupine: psorijatičare s pozitivnom odnosno negativnom obiteljskom anamnezom psorijaze. U obje skupine istražili smo učestalost antigena i gena razreda I i II, te haplotipskih sveza sustava HLA.

Rezultati istraživanja polimorfizma gena HLA razreda I (tablice 20 i 21) pokazuju da su visoko podložni aleli u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom aleli B13 (RR=5,16), B17 (RR=4,12) i Cw*0602 (RR=5,72). Među alelima razreda II u istih bolesnika na lokusu DRB1 otkrivena je povišena učestalost alela DRB1*07 (RR=3,38; tablica 22). Na lokusu DQ (tablica 23 i 24), visoko podložni aleli u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom su aleli DQA1*0201 (RR=3,44) i DQB1*0303 (RR=6,84). Statistički značajno povišena učestalost alela DQB1*0201 u tih bolesnika gubi se nakon korekcije vrijednosti p (tablica 24).

U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom otkrivena je snižena učestalost alela Cw*0701 (RR=0,24), a to je ujedno i jedini alel razreda I HLA u toj skupini bolesnika koji pokazuje statističku značajnost i nakon korekcije vrijednosti p (tablica 21). Snižena učestalost tog alela govori u prilog njegovoj možebitnoj zaštitnoj ulozi u psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom. Jedini alel razreda II koji pokazuje značajno višu učestalost u psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom u odnosu na zdravu populaciju je alel DQB1*0201 (RR=2,51). Za ostale alele (DRB1*07 i DQA1*0201) značajnost se gubi nakon korekcije vrijednosti p (tablice 22 i 23).

Analiza rezultata učestalosti haplotipskih sveza HLA-DRB1-DQA1-DQB1 pokazala je povišenu učestalost haplotipa DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 i DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom, međutim značajnost se gubi nakon korekcije vrijednosti p. U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom otkrivena je povišena učestalost jedino haplotipa DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201, ali opet samo bez korekcije vrijednosti p (tablica 27). U obje skupine bolesnika, na lokusu DQB1 produženog haplotipa, otkriven je mnogo češće alel *0201 nego alel *0303 (tablica 28). Učestalost visoko konzerviranog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 statistički je značajno viša u psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom u usporedbi sa zdravom populacijom (RR=5,72 - slika 7).

Na temelju navedenog može se zaključiti da je povezanost s podložnim alelima HLA jača i značajnija za psorijatičare s pozitivnom obiteljskom anamnezom, te da nazočnost bolesti u obitelji povećava rizik od oboljenja.

Analizom povezanosti gena sustava HLA s dobi početka psorijaze utvrđeno je da se bolesnici mogu podijeliti u dvije skupine. U prvoj skupini bolesnika (tip I) uočeno je da psorijaza počinje u ranoj životnoj dobi, da se nasljeđuje i da je povezana s Cw6, a u drugoj skupini (tip II) bolest počinje u kasnijoj životnoj dobi i javlja se sporadično (48). Stoga je u ovoj disertaciji istražena učestalost antigena i gena razreda I i II HLA u psorijatičara tipa I

(početak bolesti prije 30 godine života, nazočnost bolesti u obitelji) i tipa II (početak bolesti nakon 40. godine života, odsutnost bolesti u obitelji). Međutim, neke psorijatičare (početak bolesti prije 30. godine života, odsutnost bolesti u obitelji) nije bilo moguće svrstati niti u jednu od navedenih skupina, iako i ti bolesnici pokazuju značajnu povezanost s genima HLA. Koncept o dva tipa psorijaze nedavno su proširili Szczerkowska-Dobosz i sur. (108) koji su predložili podklasifikaciju ta dva tipa bolesti. Tako psorijatičare tipa Ia obilježava rani početak psorijaze i nazočnost Cw6; tipa Ib rani početak bolesti, ali odsutnost Cw6; tipa IIa kasni početak bolesti i nazočnost Cw6; te tipa IIb kasni početak bolesti i odsutnost Cw6.

U naših je bolesnika analiza povezanosti gena HLA s godinama početka bolesti pokazala da u čak 91% psorijatičara koji nose alel Cw*0602 bolest počinje prije 30. godine života, a u njih samo 9% bolest započinje iza 40 godine života. U skupini psorijatičara koji nemaju Cw*0602 bio je jednak broj bolesnika s ranim i kasnim početkom bolesti. Jačina povezanosti izražena vrijednošću relativnog rizika za nositelje alela Cw*0602 koji oboljevaju prije 30. godine života iznosi 43,5. Dakle, rani početak bolesti uz nazočnost alela Cw*0602 višestruko povećava rizik razvitka psorijaze. Ti rezultati u skladu su s istraživanjima u drugim populacijama (36). Tako je grčkih psorijatičara s početkom bolesti prije 25 godine života pronađena povišena učestalost antigena A1, B37, B57 i Cw6, a u onih s početkom bolesti nakon 25 godine života povezanost s antigenima A1, B57 i Cw6 bila je istovjetna kao u kontrolnoj skupini (35). U drugoj studiji, učinjenoj metodama molekularne genetike, uočena je povišena učestalost alela Cw6 samo u bolesnika s početkom bolesti u 21 godini života ili još ranije (107).

Rezultati istraživanja polimorfizma gena HLA razreda I u naših bolesnika pokazuju da su visoko podložni aleli za tip I bolesti B13 (RR=5,85), B17 (RR=4,34) i Cw*0602 (RR=6,14). Dakle, najveći relativni rizik za razvoj psorijaze tipa I imaju nosioci alela Cw*0602 što je u skladu s rezultatima drugih istraživanih populacija (102). Tako su Ikaheimo i sur. (59) potvrdili primarnu ulogu gena Cw6 u podložnosti za psorijazu, te

naglasili da je nazočnost samog alela Cw6 dovoljna za nastanak bolesti. Nadalje, povišena učestalost Cw6 je u korelaciji s dobi početka bolesti i obiteljskom anamnezom psorijaze. Međutim, nisu pronašli povezanost Cw6 s kliničkim parametarima bolesti (59).

