

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Renata Nemet-Gužvić**

**POVEZANOST GENA**

**HLA RAZREDA I I II**

**S RAZVOJEM UVEITISA NA**

**PODRUČJU ISTOČNE HRVATSKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Renata Nemet-Gužvić**

**POVEZANOST GENA  
HLA RAZREDA I I II  
S RAZVOJEM UVEITISA NA  
PODRUČJU ISTOČNE HRVATSKE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, Odjela za Laboratorijsku dijagnostiku i kliničku transfuzijsku medicinu, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Saška Marczy

Rad ima 43 lista, 7 tablica i 5 slika.

Zahvala:

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Saški Marczy na stručnoj pomoći, potpori i povjerenju tijekom studiranja i izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem pročelnici Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, prof. prim. dr. sc. Marini Samardžija, dr. med. spec. transfuziologije, na stručnoj pomoći i podršci tijekom studiranja.

Zahvaljujem kolegicama na Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu kliničkog bolničkog centra Osijek na suradnji i razumijevanju tijekom studija.

Veliko hvala mojoj obitelji.

## SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Glavni sustav tkivne snošljivosti u ljudi (HLA) .....	1
1.1.1. Definicija sustava HLA.....	1
1.1.2. Organizacija gena i svojstva sustava HLA .....	1
1.1.3. Molekule HLA razreda I i II .....	3
1.1.4. Nazivlje sustava HLA .....	4
1.1.5. Uloga HLA u imunološkoj reakciji i povezanost s bolestima .....	5
1.2. Uveitis .....	6
1.2.1. Definicija i klasifikacija uveitisa .....	6
1.2.2. Etiologija i patofiziologija uveitisa .....	7
1.2.3. Epidemiologija uveitisa .....	8
1.2.4. Dijagnostika i liječenje uveitisa .....	8
1.3. Povezanost sustava HLA s uveitisom .....	9
2. Ciljevi.....	11
3. Ispitanici i metode.....	12
3.1. Ustroj studije.....	12
3.2. Ispitanici.....	12
3.3. Metode .....	12
3.3.1. Izolacija DNA .....	12
3.3.2. Tipizacija gena HLA-A, -B, -DRB1 i -DQB1 metodom PCR-SSP .....	13
3.4. Statistička obrada podataka.....	16
4. Rezultati .....	17
4.1. Raspodjela gena HLA-A.....	17
4.2. Raspodjela gena HLA-B .....	19
4.3. Raspodjela gena HLA-DRB1 .....	21
4.4. Raspodjela gena HLA-DQB1 .....	22
5. Rasprava.....	23
6. Zaključak.....	26
7. Sažetak .....	27
8. Summary .....	28
9. Literatura.....	29

10. Životopis .....35

## KRATICE

MHC	glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
HLA	ljudski leukocitni antigen (engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
TCR	receptor T limfocita (engl. <i>T cell receptor</i> )
IMGT/HLA	engl. <i>International ImMunoGeneTics Database</i>
LD	neravnoteža udruživanja (engl. <i>Linkage disequilibrium</i> )
SUN	engl. <i>Standardization of Uveitis Nomenclature</i>
AAU	prednji akutni uveitis (engl. <i>Acute anterior uveitis</i> )
BCR	engl. <i>Birdshoot retinochorioidopathy</i>
BD	engl. <i>Behçet disease</i>
VKH	engl. <i>Voght-Konayagi-Harada syndrome</i>
TINU	tubulointersticijski nefritis s uveitisom (engl. <i>Tubulointerstitial nephritis and uveitis</i> )
JIA	juvenilni idiopatski artritis
EDTA	etilendiamin tetraoctena kiselina
TAE	engl. <i>Tris-Acetate -EDTA</i>
PCR-SSP	engl. <i>Polymerase chain reaction - sequece specific primer</i>

DNA	deoksiribonukleinska kiselina
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i> )
KBCO	Klinički bolnički centar Osijek



## 1. Uvod

### 1.1. Glavni sustav tkivne snošljivosti u ljudi (HLA)

#### 1.1.1. Definicija sustava HLA

Glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) je ključni element imunološkog sustava kralježnjaka u prepoznavanju i razlikovanju vlastitog od stranog (1).

