

<sup>1</sup>Zavod za tipizaciju tkiva ♦ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku  
Klinički bolnički centar Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb  
<sup>2</sup>Klinika za reumatske bolesti i rehabilitaciju  
Referentni centar MZSS RH za reumatoidni artritis  
Klinički bolnički centar Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

## POVEZANOST MIKROSATELITA HLA I GENA HLA-B\*27 U BOLESNIKA S PSORIJATIČNIM ARTRITISOM U HRVATSKOJ POPULACIJI

### THE CONNECTION BETWEEN HLA MICROSATELLITES AND HLA-B\*27 GENE IN PATIENTS WITH PSORIATIC ARTHRITIS IN CROATIAN POPULATION

Davor Štimac<sup>1</sup> ♦ Zorana Grubić<sup>1</sup> ♦ Katarina Štingl<sup>1</sup>  
Porin Perić<sup>2</sup> ♦ Božidar Ćurković<sup>2</sup> ♦ Renata Žunec<sup>1</sup>

#### Sažetak

Istraživana je raznovrsnost četiri mikrosatelita HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273) u skupini bolesnika s psorijatičnim artritismom (PsA) (N=22) i zdravim osobama (K; N=94) pozitivnima za gen HLA-B\*27, te povezanost haplotipskih veza gena HLA-B\*27 s PsA. Svi ispitanici bili su prethodno tipizirani za gene HLA-A i -B metodom PCR-SSP i bili su HLA-B\*27 pozitivni. Mikrosateliti HLA su analizirani metodom PCR-STR i elektroforezom u ALFexpress sekvenceru. Analiza raspodjele alela mikrosatelita HLA pokazala je statistič-

ki značajne razlike za alele D6S273-3 (PsA-21,1% naspram K-4,9%; P=0,0013) i D6S273-4 (PsA-15,8% naspram K-32,1%; P=0,0180), dok je analiza haplotipskih veza pokazala da je kombinacija HLA-B\*27/D6S273-4 bila statistički značajno smanjena u skupini bolesnika s PsA u odnosu na kontrolnu skupinu (10,5% i 40,2%; P=0,0164). Dobiveni rezultati navode na pretpostavku da je u blizini mikrosatelita D6S273 smješten gen koji igra ulogu u etiopatogenezi PsA, no za konačnu potvrdu nužno je povećati skupinu bolesnika.

#### Ključne riječi

gen HLA-B\*27, psorijatični artritis, mikrosateliti HLA, haplotipske veze

#### Summary

The polymorphism at HLA microsatellites (D6S248, D6S2674, D6S2811 and D6S273) among patients with psoriatic arthritis (PsA) (N=22) and healthy control subjects (K; N=94), as well as haplotypic associations between tested loci were analysed in this study. All subjects were previously typed for HLA-A and -B by PCR-SSP method and were HLA-B\*27 positive. HLA microsatellites were analysed using PCR-STR method and electrophoresis in an ALFexpress sequencer. The results demonstrated statistically significant P value for

following alleles: D6S273-3 (PsA-21.1% vs. K-4.9%; P=0.0013) and D6S273-4 (PsA-15.8% vs. K-32.1%; P=0.0180). Analysis of haplotypic associations showed the only statistically significant difference for combination HLA-B\*27/D6S273-4 (PsA-10.5% vs. K-40.2%; P=0.0164). The results presented in this study lead to the assumption that some other gene/s involved in etiology of PsA are located in the proximity of D6S273 microsatellite, but in order to reach a final conclusion, an increase in the number of patients is necessary.

#### Keywords

HLA-B\*27 gene, psoriatic arthritis, HLA microsatellites, haplotypic associations

doc.dr.sc. Zorana Grubić

Zavod za tipizaciju tkiva ♦ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku ♦ KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

e-mail: zgrubic@kbc-zagreb.hr

Spondiloartropatije su skupina bolesti koje imaju sličnu genetsku podlogu, dijele zajednička klinička obilježja, patogene mehanizme, a povezani su i s prisutnošću gena HLA-B\*27. Uzajamno djelovanje genetskih faktora, faktora okoliša kao i faktora imunološkog prepoznavanja odgovorno je za pojavu raznih kliničkih oblika spondiloartropatija (SpA) u koje ubrajamo: ankilozantni spondilitis (AS), Reiterov sindrom (RS), reaktivni artritis (ReA), artritis povezan s upalnim crijevnim bolestima (IBD), psorijatični artritis (PsA), juvenilne spondiloartropatije (jSpA) i nediferencirane spondiloartropatije.