U naših je psorijatičara otkrivena povezanost tipa I bolesti i s antigenima B13 i B17 (tablica 30). Neka ranija istraživanja također su pokazala povezanost antigena B13 i B57 s ranim oblikom bolesti (18, 106). Međutim, Schmidt-Egenolf i sur. (102) su zaključili da samo dva alela razreda I, B57 i Cw6, nose visok rizik za psorijazu tipa I. Naime, uočili su da je Cw6 u bolesnika značajno češće udružen s B57 nego s B13, a u zdravih ispitanika situacija je bila obrnuta, odnosno Cw6 je češće bio udružen s B13. Stoga su pretpostavili da su antigeni Cw6-B57 glavni genetski čimbenik podložnosti za psorijazu. Dakle, gen za psorijazu mogao bi biti neki podtip Cw6 udružen s B57 ili neki non-HLA gen centralne regije MHC čiji je biljeg B57 (102).

Analiza rezultata povezanosti gena razreda II HLA sa psorijazom u naših bolesnika pokazuje da su visoko podložni aleli u psorijatičara tipa I aleli DRB1*07 (RR=3,86), DQA1*0201 (RR=3,91) i DQB1*0303 (RR=7,58). Najviši relativni rizik za alel DQB1 ukazuje na primarnu ulogu alela lokusa DQB1 u razvoju psorijaze.

U jednoj od prvih studija o povezanosti gena razreda II sa psorijazom na molekularnoj razini uočena je značajno povišena učestalost alela DRB1*0701 u psorijatičara tipa I, dok se učestalost tog alela u tipu II nije razlikovala od kontrolne skupine (103). Podložnost za tip I bolesti pokazana je i za alele DQA1*0201 i DQB1*0303 koji su sa značajno povišenom učestalošću bili nazočni u psorijatičara tipa I.

Rezultati tipizacije užih specifičnosti gena DRB1*02 u naših bolesnika pokazali su sniženu učestalost podtipa *1601 u psorijatičara tipa I (RR=0,18), ali ta se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p. U hrvatskoj je populaciji upravo ovaj alel, uz alel *1501, najčešći alel lokusa DRB1 (42). Snižena učestalost alela *1601 govori u prilog mogućoj zaštitnoj ulozi tog alela u naših bolesnika, što do sada nije referirano niti za jednu

istraživanu etničku skupinu. Snižena učestalost alela DQA1*0102 u psorijatičara tipa I, koja je opet značajna samo bez korekcije vrijednosti p, također govori o mogućoj zaštitnoj ulozi tog alela za tip I bolesti. U finskih je psorijatičara otkrivena snižena učestalost alela DQA1*0501 kao mogućeg zaštitnog čimbenika za tip I bolesti (57).

Na lokusu DP je u psorijatičara tipa I otkrivena povišena učestalost alela DPB1*0901 ali samo bez korekcije vrijednosti p (tablica 36). Budući da u drugim istraživanim populacijama nije nađena povezanost psorijaze s alelima tog lokusa, podložna uloga tog alela u tipu I bolesti trebala bi biti istražena na još većem broju ispitanika. Naime, dosadašnja istraživanja pokazuju da psorijaza nije povezana s genima DPA1, DPB1 i TAP2 (102).

Analiza rezultata učestalosti haplotipskih sveza HLA razreda II u naših je psorijatičara pokazala da je visoko podložni haplotip razreda II za tip I bolesti DRB1*0701-DQA1*0202-DQB1*0201 (RR=3,61). I haplotip DRB1*0701-DQA1*02021-DQB1*0303 pokazuje povišenu učestalost u psorijatičara tipa I, ali samo prije korekcije vrijednosti p. Naime, u čak 72% psorijatičara tipa I na lokusu DQB1 produženog haplotipa nalazi se alel *0201, a u njih 28% alel *0303 (tablica 37), a isti je slučaj i u kontrolnoj skupini. To je u skladu s rezultatima Yunisa i sur. (129) koji su otkrili da je u bijeloj rasi mnogo češći haplotip DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 nego DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303. Po nekim autorima, haplotipska sveza DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 nastala je kao rezultat rekombinacije između dvije klasične sveze DR53, DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 i DRB1*0901-DQA1*0301-DQB1*0303, i to između lokusa DQA1 i DQB1 (67).

Međutim, u njemačkih je psorijatičara tipa I tri puta češće nađen haplotip DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 nego DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (103). Stoga se čini da su upravo aleli DQB1, koji se nalaze u neravnoteži udruživanja s alelima DRB1*0701 i DQA1*0201, glavni genetski čimbenik razreda II HLA u podložnosti psorijazi. Produženi

haplotip koji sadrži DQB1*0201 pokazuje povezanost i s nekim drugim autoimunim bolestima (26).

U naših je bolesnika analiza rezultata učestalosti haplotipskih sveza HLA razreda II pokazala sniženu učestalost haplotipa DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 u psorijatičara tipa I, ali ta se značajnost gubi nakon korekcije vrijednosti p, kao što je slučaj i s pojedinačnom učestalošću tih alela. Ipak, ti rezultati govore u prilog mogućoj zaštitnoj ulozi ovog haplotipa za razvoj psorijaze tipa I. U finskih psorijatičara otkrivena je snižena učestalost haplotipa B8-DR3-DQ2-DQA1*0501 za koji se misli da možda ima zaštitnu ulogu za tip I bolesti (57).

