

¹Klinika za reumatske bolesti i rehabilitaciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

²Zavod za kliničku imunologiju i reumatologiju

Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Klinička bolnica Dubrava ♦ Avenija Gojka Šuška 6 ♦ 10000 Zagreb

³Klinički zavod za radiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

⁴Zavod za tipizaciju tkiva ♦ Klinika za urologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.
KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb

RASPODJELA HLA-DRB1 GENA U HRVATSKIH BOLESNIKA S ARTRITISOM DRB1 GENS DISTRIBUTION IN CROATIAN ARTHRITIS PATIENTS

Nadica Laktašić Žerjavić¹ ♦ Dragica Soldo Jureša²
Đurđica Babić-Naglić¹ ♦ Božidar Ćurković¹ ♦ Kristina Potočki³
Renata Žunec⁴ ♦ Goran Ivanišević¹

Sažetak

Reumatoidni artritis (RA) pokazuje povezanost teškog oblika bolesti s određenim HLA-DRB1 alelima. Prema teoriji zajedničkog epitopa prisutnost alela DRB1 lokusa *0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *1001 i *1402 povezuje se s destruktivnijim oblikom bolesti, posebice ako su prisutna oba alela. Incidencija RA je 5-7 puta veća u nosioca ovih alela. Cilj rada je bio utvrditi raspodjelu HLA-DRB1 alela u skupini hrvatskih bolesnika s artritisom, i utvrditi najučestaliji podložni gen. Metodom PCR-SSP ispitivano je 90 bolesnika s nediferenci-

ranim, početnim artritisom u kojih je bio vjerojatan razvoj RA kao i bolesnici s RA u ranom i razvijenom stadiju bolesti. Kao najčešći predisponirajući alel utvrđen je DRB1 *0101 (43.33% bolesnika), potom *0401 (17.77% bolesnika) i *0404 (10% bolesnika). Pedesetosam (64.44%) bolesnika je imalo podložne gene, devet (10%) su bili homozigotni nosioci i četrdesetdevet (54,44%) heterozigotni nosioci. Bolesnici s početnim, nediferenciranim artritisom i s RA u ranom stadiju bolesti predviđeni su za daljnje praćenje.

Ključne riječi

reumatoidni artritis, zajednički epitop, HLA-DRB1 aleli

Summary

Genetic association between particular HLA-DRB1 genes and severity of rheumatoid arthritis (RA) has been documented in various clinical investigations. Susceptible alleles are *0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *1001, *1402. According to the Shared epitope hypothesis presence of these alleles were considered as poor prognostic sign. The aim was to investigate HLA-DRB1 distribution in Croatian arthritis patients. Group of 90 patients with non-specific joint arthritis, non-erosive RA

and erosive RA were typed for DRB1 alleles by PCR-SSP method. Susceptible alleles were identified in 58 (64.44 %) patients. The most frequent genes were DRB1 *0101 (43.33 %), *0401 (17.77 %), *0404 (10 %). 9 out of 58 DRB1* positive patients had 2 susceptible alleles, and the rest (49 patients) had only one susceptible allele. The patients with non-specific joint arthritis and non-erosive RA will be closely followed for more destructive disease course in DRB1* positive patients.

Key words

rheumatoid arthritis, shared epitope, HLA-DRB1 alleles

mr.sc. Nadica Laktašić Žerjavić

Klinika za reumatske bolesti i rehabilitaciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
KBC Zagreb ♦ Kišpatićeva 12 ♦ 10000 Zagreb ♦ tel.: (01) 2388171

Uvod

Reumatoidni artritis (RA) je kronična bolest u kojoj na podlozi upale sinovijske ovojnice zglobova dolazi do strukturnih promjena dovodeći u konačnici do invalidnosti i povećanog mortaliteta. Mogućnost predviđanja ishoda bolesti u pojedinog pacijenta s reumatoidnim artritisom je jedan od većih problema u reumatologiji. Identifikacija pacijenata u ranoj fazi bolesti koji su pod povećanim rizikom za razvoj težeg oblika bolesti znači i lakšu odluku za primjenu agresivne, kombinirane terapije. Više kliničkih, demografskih i genetskih pokazatelja se povezuje s težim tijekom i lošijim ishodom bolesti. To su u prvom redu vrijednost laboratorijskih pokazatelja upale (sedimentacija eritrocita - SE, C reaktivni protein - CRP), pozitivnost reumatoidnog faktora (RF) i ženski spol (1).