Psorijatični artritis je upalni artritis povezan s psorijazom, a pripada skupini seronegativnih spondiloartropatija. Neka od obilježja bolesti su: degenerativne promjene na zglobovima koje ponekad uključuju i kralježnicu, odsutstvo reumatoidnog faktora (RF), povezanost s genima HLA, kao i kožne lezije psorijaze. Istraživanja su pokazala da približno 2% osoba u Europi i Sjevernoj Americi boluje od psorijaze, a unutar te populacije 5 do 10% osoba ima i upalni oblik artritisa (1). Bolest se u najjačem obliku javlja tijekom četvrtog do šestog desetljeća života s jednakom učestalošću među muškarcima i ženama. Dosađajna istraživanja pokazala su da postoji jaka veza između antigena HLA razreda I i PsA. Ponajprije je riječ o antigenima lokusa HLA-B i to: HLA-B13, -B17, -B27, -B37, -B57 (2), no također je uočena i povezanost s antigenima HLA-Cw6 i -DR7 (3,4). Rezultati istraživanja provedenih serološkim metodama potvrđeni su i na molekularnoj razini kada je utvrđena značajna povezanost specifičnosti HLA-C\*06 i -DRB1\*07 s razvojem PsA. Autori istraživanja provedenog u Velikoj Britaniji predložili su teoriju prema kojoj bolesnici pozitivni za obje specifičnosti (HLA-C\*06 i -DRB1\*07) imaju puno manje izražene promjene na zglobovima, odnosno imaju blagi oblik PsA (5,6), za razliku od bolesnika koji imaju samo jednu od navedenih specifičnosti, a pokazuju puno teži oblik bolesti.

Povezanost spondiloartropatija s molekulom HLA-B27 je dobro istražena i već dugi niz godina poznata, a razlikuje se ovisno o tipu bolesti. Serološki dobro definirani antigen HLA-B27 tvori skupinu od, do danas otkrivenih, 58 blisko vezanih alela (B\*27:01-B\*27:59, s izuzetkom alela B\*27:22). Među alelima koji su pokazali povezanost sa spondiloartropatijama prvenstveno se ističe alel B\*27:05 za koji je uočena podložnost za razvoj SpA, te B\*27:02. Međutim, treba naglasiti da se ovi aleli gena HLA-B\*27 javljaju i među zdravim osobama u podjednakom omjeru, tj. da je među zdravim osobama u bijeloj rasi pozitivnim za gen HLA-B\*27 najčešći alel B\*27:05, a slijedi ga alel B\*27:02 (7-9). S druge strane, za podtip B\*27:06 utvrđeno je da nije povezan sa spondiloartropatijama. Stoga istraživači diljem svijeta pokušavaju utvrditi razliku između alela B\*27:05 kao i svih ostalih alela gena HLA-B\*27 uočenih kod bolesnika u odnosu na zdravu

populaciju. Jedan od smjerova tih istraživanja je analiza haplotipova, odnosno haplotipskih veza gena HLA-B\*27. Na taj se način može pokušati odgovoriti, a time i razumjeti selekciju antigenskih peptida i degeneraciju tijekom T-staničnog odgovora molekula HLA-B27 (10).

Osim s genima HLA uočena je i povezanost PsA s regijom HLA razreda I u kojoj su smješteni geni MIC, odnosno s genom MICA (engl. *MHC class I chain-related gene A*). Unutar tog gena smješten je mikrosatelit STR\_MICA čiji je alel MICA-A4 prisutan sa značajno većom učestalošću među bolesnicima s PsA (2). Treba reći da se geni MIC nalaze unutar regije HLA razreda I. Rezultati istraživanja provedenih među pripadnicima kanadske populacije ukazali su na postojanje povezanosti alela mikrosatelita unutar skupine gena za nekrozu tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor - TNF*) i PsA. Naime, autori su otkrili da polimorfizam gena TNF $\alpha$  (smješten 250 kb centromerno od gena HLA-B) utječe na razvoj bolesti, točnije da je prisutnost adenina na poziciji -238 ovog gena puno učestalija u bolesnika s PsA (P=0,01) te stoga o ovom polimorfizmu možemo govoriti kao o rizičnom faktoru za razvoj bolesti (11). Istraživanje provedeno među bolesnicima sa SpA u južnoj Indiji temeljilo se na proučavanju produženih haplotipova alela HLA razreda I, podtipova HLA-B27 i mikrosatelita u bolesnika. Rezultati istraživanja pokazali su da postoji značajna povezanost haplotipa HLA-B\*27:05-Cw\*02-STR\_MICA(A4)-C1\_4\_1(213pb)-C1\_2\_5(178pb)-MIB(340pb) s razvojem bolesti u populaciji Indijaca (12).