Schmidt-Egenolf i sur. (102) su među prvima pronašli povišenu učestalost visoko konzerviranog haplotipa EH57.1, tj. Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303, u psorijatičara tipa I. Rizik razvoja tipa I bolesti bio je 26 puta veća u nosioca rizičnog haplotipa EH57.1. Nadalje, utvrdili su da je podložnost za bolest jače povezana s krajem razreda I (Cw6-B57) nego s krajem razreda II (DRB1*0701-DQA1*02021-DQB1*0303) produženog haplotipa. Povišena učestalost kraja razreda II haplotipa vjerojatno je rezultat neravnoteže udruživanja s HLA-Cw6-B57. Već je raniji rad Jenischa i sur. (64) pokazao da haplotip razreda II DRB1*0701 i DQB1*0303 povećava podložnost za bolest samo uz nazočnost Cw6. Također je pokazano da alel Cw6 nosi jaču povezanost sa psorijazom nego cijeli haplotip Cw6, DR7 i DQA1*0201 (59). Stoga, ti rezultati ukazuju da se podložni gen nalazi telomerično od regije gena razreda II sustava MHC, dakle u središnjoj regiji ili unutar gena razreda I HLA.

U hrvatskih psorijatičara tipa I također je otkrivena statistički značajno viša učestalost produženog haplotipa Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 u usporedbi s kontrolom (RR=3,61). Isto je tako statistički značajno viša učestalost svih alela koji čine taj produženi haplotip (slika 9).

U finskih su psorijatičara otkrivena dva visoko podložna haplotipa, A1-B17-Cw6-DR7-DQA1*0201 i A2-B13-Cw6-DR7-DQA1*0201, od kojih potonji ima mnogo veći relativni rizik. Međutim, u toj studiji nije nađena povezanost s alelima DQB1 (57).

U naših psorijatičara tipa II otkrivena je povezanost s alelom Cw*03 (RR=3,18) što do sada nije referirano niti za jednu istraživanu populaciju. Međutim, ni za jedan alel razreda II, kao niti za jedan haplotip razreda II HLA nije nađena povezanost s tipom II bolesti. Isto tako nije nađen niti jedan nositelj produženog haplotipa Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0303 u istih bolesnika. Štoviše, kraj razreda II produženog haplotipa nosi isti broj psorijatičara i zdravih osoba. U njemačkih je psorijatičara ukazano na moguću povezanost tipa II bolesti s alelom DQA1*0103, ali budući da povišena učestalost pokazuje graničnu statističku značajnost, vrijednost tog rezultata je upitna (103). U ostalim istraživanim populacijama nije nađena povezanost gena HLA s tipom II psorijaze (102).

U skupini psorijatičara s ranim početkom bolesti i s odsutnošću bolesti u obitelji, koje nismo mogli razvrstati ni u psorijatičare tipa I niti tipa II, otkrivena je povezanost s visoko podložnim alelima razreda II, DRB1*07 (RR=3,60), DQA1*0201 (RR=3,75) i DQB1*0201 (RR=3,3). Riječ je opet o alelima koji tvore klasični produženi haplotip DRB1*0701-DQA1*02021-DQB1*0201 čija je učestalost značajno povišena i u ovoj skupini psorijatičara (RR=5,29). Također je pronađena povezanost s alelom razreda I, Cw*0602 (RR=4,64), za koji je već ranije pokazano da nosi najveći relativni rizik razvoja bolesti. Ovi rezultati ukazuju na važnost dobi početka bolesti u povezanosti s genima HLA. Iako je u ovoj skupini psorijatičara obiteljska anamneza negativna, budući da se radi isključivo o anamnestičkim podacima, ne možemo biti sigurni u njihovu pouzdanost. Ranije navedeni rezultati pokazuju da je najveći rizik za podložnost bolesti nazočan u psorijatičara koji rano razviju bolest uz pozitivnu obiteljsku anamnezu psorijaze. Međutim, slične rezultate pokazuju i psorijatičari s odsutnošću bolesti u obitelji, ali koji obolijevaju u ranoj životnoj dobi.

U ovoj disertaciji povezanost gena HLA sa psorijazom istražena je isključivo u psorijatičara koji boluju od vulgarne psorijaze. Iako je povezanost sa sustavom HLA nedvojbeno, što pokazuje i ovo istraživanje, još uvijek nije u potpunosti poznat mehanizam nastanka psorijatične lezije odnosno pojava ubrzane epidermopoeze, angiogeneze i neutrofilne mikropustule. Stoga bi bilo zanimljivo istražiti polimorfizam gena HLA i u bolesnika s artropatskom odnosno pustuloznom psorijazom, što će biti naš naredni istraživački program.

Zaključno, rezultati istraživanja povezanosti antigena, gena i haplotipova razreda I i II sustava HLA sa psorijazom u hrvatskoj populaciji uglavnom su u skladu s rezultatima o toj povezanosti u bijeloj rasi. Primarni podložni alel je Cw*0602, napose za psorijazu tipa I, kao i u ostalim istraživanim populacijama. Nadalje, alel Cw*0602 je u korelaciji s dobi početka bolesti i obiteljskom anamnezom psorijaze. Među alelima razreda I, visoko podložni za razvoj tipa I bolesti su i aleli B13 i B17. Visoko podložni haplotip u naših bolesnika je DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201. Zaštitna uloga otkrivena je za alel Cw7 u cijeloj populaciji psorijatičara, a u psorijatičara tipa I rezultati istraživanja govore u prilog mogućoj zaštitnoj ulozi alela DRB1*1601 i haplotipa DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata istraživanja učestalosti antigena, gena i haplotipskih sveza razreda I i II sustava HLA u bolesnika sa psorijazom možemo zaključiti

1. Podložni aleli za psorijazu su: Cw*0602 (RR=3,84), DRB1*0701 (RR=2,77), DQA1*0201 (RR=2,87) i DQB1*0201 (2,33).

Podložna haplotipska sveza je DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3,02).

