

HLA-DQA1 i HLADQB1 geni u pacijenata s celijakijom

HLA-DQA1 and HLADQB1 genes in celiac disease

Brankica Mijandrušić Sinčić^{1*}, Nada Starčević Čizmarević², Vanja Licul¹,
Marija Crnić-Martinović³, Smiljana Ristić², Miljenko Kapović²

SAŽETAK. Cilj: Utvrditi učestalost alela i genotipova HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gena u oboljelih od celijakije, kao i njihov utjecaj na kliničku ekspresiju bolesti. **Ispitanici i metode:** U ispitivanju je uključeno 110 pacijenata (60 žena i 50 muškaraca) s dijagnosticiranom celijakijom prema revidiranim ESPGHAN kriterijima (*The European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) koji su klinički obrađeni na Klinici za internu medicinu i Klinici za pedijatriju KBC-a Rijeka. Genotipizacija HLA alela klase II u pacijenata izvršena je metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) s alel specifičnim početnicama (engl. *Sequence Specific Primer – SSP*), pri čemu su korišteni komercijalni kitovi niske i srednje rezolucije GenoVision SSP. **Rezultati:** Svi pacijenti imali su barem jedan rizični HLA-DQA1 ili HLA-DQB1 alel. Homozigota za rizične HLA-DQB1 alele bilo je 36,3 %, a za HLA-DQA1 34,5 %. Genotipovi za HLA-DQ2 i/ili DQ8 heterodimere prisutni su u 92,7 % pacijenata. HLA-DQ2 prisutan je u 79,1 % pacijenata, a HLA-DQ8 u 20,9 %. Nije utvrđena značajna razlika ($P < 0,05$) u učestalosti nosioca HLA-DQ2 i/ili DQ8 ovisno o tipu celijakije. Opažen je trend ranijeg postavljanja dijagnoze kao i veća pojavnost drugih autoimunskih bolesti u homozigota u odnosu na ostale genotipove. **Zaključci:** Dobiveni rezultati ukazuju da je prisutnost HLA-DQ2/DQ8 heterodimera u hrvatskih pacijenata s celijakijom sukladna postojećem gradijentu sjever-jug u europskim populacijama. HLA genotipizacija pacijenata ima nesumnjiv značaj u kliničkoj praksi pri postavljanju dijagnoze.

Ključne riječi: celijakija; HLA-DQ2; HLA-DQ8; HLA-DQA1; HLA-DQB1

Abstract. Objective: To determine the frequency of alleles and genotypes of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes in patients with celiac disease and their impact on the clinical expression of the disease. **Subjects and Methods:** The study involved 110 patients (60 women and 50 men) with celiac disease diagnosed according to the revised ESPGHAN (The European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition) criteria at the Clinic of Internal Medicine and Pediatric Clinic, University Hospital Centre Rijeka. The genotyping of HLA class II alleles was performed by polymerase chain reaction method (PCR) with allele-specific primers (Sequence Specific Primer-SSA) using commercial kits of low and medium resolution GenoVision SSP. **Results:** All patients had at least one risk HLA-DQA1 or HLA-DQB1 allele. Homozygotes for the HLA-DQB1 alleles were 36.3 %, and for HLA-DQA1 34.5 %. Genotypes for the HLA-DQ2 and/or HLA-DQ8 heterodimers were present in 92.7 % of patients. HLA-DQ2 was present in 79.1 % of patients while HLA-DQ8 in 20.9 %. There are no significant difference ($P > 0.05$) in the frequency of the HLA-DQ2 and/or HLA-DQ8 carriers depending on the type of celiac disease. An earlier diagnosis and greater incidence of other autoimmune diseases in homozygotes, compared to other genotypes, was observed. **Conclusions:** The results have shown that the presence of HLA-DQ2/DQ8 heterodimers in Croatian celiac patients is in range with the existing north-south gradient in European populations. HLA genotyping in celiac patients has explicit effects in clinical practice when setting up the diagnosis.

Key words: celiac disease, HLA-DQ2; HLA-DQ8; HLA-DQA1; HLA-DQB1

¹Klinika za internu medicinu, KBC Rijeka, Rijeka

²Zavod za biologiju i medicinsku genetiku, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

³Klinički zavod za transfuzijsku medicinu, KBC Rijeka, Rijeka

***Dopisni autor:**

Izv. prof. dr. sc. Brankica Mijandrušić Sinčić,
dr. med.

Klinika za internu medicinu
Klinički bolnički centar Rijeka
Krešimirova 42, 51 000 Rijeka
e-mail: bsincic@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Celijakija je kronična bolest tankoga crijeva uzrokovana glutenom iz pšenice, raži i ječma. Bolest je karakterizirana poremećenim imunskim odgovorom, u genetski predisponiranih osoba, s posljedičnim oštećenjem sluznice tankoga crijeva i malapsorpcijom¹.