Zaslugom francuskog imunologa J. Dausseta, u čovjeka je MHC sustav otkriven 1958. godine na leukocitima te nazvan sustavom HLA (engl. *Human Leucocyte Antigen*) dokazom leukocitnih aloantigena u politransfundiranih bolesnika (2). HLA molekule imaju ključnu ulogu u poticanju imunološke reakcije u preradbi i predočavanju antigena T-staničnim receptorima (3).

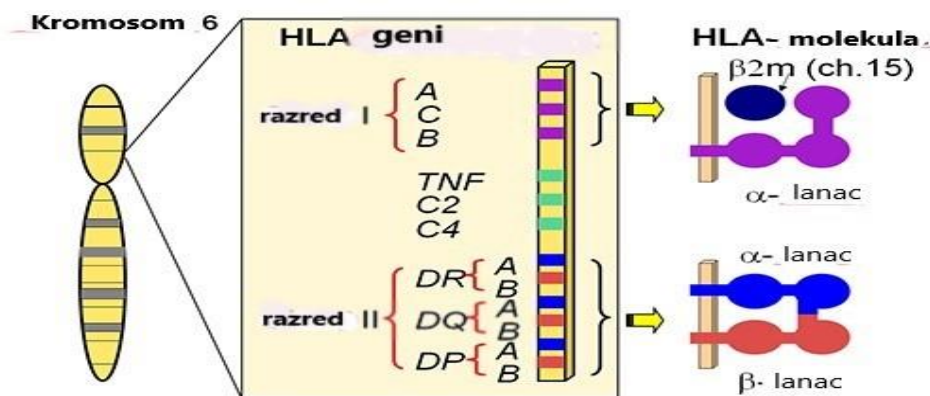
#### 1.1.2. Organizacija gena i svojstva sustava HLA

Sustav HLA se nalazi na kraćem kraku kromosoma 6 (6p21.3). Veličine je oko 4 000 kilobaza i sadrži više od 200 gena koji su podijeljeni u tri skupine, razred I, II i III (Slika 1.) (4, 5).

Regija HLA razreda I nalazi se telomerično i sadrži klasične gene (HLA-A, -B i -C) koji se odlikuju visokom raznolikošću, neklasične gene (HLA-E, -F i -G) koje odlikuje manji stupanj raznolikosti te nefunkcionalne pseudogene (HLA-H, -J, -K, -L, -P, -T, -U, -V, -W, -X) (6). Unutar regije HLA razreda II nalaze se klasični geni HLA-DQ, -DR i -DP koji su odgovorni za sintezu antigena te neklasični geni HLA-DM, -DO i -DN (7, 8, 11).

Regija HLA razreda III, čiji su geni odgovorni za sintezu komponenti komplementa, smještena je između razreda I i II (5).

Geni HLA međusobno su blisko smješteni u cis-položaju na kromosomu 6 zbog čega se i nasljeđuju u setovima, usko vezanim skupinama gena. Svaki takav set gena naziva se haplotip, a svaka osoba nasljeđuje po jedan haplotip od oca i jedan od majke. Oba nasljeđena haplotipa kodominantno su izražena na stanici. Značajka gena sustava HLA je i velika raznolikost, polimorfnost. Regija HLA najpolimorfnije je regija u ljudskom genomu.