2. Moguću zaštitnu ulogu ima alel Cw*0701 (RR=0,44)

3. Aleli lokusa DPB1 imaju neutralan utjecaj na podložnost psorijazi.

4. U psorijatičara s pozitivnom obiteljskom anamnezom psorijaze podložni aleli su: B13 (RR=5,16), B17 (RR=4,12), Cw*0602 (RR=5,72), DRB1*0701 (RR=3,38), DQA1*0201 (RR=3,44) i DQB1*0303 (RR=6,84).

Visoko podložni haplotip je Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=5,72).

5. U psorijatičara s negativnom obiteljskom anamnezom otkrivena je povezanost s alelom DQB1*0201 (RR=2,51). Moguća zaštitna uloga otkrivena je za alel Cw*0701 (RR=0,24).

6. Za tip I bolesti podložni aleli su: B13 (RR=5,85), B17 (RR=4,34), Cw*0602 (RR=6,14), DRB1*0701 (RR=3,86), DQA1*0201 (RR=3,98) i DQB1*0303 (RR=7,58).

Visoko podložni haplotip za tip I bolesti je DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3,61), a visoko podložni konzervirani haplotip za tip I bolesti je Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201 (RR=3,61)

7. Moguću zaštitnu ulogu za tip I bolesti imaju aleli DRB1*1601 (RR=0,18) i DQA1*0102 (RR=0,42), te haplotipska sveza DRB1*1601-DQA1*0102-DQB1*0502 (RR=0,21)

8. Psorijaza tipa II pokazuje povezanost s alelom Cw*0302/04 (RR=3,18).

Niti jedan psorijatičar tipa II nije nositelj produženog konzerviranog haplotipa Cw*0602-B17-DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201

9. Rezultati istraživanja povezanosti psorijaze s genima sustava HLA u hrvatskoj populaciji dobro se uklapaju u rezultate istraživanja drugih populacija bijele rase.

10. Vrijednost molekularne tipizacije HLA kao jednog od dijagnostičkih parametara u psorijazi bit će u potpunosti jasna nakon obiteljskih istraživanja, te istraživanja koja će uključiti i čimbenike okoliša.

7. LITERATURA

1. Abele DC, Dobson RL, Graham JB (1963) Heredity and psoriasis. study of a large family. *Arch dermatol* 88: 38-47
2. Apple RJ, Becker TM, Wheeler CM, Erlich HE (1995) Comparison of HLA DR-DQ disease associations found with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87: 427-436
3. Arari T, Michalski JP, McCombs CC, Elston RC, McCarthy CF, Stevens FM (1995) T cell receptor gamma gene polymorphisms and class II human lymphocyte antigen genotypes in patients with celiac disease from the west of Ireland. *Am J Med Sci* 309: 171-178
4. Archer S, Whelan MA, Badakere SS, McLean IL, Archer IV, Winrow R (1990) Effect of a free sulphhydryl group on expression of HLA-B27 specificity. *Scand J Rheumatol* 87: 44-50
5. Asahina A, Akazaki S, Nakagawa H, Kuwata S, Tokunaga K, Ishibashi J, Juji T (1991) Specific nucleotide sequence of HLA-C is strongly associated with psoriasis vulgaris. *J Invest dermatol* 97:254-258
6. Baker BS, Swain AF, Fry L, Valdimarsson H (1984) Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis. *Br J Dermatol* 110: 555-564
7. Barišić-Druško V, Paljan D, Kansky A, Vujasinović S (1989) Prevalence of psoriasis in Croatia. *Acta Derm Venereol (Stockh) Suppl.* 146: 178-179
8. Barker JNWN (1991) The pathophysiology of psoriasis. *Lancet* 338: 227-231
9. Barker JNWN, Barber R, Clough RL, Rosbotham J, Jones A, Terwilliger J, Lathrop M, Trembath RC (1996) Linkage disequilibrium disease gene mapping in psoriasis using a haplotype relative risk approach. *Br J Dermatol* 135:825
10. Begovich AB, Bugawan TL, Nepom BS, Klitz W, Nepom GT, Ehrlich HA (1989) A specific HLA-DP β allele is associated with pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis but not adult rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9489-9493

11. Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, Erlich HA, Klitz W (1992) Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* 148: 249-258
12. Berg LJ, Frank GD, Davis MM (1990) The effects of MHC gene dosage and allelic variation on TCR selection. *Cell* 60: 1043-1053
13. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED (1995) Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 46: 1-18
14. Botta A, Semprini S, Nudo M, Gennarelli M, Vultaggio P, Novelli G, Fabrizi G, Dallapicola B (1996) Lack of evidence for a psoriasis susceptibility gene on chromosome 17 in ten three generations Italian families. *Br J Dermatol* 135:838
15. Bottazzo GF, Pujol-Borell R, Hanafusa T (1983) Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *The Lancet* 12: 1115-1118
16. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H, Winkelmann RK (1991) Erythematous and erythematous-squamous skin diseases: U: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff H, Winkelmann RK. *Dermatology*, 4. izdanje. Berlin, Springer-Verlag, 403-466
17. Brennan P, Hajeer A, Ong KR, worthington J, John S, Thomson W, Silman A, Ollier B (1997) Allelic markers close to prolactin are associated with HLA-DRB1 susceptibility alleles among women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1383-1386
18. Brenner W, Gschnait F, Mayr WR (1978) HLA B13, B17, B37 and Cw6 in psoriasis vulgaris: association with the age of onset. *Arch Dermatol Res* 262: 337-339.
19. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD (1973) Ankylosing spondylitis and HL-A27. *Lancet* 1: 904-907

20. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33-39
21. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM (1994) Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen), *N Engl J Med* 330: 1192-1196
22. Burden AD, Javed S, Hodgins M, Arngrimsson R, Connor M, Tillman DM (1996) Linkage to chromosome 6p and exclusion of chromosome 17q in familial psoriasis in Scotland. *Br J Dermatol* 135:827
23. Campbell RD, Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. *Immunology Today* 14: 349-352
24. Carcassi C, Giorda R, Trucco M, Contu L (1992) A novel HLA-DR4 haplotype generated by a rare recombinational event between DRB1 and DQA1 loci. *Immunogenetics* 34: 338-340
25. Chicz RM, Lane WS, Robinson RA, Trucco M, Strominger JL, Gorga JC (1994) Self peptides bound to the type I diabetes associated class II molecules HLA-Dq1 and HLA-DQ8. *Int Immunol* 6: 1639-1649
26. Clark AGB, Vaughan RW, Stephens HAP, Chantler C, Williams DG, Welsh KI (1990) Genes encoding the β -chains of HLA-DR7 and HLA-DQw2 define major susceptibility determinants for idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Sci* 78: 391-397
27. Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL (1993) Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 260: 1121-1124
28. Cooper KD, Hammerberg C, Baadsgaard O, Elder JT, Chan LS, Sauder DN, Voorhes JJ, Fisher G (1990) IL-1 activity is reduced in psoriatic skin: decreased IL-1 alpha and increased non-functional IL-1 beta. *J Immunol* 144: 4593-4603

29. Čečuk-Jeličić E, Grubić Z, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan M, Kaštelan A (1999) Comparison of serology and DNA methods for HLA-Cw typing in the Croatian population. *Period Biol* 101: 71-75
30. Davis MM, Bjorkman PJ (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334: 395-402
- 30a. Degli-Esposti MA, Leaver AL, Christiansen T, Witt CS, Abraham LJ, Dawkins RL (1992) Ancestral haplotypes: conserved population MHC haplotypes. *Hum Immunol* 34:242-252
31. Dewald G, Lange CE, Schmeel E, Kreysel HW (1983) HLA linked complement polymorphisms (C2, BF) in psoriasis. *Arch dermatol Res* 275: 301-304
32. Duffy DL, Spelman LS, Martin NG (1993) Psoriasis in Australian twins. *J Am Acad Dermatol* 29: 428-434
33. Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA (1988) Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Exp Med* 167: 1323-1340
34. Ebringer A (1991) Ankylosing spondylitis and Klebsiella - the debate continues. *J Rheumatol* 18: 312-313
35. Economidou J, Papasteriades C, Varla Leftherioti M, Vareltzidis A, Stratigos J (1985) Human lymphocyte antigens A, B and C in Greek patients with psoriasis: relation to age and clinical expression of the disease. *J Am Acad Dermatol* 13: 578-582.
36. Enerback C, Martinsson T, Inerot A, Wahlstrom J, Enlund F, Yhr M, Swanbeck G (1997) Evidence that HLA-Cw6 determines early onset of psoriasis, obtained using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Acta Derm Venereol* 77: 273-276
37. Erlich HA, Zeidler A, Chang J (1993) HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. *Nature Genetics* 3: 358-364

38. Feltkamp TEW, Khan MA, De Castro JAL (1996) The pathogenetic role of HLA-B27
Immunology Today 17:5-7
39. Fisher RA (1973) *Statistical methods for research workers*. New York, Hafner Publishing Company
40. Fry L (1992) Psoriasis: Immunopathology and long-term treatment with cyclosporin. *J Autoimmunity* 5 (Suppl A): 277-283
41. Griffiths CEM, Powles AV, Leonard JN, Baker BS, Fry L, Valdimarsson H (1986) Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. *Br Med J* 293: 731-732
42. Grubić Z (1997) Raspodjela gena razreda II sustava HLA u hrvatskoj populaciji- molekularna istraživanja. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu
43. Haldane JBS (1956) The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 20: 309-311
44. Hammond SR, McLeod JG, Millingen KS et al. (1988) The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. *Brain* 111: 1-25
45. Hardas BD, Zhao XP, Zhang J, Xia LQ, Stoll S, Elder JT (1996) Assignment of psoriasis to human chromosomal band 1q21: coordinate overexpression of clustered genes in psoriasis. *J Invest Dermatol* 106: 753-758
46. Heard R (1994) HLA and autoimmune disease. U: *HLA and Disease*. Eds Lechler R, Academic Press, London, 123-153
47. Henseler T (1998) Genetics of psoriasis. *Arch Dermatol Res* 290: 463-476
48. Henseler T, Christophers E (1985) Psoriasis of early and late onset: characterisation of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 13: 450-456
49. Henseler T, Jenisch S, Nair RP, Zavazava N, Elder JT, Voorhes JJ, Christophers E (1993) Mechanism of linkage disequilibrium between Cw6 and DR7 in type I psoriasis: examples of inheritance in trans. *J Invest dermatol* 100:542

50. Heward J, Gough SCL (1997) Genetic susceptibility to the development of autoimmune disease. *Clin Sci* 93: 479-491
51. Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Benett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM (1991) Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352: 595-600
52. Hohler T, Kruger A, Schneider PM, Schopf RE, Knop J, Rittner C, zum Buschenfelde KHM, Marker-Herman E (1997) A TNF- α promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol* 109: 562-565
53. Hohler T, Weinmann A, Schneider PM, Rittner C, Schopf RE, Knop J, Hasenclever P, zum Buschenfelde KHM, Marker-Herman E (1996) TAP-polymorphisms in juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *Hum Immunol* 51: 49-54
54. Hors J (1997) HLA and disease - an anniversary. *Presse Med* 26: 1300-1302
55. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G (1996) Mapping of a susceptibility locus for Chron's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-823
56. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Apella E, Engelhard VH (1992) Characterisation of peptides bound to class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255: 1261-1263
57. Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinen S, Karvonen J, Jarvinen T, Tiilikainen A (1996) Immunogenetic profile of psoriasis vulgaris: association with haplotypes A2, B13, Cw6, DR7, DQA1*0201 and A1, B17, Cw6, DR7, DQA1*0201. *Arch Dermatol Res* 288: 63-67.
58. Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinene S, Karvonen J, Tiilikainen A (1994) Alanin at position 73 of HLA-C is associated with psoriasis vulgaris in Finland. *Br J Dermatol* 131:257-259

