

<sup>1</sup>Zavod za tipizaciju tkiva ♦ Klinika za urologiju<sup>2</sup>Klinika za reumatske bolesti i rehabilitaciju

KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

## RASPODJELA ALELA HLA RAZREDA I I RAZREDA II U BOLESNIKA S PSORIJATIČNIM ARTRITISOM U HRVATSKOJ

### THE DISTRIBUTION OF HLA ALLELES CLASS I AND CLASS II AMONG PATIENTES WITH PSORIATIC ARTHRITIS IN CROATIA

Zorana Grubić<sup>1</sup> ♦ Porin Perić<sup>2</sup> ♦ Esmā Čečuk-Jeličić<sup>1</sup> ♦ Renata Žunec<sup>1</sup>  
Božidar Ćurković<sup>2</sup> ♦ Vesna Kerhin-Brkljačić<sup>1</sup>

#### Sažetak

Cilj ovog rada bio je istražiti raspodjelu alela lokusa HLA-A, -B, -Cw i DRB1 među bolesnicima s psorijatičnim artritisom (PsA) u Hrvatskoj. DNA, izolirana iz uzorka periferne krvi 58 bolesnika (28 muškaraca i 30 žena) i 157 kontrolnih osoba, testirana je metodom lančane reakcije polimerazom i primerima specifičnih sekvenci (PCR-SSP) za polimorfizam navedenih lokusa HLA. Najjaču povezanost s PsA među Hrvat-

skim bolesnicima pokazali su aleli lokusa HLA-B (B\*39 i B\*57), dok su aleli B\*27 i B\*13 pokazali povišenu učestalost samo prije korekcije p vrijednosti. Povišena zastupljenost alela Cw\*02, te alela DRB1\*16 posljedica je neravnoteže udruživanja tih alela s alelima lokusa HLA-B koji su povezani s PsA u Hrvatskoj. Među bolesnicima je smanjena zastupljenost alela B\*0702, B\*18 i B\*38.

#### Ključne riječi

HLA, psorijatični artritis, populacijska istraživanja, Hrvatska

#### Summary

The aim of the present study was to analyze the distribution of HLA-A, -B, -Cw, and -DRB1 alleles among patients with psoriatic arthritis (PsA) in Croatia. DNA was isolated from peripheral blood of 58 PsA patients (28 male and 30 female) and tested by PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers) method for polymorphism of the above mentioned HLA loci. The strongest association between psoriatic arthritis and HLA in the Croatian population

was observed for alleles at HLA-B locus (B\*39 and B\*57), while the association of B\*27 and B\*13 alleles with PsA reached significance only before correction of p value with the number of tested alleles. Higher frequency of Cw\*02 and DRB1\*16 alleles is a result of linkage disequilibrium between these alleles and HLA-B alleles associated with PsA in Croatia. We also observed lower frequency of B\*0702, B\*18 and B\*38 alleles in our group of patients.

#### Key words

HLA, psoriatic arthritis, population study, Croatia

#### Uvod

Psorijatični artritis (PsA) je progresivna, kronična, upalna reumatska bolest koja se pojavljuje u 7%-42% bolesnika s psorijazom (1,2). Općenito je prihvaćeno da se psorijaza pojavljuje u 2-3% populacije (3).

Psorijatični artritis je jedan od podtipova spondiloartropatija, koji karakteriziraju klinički znaci poput asimetričnog zglobnog artritisa, učestale pojave oligoartikularnog oblika bolesti, podjednake zahvaćenosti oba

doc.dr.sc. Zorana Grubić

Zavod za tipizaciju tkiva ♦ Klinika za urologiju ♦ KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb  
tel.: (01) 2388689 ♦ fax: (01) 2312684 ♦ e-mail: zgrubic@kbc-zagreb.hr

spola, upale u području tetivnih hvatišta te izvanzglobne manifestacije poput iritisa i odsutnost reumatoidnog faktora u serumu (4,5).

Na pojavu i razvoj PsA utječe kombinacija faktora okoliša (bakterijske i virusne infekcije, fizičke i psihičke traume) i genetskih faktora (6,7). Brojni autori pisali su ne samo o etiologiji i prevalenciji PsA, različitim formama bolesti, faktorima rizika za bolest, već i o problemima razlikovanja psorijatičnog artritisa od psorijaze tipa I (8,9). Međutim, za razliku od velikog broja radova koji se bave genetikom psorijaze tipa I, broj radova o genetskoj podlozi psorijatičnog artritisa je daleko manji (10). Studije provedene unutar skupine od 100 obitelji bolesnika s PsA ukazale su da srodnici bolesnika imaju 48 puta veću šansu oboljeti od PsA nego nasumce odabrani ispitanici (11).