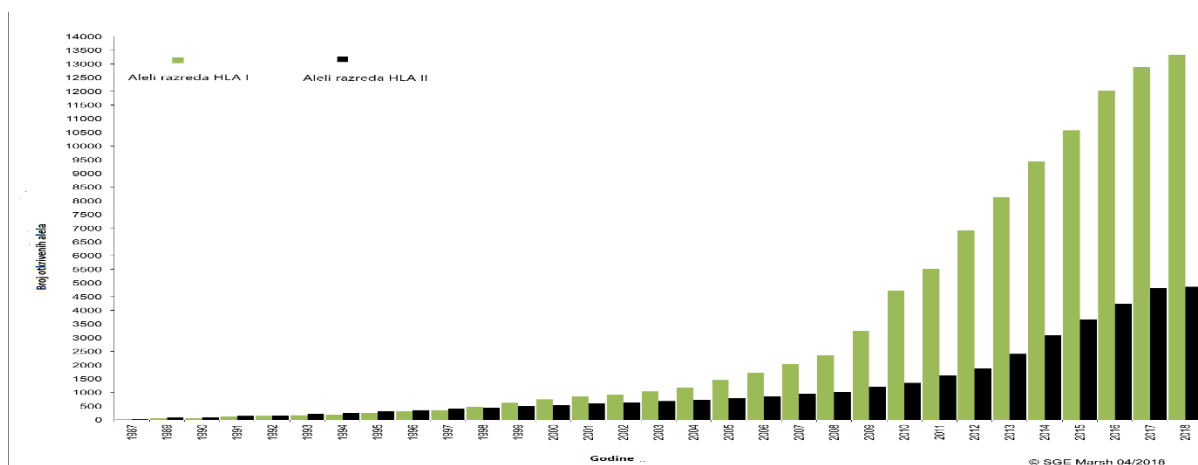


**Slika 1.** Shematski prikaz genske karte i antigena sustava HLA. Preuzeto i prilagođeno s dopuštenjem autora (53).

Visok stupanj raznolikosti kod klasičnih HLA gena posljedica je prirodne selekcije. Kao rezultat evolucijske prilagodbe heterozigoti su u selektivnoj prednosti zbog mnogo većeg repertoara antigena, kojeg heterozigotne jedinice, u odnosu na homozigotne mogu predočiti. Time heterozigoti imaju preduvjet za otpornost na različite uzročnike bolesti (9). Od preko 200 gena unutar HLA regije ekspresiju ima 57 %. Od gena HLA koji imaju ekspresiju u regulaciji imunskog odgovora sudjeluje oko 40 % izraženih lokusa (10, 11).

Napretkom laboratorijsko-dijagnostičkih tehnologija i brojnim istraživanjima svakodnevno se povećava broj novootkrivenih alela koji su evidentirani u bazi IMGT/HLA (verzija 3.32.0 2018-04) s više od 13 500 otkrivenih alela (Slika 2.). U razredu I sustava HLA najpolimorfiji je lokus HLA-B s 5091 alelom, dok je najpolimorfiji lokus razreda II HLA-DRB1 s 2464 alela (<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>) (12).

Pojedini HLA aleli dvaju ili više usko vezanih HLA gena u haplotipovima pojavljuju se češće nego što bi se to očekivalo s obzirom na pojedinačnu učestalost pojavljivanja tih alela. Ta pojava naziva se neravnoteža udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*, *LD*), a rezultat je niske učestalosti rekombinacija između lokusa HLA koji su blisko smješteni na kromosomu 6 (2, 3, 4, 5).



**Slika 2.** Porast broja novootkrivenih alela od 1987. do travnja 2018. godine

Preuzeto i prilagođeno prema (54).