Uloga genetskih faktora u predviđanju ishoda bolesti je kontroverzna (2,3). Reumatoidni artritis nije nasljedna bolest ali postoji čvrsta genetska povezanost teškog oblika bolesti s određenim HLA-DR alelima. Nosioци HLA-DR4 imaju češće pozitivan RF i radiografski težu bolest (4).

Najbolje istraženi genetski faktor rizika za razvoj bolesti kao i za teži oblik i lošiji ishod bolesti je HLA-DRB1 lokus (5). Molekularna osnova za tu povezanost poznata je pod nazivom zajednički epitop. Teorija zajed-

ničkog epitopa pretpostavlja da su HLA molekule klase II direktno involvirane u etiopatogenezu reumatoidnog artritisa (6). Zajednički epitop predstavlja istu sekvencu aminokiselina koja se nalazi na 70-74 mjestu u nekoliko različitih HLA-DR gena, alela DRB1 lokusa. Prisutnost HLA-DRB1* zajedničkog epitopa se definira kao pozitivitet *0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *1001, *1402 (1). HLA-DRB1 *0401, *0404, *0405, *0408, *1402 su sve aleli koji kodiraju dio molekule DR4, i to dio b lanca koji tvori dio veznog mjesta za antigen (treću hipervarijabilnu regiju b lanca, a heliks koji je dio zida džepa koji veže peptidni antigen u DR heterodimerima i prezentira ga T stanicama), što objašnjava povezanost DR4 sa reumatoidnim artritisom. Preostali HLA DRB1 aleli *0101, *1001 koji nose istu sekvencu aminokiselina (zajednički epitop) vezani su uz molekulu DR1.

Svrha istraživanja bila je utvrditi distribuciju HLA-DRB1 alela u hrvatskih bolesnika s artritisom budući da rezultati istraživanja prikazanih u literaturi pokazuju različitu distribuciju podložnih gena u različitim populacijama bolesnika (1,7,8,9,10). Zanimalo nas je koji je podložni HLA DRB1* alel najučestaliji u hrvatskoj populaciji bolesnika s artritisom.

Ispitanici i metode rada

U ispitivanje su uključeni bolesnici sa nediferenciranim, početnim artritisom u kojih je bio vjerojatan razvoj reumatoidnog artritisa i bolesnici sa zadovoljenim kriterijima za RA (11), u ranom i razvijenom stadiju bolesti. U skupinu bolesnika s nediferenciranim artritisom raspodjeljeni su bolesnici u kojih je artritis trajao najmanje šest tjedana, i u trenutku uključivanja u ispitivanje nije zadovoljavao kriterije za dijagnozu neke od klasificiranih upalnih reumatskih bolesti ali je bila prisutna utemeljena klinička pretpostavka reumatologa za razvoj bolesti u smjeru RA i seropozitivnost. U skupinu bolesnika s reumatoidnim artritisom raspodijeljeni su pacijenti koji su u trenutku uključivanja u istraživanje zadovoljavali revidirane klasifikacijske kriterije za reumatoidni artritis Američkog reumatološkog društva iz 1987. godine (11). Svi su ispitanici bili hospitalizirani u Klinici za reumatske bolesti i rehabilitaciju KBC Zagreb u tijeku 2000.-2001. godine. Promatrane varijable su bile dob, spol, trajanje bolesti, prisutnost zajedničkog epitopa HLA-

DRB1, prisutnost erozivnih promjena na radiogramu šaka i stopala (radiološki stadij ≥ 3 po Larsenu) (12), pozitivnost reumatoidnog faktora (Waller-Rose titar), laboratorijski pokazatelj upale (SE mm/h), broj bolnih i otečenih zglobova te funkcionalni status (Health Assessment Questionary, HAQ) (13). Svim ispitanicima je na limfocitima iz periferne krvi učinjena HLA-DRB1 tipizacija metodom molekularne biologije koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze: Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers (PCR-SSP) (14,15). Prisutnost HLA-DRB1 zajedničkog epitopa je definirana kao pozitivnost DRB1 *0101, *1001, *0401, *0404, *0405, *0408, *1402. Bolesnici sa nediferenciranim, početnim artritisom, te bolesnici sa zadovoljenim kriterijima za RA u ranom stadiju bolesti predviđeni su za daljnje pažljivo kliničko praćenje kako bi se ocijenila težina bolesti i utvrdila važnost HLA-DRB1 genotipizacije u predviđanju razvoja nediferenciranog artritisa u reumatoidni artritis kao i u procjeni ishoda reumatoidnog artritisa.