Razvoj i primjena molekularnih metoda u biologiji, a time i u medicini, doveo je i do primjene tih metoda u istraživanjima genetske podloge različitih bolesti. U takvim istraživanjima posebno su mjesto zauzela pretraživanja ljudskog genoma i potraga za kromosomskim regijama odgovornim za nastanak pojedine bolesti (12). Za razliku od većeg broja radova koji su se bavili pretraživanjem genoma upravo u bolesnika s psorijazom (PV) tipa I i traženjem takvih kromosomskih regija povezanih s PV tipa I, do danas su poznati rezultati samo jednog pretraživanja genoma u bolesnika s PsA-om (13). Studije među bolesnicima s PV tipa I uočile su povezanost s različitim kromosomskim regijama (1p, 4q, 6p i 17q), dok je za PsA pronađena, u prvom redu povezanost s regijom HLA, te s regijom na kromosomu 16, regijom 16q (14,15).

## Ispitanici i metode

### Ispitanici

Skupinu od 58 bolesnika, liječenih u Klinici za reumatske bolesti, KBC-Zagreb, sačinjavalo je 28 muškaraca i 30 žena.

Bolesnicima je dijagnoza postavljena na temelju Amorovih kriterija iz 1990. godine, koji uključuju postojanje kliničkih simptoma tipičnih za spondiloartritise, pozitivan radiološki nalaz bilateralnog sakroileitisa II stupnja ili unilateralnog III stupnja, genetsku podlogu (antigen HLA-B27 pozitivan i/ili obiteljska anamneza za psorijazu) te dobar odgovor na primjenu nesteroidnih antireumatika i ponovna pojava boli nakon njihovog izostavljanja (20). Kao kontrolna skupina korištena je standardna kontrolna skupina Zavoda za tipizaciju tkiva, KBC-Zagreb, koja se sastojala od 157 zdravih nesrodnih ispitanika stanovnika grada Zagreba.

### Metode

Svim ispitanicima uzeto je 10 ml periferne krvi s EDTA te izolirana genomski DNA klasičnom metodom izoliranja s 6 M NaCl (21).

Početak istraživanja o povezanosti PsA s antigenima HLA smatra se sredina sedamdesetih godina 20. stoljeća kada je po prvi put uočena povećana učestalost antigena HLA-B27 među bolesnicima s PsA (16). Nastavak tih istraživanja, u različitim populacijama, dao je vrlo šarolike rezultate koji govore o povezanosti sustava HLA i PsA. U prilog objašnjenju takvih rezultata govori ne samo povezanost PsA s različitim antigenima pojedinog lokusa HLA, već i povezanost s različitim lokusima HLA (HLA-A-1; HLA-B13, -B27, -B37, i -B57; HLA-Cw\*02, \*0602; HLA-DR4, -DR7) (17). Iz tih genetskih analiza pojedini su autori zaključili da je za nastanak bolesti odgovoran ne samo jedan, pojedinačni antigen HLA, već kombinacija više antigena HLA. Naime, uočeno je da antigen HLA-B27 u kombinaciji s antigenom HLA-DR7 i -B39 uzrokuje progresiju bolesti, dok su pak drugi autori izvijestili da antigen HLA-DQw3 u bolesnika koji nemaju antigen HLA-DR7 također uvjetuje progresiju bolesti (17).

Krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća, u Hrvatskoj je provedeno istraživanje o povezanosti PsA i antigena HLA, pri tome je otkrivena povećana učestalost antigena HLA-B13, -B27 i -B17 među bolesnicima s PsA (19). Međutim, ovo je istraživanje, gledano iz današnje perspektive, nepotpuno jer nije obuhvatilo i druge lokuse HLA (HLA-Cw i -DRB1), te manjkavo zbog ograničenih mogućnosti tipizacije HLA u to doba.

Iz tog razloga, cilj ovog istraživanja bio je analizirati raspodjelu alela lokusa HLA-A, -B, -Cw i -DRB1 među bolesnicima s psorijatičnim artritismom u Hrvatskoj te dobivene rezultate usporediti s rezultatima raspodjele alela HLA među zdravim ispitanicima.

Nakon izolacije DNA uzorci su analizirani za polimorfizam lokusa HLA metodom PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers). Metoda se temelji na analizi eksona 2 i 3 gena HLA razreda I, odnosno analizi eksona 2 gena HLA razreda II pomoću lančane reakcije polimerazom i primera (klica) specifičnih za pojedini alel ili skupinu alela (16). Uzorci su nakon umnažanja analizirani elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu te vizualizirani na UV stoliću i dokumentirani polaroid kamerom. Detaljniji podaci o protokolima umnažanja pojedinih lokusa HLA nalaze se u objavljenim radovima drugih autora (22).