### 1.1.3. Molekule HLA razreda I i II

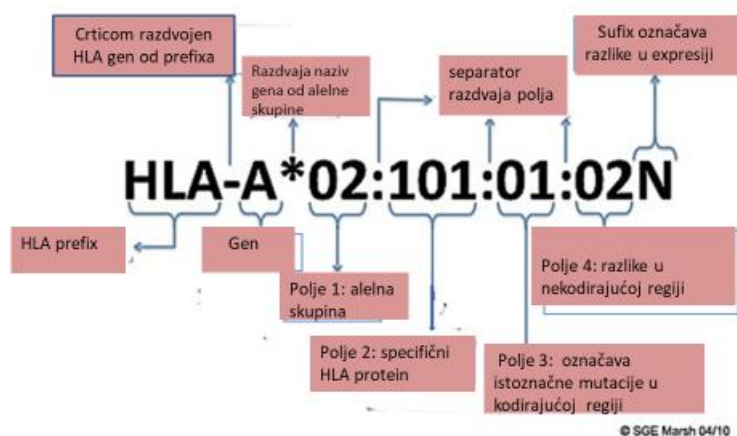
Molekulu HLA razreda I čine četiri osnovna dijela: vanjski dio koji veže peptidne ulomke, dio sličan imunoglobulinu te transmembranski i citoplazmatski dio. Najvažniji dio molekule su dijelovi teškoga  $\alpha$ -polipeptidnoga lanca izvan stanice. Domene  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  tvore pukotinu gdje mogu vezati peptid-antigene veličine 8-11 aminokiselina. Domena  $\alpha 3$  je vezno mjesto za molekulu CD8 na citotoksičnom limfocitu T. Geni HLA razreda I (HLA-A, -B, -C) kodiraju  $\alpha$ -lanac (45 kD). Polimorfizam i brojni alelni oblici gena HLA vezani su za raznolikost sljedova aminokiselina u domenama  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ , što osigurava vezanje velikog broja potencijalnih antigena. Laki lanac ( $\beta 2$ -mikroglobulin) kodira gen na kromosomu 15, jednak je u svih molekula HLA razreda I, nalazi se izvan stanice, nekovalentno je vezan za teški lanac. Svrha mu je izražavanje molekule HLA razreda I, također slični imunoglobulinu. Molekule HLA razreda I (HLA-A, -B i -C) predočuju antigene CD8 citotoksičnim T limfocitima mehanizmom spregnutog prepoznavanja. Receptori T-limfocita određenim afinitetom vežu antigenski ulomak, tako i dijelove molekule HLA. Molekule HLA razreda I nalaze se na gotovo svim stanicama s jezgrom, osim na stanicama endotela rožnice, neuronima središnjeg živčanog sustava i egzokrinog dijela gušterače, a predočuju prerađene citosolne, endogene i virusne antigene, te peptide tumorskih stanica (3, 4, 5).

Molekule HLA razreda II građene su od dva polipeptidna lanca  $\alpha$  i  $\beta$ . Teški  $\alpha$ -lanac (33-48 kD) kodiraju A geni HLA razreda II, laki  $\beta$ -lanac (26-29 kD) kodiraju B geni HLA razreda II.

Polimorfizam molekula HLA razreda II zastupljeniji je u genima koji kodiraju  $\beta$ -lanac. Molekule HLA razreda II sastoje od četiri osnovna dijela: vanjski dio koji veže peptidne ulomke, dio sličan imunoglobulinu te transmembranski i citoplazmatski dio. Izvan stanice strše  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$ ;  $\beta 1$  i  $\beta 2$  domene. Dijelovi lanaca  $\alpha 1$  i  $\beta 1$ , tvore veznu pukotinu čiji su krajevi u slučaju ovih molekula otvoreni (za razliku od molekula HLA razreda I). Zbog takve konfiguracije vezani peptidni dijelovi mogu se nalaziti i dijelom izvan pukotine, što omogućuje vezanje većih peptida građenih od 10 do 30 aminokiselina. U domeni  $\beta 2$  nalazi se vezno mjesto za koreceptorsku molekulu CD4 na pomagačkom limfocitu T. Mehanizmom spregnutog prepoznavanja limfocit T CD4 dalje usmjerava imunološki odgovor prema limfocitima B i produkciji odgovarajućih protutijela. Molekule HLA razreda II prisutne su na fagocitnim odnosno antigen-predočnim stanicama poput makrofaga, dendritičkih stanica, B-limfocita, na endotelnim crijevnim i epitelnim stanicama, a predočuju vezikularne ili izvanstanične antigene nakon procesa fagocitoze (3, 4, 5).