59. Ikaheimo I, Tiilikainen A, Karvonen J, Silvennoinen-Kassinene S (1996) HLA risk haplotype Cw6, DR7, DQA1*0201 and HLA-Cw6 with reference to the clinical picture of psoriasis vulgaris. *Arch Dermatol Res* 288: 363-365
60. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T (1992) Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. U: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds) HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol 1. Oxford University Press, Oxford, 1065-1220
61. Jacob C, Fronck Z, Lewis G et al. (1990) Heritable major histocompatibility complex class II- associated differences in production of tumour necrosis factor α : relevance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1233-1237
62. Jajić I, Kaštelan A, Brnobić A, Kerhin V, Brkljačić Lj (1977) HLA antigens in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arch Dermatol* 113: 1724-1726
63. Jenisch S, Henseler T, Nair R, Guo SW, Stuart P, Lange E, Kronke M, Voorhes J, Christophers E, Elder J (1998) Linkage analysis of human leukocyte antigen (HLA) markers in familial psoriasis: strong disequilibrium effects provide evidence for a major determinant in the HLA-B/C region. *Am J Hum Genet* 63:191-199
64. Jenisch S, Henseler T, Wetphal E, Elder JT, Nair RP, Voorhes JJ, Christophers E (1995) HLA DQ9 (DQB1*0303) increases susceptibility to type I psoriasis in multiplex families, but only in the presence of HLA-Cw6. *J Invest Dermatol* 104:629
65. Kappes D, Strominger JL (1988) Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem* 57: 991-1028
66. Karvonen J, Tiilikainen A, Lassus A (1976) HLA antigens in psoriasis. A family study. *Ann Clin Res* 8:298-304
67. Kagnoff MF, Harwood JI, Bugawan TL, Erlich HA (1989) Structural analysis of the HLA-DR, -DQ and -DP alleles on the celiac disease associated HLA-DR3 (Drw17) haplotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6274-6278

68. Kelly AP, Monaco JJ, Cho S, Trowsdale J (1991) A new human HLA-class II related locus, DM. *Nature* 353: 571-573
69. Kimura A, Sasazuki T (1992) Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA typing technique. U: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. *HLA 1991*. Vol 1. Oxford; Oxford University Press, 397-419
70. Klitz W, Thomas G, Baur MP (1986) Contrasting evolutionary histories among tightly linked HLA loci. *Am J Hum Genet* 39: 340-343
71. Krulig L, Farber E, Grumet FC, Payne RO (1975) Histocompatibility (HL-A) antigens in psoriasis. *Arch Dermatol* 111: 857-860
72. Kurtzke JF (1980) Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. *Neurology* 30: 61-79.
73. Le Bouteiller P (1994) HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 14: 89-129
74. Lee FI, Bellary SV, Francis C (1990) Increased occurrence of psoriasis in patients with Crohn's disease and their relatives. *Am J Gastroenterol* 85: 962-963
75. Loke YW, King A (1991) Recent developments in the human maternal-fetal immune interaction. *Curr Opin Immunol* 3: 762-766
76. Lomholt G (1963) Psoriasis. Prevalence, spontaneous course and genetics: a census study on the prevalence of skin diseases on Faroe Islands, G. E. C. Gad, Copenhagen
77. Mallon E, Bunce M, Wojnarowska F, Welsh K (1977) HLA-Cw*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics. *J Invest Dermatol* 109: 183-186
78. Manfras BJ, Swinyard M, Rudert WA, Ball EJ, Lee PA, Kuhl P, Trucco M, Bohm BO (1993) Altered CYP21 genes in HLA-haplotypes associated with congenital adrenal hyperplasia (CAH) in a family study. *Hum Genet* 92: 33-39

79. Marcusson JA, Johansson A, Moller E (1981) HLA-A, B, C and DR antigens in psoriasis. *Tissue Antigens* 17: 525-529
80. Massa PT, Ozato K, McFarlin DE (1993) Cell type-specific regulation of major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in astrocytes, oligodendrocytes and neurons. *Glia* 8: 201-207
81. Matthews D, Fry L, Powles A, Weber J, McCarthy M, Fisher E, Davies K, Williamson R (1996) Evidence that a locus for familial psoriasis maps to chromosome 4q. *Nat Genet* 14: 231-233
82. Mawas C, Charmot D, Sivy M et al. (1978) A weak human MLR locus mapping at the right of a crossing over between HLA-D, Bf and GLO. *J Immunogenet* 5: 383-395
83. McCutcheon JA, Gumperz J, Smith KD, Lutz CT, Parham P (1995) Low HLA-C expression at cell surfaces correlates with increased turnover of heavy chain mRNA. *J Exp Med* 181: 2085-2095
84. Melski JW, Stern RS (1981) The separation of susceptibility to psoriasis from age at onset. *J Invest Dermatol* 77: 474-477
85. Miller SA, Dykes DD, Polsky HF (1988) A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 655-656
86. Nair RP, Guo SW, Jenisch S, Henseler T, Lange EM, Terhune M, Westphal E, Christophers E, Voorhes JJ, Elder JT (1995) Scanning chromosome 17 for psoriasis susceptibility: lack of evidence for a distal 17q locus. *Hum Hered* 45:219-230
87. Nair RP, Henseler T, Jenisch S, Stuart P, Bichakjian CK, Lenk W, Westphal E, Guo SW, Christophers E, Voorhes JJ, Elder JT (1997) Evidence for two psoriasis susceptibility loci (HLA and 17q) and two novel candidate region (16q and 20p) by genome wide-scan. *Hum Mol Genet* 6: 1349-1356
88. Nepom GT, Ehrlich H (1991) MHC class II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 9: 493-525

89. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acid Res* 1989;17:2503-2516.
90. Nickoloff BJ (1991) The cytokine network in psoriasis. *Arch Dermatol* 127: 871-884
91. Nickoloff BJ (1999) The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol* 135: 1104-1110
92. Nini G, Bianchi L, Iraci S, Camplone G, Spagnuolo A, Adorno D, Papola F (1989) HLA antigens and infantile psoriasis. *acta Derma Venereol (Suppl) Stockh* 146: 59-62
93. O'Donnell BF, O'Loughlin S, Codd MB, Powell FC (1993) HLA typing in Irish psoriatics. *Ir Med J* 86: 65-68
94. Ortonne JP (1996) Aetiology and pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol* 135 (Suppl 49): 1-5
95. Pandey JP, Goust JM, Salier JP et al. (1981) Immunoglobulin G heavy chain (Gm) allotypes in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 67: 1797-1800
96. Parham P (1990) Antigen processing. Transporters of delight. *Nature* 348: 674-675
97. Ramensee HG (1995) Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 7: 85-96
98. Richeldi L, Sorrentino R, Saltani C (1993) HLA-DPB1*Glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease. *Science* 262: 242-244
99. Roitberg-Tambur A, Friedmann A, Tzfonii EE, Battat S, Hammo RB, Safirman C, Tokunaga K, Asahina A, Brautbar C (1994) Do specific pockets of HLA-C molecules predispose Jewish patients to psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 31: 964-968
100. Sakkas LI, Loqueman N, Bird H, Vaughan RW, Welsh KI, Panayi GS (1990) HLA class II and T cell receptor gene polymorphism in psoriatic arthritis and psoriasis. *J Rheumatol* 17: 1487-1490

101. Salmon M (1992) The immunogenetic component of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatol Europe* 4: 342-347
102. Schmidt-Egenolf M, Eiermann TH, Boehncke WH, Stander M, Sterry W (1996) Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigens HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1*0701-DQA1*02021-DQB1*0303: a population and family based study. *J Invest dermatol* 106: 711-714
103. Schmidt-Egenolf M, Eiermann TH, Boehncke WH, Stander M, Sterry W (1993) Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA-DRB1*0701/0702, -DQA1*0201-DQB1*0303 extended haplotype. *J Invest dermatol* 100: 749-752
104. Scholz S, Albert E (1994) Immunogenetic aspects of juvenile chronic arthritis. *Rheumatol Europe* 23: 92-94
105. Suarez Almazor ME, Russell AS (1990) The genetics of psoriasis. Haplotype sharing in siblings with the disease. *Arch Dermatol* 126: 1040-1042
106. Svejgaard A, Staub-Nielsen L, Svejgaard E, Kissmeyer Nielsen F, Hjortshoj A, Zachariae H (1974) HL-A in psoriasis vulgaris and in pustular psoriasis: population and family studies. *Br J Dermatol* 91: 145-153
107. Swanbeck G, Inerot A, Martinsson T, Wahlstrom J, Enerback C, Enlund F, Yhr M (1995) Age at onset and different types of psoriasis. *Br J Dermatol* 133: 768-773
108. Szczerkowska-Dobosz A, Placek W, Szczerkowska Z, Roszkiewicz J (1996) Psoriasis vulgaris with the early and late onset - HLA phenotype correlations. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 44: 265-269
109. Teriu T, Aiba S, Kato T, Tanaka T, Tagami H (1987) HLA-DR antigen expression on keratinocytes in highly inflamed parts of psoriatic lesions. *Br J Dermatol* 116: 87-93
110. Thorsby E, Kirby KE, Brettle A (1970) Cross-reactive HLA antibodies. Absorption and immunizate studies. *Vox Saugs* 18: 373-378

111. Tiilikainen A, Lassus A, Karvonen J, Vartiainen P, Julin M (1980) Psoriasis and HLA-Cw6. *Br J Dermatol* 102: 179-184
112. Tiwari JL, Lowe NJ, Abramovits W, Hawkins BR, Park MS (1982) Association of psoriasis with HLA-DR7. *Br J Dermatol* 106: 227-230
113. Tiwari JL, Terasaki PI (1985) *HLA and Disease*. Springer Verlag, New York.
114. Tomfohrde J, Silverman A, Barnes R, Fernandez Vina MA, Young M, Lory D, Morris L, Wueper KD, Stastny P, Menter A (1994) Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q. *Science* 264: 1141-1145
115. Townsend A, Trowsdale J (1993) The transporters associated with antigen processing. *Semin Cell Biol* 4: 53-61
116. Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camprop GM, Barker JNWN (1997) Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis. *Hum Mol Genet* 6: 813-820
117. Tsuji K, Inouye H, Nose Y, Sasazuki T, Ozawa A, Ohkido M (1979) Further study on HLA-A, B, C, D, DR and haplotype antigen frequencies in psoriasis vulgaris. *Acta Dermatol Venerol* 87 (suppl): 107-108
118. Turowski G, Pietrzyk JJ, Kapinska Mrowska M (1981) Locus B HLA antigens in psoriatic patients. Population and family studies and clinical relationship. *Arch Dermatol res* 271: 315-324
119. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Fry L (1988) Psoriasis: a disease of abnormal keratinocyte proliferation induced by T lymphocytes. *Immunol Today* 7: 256-259
120. Valdimarsson H, Baker BS, Jonsdottir I, Powles A, Fry L (1995) Psoriasis: a T-cell mediated autoimmune disease induced by streptococcal superantigens? *Immunology Today* 16:145-149