Rezultati

HLA-DRB1 genotipizacija je određena u 90 bolesnika, 79 žena i 11 muškaraca, prosječne životne dobi 43 godine (median 46, raspon 16-72), kojima je zglobna bolest prosječno trajala 44 mjeseca, (median 27, raspon 2-360).

Prosječna SE je iznosila 45 mm/h (median 48, raspon 4-100), broj bolnih zglobova 11 (median 11, raspon 0-38), broj otečenih zglobova 6 (median 5, raspon 1-

34), HAQ 0.99 (median 0.8, raspon 0-3). Reumatoidni faktor je bio pozitivan u 13 (14.44%) bolesnika.

Radiološki su utvrđene erozivne promjene (Larsen ≥ 3) na šakama i/ili stopalima u 40 (44.44%) bolesnika.

Raspodjela alela HLA-DRB1 prikazana je u tablici 1. Kao najčešći predisponirajući alel (nosioц zajedničkog epitopa) utvrđen je DRB1 *0101 (43.33% bolesnika), potom *0401 (17.77% bolesnika) i *0404 (10% bolesnika),

dok su ostali predisponirajući aleli bili zastupljeni u zanemarivom broju bolesnika (tablica 1). U ukupno 58 (64.44%) bolesnika je utvrđena prisutnost podložnih HLA-DRB1 gena. Devet (10%) bolesnika su bili homozigotni nositelji podložnih gena (tablica 2), dok je u 49 (54,44%) bolesnika bio prisutan samo jedan podložni gen, odnosno navedeni bolesnici su bili heterozigotni nositelji (tablica 3).

Tablica 1. Raspodjela HLA-DRB1 alela u bolesnika s artritisom (n=90)
Table 1. The distribution of HLA-DRB1 alleles in arthritic patients (n=90)

Alel	Alel n (%)
0101*	39 (43.33)
0301	11 (12.22)
0401*	16 (17.77)
0402	5 (5.55)
0403	2 (2.22)
0404*	9 (10.0)
0405*	1 (1.11)
0407	1 (1.11)
0701	10 (11.11)
1001*	2 (2.22)
1101	2 (2.22)
1301	2 (2.22)
1302	2 (2.22)
1303	2 (2.22)
1401	1 (1.11)
1501	1 (1.11)

*aleli nosioci zajedničkog epitopa
n - broj bolesnika
*alleles with the shared epitope
n - number of patients

Tablica 2. P/P grupa (n=9)
Table 2. S/S group (n=9)

	0101*	0401*	0404*
0101*	0	5	2
1001*	2	0	0

* aleli nosioci zajedničkog epitopa
n - broj bolesnika P - nositelji podložnog alela
N - bolesnici koji nisu nositelji podložnog alela
* alleles with the shared epitope n - number of patients
S - susceptible alleles N - non-susceptible alleles

Tablica 3. P/N grupa (n=49)
Table 3. S/N group (n=49)

	0101*	0401*	0404*	0405*	1001*
0301	3	0	3	0	0
0402	2	0	0	0	0
0701	6	0	1	0	0
1401	0	0	1	0	0
1501	0	1	0	0	0
ostalo	20	9	2	1	0

* aleli nosioci zajedničkog epitopa
n - broj bolesnika P - nositelji podložnog alela
N - bolesnici koji nisu nositelji podložnog alela
* alleles with the shared epitope n - number of patients
S - susceptible alleles N - non-susceptible alleles

Rasprava

Novija istraživanja potvrđuju povezanost prisutnosti određenih alela HLA-DRB1 prema teoriji zajedničkog epitopa s radiološkom progresijom i lošijim funkcionalnim ishodom bolesti, tj. njihovo prisustvo se povezuje s destruktivnijim oblikom bolesti, posebice ako su prisutna oba alela (1,5,16,17,18,19,20,21). Lošija prognoza homozigota ukazuje na recesivna svojstva predisponirajućih alela u odnosu na nepodložne alele (17,18). Prisutnost predisponirajućeg alela u seronegativnih (RF negativnih) bolesnika s RA je značajnija, budući da je seropozitivnost sama po sebi dobar i snažniji prognostički faktor težeg tijeka i lošijeg ishoda bolesti (1,19). HLA DRB1 lokus posebno modificira tijek bolesti u ranoj fazi reumatoidnog artritisa u homozigota dok ima limitirajući utjecaj na terapijski ishod klinički teških oblika ranog RA (20).