Iako je još 1888. godine Samuel Gee dao cjelovit opis bolesti, naglasivši da se bolest može javiti u svakoj životnoj dobi², dugi niz godina je celijakija

U etiopatogenezi celijakije uz gluten kao okidač bolesti genetska predispozicija ima ključnu ulogu, pri čemu je HLA sustav najvažniji genetski čimbenik. Istraživanje HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gena u hrvatskih pacijenata s celijakijom sukladno je postojećem gradijentu sjever-jug u europskim populacijama. Potvrđena je i veća pridruženost drugih autoimunskih bolesti.

smatrana bolešću dječje dobi. Klasičnu sliku bolesti karakteriziraju proljevi i gubitak tjelesne težine uz kliničke znakove uzrokovane malapsorpcijom makro i mirkonutrijenata. Takva se klinička slika najčešće javlja u djece u dobi između 6. i 24. mjeseca. U odraslih je pacijenata najčešće prisutna neklasična, atipična klinička slika u kojoj dominiraju izvancrijevne manifestacije bolesti: anemija uslijed manjka željeza, gubitak koštane mase, periferna neuropatija, alterirani jetreni nalazi i dr.¹⁻³ Nadalje, celijakija se češće javlja uz druge autoimunske bolesti i urođene sindrome⁴, a povezanost se dijelom tumači zajedničkom genetskom predispozicijom. Najčešće bolesti povezane s celijakijom su: šećerna bolest tip 1, autoimunske bolesti štitnjače, autoimunske bolesti jetre, upalne bolesti crijeva (Crohnova bolest i ulcerozni kolitis), Sjogrenova bolest te IgA deficijencija⁴⁻⁷. Do 20 % pacijenata može imati i egzokrinu pankreasnu insuficijenciju⁸.

Osim celijakije, klasične autoimunske bolesti uzrokovane glutenom, postoje još barem dva klinička entiteta vezana za gluten i to: necelijakična preosjetljivost na gluten (NCGS) i alergija na pšenicu^{1,9}. Za NCGS ne postoje serološki testovi, a bolest se dokazuje dvostruko-slijepim, placebo-kontroliranim uvođenjem glutena u prehranu. U

alergiji na pšenicu postoje specifična IgE protutijela, a za postavljanje dijagnoze je uz IgE protutijela potrebno i dvostruko-slijepo, placebo-kontrolirano uvođenje glutena⁹. Pod utjecajem popularne literature zamjetan broj ljudi prakticira dijetu bez glutena, što stvara dodatan problem u egzaktnom postavljanju dijagnoze celijakije. Recentno objavljene smjernice za dijagnozu i liječenje celijakije¹⁰⁻¹² uz serologiju i biopsiju sluznice (*zlatni standard* u postavljanju dijagnoze) snažno afirmiraju i genetsko testiranje na HLA-DQ2 i HLA-DQ8 heterodimere u dijagnostičkom algoritmu. Genetsko testiranje je najčešće potrebno učiniti u slučajevima diskordantnosti nalaza specifičnih protutijela i nalaza biopsije te u pacijenta koji su sami započeli s dijetom bez glutena i ne prihvaćaju test opterećenja^{11,12}. Najveći klinički značaj genetskog testiranja na prisutnost HLA-DQ2 i HLA-DQ8 heterodimera je u isključivanju bolesti s obzirom na njegovu visoku negativnu prediktivnu vrijednost¹⁰⁻¹³ - više od 95 % oboljelih od celijakije nosi HLA-DQ2 ili HLA-DQ8 haplotip^{11,12}. No važno je istaknuti da je 25 % pripadnika bijele rase HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 pozitivno, a celijakiju će razviti samo 4 % nositelja rizičnog genotipa¹⁴.

HLA-DQ2 i HLA-DQ8 molekule kodirane su HLA sustavom koji je lociran na kratkom kraku kromosoma 6, u regiji 6p21.3. Regiju čini više od 250 gena s 4 milijuna parova baza, što približno obuhvaća 0,12 % humanog genoma. HLA geni kodiraju sintezu proteina koji predočavaju antigene imunskom kompetentnim stanicama¹⁵⁻¹⁷. *HUGO-Gene Nomenclature Committee* je označio HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gene razreda II kao CELIAC1 i smatra se da samo HLA regija pridonosi oko 40 % heritabilnosti celijakije¹⁸⁻¹⁹. Izoforme receptora HLA-DQ2 i HLA-DQ8, koje su produkti rizičnih alela, imaju snažan afinitet za deaminirani glijadin, što dovodi do aktivacije T-limfocita kao ključnog dijela u patogenezi celijakije²⁰.