#### 1.1.4. Nazivlje sustava HLA

Važeće nazivlje za HLA sustav ustrojeno od strane Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *WHO Committee for Factors of the HLA System*) u primjeni je od 2010. godine (13). Nakon oznake genskog lokusa znak \* razdvaja gen od alela. Naziv svakog pojedinog alela odlikuje se jedinstvenim brojem koji se sastoji od najmanje 2 polja te najviše 4 polja brojeva odijeljenih dvotočkom. Naziv započinje oznakom gena kojeg znak \* razdvaja od prvog polja (2 broja) koji označava skupinu alela. U najvećem broju slučajeva prvo polje odgovara određenoj serološkoj specifičnosti. Sljedeća polja sastoje se od brojeva koji opisuju specifičnosti podtipova gena. Drugo polje opisuje specifičan alel. Na trećem polju se prikazuju istoznačne mutacije u kodirajućoj regiji. Četvrto polje prikazuje razlike izvan kodirajuće regije. Neki aleli u nazivu imaju sufiks koji označava status ekspresije dotičnog alela (Slika 3.) (13).



**Slika 3.** Nazivlje sustava HLA. Prilagođeno prema (12).

### 1.1.5. Uloga HLA u imunološkoj reakciji i povezanost s bolestima

Molekule HLA združuju se s peptidima za vrijeme svoje biosinteze i sklapanja unutar stanice. Tako stvaraju stabilne komplekse (HLA molekula/peptid-antigen) s fragmentima peptida stranih antigena te ih predaju na površini stanice kako bi ih limfociti T prepoznali svojim T-staničnim receptorom (eng. *T cell receptor*, *TCR*). Jednim dijelom svoga TCR receptora prepoznaju vlastitu HLA molekulu, a drugim dijelom izloženi antigeni peptid u kompleksu s vlastitom HLA molekulom. Prema tome, HLA geni i molekule osim u prezentaciji peptida, reguliraju imunološku reaktivnost jedinice jer su istovremeno i integralne komponente liganada koje prepoznaju T limfociti. Ova jedinstvena osobina T-limfocita biološki je veoma važna, omogućuje precizno usmjeravanje aktiviranih T-limfocita na mjesto gdje se prepoznavanje odigralo. Zahvaljujući HLA molekulama T-limfociti selektivno ostavljaju neinficirane stanice nepovrijeđenima. Ukoliko limfocit T ne prepozna kompleks HLA/strani antigen, ne može se dogoditi specifična imunoreakcija (3).

Jedan T-limfocit može reagirati s većim brojem različitih peptida, odnosno isti T-limfocitni receptor može križno reagirati sa različitim peptid-HLA kompleksima, sve dok ti kompleksi imaju sličan raspored naboja aminokiselinskih ostataka unutar peptid-vezujućeg žlijeba. Ova fleksibilnost T-limfocitnog receptora u prepoznavanju peptida smatra se presudnom za mnoge

imunološke procese, uključujući selekciju u timusu i sposobnost T-limfocitnog receptora da prepozna gotovo sve peptide koji su porijeklom od različitih patogena. Jedan od nepoželjnih efekata ovakve fleksibilnosti je i potencijal za indukciju autoimunih reakcija preko mikrobnih antigena. Tolerancija na vlastito je svojstvo limfocita, te veliki broj vlastitih peptida u kompleksu s HLA molekulama normalno ne potiče imuni odgovor. Vežanje peptida za HLA molekulu nije specifično, ona ne pravi razliku između vlastitih i stranih peptida. Prezentiranjem antigena, molekule HLA imaju centralnu ulogu u kontroliranju imunološkog prepoznavanja i razlikovanja vlastitog od stranog, te stoga i u odbacivanju transplantiranog tkiva (grafta), autoimunim reakcijama i imunim reakcijama na patogene (4).

Imunoreaktivnost protiv vlastitih antigena i selektivno vežanje i prepoznavanje autoantigena ovisi o ekspresiji HLA i TCR gena. Brojna istraživanja tijekom nekoliko desetljeća ukazuju na primarnu ulogu HLA razreda I i/ili razreda II u povezanosti s određenim autoimunim bolestima (38). Većina autoimunih bolesti posljedica su kompleksne interakcije produkata suscetibilnih i protektivnih gena HLA (56). Mehanizam ekspresije autoimunih bolesti je složen. Osim međusobnih interakcija produkata gena HLA i drugih gena izvan HLA regije, na ekspresiju bolesti također utječe interakcija između gena i okolišnih uvjeta, te epigenetički mehanizmi regulacije genske aktivnosti (38, 57).