Upravo je pomoću polimorfničkih genetskih biljega, mikrosatelita, omogućeno bolje razumijevanje genetske podloge za bolest. Mikrosateliti sadrže jedinice DNA koje se ponavljaju, dužine 2-6 parova baza, a smješteni su u izvangenskim i genskim regijama. U humanom genomu javljaju se u prosjeku svakih 6kb (13), a međusobno se razlikuju u dužini ponavljanog slijeda, broju ponavljanja te složenosti uzorka koji se ponavlja. Visok stupanj mutacija ( $10^{-3}$  do  $10^{-5}$  mutacija po mikrosatelitskom lokusu, po generaciji), visoka raznovrsnost, kodinantnost te jednostavan mendelski način nasljeđivanja, čine mikrosatelite vrlo popularnim i vrlo često primjenjivanim genetskim biljegovima. Zbog navedenih osobina i relativno jednostavnog određivanja alela mikrosatelita, danas se koriste u raznim znanstvenim područjima kao što su: evolucijska i populacijska genetika, sudska medicina, povezanost s raznim bolestima (hemokromatoza, reumatoidni artritis, šećerna bolest tip 1, itd). Unutar regije HLA do danas je otkriveno približno 350 mikrosatelita, od kojih se najvećim dijelom radi o dinukleotidnim ponavljanjima i to u više od 60% slučajeva ponavljanjima slijeda CA. Prosječna udaljenost između dva mikrosatelita unutar regije HLA iznosi 10kb (14). Upravo analizom mikrosatelita HLA pokušava se utvrditi postoje li još neki dijelovi regije HLA, osim sa-

mih gena lokusa HLA-B, odnosno gena HLA-B\*27 koji igraju ulogu u etiopatogenezi spondiloartropatija.

Glavni cilj ovog rada bio je istražiti raznovrsnost četiriju mikrosatelita unutar regije HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273) među HLA-B27 poziti-

vnim zdravim nesrodnim osobama i bolesnicima s PsA unutar hrvatske populacije, te odrediti pojedinačne haplotipove, odnosno haplotipske veze, u obje istraživane skupine kako bi se pokušao naći odgovor koje su halotipske veze gena HLA-B\*27 podložne za razvoj PsA.

## Materijal i metoda rada

### Ispitanici

Iz skupine od 58 bolesnika (28 muškaraca i 30 žena) kojima je dijagnosticiran psorijatični artritis na Klinici za reumatske bolesti i rehabilitaciju Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC-Zagreb), izdvojen je uzorak od 22 bolesnika (10 muškaraca i 12 žena) koji su bili pozitivni za gen HLA-B\*27. Svi oboljeli imali su upalni artritis povezan s psorijazom i nisu pokaziva-

li druge reumatske poremećaje (tablica 1). Dijagnoza bolesti temeljila se na kriterijima Europske spondiloartropatijske studijske grupe (engl. *European Spondyloarthropathy Study Group - ESSG*). Kontrolna skupina sastojala se od 94 zdrave, nesrodne osobe pozitivne za gen HLA-B\*27. Svi postupci su bili u skladu s etičkim načelima KBC-a Zagreb. Svim ispitanicima uzeto je 5ml periferne krvi s EDTA.

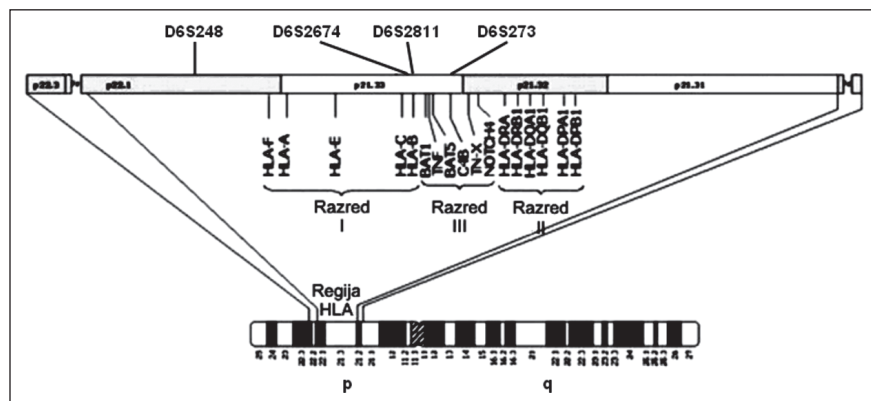
Tablica 1. Osobine bolesnika s psorijatičnim artritismom (PsA)  
Table 1. The characteristics of the patients with psoriatic arthritis (PsA)

Bolesnici s PsA, HLA-B27 pozitivni	N	Postotak
Muškarci	10	45,5%
Žene	12	54,5%
Dob bolesnika	Prosjek	Raspon
Dob	52,4 godina	34-73 godina
Dob početka razvoja bolesti	Prosjek	Raspon
Artritis	41,2 godina	23-50 godina
Psorijaza	33,8 godina	19-54 godina
Trajanje bolesti	Prosjek	Raspon
Artritis	8,7 mjeseci	1-35 mjeseci
Psorijaza	12,3 mjeseci	1-53 mjeseci

Tablica 2. Obilježja analiziranih mikrosatelita HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273)  
Table 2. The characteristics of the analyzed HLA microsatellites (D6S248, D6S2674, D6S2811 and D6S273)