Polazeći od tih spoznaja multicentrične studije provedene u Europi prijavile su prisutnost haplotipa HLA-DQ2 u 86 do 93 % oboljelih od celijakije, dok oko 3 do 8 % ovih pacijenata ima HLA-DQ8, ali ne i HLA-DQ2 molekule¹⁹. Dosadašnja serološka istraživanja sugeriraju da je celijakija u hrvatskoj populaciji primarno povezana s HLA-DR3-DQ2

haplotipom²¹, te je utvrđena prisutnost HLA-DQ2 heterodimera u više od 90 % pacijenata²², što je potvrđeno i HLA genotipizacijom u 63 djeteta oboljela od celijakije²³.

Cilj rada

Zbog neupitnog značaja HLA genotipizacije u etiopatogenezi u dijagnostici celijakije cilj rada bio je utvrditi učestalost HLA-DQA1 i HLA-DQB1 alela i genotipova, kao i utjecaj navedenih gena na kliničku ekspresiju bolesti.

ISPITANICI I METODE

Ispitanici

U ispitivanje je uključeno 110 pacijenata (60 žena i 50 muškaraca) s dijagnosticiranom celijakijom prema revidiranim ESPGHAN kriterijima²⁴ koji su klinički obrađeni na Klinici za internu medicinu i Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra u Rijeci. Pacijenti su prikupljeni u okviru znanstveno-istraživačkog projekta „Genetsko testiranje pacijenata s kroničnim bolestima tankog crijeva“ (br. 062-0000000-0219) koji je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske.

Medicinski podaci i humani materijal prikupljeni su sukladno etičkim i bioetičkim principima te je osigurana privatnost ispitanika uključenih u istraživanje i zaštita tajnosti podataka. Nakon objašnjenja svrhe i metodologije istraživanja te odgovora na eventualna pitanja ispitanika, ispitanik ili roditelj/skrbnik potpisao je informirani pristanak. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine prema kliničkoj prezentaciji bolesti (klasična i neklasična, atipična klinička manifestacija celijakije).

Metode

Molekularno-genetička analiza HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gena napravljena je na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Rijeci i Zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Rijeka. Ispitanicima je u epruvete s antikoagulantom (EDTA) izvađeno po 5 ml periferne krvi. Genomski DNA izolirao se pomoću kitova za izolaciju (Qiagen FlexiGene DNA Kit -QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) prema uputama proizvođača.

Genotipizacija HLA alela klase II u pacijenata izvršena je metodom lančane reakcije polimerazom

(PCR, *Polymerase Chain Reaction*) s alel specifičnim početnicama (*engl. Sequence Specific Primer – SSP*), pri čemu su korišteni komercijalni kitovi niske i srednje rezolucije GenoVision SSP (Olerup SSP AB, Allenex AB, Stockholm, Sweden). Genetička analiza provedena je standardno prema uputama proizvođača, a interpretacija rezultata vršila se također prema uputi proizvođača koristeći listu alela IGMT/HLA²⁵.

Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je računalnim programom Statistika 10.0. Na temelju dobivenih rezultata uspoređene su učestalosti genotipova za nosioce HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 molekula u podskupinama pacijenata pomoću Hi-kvadrat testa. Također je ispitana povezanost između genotipa i fenotipske ekspresije bolesti. U okviru analize kliničkih pokazatelja korištena je deskriptivna statistika (srednje vrijednosti, standardne devijacije). Utjecaj genotipova na dob nastupa bolesti testiran je jednosmjernim ANOVA testom. Rezultati su smatrani statistički značajno različitim na razini $P < 0,05$.

REZULTATI

Klasičnom tipu bolesti pripadalo je 55 (50,0 %) pacijenata, a neklasičnom tipu također 55 (50,0 %) pacijenata. Obiteljski oblik bolesti (više od jednog oboljelog unutar obitelji) imao je 51 pacijent (46,4 %), a neobiteljski oblik (pojedinačni slučaj bolesti unutar obitelji) 59 (53,6 %) (tablica 1). Prosječna dob dijagnosticiranja bolesti u neklasičnom tipu celijakije bila je $25,6 \pm 8,6$ godina. Nije bilo značajne razlike ($P = 0,798$) u dobi dijagnosticiranja između pacijenata ($23,9 \pm 10,1$) i pacijentica ($26,7 \pm 7,6$). Pacijenti s neklasičnim tipom bolesti podijeljeni su prema prvom simptomu bolesti na one sa supkliničkom (20 pacijenata) i simptomatskom (35 pacijenata) manifestacijom bolesti. Nadalje, pridružene autoimunsne bolesti (šećerna bolest tip I, autoimunosni hepatitis, autoimunsna bolest štitnjače, artritis) imalo je ukupno 19 pacijenata, 14 žena i 5 muškaraca. Od navedenih kliničkih karakteristika bolesti nisu utvrđene značajne razlike između muškaraca i žena ($P > 0,05$), iako su u žena češće primijećeni i drugi autoimunosni poremećaji (23,3 % vs.