### Statistika

Učestalost alela lokusa HLA izračunavana je direktnim brojanjem. U slučaju da je osoba imala samo jedan alel na nekom od testiranih lokusa HLA, pretpostavili smo da je osoba homozigot za taj alel. Dva puta dva tablica i Fisher-ov test korišteni su za usporedbe učestalosti između dvije skupine ispitanika. Relativni rizik (RR) izračunavan je prema Woolfovoj metodi (23).

## Rezultati

### HLA-A

Ukupno četrnaest različitih alela lokusa HLA-A uočeno je među našim bolesnicima, njihova učestalost se kretala od 0,9% za alele A\*29 i A\*33 do 31,8% za alel A\*02. Usporedba dvije skupine ispitanika nije dala nikakve statistički značajne razlike (tablica 1). Naime, povećana zastupljenost alela A\*01 među bolesnicima (15,5%) u odnosu na kontrolu (9,6%), nije statistički značajna, kao ni povećana učestalost alela A\*11 među bolesnicima (7,3%) u usporedbi sa zdravim osobama (4,1%). Smanjena učestalost alela A\*32 (1,8%) među bolesnicima u usporedbi s kontrolom (6,4%) također nije statistički značajna ( $p=0,081$ ).

Tablica 1. Učestalost alela lokusa HLA-A među bolesnicima s PsA (N=58) i zdravim ispitanicima (N=157) u Hrvatskoj  
Table 1. The frequency of HLA-A alleles among patients with PsA (N=58) and healthy controls (N=157) in Croatia

HLA-A	PsA bolesnici % (N=58)	Zdravi ispitanici % (N=157)	p - statistička značajnost	$P_{\text{corr}}$ - p vrijed. korigirana brojem testir. alela
A*01	15,45	9,6	0,1833	
A*02	31,81	28,3		
A*03	8,12	11,5		
A*11	7,27	4,1	0,2059	
A*23	2,73	2,2		
A*24	10,0	15,9		
A*25	2,73	3,2		
A*26	3,64	5,7		
A*29	0,91	1,0		
A*30	5,45	1,9		
A*31	4,55	2,6		
A*32	1,82	6,4	0,0805	1,122
A*33	0,91	2,3		
A*68	4,88	4,8		

### HLA-B

Na najpolimorfnijem lokusu sustava HLA, lokusu HLA-B, među bolesnicima je najveću učestalost pokazao alel HLA-B\*27 (12,1%), dok je među zdravim ispitanicima njegova učestalost iznosila 5,2% ( $p=0,043$ ;  $p_{\text{corr}}=0,724$ ). Drugi je najčešći alel ovog lokusa među bolesnicima bio alel B\*39 koji je nađen u 11,2% slučajeva (tablica 2), što je skoro osam puta više nego među zdravim osobama (1,5%). Uočena razlika u učestalosti ovog alela između dvije testirane skupine je statistički značajna i nakon korekcije p vrijednosti s brojem testiranih alela ( $p=0,00004$ ;  $p_{\text{corr}}=0,0007$ ). Alel B\*57 je također pokazao statistički značajno povećanu učestalost među bolesnicima s PsA (10,3%) u odnosu na zdrave ispitanike (1,5%), a p vrijed-

nost je zadržala statističku značajnost i nakon korekcija ( $p=0,0001$ ;  $p_{\text{corr}}=0,009$ ). Pojedinačna učestalost svih ostalih alela lokusa HLA-B među bolesnicima s psorijatičnim artritisom bila je ispod 10%. Među bolesnicima su tri alela (B\*0702, B\*18, B\*38) uočena sa statistički smanje-

Tablica 2. Učestalost alela lokusa HLA-B među bolesnicima s PsA (N=58) i zdravim ispitanicima (N=157) u Hrvatskoj  
Table 2. The frequency of HLA-B alleles among patients with PsA (N=58) and healthy controls (N=157) in Croatia

HLA-B	PsA bolesnici % (N=58)	Zdravi ispitanici % (N=157)	p - statistička značajnost	$P_{\text{corr}}$ - p vrijed. korigirana brojem testir. alela	RR - relativni rizik
B*07	1,7	8,8	0,015	0,260	0,2
B*08	10,9	4,8			
B*13	7,8	2,1	0,012	0,201	4,2
B*14	0,9	2,6			
B*15	4,6	7,0			
B*18	4,3	11,2	0,04	0,68	0,3
B*27	12,1	5,2	0,043	0,724	2,4
B*35	8,2	13,7			
B*37	-	1,9			
B*38	1,7	6,4	0,036	0,611	0,3
B*39	11,2	1,5	0,00004	0,0007	9,2
B*4001	3,6	1,3			
B*4002	1,8	2,6			
B*41	-	1,6			
B*44	7,3	7,6			
B*49	2,7	1,6			
B*51	7,3	11,8			
B*52	0,9	0,6			
B*53	0,9	0,3			
B*55	0,9	0,6			
B*56	1,8	1,3			
B*57	10,3	1,5	0,0001	0,009	8,4
B*58	-	1,2			

nom učestalošću ( $p<0,05$ ). Naime, aleli B\*0702 i B\*38 spadaju u česte alele lokusa HLA-B među zdravim ispitanicima u Hrvatskoj, dok su među bolesnicima bili nazočni u samo 1,7%. Alel B\*18 je imalo samo 4,3% bolesnika što je više od dva puta manje nego u zdravim ispitanicima (11,2%).