Mikrosatelit	D6S248	D6S2674	D6S2811	D6S273
Dužina PCR produkta (pb)	261-301	131-187	98-138	124-138
Broj alela	21	29	21	8
Ponavljanje DNA	(CA) <sub>n</sub>	(CA) <sub>n</sub>	(CA) <sub>n</sub> AA(CA) <sub>n</sub>	(GT) <sub>n</sub>

Slika. Položaj istraživanih mikrosatelita unutar regije HLA  
Figure. Map of HLA region with four tested HLA microsatellite loci



### Metode

#### Određivanje gena HLA-B\*27

Iz periferne krvi izolirana je DNA pomoću komercijalnog seta za DNA izolaciju (NucleoSpin® Blood). Sve osobe su prethodno bile tipizirane za gene HLA razreda I (A i B) metodom PCR-SSP (engl. *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer*) tj. lančanom reakcijom polimeraze i početnica specifičnih za određeni slijed (15).

#### Određivanje alela mikrosatelita HLA

Četiri mikrosatelita (D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273) umnožena su po protokolu XIII IHW (engl. *International Histocompatibility Workshop*) (15). Smještaj testiranih mikrosatelita HLA unutar regije HLA je prikazan na slici, a obilježja pojedinog analiziranog mikrosatelita navedena su u tablici 2.

Mikrosatelitski lokusi HLA analizirani su pomoću PCR-a i specifičnih početnica 5' i 3'. Početnica 5' je bila obilježena fluorescentnom bojom Cy5. Umnoženi produkti su analizirani elektroforezom na 6% -tnom poliakrilamidnom gelu u automatskom sekvenceru (ALFexpress, Amersham Pharmacia, Uppsala, Švedska). Očitavanje alela provedeno je uz pomoć lasera koji pobuđuje fluorescenciju boje vezane za fragmente DNA te fotodetektora koji očitavaju fluorescenciju u trenutku kad fragment DNA prolazi kroz lasersku zraku. Određivanje duljine

alela DNA provedeno je uz pomoć računalnog programa AlleleLocator (Amersham Pharmacia) koji na temelju vremena elektroforeze standarda poznate duljine izračunava duljinu alela analiziranog mikrosatelita (16).

#### Statistička analiza

Učestalost alela za svaki mikrosatelitski lokus određena je direktnim brojanjem, a osoba se smatra homozigotom za analizirani lokus ukoliko je na njemu

određen samo jedan alel. Za usporedbu učestalosti alela mikrosatelita HLA između ispitivanih skupina koristio se  $\chi^2$  test i Fischerov egzaktni test, a omjer izgleda (OR) računao se po Woolfovoj formuli (17). Povezanost pojedinih genetskih čimbenika procijenjena je uz pomoć 2x2 tablica pri čemu je razina statističke značajnosti bila 0,05, u slučaju kada je broj pojedinog čimbenika bio manji od 5, koristio se Fisherov test.

### Rezultati

#### Raspodjela alela na mikrosatelitima HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811, D6S273) u skupini bolesnika s psorijatičnim artritismom (N=22) i kontrolnoj skupini (N=94)

U tablici 3 prikazana je raspodjela alela četiri testirana mikrosatelita HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273) među bolesnicima s PsA i kontrolnim osobama pozitivnim za gen HLA-B\*27.

Na lokusu D6S248 u obje istraživane skupine najveću učestalost pokazali su aleli D6S248-13 i D6S248-4. Učestalost svih ostalih alela bila je  $\leq 10,0\%$ . Povećana učestalost alela D6S248-10 (10,0%) među bolesni-

cima s PsA u usporedbi sa skupinom zdravih ispitanika (2,7%) nije bila statistički značajna ( $P=0,0522$ ).

Analiza raspodjele alela na lokusu D6S2674 pokazala je da se radi o mikrosatelitu na kojem je u obje istraživane skupine dominirao alel D6S2674-1 dok je učestalost ostalih alela lokusa D6S2674 bila  $< 10,0\%$ . Na ovom lokusu uočen je najveći broj ispitanika sa samo jednim alelom tj. pretpostavljenih homozigota (bolesnici - 37,50%, kontrola - 5,11%) što je bilo i očekivano jer je uočeni polimorfizam ovog lokusa mali. Naime, samo šest različitih alela lokusa D6S2674 uočeno je u obje testirane skupine, što je u suprotnosti s brojem poznatih alela D6S2674

Tablica 3. Učestalost alela mikrosatelita HLA (D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273) među bolesnicima s psorijatičnim artritismom (N=22) i kontrolnim ispitanicima (N=94)  
Table 3. The frequency of HLA microsatellite alleles (D6S248, D6S2674, D6S2811, and D6S273) among patients with psoriatic arthritis (N=22) and healthy control subjects (N=94)