Tablica 1. Kliničke karakteristike pacijenata s celijakijom (N = 110)

	Ukupno N = 110 (%)	Muškarci N = 50 (%)	Žene N = 60 (%)	P
Tip bolesti				
Klasični tip	55 (50,0)	28 (56,0)	27 (55,0)	0,338
Neklasični tip	55 (50,0)	22 (44,0)	33 (45,0)	
Dob (godine) dijagnosticiranja u neklasičnom tipu bolesti (x ± SD)	25,6 ± 8,6	23,9 ± 10,1	26,7 ± 7,6	0,241
Obiteljski pacijenti	51 (46,4)	19 (38,0)	32 (53,3)	0,157
Neobiteljski pacijenti	59 (53,6)	31 (62,0)	28 (46,7)	
Prvi simptomi bolesti u neklasičnom tipu celijakije (N)	55	22	33	
Supklinički	20 (36,4)	5 (22,7)	15 (45,5)	0,153
Simptomatski	35 (63,6)	17 (77,3)	18 (54,5)	
Pridružene autoimunosne bolesti	19 (17,3)	5 (10,0)	14 (23,3)	0,073

Tablica 2. Frekvencije HLA-DQA1 i HLA-DQB1 alela u pacijenata s celijakijom (N = 110)

HLA-DQA1 n = 220			HLA-DQB1 n = 220		
Alel	Broj alela	Frekvencija (%)	Alel	Broj alela	Frekvencija (%)
*01:01	12	5,4	*02	110	50,0
*01:02	15	6,8	*03:01	10	4,5
*01:03	15	6,8	*03:02	37	16,8
*01:04	2	0,9	*03:03	3	1,4
*02:01	49	22,3	*03:04	2	0,9
*03:01	38	17,3	*04	5	2,3
*04:01	5	2,3	*05	28	12,7
*05:01	79	35,9	*06	25	11,4
*05:05	5	2,3	* -		
* -					

Tablica 3. Frekvencije HLA-DQA1 i HLA-DQB1 genotipova u pacijenata s celijakijom (N = 110)

Genotip HLA-DQA1		Frekvencija N (%)	Genotip HLA-DQB1		Frekvencija N (%)
*05:01	*02:01	26 (23,6)	*02	*02	26 (23,6)
*05:01	*03:01	14 (12,7)	*02	*05	18 (16,4)
*05:01	*01:03	8 (7,3)	*02	*06	16 (14,5)
*05:01	*05:01	7 (6,4)	*03:02	*06	7 (6,4)
*05:01	*01:02	6 (5,5)	*02	*03:02	9 (8,2)
*02:01	*01:03	6 (5,5)	*03:02	*05	7 (6,4)
*03:01	*03:01	5 (4,5)	*02	*03:01	6 (5,5)
*03:01	*01:01	5 (4,5)	*03:02	*03:02	5 (4,5)
*03:01	*01:02	5 (4,5)	*02	*04	4 (3,6)
*05:01	*01:01	4 (3,6)	*03:02	*03:01	3 (2,7)
#	#	< 3,0	*02	*03:03	2 (1,8)
			*02	*03:04	2 (1,8)
			&	&	< 2,0

HLA-DQA1 genotipovi zastupljeni su pojedinačno s manje od 3 %: *02:01 *05:05 1,8 %, *01:04 *05:01 1,8 %, *02:01 *04:02 0,9 %, *03:01 *02:01 2,7 %, *01:01 *02:01 1,8 %, *01:02 *02:01 2,7 %, *01:03 *03:01 0,9 %, *05:01 *05:05 1,8 %, *02:01 *02:01 1,8 %, *02:01 *04:01 0,9 %, *01:01 *05:05 0,9 %, *05:01 *04:01 2,7 %

& HLA-DQB1 genotipovi bez rizičnih alela zastupljeni su pojedinačno s manje od 2 %: *05 * 06 1,8 %, *05 * 05 0,9 %, *06 *03:01 0,9 %, *04 *03:02 0,9 %

Tablica 4. Frekvencije HLA-DQ2 i HLA-DQ8 u pacijenata prema tipu celijakije (N = 110)

HLA	Pacijenti N (%)	*Klasični tip celijakije (N = 55) N (%)	*Neklasični tip celijakije (N = 55) N (%)
DQ2	87 (79,1)	41 (74,5)	45 (81,8)
DQ8	23 (20,9)	12 (21,8)	11 (20,0)
DQ2 i DQ8	8 (7,3)	4 (7,3)	4 (7,3)
Homozigot za DQ2 ili DQ8	22 (20,0)	8 (14,5)	13 (23,6)
DQ2/DQ8 negativan	8 (7,3)	6 (10,9)	3 (5,5)

*P vrijednost između klasičnog i neklasičnog tipa celijakije > 0,05

10,0 %), dok pri prvoj manifestaciji bolesti kod pacijenata s neklasičnim tipom celijakije muškarci imaju izraženu simptomatsku pojavnost bolesti (77,3 % vs. 54,5 %).