### HLA-Cw

Između 13 alela lokusa HLA-Cw najčešće se pojavio alel Cw\*07 (25,9%), dok je među zdravim osobama ovaj alel imalo 18,1% ispitanika. Povišena učestalost alela Cw\*02 (16,4%) je u odnosu na kontrolu bila značajna samo prije korekcije ( $p=0,0203$ ;  $p_{\text{corr}}=0,264$ ). Alel Cw\*0602 je također uočen s povišenom učestalošću među bolesnicima s PsA, ali ta razlika nije statistički značajna ( $p=0,086$ ). Dvostruko smanjena učestalost alela Cw\*04

među bolesnicima bila je statistički značajna samo prije korekcije p vrijednosti s brojem testiranih alela ( $p=0,039$ ;  $p_{\text{corr}}=0,511$ ). Svih preostalih 9 alela ovog lokusa pokazalo je pojedinačno približno jednake učestalosti u obje ispitivane skupine.

### HLA-DRB1

Aleli lokusa HLA-DRB1 po prvi put su istraživani među bolesnicima s PsA-om u hrvatskoj populaciji (tablica 3). Analiza je ukazala da među 58 bolesnika niti jedan bolesnik nije imao alel DRB1\*1001, koji se među zdravim ispitanicima javio u 1,8% osoba. Od 11 različitih alela lokusa DRB1, najveću učestalost među bolesnicima pokazao je alel DRB1\*16, kojeg je imalo 23,3% psorijatičara, što je dvostruko više nego među zdravim ispitanicima (11,9%). Razlika je statistički značajna ( $p=0,006$ ) ali samo prije korekcije p vrijednosti s brojem testiranih alela ovog lokusa ( $p_{\text{corr}}=0,083$ ). Alel DRB1\*07 je također pokazao razliku u zastupljenosti između dvije skupine, 16,4% bolesnika i 9,6% zdravih osoba imalo je ovaj alel, ali ta razlika nije bila statistički značajna ni prije korekcije. Unatoč dvostruko manjoj zastupljenosti alela DRB1\*15 među bolesnicima (4,6%) u usporedbi s kontrolnim osobama (10,6%), nismo otkrili statistički značajnu razliku.

### Rasprava

Naše istraživanje o raspodjeli alela HLA razreda I i razreda II među bolesnicima s PsA po prvi put je dalo uvid u polimorfizam lokusa HLA-Cw i DRB1 među tim bolesnicima u Hrvatskoj. Najjača povezanost otkrivena je za alele B\*39 i B\*57, što je djelomično u skladu s prethodnim, skoro trideset godina starim, istraživanjem u kojem je uočena povezanost s antigenima HLA-B13, -B17 i -B27 (19). Dio objašnjenja za različite rezultate leži u činjenici da je većim mogućnostima seroloških, a kasnije i razvojem molekularnih metoda, rasla i mogućnost preciznije tipizacije HLA tj. određivanja specifičnosti HLA. Naime, krajem sedamdesetih godina prošlog stoljeća mislilo se da je antigen HLA-B17 jedinstven tj. da se radi o samo jednom antigenu. Kasnije je utvrđeno da se unutar tog antigena HLA kriju dva odvojena antigena HLA, koji dijele jedan zajednički dio strukture, ali isto tako i svaki ima svoj, specifični dio koji se mogao određivati preciznijim testovima, odnosno bolje definiranim specifičnim antiserumima HLA. Ta dva antigena, obuhvaćena nekadašnjim antigenom HLA-B17 su antigeni HLA-B57 i -B58. Međutim, daljnji napredak i primjena molekularnih metoda, kojima su se mogli izravno analizirati geni HLA (a ne njihovi produkti-antigeni HLA) omogućio je spoznaju da se unutar serološke specifičnosti HLA-B57 krije čitav niz različitih podtipova tj. alela gena HLA-B57 (npr. do danas je poznato 10 različitih podtipova B\*57 koji se označavaju od B\*5701 do B\*5710).