D6S248			D6S2674			D6S2811			D6S273		
Alel	Bolesnici s PsA	Kontrola	Alel	Bolesnici s PsA	Kontrola	Alel	Bolesnici s PsA	Kontrola	Alel	Bolesnici s PsA	Kontrola
1-261pb	-	1,63%	1-131pb	47,50%	42,05%	1-98pb	47,37%	41,94%	1-126pb	-	1,63%
2-263pb	5,00%	3,26%	2-133pb	-	1,14%	2-100pb	-	1,08%	2-128pb	5,26%	1,63%
3-265pb	5,00%	0,54%	3-137pb	7,50%	0,57%	3-104pb	-	1,08%	3-130pb <sup>1</sup>	21,05%	4,89%
4-267pb	20,00%	19,57%	4-139pb	-	1,14%	4-106pb	-	0,54%	4-132pb <sup>2</sup>	15,79%	32,07%
5-269pb	-	2,17%	5-141pb	-	1,70%	5-108pb	2,63%	4,84%	5-134pb	34,21%	27,17%
6-273pb	-	4,89%	6-413pb	2,50%	2,84%	6-110pb	2,63%	2,15%	6-136pb	2,63%	2,17%
7-277pb	10,00%	5,98%	7-145pb	-	1,14%	7-112pb	2,63%	1,61%	7-198pb	2,63%	4,35%
8-279pb	-	1,09%	8-147pb	2,50%	2,84%	8-114pb	-	2,15%	8-124pb	2,63%	-
9-283pb	5,00%	-	9-149pb	-	1,70%	9-116pb	-	4,84%	Nedefin.	15,79%	26,09%
10-285pb	10,00%	2,72%	10-151pb	-	5,11%	10-118pb	-	2,15%			
11-287pb	-	5,43%	11-153pb	-	2,84%	11-120pb	2,63%	3,23%			
12-289pb	2,50%	2,17%	12-155pb	-	0,57%	12-122pb	5,26%	0,54%			
13-291pb	32,50%	27,17%	13-157pb	-	2,27%	13-124pb	-	1,08%			
14-293pb	2,50%	5,43%	14-159pb	-	1,70%	14-126pb	5,26%	15,05%			
15-295pb	-	4,35%	15-161pb	-	5,11%	15-128pb	2,63%	5,91%			
16-297pb	-	2,17%	16-163pb	-	11,93%	16-130pb	5,26%	4,30%			
Nedefin.	7,50%	11,41%	17-165pb	2,50%	4,55%	17-134pb	-	0,54%			
			18-167pb	-	3,41%	18-136pb	-	0,54%			
			19-169pb	-	1,14%	Nedefin.	23,68%	6,45%			
			20-173pb	-	0,57%						
			21-187pb	-	0,57%						
			Nedefin.	37,50%	5,11%						

<sup>1</sup>P=0,0013 <sup>2</sup>P=0,0180

(do danas je poznato 29 različitih alela; 21 alel je uočen u kontrolnoj skupini ispitanika, tablica 3).

Na lokusu D6S2811 uočili smo 18 od 21 poznatih alela dužine od 98pb do 138pb. Najčešći alel u obje ispitivane skupine bio je alel D6S2811-1. Smanjena učestalost alela D6S2811-14 u skupini bolesnika s PsA (5,3 %) u usporedbi s kontrolom (15,1 %) nije statistički značajna.

Alel D6S273-5 bio je najzastupljeniji na lokusu D6S273, a u kontrolnoj skupini bio je na drugom mjestu po zastupljenosti. Razlika učestalosti alela D6S273-3 (PsA-21,1 %, K-4,9 %) statistički je značajna ( $P=0,0013$ ) kao i smanjena učestalost alela D6S273-4 u skupini bolesnika s PsA u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $P=0,0180$ ). Zanimljivo je spomenuti da je kod jednog bolesnika s PsA uočen alel D6S273-8 koji je kraći od najkraćeg dosad opisana alela ovog lokusa, alela D6S273-1 (126pb).

#### **Analiza produženih haplotipskih veza gena HLA-B\*27 u skupini bolesnika s psorijatičnim artritismom (N=22) i kontrolnoj skupini (N=94)**

Naredni cilj ovog rada bio je analizirati produžene haplotipske veze gena HLA-B\*27 u obje ispitivane skupine (tablica 4). Koristimo pojam haplotipska veza, a ne haplotip jer su istraživanjem bili obuhvaćeni nesrodni pojedinci.