Analiza HLA-DQA1 i HLA-DQB1 lokusa obuhvatila je 110 pacijenata s celijakijom. U tablici 2 prikazane su frekvencije HLA-DQA1 i HLA-DQB1 alela, dok je u tablici 3 prikazana distribucija HLA-DQA1 i HLA-DQB1 genotipova u ovih pacijenata. Među HLA-DQA1 alelima najveća frekvencija utvrđena je za alel HLA-DQA1*05:01 (35,9 %), zatim za HLA-DQA1*02:01 (22,3 %) te HLA-DQA1*03:01 (17,3 %), dok među HLA-DQB1 alelima najveću učestalost imaju HLA-DQB1*02 (50,0 %) i HLA-DQB1*03:02 (16,8 %) te HLA-DQB1*05 (12,9 %) i HLA-DQB1*06 (11,4 %). Distribucija HLA-DQA1 genotipova pokazuje najveću učestalost heterozigota s po dva rizična alela HLA-DQA1*05:01/DQA1*02:01 (23,6 %) te HLA-DQA1*05:01/DQA1*03:01 (12,7 %), dok je homozigota HLA-DQA1*05:01/DQA1*05:01 bilo 6,4 %. Homozigot za HLA-DQB1*02 alel pokazao se najučestaliji s 23,6 %, zatim slijede genotip HLA-DQB1*02/DQB1*05 s 16,4 % i genotip HLA-DQB1*02/DQB1*06 s 14,5 %. Analiza HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gena uspoređena je u skupinama pacijenata ovisno o spolu i tipu bolesti (klasični i neklasični tip; obiteljska i neobiteljska celijakija), pri čemu nisu utvrđene statistički značajne razlike u frekvencijama alela i genotipova među navedenim skupinama ($P > 0,05$).

Od svih pacijenata u njih 5 (2,9 %) nije utvrđen genotip s rizičnim DQB1 alelom. Nadalje, analiza je pokazala da 8 (7,3 %) od 110 pacijenata s celijakijom nema niti HLA-DQ2 niti HLA-DQ8 heterodimer (tablica 4), iako svi pacijenti imaju barem

jedan rizični HLA-DQA1 ili HLA-DQB1 alel. Najveći broj pacijenata ima HLA-DQ2 (79,1 %), njih 20,9 % ima HLA-DQ8, dok je homozigota za HLA-DQ2, odnosno HLA-DQ8, ili složenih heterozigota (DQ2/DQ8) ukupno 27,3 %. Nije utvrđena razlika ($P < 0,05$) u učestalosti nosioca HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 u ovisnosti o tipu celijakije. Kod pacijenata s neklasičnim tipom celijakije uspoređena je dob dijagnoze bolesti ovisno o statusu HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 (negativan, jednostruka ili dvostruka doza) pri čemu je opažen trend ($F = 1,99$; $P = 0,146$) ranijeg postavljanja dijagnoze u homozigota ($23,6 \pm 9,9$ godina) za navedene HLA-DQ heterodimere u odnosu na heterozigote ($26,0 \pm 7,1$ godina) i pacijente bez HLA-DQ2 i HLA-DQ8 ($34,0 \pm 13,4$ godina). Također je primijećena veća pojavnost drugih autoimunskih bolesti kod homozigota HLA-DQ2 i/ili HLA-DQ8 (26,7 %) u odnosu na heterozigote (15,5 %) ($P = 0,194$).

Niti rizični HLA-DQB1*02 alel u homozigotnom obliku nije bio združen sa značajno ranijim nastupom neklasičnog tipa celijakije (25,2 vs. 25,7 godina, $P = 0,854$), dok je opažen trend češće pridruženosti autoimunskih poremećaja u ovih homozigota (19,2 vs. 14,3 %, $P > 0,05$).

RASPRAVA

Značaj HLA-DQ2 i HLA-DQ8 heterodimera u patogenezi celijakije otkriven je još ranih sedamdesetih godina prošlog stoljeća¹³. Brojna genetičko-epidemiološka istraživanja ukazala su da većina pacijenata ima HLA-DQA1*05 i HLA-DQB1*02 alele koji kodiraju HLA-DQ2 protein, dok su u ostalih slučajeva najčešće utvrđeni HLA-DQA1*03 i HLA-DQB1*03:02 aleli koji kodiraju HLA-DQ8 protein^{19,26,27}. Prema rezultatima našeg istraživa-

nja genotipovi za HLA-DQ2 i HLA-DQ8 heterodimere prisutni su u 92,7 % pacijenata s celijakijom. No HLA-DQ2 prisutan je u 79,1 % pacijenata, što je nešto niže od vrijednosti prijavljenih u većini europskih populacija, prvenstveno iz sjeverozapadne i srednje Europe^{26,27}. Razlike u učestalosti HLA-DQ2 i HLA-DQ8 već su opisane između populacija sjeverne i južne Europe, pa je tako, primjerice, u talijanskih pacijenata frekvencija HLA-DQ2 također nešto niža i iznosi 83,8 %²⁷. S druge pak strane, HLA-DQ8 heterodimer utvrđen