Objašnjenje za različite rezultate, ovog, u odnosu na prethodno istraživanje, za alel B\*39 također leži u

Tablica 3. Učestalost alela lokusa HLA-DRB1 među bolesnicima s PsA (N=58) i zdravim ispitanicima (N=141) u Hrvatskoj  
Table 3. The frequency of HLA-DRB1 alleles among patients with PsA (N=58) and healthy controls (N=141) in Croatia

HLA-DRB1	PsA bolesnici % (N=58)	Zdravi ispitanici % (N=141)	P - statistička značajnost	$P_{\text{corr}}$ p vrijed. korigirana brojem testir. alela	RR - relativni rizik
DRB1*01	11,8	8,9			
DRB1*0301	9,0	6,4			
DRB1*04	7,3	9,6			
DRB1*0701	16,4	9,6	ns	ns	2,1
DRB1*08	0,9	3,2			
DRB1*0901	0,9	0,4			
DRB1*11	8,1	15,6			
DRB1*13	7,3	12,8			
DRB1*14	9,1	4,3	ns	ns	
DRB1*15	4,6	10,6	ns	ns	
DRB1*16	23,3	11,9	0,006	0,083	2,8

ograničenim mogućnostima tipizacije prije tridesetak godina. Naime, tada se antigen HLA-B39 nije određivao kao poseban antigen već u sklopu antigena Bw16, za kojeg se kasnije utvrdilo da obuhvaća antigene HLA-B38 i -B39. Kako smo mi ovim istraživanjem uočili povećanu učestalost alela B\*39 i smanjenu učestalost alela B\*38 to objašnjava zašto prethodno istraživanje kao rezultat nije pokazalo povećanu učestalost antigena HLA-Bw16. Isto tako ova specifičnost je dugo godina bila problematična za određivanje zbog nedostatka specifičnih antiseruma, pa su brojne osobe s tim antigenom određivane kao HLA-Bx, odnosno nije im bio određen drugi antigen lokusa HLA-B.

Sadašnje je istraživanje, također potvrdilo da je alel B\*27 (12,1%) najčešći alel lokusa HLA-B među bolesnicima s PsA u Hrvatskoj, međutim ovaj alel nije pokazao najveći relativni rizik za bolest (RR=2,4). Dva, prije spomenuta alela, alel B\*39 (RR=9,2) i B\*57 (RR=8,4) pokazali su najveće relativne rizike za PsA u Hrvatskoj. O povećanoj učestalosti alela B\*27 među bolesnicima s PsA govore radovi brojnih autora iz različitih dijelova svijeta (Evropa, SAD, Japan), pri čemu ta zastupljenost varira od 10,7% (Japanci) do preko 30% (Španjolci) (25-30). Potvrđena je povišena učestalost alela B\*13 među našim bolesnicima, ali samo prije korekcije p vrijednosti; relativni rizik za ovaj alel iznosio je 4,2.

Rezultati istraživanja povezanosti PsA i sustava HLA, provedenih diljem svijeta, vrlo su heterogeni, te su stoga usporedbe naših rezultata s rezultatima drugim

autora pokazala neke sličnosti, ali i razlike. Uočene povezanosti s alelima B\*39 i B\*57 u skladu su s rezultatima istraživanja u Kanadi i Italiji gdje su također uočene povezanosti s alelom B\*39 i B\*27, ali ne i alelom B\*57 (31,32). S druge strane, skupina autora iz Njemačke izvijestila je upravo o povezanosti antigena HLA-B57 i -B27 s PsA u njihovoj zemlji, dok su Španjolci našli najveću povezanost s antigenom HLA-B13 i -B27 (3). Studije provedene u SAD i Francuskoj također su pronašle povezanost s ovim antigenima (17).

Analiza raspodjele alela lokusa HLA-B u naših bolesnika pokazala je smanjenu zastupljenost alela B\*07, B18 i B\*38, što može govoriti u prilog protektivnoj ulozi ovih alela u pojavi PsA u nas. Međutim, smanjena zastupljenost alela B\*38 među bolesnicima s PsA u Hrvatskoj, uočena ovim istraživanjem, u suprotnosti je s rezultatima skupine autora iz Izraela koji su među tamošnjim psorijatičarima pronašli povišenu učestalost ovog alela (33). S druge strane rezultati iz drugih populacija (sjever Švedske, Velika Britanija) govore o smanjenoj zastupljenosti antigena HLA-B22 i -B62 među bolesnicima s PsA (17-29). Za donošenje bilo kakvog konačnog zaključka o njihovoj zaštitnoj ulozi, potrebno je obuhvatiti veći ukupan broj bolesnika te vidjeti postoje li razlike u raspodjeli alela HLA među različitim formama ove, nadasve, složene bolesti.

O povezanosti PsA s alelima lokusa HLA-A izvijestili su Izraelci i Japanci, koji su među svojim bolesnicima našli povećanu učestalost alela A\*03, odnosno alela A\*02 (30,33). Mi, među našim bolesnicima nismo našli povezanost s niti jednim od 14 uočenih alela ovog lokusa. To govori u prilog pretpostavci da aleli ovog lokusa ne igraju ulogu u nastanku bolesti, već da je povišena učestalost alela lokusa HLA-A rezultat neravnoteže udruživanja (linkage disequilibrium-LD) s alelima lokusa HLA-B, koji su povezani s PsA (34).