Analiza haplotipske veze gena HLA-B\*27 i alela na lokusu D6S248 pokazala je najveću učestalost kombinacije HLA-B\*27/D6S248-13. Ova haplotipska veza pojavila se s najvećom učestalošću u skupini bolesnika s PsA no u usporedbi sa kontrolnom skupinom razlika nije bila statistički značajna ( $P=0,1910$ ). Za haplotipske veze HLA-B\*27/D6S2674-1 i HLA-B\*27/D6S2811-1 iz tablice 4 vidljivo je da se pojavljuju s približno jednakom zastupljenošću u obje skupine ispitanika. U slučaju haplotipskih veza HLA-B/D6S273 kombinacija HLA-B\*27/D6S273-5 bila je najučestalija kod bolesnika s PsA. Haplotipska veza HLA-B\*27/D6S273-4 bila je zastupljena s 10,5 % među bolesnicima s PsA, što je u odnosu na kontrolnu skupinu, gdje je uočena kod 40,2 % zdravih ispitanika, statistički značajna razlika ( $P=0,0164$ ). Naprotiv, razlika u zastupljenosti haplo-

tipske veze HLA-B\*27/D6S273-3 među bolesnicima i kontrolnom skupinom nije statistički značajna.

Analizirajući produžene haplotipske veze gena HLA-B\*27 koje su uključile sve testirane mikrosatelite uočili smo da se produžena haplotipska veza D6S248-4/D6S2674-1/HLA-B\*27, kao i haplotipska veza D6S248-4/D6S2674-1/D6S2811-1/HLA-B\*27 pojavljuju s približno jednakom zastupljenošću unutar skupine bolesnika s PsA i kontrole (PsA-18 %, K-22 %), dok se produžene haplotipske veze D6S248-13/D6S2674-1/HLA-B\*27 i D6S248-13/D6S2674-1/D6S2811-1/HLA-B\*27 pojavljuju s manjom zastupljenošću (<11,0 %) bez statističke značajnosti.

Tablica 4. Učestalost haplotipskih veza gena HLA-B\*27 i mikrosatelita D6S248, D6S2674, D6S2811, D6S273 među bolesnicima s psorijatičnim artritismom (N=22) i kontrolnim ispitanicima (N=94)

Table 4. The frequency of haplotype associations between gene HLA-B\*27 and D6S248, D6S2674, D6S2811, D6S273 microsatellites among patients with psoriatic arthritis (N=22) and healthy control subjects (N=94)

Haplotipska veza	Bolesnici s PsA	Kontrola	
HLA-B/D6S248	B*27/D6S248-3	10,00 %	1,09 %
	B*27/D6S248-4	20,00 %	31,52 %
	B*27/D6S248-7	15,00 %	6,52 %
	B*27/D6S248-9	5,00 %	-
	B*27/D6S248-12	5,00 %	-
	B*27/D6S248-13	40,00 %	22,83 %
HLA-B/D6S2674	B*27/D6S2674-1	50,00 %	61,36 %
	B*27/D6S2674-3	10,00 %	1,14 %
HLA-B/D6S2811	B*27/D6S2811-1	47,37 %	62,36 %
	B*27/D6S2811-5	5,26 %	3,23 %
	B*27/D6S2811-7	5,26 %	-
	B*27/D6S2811-11	5,26 %	2,15 %
	B*27/D6S2811-16	5,26 %	-
HLA-B/D6S273	B*27/D6S273-3	21,05 %	9,78 %
	B*27/D6S273-4	10,531 %	40,21 %
	B*27/D6S273-5	36,84 %	25,00 %
	B*27/D6S273-6	5,26 %	1,09 %
	B*27/D6S273-7	5,26 %	1,09 %
	B*27/D6S273-8	5,26 %	-

<sup>1</sup>P= 0,0164

#### **Rasprava**

Cilj rada bio je istražiti raznovrsnost produženih haplotipova gena HLA-B\*27 među bolesnicima s psorijatičnim artritismom u Hrvatskoj.

Mikrosatelitski lokusi HLA uključeni u ovo istraživanje bili su: D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273, a naglasak je stavljen na utvrđivanje odnosa između mikrosatelita i lokusa HLA-B. Drugim riječima, uz pomoć analize mikrosatelita koji su smješteni unutar regije HLA, pokušalo se utvrditi postoje li još neki dijelovi regije HLA, osim samog lokusa HLA-B i samog gena HLA-B\*27, koji

igraju ulogu u etiopatogenezi psorijatičnog artritisa. Naime, opće je poznato da prisutnost alela HLA-B\*27 povećava rizik da se kod nositelja tog alela bolest i pojavi.

Od analiziranih mikrosatelita HLA, na lokusu D6S248, smještenom između gena HLA-A i gena HLA-F nije uočen niti jedan alel za koji bi mogli reći da ima podložnu ili zaštitnu ulogu u nastanku PsA. Iz dostupnih literaturnih podataka uočena je povezanost s hemokromatozom. Istraživanjem provedenim u Australiji među bolesnicima s hemokromatozom uočena je po-

većana učestalost alela D6S248-11 u odnosu na zdrave ispitanike, što govori u prilog teoriji da je taj alel podložan za razvoj hemokromatoze (18).