121. Walford RI, Finkelstein S, Neerhout R (1970) Acute childhood leukemia in relation to the HL-A human transplantation genes. *Nature* 225: 461-463 Amiel JL (1967) *Histocompatibility Testing 1967* (eds Curtoni ES, Mattiuz PL Tosi RM) Munksgaard Copenhagen, 79-81
122. Watson W, Cann HM, Farber EM, Nall ML (1972) The genetics of psoriasis. *Arch Dermatol* 105: 197-207
123. Webb SR, Gascoigne NRJ (1994) T-cell activation by superantigens. *Curr Opin Immunol* 6: 467-475
124. Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA (1985) Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol* 85: 579-584
125. Woolf B (1955) On estimating the relationship between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19: 251-253
126. Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995) Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases. *J Exp Med* 181: 1597-1601
128. Yoon JW, Austin M, Onodera T et al (1979) Virus induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 300: 1173-1179
129. Yunis JJ, Salazar M, Delgado MB, Alper CA, Bing DH, Yunis EJ (1992) HLA-DQ and DPB1 alleles on HLA-DQW2 and HLA-DQW9 extended haplotypes. *Hum Immunol* 34 (suppl 1):36
130. Zhou J, Chaplin DD (1993) Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9470-9474

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime	Marija Kaštelan
Radno mjesto	Klinika za kožne i spolne bolesti KBC Rijeka
Datum i mjesto rođenja	14. kolovoz 1965. Rijeka, Hrvatska
Obrazovanje	1984. Pedagoški obrazovni centar, Klaićeva 1, Zagreb 1990. diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1990. Summer School on Prenatal Medicine, IUC Dubrovnik 1996. magistar znanosti na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu
Zaposlenje Zagreb	1990-91. liječnički staž, Bolnica za traumatologiju, 1991-94. znanstveni novak, Laboratorij za genotoksične agense, Institut "Ruđer Bošković" u Zagrebu 1994-95. znanstveni suradnik, Klinika za kožne i spolne bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u
Rijeci	1996 - liječnik na specijalizaciji iz dermatologije i venerologije Klinike za kožne i spolne bolesti, KBC Rijeka
Nastava	1994-1995. voditelj vježbi iz dermatovenerologije 1996-1997. voditelj vježbi iz dermatovenerologije
Članstva	Hrvatsko dermatološko društvo Hrvatsko flebološko društvo Hrvatski liječnički zbor

9. POPIS RADOVA

1. Ferle-Vidović A, Kaštelan M, Petrović D, Svetič B, Škrk J, Gabrijelečić D, Turk V. Hipertermičko potenciranje toksičnosti zračenja i citostatika mjereno promjenom količine intracelularnih proteinaza. Zbornik radova Prvog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Zagreb, 1992;68-71.
2. Ferle-Vidović A, Kaštelan M, Petrović D, Šuman L, Kaselj M, Škare D, Mlinarić-Majerski K. Synthesis and biological activity of phencyclidine and its adamantylamine derivatives. Eur J Med Chem 1993;28:243-250.
3. Ferle-Vidović A, Kaštelan M, Petrović D, Škrk J, Vrhovec I. Changes in the quantity of cathepsin D in irradiated human cells following treatment with hyperthermia and interferon α . Radiol Oncol 1993;27:271-274.
4. Petrović D, Ferle-Vidović A, Kaštelan M, Škrk J, Vrhovec I. Utjecaj hipertermije i interferona alfa na sadržaj katepsina D u zračenim stanicama u kulturi. Zbornik radova drugog simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Zagreb, 1994;231-235.
5. Gruber F, Lenković M, Čabrijan L, Brajac I, Kaštelan M. Treatment of generalised pruritus. Period Biol 1997; 99:107 (suppl 1).
6. Grubić Z, Kaštelan M, Čečuk E, Žunec R, Gruber F, Kaštelan A. Molecular analysis of HLA-class II genes in psoriasis vulgaris patients. EurJ Immunogen 1998; 25:59 (suppl 1).
7. Čečuk E, Kaštelan M, Grubić Z, Gruber F, Kaštelan A. The relationship between HLA-Cw alleles and two types of psoriasis vulgaris. EurJ Immunogen 1998; 25:59 (suppl 1).
8. Kaštelan M, Gruber F, Čečuk E, Kerhin-Brkljačić V, Brkljačić-Šurkalović Lj, Pavlović S, Brajac I, Kaštelan A. Risk HLA antigens for psoriasis vulgaris in Croatia. Acta Dermatovenerol Croat 1998; 6:32.
9. Kaštelan M, Gruber F, Čečuk E, Kaštelan A. Polymorphism of HLA-C genes in Croatian patients with psoriasis. Period Biol 1998; 100:84 (suppl 3).

10. Kaštelan M, Brajac I, Gruber F. Treatment of leg ulcers with autologous heparinized blood. *Acta Dermatovenerologica A.P.A.* 1998;7:30-34.
11. Lenković M, Katalenić S, Gruber F, Brajac I, Kaštelan M. Sweet's syndrome: Clinical spectrum. *Acta Dermatovenerol Croat* 1998;5:39-42.
12. Peharda V, Brajac I, Kaštelan M, Stojnić L, Gruber F. Navike uzimanja alkohola i pušenja kod bolesnika s psorijazom. *Psoriasis* 1998;41:21-24.
13. Gruber F, Grubišić-Greblo H, Kaštelan M, Brajac I, Lenković M, Zamolo G. Azithromycin compared with minocycline in the treatment of acne comedonica and papulo-pustulosa. *J Chemother* 1998; 10:481-485.
14. Gruber F, Zamolo G, Saftić M, Peharda V, Kaštelan M. Treatment of confluent and reticulated papillomatosis with azithromycin. *Clin Exp Dermatol* 1998;23:191.
15. Peharda V, Kaštelan M, Čabrić L, Saftić M, Gruber F. Terbinafine in the treatment of tinea capitis. *Acta Dermatovenerologica A.P.A.* 1998;7:164-166.
16. Čečuk-Jeličić E, Grubić Z, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan M, Kaštelan A. Comparison of serology and DNA methods for HLA-Cw typing in the Croatian population. *Period Biol* 1999; 101: 71-75.