.

## 1.2. Uveitis

### 1.2.1. Definicija i klasifikacija uveitisa

Srednja očna ovojnica (lat. *uvea*) gusto je vaskularizirani, pigmentirani dio oka. Sastoji se od šarenice (lat. *iris*), zrakastoga tijela (lat. *corpus ciliare*) te žilnice (lat. *chorioidea*). Upale srednje očne ovojnice, uveitisi, skupina su upalnih bolesti lokaliziranih primarno u uvealnom traktu, a često zahvaćaju i ostale dijelove oka ugrožavajući njegovu funkciju.

Prema lokalizaciji i specifičnostima upalnog procesa uveitise dijelimo na:

- Prednji uveitis (lat. *uveitis anterior*) - upalu lokaliziranu na šarenici (lat. *iritis*) ili prednjem dijelu cilijarnoga tijela (lat. *cyclitis*), odnosno iridocyclitis kod zahvaćena oba dijela prednje uveje radi anatomske blizine

- Intermedijarni uveitis (lat. *uveitis intermedialis*) - upala lokalizirana na ravnom dijelu (lat. *pars plana*) cilijarnoga tijela u staklovini te zahvaća i periferne krvne žile mrežnice (lat. *vasculitis*)
- Stražnji uveitis (lat. *uveitis posterior, chorioiditis*) – upala zahvaća žilnicu, radi bliskog kontakta, često i mrežnicu (lat. *chorioretinitis*). Ukoliko upala zahvaća mrežnicu i vidni živac, govorimo o neuroretinitisu.

Panuveitis je naziv za upalu kojom su zahvaćeni svi dijelovi srednje očne ovojnice.

Bolest koja se pojavljuje naglo, s izraženim simptomima i ograničenoga trajanja do 3 mjeseca nazivamo akutni uveitis. Periodičnu pojavu bolesti s razdobljima remisije bez terapije dulje od 3 mjeseca nazivamo rekurentni uveitis. Trajni uveitis uz relapse u periodu kraćem od 3 mjeseca nakon prekida terapije kronični je uveitis. Simptomi će ovisiti o vrsti uveitisa. Glavni simptomi anteriornog uveitisa uključuju bol, crvenilo, osjetljivost na svjetlost i zamućenje vida, dok su simptomi srednjeg i stražnjeg uveitisa bezbolne crne točke ili linije (floaters) i oštećenje vida.

Upala uzrokovana uveitisom može izravno oštetiti vid, bilo privremeno ili stalno. Upala unutar oka u uveitisu može potencijalno dovesti do raznih drugih problema u oku, kao što su glaukom i katarakta (14).

Uveitis nije jedna bolest, često je povezan s nizom sistemskih poremećaja, infekcija i okularnih sindroma. Bolest se pojavljuje utjecajem mnogih čimbenika, uključujući genetičke, geografske i okolišne. U Standardizaciji nomenklature uveitisa (SUN) identificirano je 27 različitih fenotipova uveitisa (60). Postoje različiti referalni obrasci i dijagnostički kriteriji za poremećaje povezane s uveitisom. Izuzetno važne studije svih vrsta, uzroka i distribucije uveitisa pomažu kliničaru fokusirati pristup liječenju (14, 15).

### 1.2.2. Etiologija i patofiziologija uveitisa

Srednju očnu ovojnicu karakterizira nedostatak limfatičnoga sustava, krvno-tkivna barijera vaskularija mrežnice i šarenice te barijera epitela cilijarnoga tijela i mrežničnoga pigmentnog epitela. Takva hemato-okularna barijera blokira prolazak stanica i makromolekula iz intravaskularnoga u intraokularni dio. Time štiti mrežnicu, dok veći dio srednje očne ovojnice, radi fenestracije njezinih kapilara, nije zaštićen. Srednja očna ovojnica sadržava brojne makrofage i dendritičke stanice koje sa stanicama retinalnoga pigmentnog epitela i vaskularnog endotela mrežnice aktivno sudjeluju u imunskim procesima stvarajući inicijatore i posrednike

upalne reakcije. Imunosni odgovor smanjuju mrežnične Müllerove stanice, dok prednja očna sobica (prednji dio intraokularnoga odjeljka) ima mogućnost supresije imunskog procesa i tolerancije stranih antigena. U uveitisu, proboj hemato-okularne barijere omogućuje makromolekulama i stanicama prolazak u mrežnicu i intraokularni dio. Osnova uveitisa je imunski odgovor oka na različite antigene. Antigeni mogu biti vanjski (infekcijski, neinfekcijski), te unutarnji (vlastiti, tumorski, degenerativno tkivo i dr.) (15, 16).