Osnovne vrijednosti određivanja HLA DRB1 jesu predikcija prognoze bolesti posebno u ranom RA, te time otkrivanje rizičnih bolesnika u ranijoj fazi bolesti, što doprinosi terapijskoj odluci (22). Prednost pred ostalim prediktorima loše prognoze je da se DRB1 tipizacija ne mijenja tijekom života.

Iako je incidencija RA 5-7 puta veća u nositelja ovih alela (22), oko 25% pacijenata s RA nije nositelj HLA-DRB1 zajedničkog epitopa (23). Stoga treba naglasiti da HLA-DRB1* tipizacija nije dijagnostički kriterij za RA, odnosno na osnovu nje se bolest ne može potvrditi niti isključiti.

Rezultati istraživanja prikazanih u literaturi pokazuju različitu distribuciju podložnih gena u različitim popula-

cijama bolesnika. Tako rezultati dosadašnjih istraživanja na populaciji pacijenata bijele rase s RA uključujući Eskime, te pacijente iz sjeverne Europe i Engleske pokazuju najčvršću povezanost alela DRB1*0401 i *0404 s RA i težim ishodom bolesti (1,7). U populaciji sjevernoameričkih Indijanaca najučestaliji predisponirajući alel je *1402 (8). U mediteranskim zemljama najčešći predisponirajući aleli jesu *0101 i *1001. Ispitivanja provedena na populaciji pacijenata iz južne Francuske i Španjolske, koje zemljopisno pripadaju području Mediterana, utvrdila su DRB1*0101 u južnoj Francuskoj i *0405 u Španjolskoj kao najučestaliji predisponirajući alel (9,10).

Ovim istraživanjem utvrđena najveća učestalost predisponirajućeg alela *0101 u hrvatskih bolesnika s artritisom ukazuje da se Hrvatska ubraja u krug mediteranskih zemalja, genetski i zemljopisno.

Osim u ranom reumatoidnom artritisu HLA DRB1 tipizacija kao prediktor loše prognoze može pridonijeti terapijskoj odluci i kod nediferenciranog početnog artritisa kada još nisu zadovoljeni kriteriji za dijagnozu RA, jer je i u tih pacijenata potrebno donijeti terapijsku odluku. Nediferencirani artritis čini oko 50% svih početnih upalnih artritisa. Tri činioca s najvećom prediktivnom vrijednosti razvoja nediferenciranog artritisa u kasnijem tijeku bolesti u RA sa zadovoljenim dijagnostičkim kriterijima jesu utemeljena klinička pretpostavka reumatologa, seropozitivnost (pozitivan RF) i prisutnost predisponirajućeg alela DRB1*0404 i *0401 (24,25). Prisutnost predisponirajućih HLA DRB1 alela, ako se shvati kao

loš prognostički znak, može u pacijenata sa seronegativnim nediferenciranim artritismom u kojih postoji klinička pretpostavka daljnjeg razvoja artritisa u RA opravdati ranu primjenu agresivnije diferentne terapije. Rezultati

ovog istraživanja ukazuju da bi prisutnost alela *0101 uz *0401 i *0404 kao i nazočnost RF trebala imati najveću prediktivnu vrijednost daljnjeg razvoja nediferenciranog artritisa za hrvatske bolesnike u reumatoidni artritis.

Zaključak

Najučestaliji predisponirajući HLA-DRB1* alel u populaciji Hrvatskih bolesnika s artritismom je *0101. Nešto više od 64% bolesnika s artritismom je nositelj barem jednog predisponirajućeg DRB1* alela, što ukazuje na njihovu važnost u etiopatogenezi RA. Daljnje pomno praćenje ovih bolesnika pokazat će eventualno teži tijek bolesti kao i pre-

diktivnu vrijednost nazočnosti predisponirajućeg alela u razvoju nediferenciranog početnog artritisa u diferencirani RA. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da bi uz seropozitivnost prisutnost alela *0101, *0401 i *0404 trebala imati najveću prediktivnu vrijednost razvoja nediferenciranog artritisa u reumatoidni artritis u populaciji hrvatskih bolesnika.