Sljedeći analizirani lokus D6S2674 smješten je između lokusa HLA-B i HLA-C, riječ je o mikrosatelitu HLA s velikim brojem alela. Kod ispitanika s PsA dominirao je alel D6S2674-1 međutim bez statistički značajne razlike u odnosu na zdravu kontrolu tako da ne možemo govoriti o njegovoj povezanosti s psorijatičnim artritisom. Razlog za uključivanje ovog mikrosatelita bio je dobro poznata povezanost gena lokusa HLA-C s psorijazom tipa I (alel HLA-C\*06:02). Istraživanja provedena u brojnim populacijama u svijetu utvrdila je vrlo jaku povezanost alela HLA-C\*06 s psorijazom tipa I. Istovremeno, analizirajući skupine bolesnika s PsA utvrđeno je da bolesnici s PsA i psorijazom tipa I imaju statistički značajno veću učestalost alela HLA-C\*06 u odnosu na zdrave ispitanike, dok kod bolesnika s PsA i psorijazom tipa II takva povezanost nije pronađena.

Centromerno od lokusa HLA-C nalazi se treći mikrosatelit HLA analiziran u ovom radu. Mikrosatelit D6S2811 (C1\_2\_5) vrlo je zanimljiv zbog rezultata prethodnih istraživanja na populacijama Indijaca i Kineza gdje je uočena jaka povezanost tog lokusa s SpA. Istraživanje provedeno u Kini pokazalo je da je alel D6S2811-15 neovisan genetski biljeg podložan za razvoj ankilozantnog spondilitisa, što govori u prilog tome da u blizini gena HLA-B i HLA-C postoje još i dodatni geni koji određuju podložnost za bolesti SpA neovisno o samom genu HLA-B\*27 (19).

Za mikrosatelit D6S273 brojnim istraživanjima dokazana je povezanost s različitim bolestima, njegov je položaj u blizini gena TNF- $\alpha$  i gena TNF- $\beta$  koji su u prethodnim istraživanjima pokazali povezanost s PsA. Točnije, proučavanjem polimorfizma gena TNF utvrđena je dominacija alela TNF\*-238A i TNF\*-857T kod oboljelih od psorijaze i PsA. Znanstvenici smatraju da je rezultat te povezanosti utjecaj alela TNF\*-857T na povećanu proizvodnju citokina TNF- $\alpha$  što rezultira nastajanjem upalnih puteva koji su odgovorni za pojavu PsA (20). Za alel D6S273-4 možemo ustvrditi da ima zaštitnu ulogu jer je

kod osoba s PsA, u odnosu na zdrave ispitanike uočena značajno smanjena zastupljenost ( $P=0,0180$ ) tog alela. Također, unutar skupine bolesnika s PsA uočeno je da alel D6S273-3 ima povećanu učestalost u odnosu na kontrolu i za taj alel možemo pretpostaviti da je rizičan faktor za bolest tj. njegova prisutnost kod HLA-B27 pozitivnih osoba povećava rizik nastanka bolesti. Usporedba učestalosti alela mikrosatelita D6S273 (D6S273-3, D6S273-4 i D6S273-5) između hrvatske populacije i drugih europskih populacija (Italija, Nizozemska) nisu uočene statistički značajnije razlike (21). Zanimljivo je spomenuti da za alel D6S273-2 nije uočena podložnost u razvoju PsA dok je istraživanjem provedenim u Kini utvrđeno da je podložan za razvoj reumatoidnog artritisa (22).

Analizom haplotipske veze gena HLA-B\*27 i alela lokusa D6S248, D6S2674, D6S2811 i D6S273 uočeno je da povećana učestalost haplotipske veze HLA-B\*27/D6S248-13 među bolesnicima s PsA nema utjecaja na razvoj bolesti. Isti rezultat je dobiven i za haplotipske veze HLA-B\*27/D6S2674 i HLA-B\*27/D6S2811. Usporedba haplotipskih veza između alela na lokusu D6S273 i gena HLA-B\*27 pokazala je da među bolesnicima s PsA postoji znatno manja zastupljenost haplotipske veze HLA-B\*27/D6S273-4 u odnosu na zdravu kontrolu ( $P=0,0164$ ) te možemo pretpostaviti da ta haplotipska veza ima zaštitnu ulogu u nastanku PsA. Niti jedna produžena haplotipska veza gena HLA-B\*27 koja je uključila alele sva četiri testirana mikrosatelita HLA nije pokazala statistički značajnu razliku u učestalosti između dvije skupine ispitanika, što govori u prilog pretpostavci da gen/i povezani s nastankom PsA nisu smješteni na čitavom području na kojim se nalaze testirani mikrosateliti (udaljenost između mikrosatelita D6S248 i mikrosatelita D6S273). Naime, na temelju rezultata ovog rada možemo pretpostaviti da se upravo u blizini lokusa D6S273, bilo prema lokusu HLA-B ili prema lokusu HLA-DRB1, nalaze gen/i koji igraju ulogu u etiopatogenezi PsA. Stoga je nužno povećati bolesničku skupinu kako bi se pronašle razlike između "bolesnih" i "zdravih" haplotipskih veza gena HLA-B27, ali isto tako uključiti i druge mikrosatelite u tom dijelu regije HLA.