Molekularna metoda, metoda PCR-SSP, omogućila nam je da po prvi put detaljnije analiziramo raznovrsnost alela lokusa HLA-Cw među bolesnicima s PsA u Hrvatskoj. Naime, veliki broj antigena lokusa HLA-Cw nije mogao biti određen serološkim testovima zbog nedostatka specifičnih antiseruma za ovaj lokusa. Među našim bolesnicima niti jedan od 14 različitih alela lokusa HLA-Cw nije pokazao statistički značajnu korigiranu p vrijednost. Takve rezultate iznijeli su i autori iz Švedske, Izraela i Velike Britanije, no nasuprot njima, rezultati istraživanja provedenih u Španjolskoj, Italiji i Kanadi govore o povezanosti s alelom Cw\*0602 (17,35). Alel Cw\*0602 imalo 16,4% bolesnika s PsA, što je više nego u kontrolnoj skupini (9,6%), ali nije statistički značajno. Treba reći da je jedino alel Cw\*02 pokazao statistički značajno povišenu učestalost među hrvatskim bolesnicima ( $p=0,039$ ), ali samo prije korekcije p vrijednosti, što je, smatramo, rezultat povišene učestalosti alela B\*27

među bolesnicima, koji je u neravnoteži udruživanja s alelom Cw\*02 (34). O povećanoj zastupljenosti alela Cw\*02 među bolesnicima s PsA izvijestili su i istraživači iz Njemačke (36).

I na kraju, posljednji lokus HLA koji je analiziran u ovom radu, je lokus HLA-DRB1. S obzirom da je nekoliko istraživanja iznijelo zaključke o povezanosti PsA s alelima ovog lokusa HLA razreda II, jedan od naših ciljeva je bila analiza raspodjele alela lokusa HLA-DRB1 među bolesnicima s PsA u Hrvatskoj i usporedba sa zdravim ispitanicima. Analiza je pokazala povećanu učestalost alela DRB1\*16 među bolesnicima, ali samo prije korekcije p vrijednosti. Iz tog razloga ne možemo govoriti o povezanosti ovog alela i PsA u Hrvatskoj. Ovaj nalaz je u suprotnosti s nalazom u engleskoj populaciji gdje je zapažena smanjena učestalost skupine HLA-DR2, koja obuhvaća DR15 i DR16 (31). Objašnjenje povišene učestalosti alela DRB1\*16 vjerojatno leži u rezultatima populacijskih istraživanja, provedenim u Hrvatskoj gdje je uočena neravnoteža udruživanja tog alela s alelima B\*27 i B\*39 gdje su takvi haplotipovi HLA bili prisutni u 1,9% odnosno 1,4% zdravih ispitanika (34). Stoga možemo reći da je povišena učestalost alela DRB1\*16 među bolesnicima sekundarna i posljedica povećane učestalosti alela B\*27 i B\*39. Za razliku od Amerikanaca, mi nismo našli povezanost s alelom DRB1\*04, ali ni s alelom DRB1\*07 o čemu je izvijestila skupina autora iz Velike Britanije (37,38).

Na temelju iznijetog možemo reći da naši rezultati podržavaju hipotezu koja kaže da je za nastanak PsA odgovorna regija oko lokusa HLA-B tj. da se tu nalazi jedan od gena odgovornih za PsA (1). Nasuprot tome, psorijaza tipa I povezana je s regijom dužine približno 170 parova baza u blizini lokusa HLA-Cw, što ide u prilog stavu da te dvije bolesti imaju različitu genetsku podlogu (39). To je u suprotnosti s radom Martinez-Borra i suradnika koji pretpostavljaju da je za nastanak i jedne i druge bolesti odgovorna ista regija na kromosomu 6 (15).

Na kraju je potrebno reći da se istraživanja o ulozi sustava HLA u etiologiji različitih bolesti sve više okreću ne samo drugim genima unutar sustava HLA (MICA - class I MHC chain-related gene; TNF - Tumor Necrosis Factor) već i mikrosatelitskim lokusima unutar regije HLA (34,35). Mikrosateliti HLA (TNFa, D6S273, DQCAR, Bat2,...) pomogli su u boljem definiranju osoba podložnih reumatoidnom artritisu, psorijazi, hemokromatozi, dijabetesu ovisnom o inzulinu, celijakiji te čitavom nizu drugih bolesti (40-46).