Literatura

1. Mathey DL, Hassell AB, Dawes PT. et al. Independent Association of Rheumatoid factor and the HLA-DRB1 Shared Epitope With Radiographic Outcome in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1529-1533.
2. Reveille JD. The genetic contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1988;10:197-200.
3. Reveille JD. Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future. *J Rheumatol* 2005;72:10S-3S.
4. McMahon MJ, Hillarby MC, Calrkson RWE, Hollis S, Grennan DM. Major histocompatibility complex variants and articular disease severity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1991;32:899-902.
5. Gorman JD, David-Vaudey E, Pai M, Lum RF, Criswell LA. Particular HLA-DRB1 shared epitope genotypes are strongly associated with rheumatoid vasculitis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3476-3484.
6. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The Shared Epitope Hypothesis; An Approach to Understanding The Molecular Genetics of Susceptibility to Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205-1213.
7. Toussirot E, Benoit A, Tiberghien P, Chabod J, Cedoz JP, Wendling D. HLA-DRB1 alleles and Shared Amino Acid Sequences in Disease Susceptibility and Severity in Patients from Eastern France with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:1446-1451.
8. Castro F, Acevedo E, Ciusani E, Angulo JA, Wollheim FA, Sandberg-Wollheim M. Tumour necrosis factor microsatellites and HLA-DRB1*, HLA-DQA1*, and HLA-DQB1* alleles in Peruvian patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001;60:791-795.
9. Benazet JF, Reviron D, Mercier P, Roux H, Roudier J. HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in Southern France. Absence of extraarticular disease despite expression of shared epitope. *J Rheumatol* 1995;22:607-610.
10. Yelamos J, Garcia-Lozano JR, Moreno I, et al. Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and

- DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Arthritis Rheum* 1993;36:811-814.
11. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA. et al. The American Rheumatism Association 1987. Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-324.
12. Larsen A, Dale K, Eek M. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol* 1977;18:481-491.
13. Pincus T, Summey JA, Soracy SA, Hummon NP, Wallsoton KA. Assessment of Patient satisfaction in activities of daily living using a modified Stanford Health Assessment Questionnaire. *Arthritis Rheum* 1983;26:1346-1353.
14. Erlich HA, Bugawan TL. PCR technology. U: Erlich HA, ur. New York: Stockton Press. 1988:193-98.
15. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-235.
16. Toda Y, Minamikawa Y, Akagi S. et al. Rheumatoid-susceptible alleles of HLA-DRB1 are genetically recessive to non-susceptible alleles in the progression of bone destruction in the wrists and fingers of patients with RA. *Ann Rheum Dis* 1994;53:597-592.
17. Tanaka N, Masuko T, Ishii S. A Retrospective Study Using Nail Clippings of Rheumatoid Susceptible Alleles of HLA-DRB1 as a Prognostic Factor in Early Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:767-772.
18. Deighton CM, Cavanagh G, Rigby AS, Lloyd HL, Walker DJ. Both inherited HLA-haplotypes are important in the predisposition to the rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1993;32:893-898.
19. Rau R, Herborn G, Zueger S, Fenner H. The Effect of HLA-DRB1 Genes, Rheumatoid Factor, and Treatment on Radiographic Disease Progression in Rheumatoid Arthritis Over 6 Years. *J Rheumatol* 2000;27:2566-2575.

20. Seidl C, Koch U, Buhleier T. et al. Association of (Q)R/KRAA Positive HLA-DRB1 Alleles with Disease Progression in Early Active and Severe Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 1999;26:773-776.

21. Huang J, Stewart N, Crabbe J. et al. A 1-year follow up study of dynamic magnetic resonance imaging in early rheumatoid arthritis reveals synovitis to be increased in shared epitope-positive patients and predictive of erosions at 1 year. *Rheumatol* 2000;39:407-416.

22. O'Dell J, Nepom BS, Haire C. et al. HLA-DRB1 typing in rheumatoid arthritis: predicting response to specific treatments. *Ann Rheum Dis* 1998;57:209-213.

23. Mu H, Chen JJ, Jiang Y, King MC, Thomson G, Criswell LA. Tumor Necrosis Factor a Microsatellite Polymorphism is Associated with Rheumatoid Arthritis Severity through an Interaction with the HLA-DRB1 Shared Epitope. *Arthritis Rheum* 1999;42:438-442.

24. Morel J, Leqouffe MC, Bozonat MC. et al. Outcomes in patients with incipient undifferentiated arthritis. *Joint Bone Spine* 2000;67:49-53.

25. Emery P, Salmon M, Bradley H, Wordsworth P, Tunn E, Bacon PA, Waring R. Genetically determined factors as predictors of radiological change in patients with early symmetrical arthritis. *BMJ* 1992;305:1387-1389.