Prema recentnim smjernicama za dijagnozu i liječenje celijakije genetsko testiranje ima važno mjesto u dijagnostičkom algoritmu zahvaljujući svojoj negativnoj prediktivnoj vrijednosti. Zbog sve češćeg izostavljanja glutena iz prehrane uvođenje molekularne dijagnostike u kliničku praksu ima dodatni značaj u točnijem postavljanju dijagnoze celijakije kao jedne od najčešćih kroničnih bolesti probavnog sustava.

je u 20,9 % naših pacijenata, što je više negoli u nedavnoj europskoj studiji²⁶ provedenoj na 2 308 pacijenata iz Nizozemske, Velike Britanije i Irske, gdje frekvencija iznosi do 10 %. U susjednim populacijama srpskih i slovenskih pacijenata HLA-DQ8 je zastupljen u 2,7 %, odnosno 8,8 %, u talijanskih pacijenata iznosi 12,7 %, dok populacija iranskih pacijenata bilježi visoku frekvenciju HLA-DQ8 od 25,4 %^{26,28-30}.

Istraživanja HLA-a u oboljelih od celijakije u hrvatskoj populaciji temeljena su uglavnom na serološkoj analizi, dok je naša studija analizirala HLA-DQA1 i HLA-DQB1 alele i genotipove te njezini rezultati proširuju dosadašnje podatke dobivene u različitim europskim populacijama. Tako su do sada objavljena serološka istraživanja HLA antigena u djece oboljele od celijakije, gdje su Peršić i suradnici²¹ utvrdili da je od 26 djece njih 73 % imalo HLA-DR3 fenotip. Istraživanje Jurčića i sur.²² temeljeno na HLA tipizaciji 58 djece oboljele od celijakije pokazalo je da su HLA-DR3 antigeni bili prisutni u 84 % oboljelih. Jedina molekularno-genetička studija Žunec i sur.²³ provedena je u 63 djeteta oboljela od celijakije, te je utvrdila HLA-DQ2 heterodimere u 93,7 %, a HLA-DQ8 u 4,8 %

pacijenata, s višim udjelom HLA-DQ2 i nižim udjelom HLA-DQ8 u odnosu na naše rezultate.

U našem istraživanju bila je veća frekvencija HLA-DQA1*0201-DQB1*02 haplotipa negoli u radu Žunec i sur.²³ (37,3 % vs. 10,3 %). Naime, HLA-DQA1*02:01-DQB1*02:02 haplotip zastupljeniji je u zemljama Mediterana i kodira DQ2.2 isoformu²⁷. Heterodimer $\alpha 1^*0201\text{-}\beta 1^*02$ može prezentirati pojedine epitope glutena na T-stanicama te je implicirana njegova uključenost u patogenezu celijakije. Mogući uzrok ovih razlika u HLA distribuciji je mali broj ispitanika, ali i činjenica da su svi pacijenti uključeni u naše istraživanje iz primorskog dijela Hrvatske, dok je većina ispitanika u prethodnoj studiji bila iz područja kontinentalne Hrvatske. Važno je istaknuti i da su prethodne hrvatske studije ispitivale isključivo pedijatrijsku populaciju.

Nadalje, prema našim rezultatima svi pacijenti imali su barem jedan rizični HLA-DQA1 ili HLA-DQB1 alel, dok samo jedan pacijent nije imao rizični HLA-DQB1 alel nego DQA1*05:01 alel. To je u skladu s prijašnjim studijama u kojima je pokazano da i samo jedan alel DQA1*05 ili DQB1*02, koji kodira polovicu HLA-DQ2 heterodimerne molekule, može pridonijeti predispoziciji i pojavnosti celijakije^{27,29}. Homozigota i složenih heterozigota za rizične HLA-DQB1 alele bilo je 51,8 %, a za HLA-DQA1 34,5 %. Slične frekvencije prijavljene su i u drugim europskim populacijama.

Još jedan zanimljiv pokazatelj je da u 7,1 % naših pacijenata nije potvrđen HLA-DQ2 niti HLA-DQ8 što je sukladno s rezultatima dobivenim na uzorku od 1008 pacijenata iz europskih populacija, gdje je prosječna frekvencija 6,1 %¹⁹. Niže frekvencije HLA-DQ2 i HLA-DQ8 negativnih pacijenata prisutne su u populacijama sjeverozapadne Europe, primjerice u Finskoj 4 % te u Norveškoj i Švedskoj 3,4 %. S druge strane veći udio HLA-DQ2 i HLA-DQ8 negativnih pacijenata prijavljen je u Francuskoj (6,6 %) i Italiji (9,0 %)^{19,29}. Ipak, recentna talijanska studija³¹ referira 4,2 % pacijenata koji su HLA-DQ2/DQ8 negativni, te sugerira visoku prevalenciju DQ7 haplotipa u ovih pacijenata.