Ovo istraživanje možemo smatrati pilot studijom u kojoj je dobiven tek mali uvid u genetsku strukturu bolesnika s PsA u Hrvatskoj, i to samo za neke od lokusa HLA. Međutim, jedno je sigurno, povezanost je izrazito složena i nije uniformna, kao što je npr. povezanost HLA-B27 i ankilozantnog spondilitisa (47,48).

## Zaključak

Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da je u Hrvatskoj psorijatični artritis prvenstveno povezan s alelima lokusa HLA-B, a povišena učestalost alela na drugim, istraživanim, lokusima HLA-(A, Cw i DRB1) posljedica je neravnoteže udruživanja alela tih lokusa s alelima lokusa HLA-B. Za dobivanje potpune slike o genetskoj podlozi ove bolesti neophodno je uključiti veći

broj bolesnika, koje bi u tom slučaju mogli podijeliti obzirom na kliničke slike. Isto tako bilo bi korisno uključiti i druge lokuse unutar regije HLA, posebno oko lokusa HLA-B te na taj način pokušati dobiti uvid koji je gen(i) odgovoran za samu bolest. Također, poželjno bi bilo u daljnjim istraživanjima analizirati i ulogu drugih kromosomskih regija, eventualno odgovornih za pojavu PsA.

## Literatura

1. Shbeeb M, Uramoto KM, Gibson LE, O'Fallon WM, Gabriel SE. The epidemiology of psoriatic arthritis in Olmsted Country, Minnesota, USA, 1982-1991. *J Rheumatol* 2000;27(5):1247-1250.
2. Gladman DD. Psoriatic Arthritis. U: Maddison PJ, Isenberg DA, Glass DN, ur. *Oxford textbook of rheumatology*. Oxford: Oxford University Press. 1998:1071-1084.
3. Adams PF, Hendershot GE, Marano MA. Current estimates from the National Health Interview Survey, 1996. National Center for Health Statistics. *Vital Health Statistics* 1999;10(200)1-212.
4. Moll JM, Wright V. Psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1973;3(1):55-78.
5. Gladman DD, Brockbank J. Psoriatic arthritis. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9(7):1511-1522.
6. Veale D, FitzGerald O. Psoriatic arthritis. *Best Practice Research Clin Rheumatol* 2002;16(4):523-535.
7. Olivieri I, van Tubergen A, Salvarani C, Van der Linden S. Seronegative spondyloarthritides. *Best Practice Research Clin Rheumatol* 2002;16(5):723-739.
8. Scarpa R, Cosenti E, Mangusi F. i sur. Clinical and genetic aspects of psoriatic arthritis "sine psoriasis". *J Rheumatol* 2003;30(12):2638-2640.
9. Gladman DD, Brubacher B, Buskila D, Langevitz P, Farewell VT. Differences in the expression of spondyloarthropathy: a comparison between ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis. *Clin Invest Med* 1993;16(1):1-7.
10. Espinoza LR, van Solingen R, Cuellar ML, Angulo J. Insights into the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Am J Med Sci* 1998;36:271-276.
11. Stafford L, Youssef PP. Spondyloarthropathies: an overview. *Internat Med J* 2002;32:40-48.
12. Samuelsson L, Enlund F, Torinsson A. i sur. A genome-wide search for genes predisposing to familial psoriasis by using a stratification approach. *Hum Genet* 1999;105:523-528.
13. Karason A, Gudjonsson JE, Upmanyu R. i sur. A susceptibility gene for psoriatic arthritis maps chromosome 16q: evidence for imprinting. *Am J Hum Genet* 2003;72(1):125-131.
14. Gladman DD, Farewell VT, Pellett F, Schentag C, Rahman P. HLA is a candidate region for psoriatic arthritis: evidence for excessive HLA sharing in sibling pairs. *Hum Immunol* 2003;64:887-889.
15. Martinez-Borra J, Gonzalez S, Santos-Juanes J. i sur. Psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis share a 100 kb susceptibility region telomeric to HLA-C. *Rheumatology* 2003;49(9):1089-1092.
16. Metzger AL, Morris RI, Bluestone R, Terasaki PI. HL-A W27 in psoriatic arthropathy. *Arthritis Rheum* 1975;18:111-115.
17. Tiwari JL, Terasaki PI. *HLA and disease associations*. New York: Springer-Verlag. 1985:75-81.
18. Hohler T, Grossmann S, Stradmann-Bellinghausen B. i sur. Differential association of polymorphisms in the TNFalpha region with psoriatic arthritis but not psoriasis. *Ann Rheum Dis* 2002;61(3):213-218.
19. Jajić I, Kašelan A, Brnobić A, Kerhin V, Brkljačić Lj. HLA antigens in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arch Dermatol* 1977;113:2-4.
20. Amor B, Dougados M, Mijiyava. Criterie diagnostique des spondylarthropathies. *Rev Rheum* 1990;57:85-89.
21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HE. A simply salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988;16:1215-1216.
22. Olerup O, Zelterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1992;39:225-229.
23. Bunce M, Bernardo MC, Procter J. i sur. High resolution HLA-C typing by PCR-SSP identification of allele frequencies and linkage disequilibrium in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. *Tissue Antigens* 1997;50:100-105.
24. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955;41:251-253.
25. Gladman DD, Farewell VT. The role of HLA antigens as indicators of disease progression in psoriatic arthritis: Multivariate relative risk model. *Arthritis Rheum* 1995;38(6):845-850.
26. Queiro R, Torre JC, Gonzalez S, Lopez-Larrea C, Tinture T, Lopez-Lagunas I. HLA antigens may influence the age of onset of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2003;30(3):505-507.
27. Marshal S, Armadas-Gill L, Martinez M, Gallardo D, Ribera A, Lience E. Clinical, radiographic and