## Literatura

1. Rahnam P, Elder JT. Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005;64:37-39.
2. Grubić Z, Perić P, Čečuk-Jeličić E, Žunec R, Štingl K, Čurković B, Kerhin-Brkljačić V. The MICA-A4 triplet repeats polymorphism in the transmembrane region confers additional risk for development of psoriatic in the Croatian population. *European Journal of Immunogenetics* 2004;31:93-98.
3. Nograles EK, Brasington DR, Bowcock MA. New insights into the pathogenesis and genetics of psoriatic arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2009;5(2):83-91.
4. Ho YPCP, Barton A, Worthington J, Plant D, Griffiths EMC, Young SH, Bradburn P, Thomson W, Silman JA, Bruce NI. Investigating the role of the HLA-Cw\*06 and HLA-DRB1 genes in susceptibility to psoriatic arthritis: comparison with psoriasis and undifferentiated inflammatory arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008;67:677-682.
5. Ho YPCP, Barton A, Worthington J, Thomson W, Silman JA, Bruce NI. HLA-Cw6 and HLA-DRB1\*07

together are associated with less severe joint disease in psoriatic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007;66:807-811.

6. Queiro R, Gonzalez S, Lopez-Larrea C, Alperi M, Sarasqueta C, Riestra LJ, Ballina J. HLA-C locus alleles may modulate the clinical expression of psoriatic arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2006;8:R185.

7. Grubić Z. Gen HLA-B27: polimorfizam, evolucija, raspodjela i povezanost sa spondiloartropatijama. *Reumatizam* 2006;53(1):5-10.

8. Škifić M, Štingl K, Žunec R, Grubić Z. Raznovrsnost produženih haplotipova gena HLA-B\*27 u Hrvatskoj. *Reumatizam* 2009;56(1):17-24.

9. Grubić Z, Kerhin-Brkljačić V, Perić P, Čečuk-Jeličić E, Žunec R, Kaštelan A. HLA-B27 subtypes in Croatian patients with ankylosing spondylitis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2001;30:51-52.

10. Bowness P, Zaccari N, Bird L, Jones YE. HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 1999;16:1-10.

11. Rahman P, Siannis F, Butt C, Farewell V, Peddle L, Pellett F, Gladman D. TNF $\alpha$  polymorphisms and risk of psoriatic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006;65(7):919-923.

12. Thomas R, Philip J, Banerjee M. Association of an extended haplotype of HLA class I alleles and their flanking microsatellites with spondyloarthropathies in south Indian patients. *Human Immunology* 2006;67:318-323.

13. Koreth J, Leary OJ, McGee J. Microsatellites and PCR genomics. *Journal of Pathology* 1996;178:239-248.

14. Li Y-C, Korol BA, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 2004;21:991-1007.

15. HLA 2004: Immunobiology of the Human MHC. U: Hansen JA, Dupont B, eds. *Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Congress*. Seattle, WA: IHWG Press. 2004:vol I & II.

16. Štingl K. *Uloga rezultata analize mikrosatelitskih lokusa u transplantaciji hematopoetskih matičnih stanica*. Disertacija. Zagreb. 2009.

17. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Annals of Human Genetics* 1955;19:251.

18. Jazwinska EC, Pyper WR, Burt MJ, Francis JL, Goldwurm S, Webb SI, Lee SC, Halliday JW, Powell LW. Haplotype analysis in Australian hemochromatosis patients: Evidence for a predominant ancestral haplotype exclusively associated with hemochromatosis. *The American Journal of Human Genetics* 1995;56:428-433.

19. Fang M, Chen R, Cai Q, Duan S, Lv K, Cheng N, Sun S. Association of HLA genes with ankylosing spondylitis in Han population of eastern China. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007;65:559-566.

20. Reich K, Hüffmeier U, König RI, Lascorz J, Lohmann J, Wendler J, Traupe H, Mössner R, Reis A, Burkhardt H. TNF polymorphisms in psoriasis. Association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF\* $\alpha$ -857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis & Rheumatism* 2007;56:2056-2064.

21. Grubić Z, Moghaddam PH, Giphart MJ, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kaštelan A. Distribution of alleles at two microsatellite loci (D6S273 and TNF $\alpha$ ) in Croatian population. *Collegium Antropologicum* 1999;23:87-90.

22. Harjaček M, Margetić T, Kerhin-Brkljačić V, Martinez N, Grubić Z. HLA-B\*27/HLA-B\*07 in combination with D6S273-134 allele is associated with increased susceptibility to juvenile spondyloarthropathies. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2008;26:498-504.