Analiza HLA genotipa i kliničke ekspresije bolesti nije pokazala značajnu povezanost, što je moguća posljedica relativno malog broja testiranih

pacijenata. Ipak je u pacijenata s neklasičnim tipom celijakije uočen trend ranijeg postavljanja dijagnoze, kao i veća pojavnost drugih autoimunskih bolesti u homozigota za HLA-DQ2 i/ili DQ8 heterodimere. Naime, poznato je da homozigoti za HLA-DQ2 genotip imaju najveći rizik za razvoj celijakije, a na temelju genetskog testiranja i detekcije polimorfizama HLA-DQA1 i HLA-DQB1 gena te haplotipova stvoreni su modeli za predikciju rizika za celijakiju unutar europskih populacija^{26,27,32}.

Genetsko testiranje se u našoj dosadašnjoj kliničkoj praksi najvećim dijelom koristilo u transplantacijskoj medicini te u reumatologiji. No, prema recentnim smjernicama za dijagnozu i liječenje celijakije genetsko testiranje ima važno mjesto u dijagnostičkom algoritmu, zahvaljujući svojoj negativnoj prediktivnoj vrijednosti¹⁰⁻¹². Zbog sve češćeg izostavljanja glutena iz prehrane, postavljanje egzaktno dijagnoze najčešće je nemoguće bez genetskog testiranja. Recentna literatura^{10-12,33} preporučuje genetsko testiranje u kliničkoj praksi u sljedećim situacijama: pacijenti sa sumnjom na celijakiju u kojih postoji diskrepanca serološkog i patohistološkog nalaza biopsije sluznice tankoga crijeva, u pacijenata koji su započeli bezglutensku dijetu bez adekvatnog odgovora na terapiju – genetsko testiranje može isključiti eventualno netočno postavljenu dijagnozu, u pacijenata koji su započeli dijetu bez glutena prije adekvatne kliničke obrade i ne žele na test opterećenja glutenom, u pacijenata s povišenim rizikom za celijakiju – pridružene autoimunske bolesti (šećerna bolest tip I, autoimunska bolest štitnjače i autoimunska bolest jetre) i u pacijenata s kromosomskim aberacijama (Down, Turner, Williams sindrom) te u prvih srodnika pacijenata.

Nadalje prema ESPGHAN-ovim smjernicama iz 2012. godine¹⁰ te preporukama Hrvatskog društva za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu (Postupnik za dijagnostiku celijakije u djece)³⁴, predlaže se izostavljanje biopsije sluznice tankoga crijeva u pacijenata sa simptomima celijakije uz prisutnost 10 x N vrijednosti protutijela na tkivnu transglutaminazu (anti-tTG) i pozitivnih endomizijskih protutijela (EMA) te pozitivno genetsko testiranje na DQ2/DQ8 heterodimere.

ZAKLJUČCI

Zaključno, naš rad pokazao je prisutnost HLA-DQ2/DQ8 heterodimera u 92,7 % ispitanika, s većim udjelom HLA-DQ8 (20,9 %), što je sukladno postojećem sjever-jug gradijentu u europskim populacijama. Pacijenti koji su bili HLA-DQ2/DQ8 negativni imali su barem po jedan rizični alel, od kojih 68 % HLA-DQA1*05, što je u skladu s recentnom literaturom.

U pacijenata s neklasičnim tipom celijakije uočen je trend ranijeg postavljanja dijagnoze, kao i veća pojavnost drugih autoimunskih bolesti u homozigota za HLA-DQ2 i/ili DQ8 heterodimere.

Unatoč manjem broju ispitanika i genetičkoj analizi niske i srednje rezolucije, ovaj rad ima nesumnjiv značaj jer daje podatke o HLA genotipovima u hrvatskih pacijenata s celijakijom. Zbog sve većeg broja ljudi koji izostavljaju gluten iz prehrane uvođenje molekularne dijagnostike u svakodnevnu kliničku praksu ima dodatni značaj u točnijem postavljanju dijagnoze celijakije kao jedne od najčešćih kroničnih bolesti probavnog sustava.

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR et al. The Oslo definition and related terms. *Gut* 2013;62:43-52.
2. Freeman HJ. Celiac disease: a disorder emerging from antiquity, its evolving classification and risk, and potential new treatment paradigms. *Gut Liver* 2015;9:28-37.
3. Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:204-13.
4. Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J et al. Incidence of autoimmune disease in celiac disease: protective effect of the gluten free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:753-8.
5. Viljama M, Kaukinen K, Huhtala H, Kyropalo S, Rasmussen M, Collin P. Celiac disease, autoimmune diseases and gluten exposure. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:437-43.
6. Casella G, D'Inca R, Oliva L, Daperno M, Saladino V, Zoli G et al. Prevalence of celiac disease in inflammatory bowel disease: an IG-IBD multicentre study. *Dig Liver Dis* 2010;42:171-2.
7. van der Pals M, Iversson A, Norstrom F, Hogberg I, Svensson J, Carlsson A. Prevalence of thyroid autoimmunity in children with celiac disease compared with healthy 12-year old. *Autoimmune Dis* 2014;ID 417356.