HLA associations as markers for different patterns of psoriatic arthritis. *Rheumatology* 1999;38:332-337.

28. Gladman DA, Farewell VT. HLA studies in psoriatic arthritis: current situation and future needs. *J Rheumatol* 2003;30(1):4-6.

29. Alenius GM, Jidell E, Nordmark L, Rantapaa DS. Disease manifestations and HLA antigens in psoriatic arthritis in northern Sweden. *Clin Rheum* 2002;21(5):357-362.

30. Muto M, Nagai K, Mogami S. i sur. HLA antigens in Japanese patients with psoriatic arthritis. *Tissue Antigens* 1995;45:362-364.

31. Gladman DD, Farewell VT, Kopiuck KA, Cook RJ. HLA markers and progression in psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 1998;25(4):730-733.

32. Trabace S, Cappellacci S, Ciccarone P, Liaskos S, Polito R, Zorzini L. Psoriatic arthritis: a clinical, radiological and genetic study of 58 Italian patients. *Acta Derm Vener* 1994;186:69-70.

33. Elkayam O, Segal R, Caspi D. Human leukocyte antigens distribution in Israeli patients with psoriatic arthritis. *Rheum Intern* 2004;24(2):93-97.

34. Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB, -DQA1, -DQB1 haplotypes in the Croatian population. *European J Immunogenet* 1999;27:47-50.

35. Eastmond CJ. Psoriatic arthritis: Genetics and HLA antigens. *Baillieres Clin Rheumatol* 1994;8(2):263-276.

36. Hohler T, Kruger A, Schneider PM. i sur. A TNF-alpha promoter polymorphism is associated with juvenile onset psoriasis and psoriatic arthritis. *J Invest Dermatol* 1997;109(4):562-565.

37. Korendowych E, Dixey J, Cox B, Jones S, McHugh N. The influence of the HLA-DRB1 rheumatoid arthritis shared epitope on the clinical characteristics and radiological outcome of psoriatic arthritis. *J Rheumatol* 2003;30(1):96-101.

38. Gladman DD, Farewell VT, Rahman P. i sur. HLA-DRB1\*04 alleles in psoriatic arthritis: compari-

son with rheumatoid arthritis and healthy controls. *Hum Immunol* 2001;62:1239-1244.

39. Nair RP, Stuart P, Hensler T. i sur. Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 2000;66(6):1833-1844.

40. Hohler T, Weinmann A, Schneider PM. i sur. TAP polymorphism in Juvenile Onset Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *Hum Immunol* 1996;51:49-54.

41. Hohler T, Schneider PM, Rittner C. i sur. RLMP polymorphisms do not influence disease expression in psoriatic arthritis. *Clinic Exp Rheumatol* 1996;14(6):661-664.

42. Smerdel A, Lie BA, Finholt C. i sur. An additional susceptibility gene for juvenile idiopathic arthritis in the HLA class I region on several DR-DQ haplotypes. *Tissue Antigens* 2003;61:80-84.

43. Choi HB, Han H, Youn JI, Kim TY, Kim TG. MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. *Tissue Antigens* 2000;56:548-551.

44. Fernandez L, Fernandez-Arquero M, Gual L. i sur. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene in the celiac disease. *Tissue Antigens* 2002;59:219-222.

45. Park YS, Sanjeevi CB, Robles D. i sur. Additional association on intra-MHC genes, MICA and D6S273, with Addison's disease. *Tissue Antigens* 2002;60:155-163.

46. Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A. A Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens* 2000;55:477-509.

47. Gonzales-Roces S, Alvarez MV, Gonzales S. i sur. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997;49:116-123.

48. Queiro R, Sarasqueta C, Belzunegui J, Gonzalez C, Figueroa M, Torre-Alonso JC. Psoriatic spondyloarthropathy: a comparative study between HLA-B27 positive and HLA-B27 negative disease. *Semin Arthritis Rheum* 2002;31(6):413-418.