8. Licul V, Starčević Čizmarević N, Ristic S, Mikolašević I, Mijandrušić BS. CTLA-4+49 and TNF- α -308 gene polymorphisms in celiac disease with exocrine pancreatic insufficiency. *Coll Antropol* 2013;37:1191-4.
9. Husby S, Murray J. Non-celiac gluten hypersensitivity: what is all the fuss about? *Fl000 Prime Reports* 2015; 7:1-4.
10. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:136-60.
11. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2013;108:656-76.
12. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ et al. Diagnosis and management of adult celiac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* 2014;63:1210-28.
13. Wijmenga C, Gutierrez-Achury J. Celiac disease genetics: past, present and future challenges. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014;59:54-7.
14. May-Ling Tjon J, van Bergen J, Koning F. Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics* 2010;62: 641-51.
15. Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQB1 in celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 2012;11:19-88.
16. Medrano LM, Dema B, Lopez-Larios A, Maluenda C, Bodas A, Lopez-Palacios N et al. HLA and celiac disease susceptibility: new genetic factors bring open questions about HLA influence and gene dosage effects. *PloS One* [Internet]. 2012;7. [cited 2015 November 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23119005>
17. Hunt KA, van Heel DA. Recent advances in celiac disease genetics. *Gut* 2009;58:473-6.
18. Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. Baltimore: An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. c2015 [cited 2015 Sep 8]. Available from: <http://omim.org/entry/212750>
19. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 2003;64:469-77.
20. Starčević Čizmarević N, Mijandrušić Sinčić B, Licul V, Kapović M, Ristić S. Geni i celijakija. *Pediatr Croat* 2015;59:88-94.
21. Peršić M, Vujaklija-Stipanović K, Crnić-Martinović M, Fućak M. HLA tipizacija u djece s glutenskom enteropatijom. *Jugosl Pedijatr* 1988;31:93-6.
22. Jurčić Z, Brkljačić-Šurlaković L, Grubić Z, Žunec R, Vezmar V, Kaštelan A. Gluten enteropathy in Croatian children is primarily associated with the HLA-DR3-DQ2 haplotype. *Lijec Vjesn* 2000; 122:259-63.
23. Žunec R, Grubić Z, Jurčić Z, Peršić M, Kaštelan A, Kerhin-Brkljačić V. HLA-DQ2 heterodimer in the diagnosis of celiac disease. *Biochemia Medica* 2004;14:119-24.
24. Revised criteria for celiac disease. Working group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child* 1990;65:909-11.
25. European Molecular Biology Laboratory [Internet]. Hinxton: IMG/HLA Database. c2015 [cited 2013 Jun 3]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>
26. Romanos J, van Diemen CC, Nolte IM, Trynka G, Zhernakova A, Fu J et al. Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. *Gastroenterology*. 2009;137:834-40.
27. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Louka AS, Clot F, Coto I et al. HLA-DQ relative risks for celiac disease in European populations: a study of the European genetics cluster on celiac disease. *Tissue Antigens* 2004;63:562-7.
28. Stanković B, Radlović N, Leković Z, Ristić D, Radlović V, Nikčević G et al. HLA typing in pediatric celiac disease patients. *Bosn J Basic Med Sci* 2014;14:171-6.
29. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, Lulli P, Mazzilli MC. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol*. 2009 Jan; 70(1):55-9.
30. Rostemi-Nejad M, Romanos J, Rostami K, Ganji A, Ehsani-Ardakani MJ, Bakhshipour AR et al. Allele and haplotype frequencies for HLA-DQ in Iranian celiac disease patients. *World J Gastroenterol* 2014;20: 6302-8.
31. Tinto N, Cola A, Piscopo C, Capuano M, Galatola M, Greco L et al. High frequency of haplotype HLA-DQ7 in celiac disease patients from south Italy: retrospective evaluation of 5535 subjects at risk of celiac disease. *PloS One* [Internet]. 2015;10. [cited 2015 November 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=tinto>
32. Bourgey, Calcano G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L et al. HLA related genetic risk for celiac disease. *Gut* 2007;
33. Tye-Din JA, Cameron DJ, Daveson AJ, Day AS, Dallsperger P, Hogan C et al. *Intern Med J* 2015;45:411-50.
34. Mišak Z, Kolaček S, Barbarić I, Despot R, Hegeduš-Jungvirth M, Jelić N et al. Preporuke Hrvatskog društva za dječju gastroenterologiju, hepatologiju i prehranu. Postupnik za dijagnostiku celijakije u djece. [cited 2015 November 21.] Available from: <http://hdpgph.hlz.hr/algoritmi.html>