### **1.2.3. Epidemiologija uveitisa**

Uveitis kao najčešći oblik očnih upalnih bolesti, vodeći je uzrok ozbiljnog poremećaja vida te izaziva 10 – 25 % slučajeva sljepoće u svijetu (17, 58, 59).

Akutni anteriorni uveitis (AAU) najčešći je oblik uveitisa, oko 60 % svih slučajeva uveitisa. U usporednom pregledu tipova uveitisa širom svijeta, prednji je uveitis bio najčešće zastupljen u Australiji (76 % slučajeva), SAD-u (52 - 91 % ukupnih slučajeva) i Europi (49 - 92 % ukupnih slučajeva). Prednji uveitis utječe na značajan udio mladih radno sposobnih odraslih stanovnika i stoga uzrokuje teške osobne i populacijske troškove. U australskim, američkim i europskim studijama drugi najčešći tip bio je stražnji uveitis (5 - 26 % ukupnih slučajeva) (17, 59).

### **1.2.4. Dijagnostika i liječenje uveitisa**

Opservacija se temelji i usmjerava prema kliničkom nalazu inflamiranog oka, stanju organizma, te iscrpnim anamnestičkim podacima. Laboratorijskim pretragama treba utvrditi funkciju vitalnih organa (CKS, funkciju jetre i bubrega), učiniti rendgenski snimak pluća, pretrage na tuberkulozu, seološke pretrage na lues, boreliju burgdorferi, toksoplazmozu, herpes viruse, HIV-viruse uz antinuklearna protutijela (ANA) i antineutrofilna citoplazmatska protutijela (ANCA) te HLA tipizaciju (16). Oftalmološke dijagnostičke metode poput fluoresceinske angiografije, indocyanin green angiografije, fundusne autofluorescencije, UZV, perimetrije, elektroretinografije i evocirani potencijali daju podatke o etiopatogenezi lokalizacije i komplikacijama u uveitisu. Liječenje se usmjerava na očuvanje vidne funkcije, smanjenje simptoma i liječenje eventualne sustavne bolesti. Posljednjih godina razvila se biološka terapija u obliku monoklonskih protutijela usmjerenih protiv upalnih molekula kao što su IL-2 i TNF- $\alpha$ . Za bolesti jasne infekcijske etiologije rabe se antibiotici, antiparazitici,



antifungici, te antivirusni lijekovi. Kirurško liječenje je potrebno kod komplikacija kao što su katarakta, zamućenje staklovine, ablacija mrežnice (14, 15) (Slika 4.).



**Slika 4.** Prikaz uveitisa oftalmološki i histološki. Preuzeto i prilagođeno s dopuštenjem autora (55).

### 1.3. Povezanost sustava HLA s uveitisom

Poznata je uloga HLA u prezentaciji antigena, uspostavljanju i održavanju imuno tolerancije. Unatoč tome što mikrobiološki patogeni mogu imati izravnu ulogu, uveitis je vjerojatno u mnogim slučajevima povezan s HLA i barem djelomično posljedica autoimunog procesa koji proizlazi iz gubitka tolerancije na vlastite antigene. Ljudske uvealne stanice, izuzev vaskularnoga endotela, ne izražavaju molekule HLA razreda I. Retinalne pigmentne stanice epitela normalno ne izražavaju molekule HLA razreda II.

Prema teoriji “molekularne mimikrije“ bakterijski antigeni na površini mukoze u kontekstu upalnoga procesa mogu dovesti do imunog odgovora na slične okularne antigene. Molekule HLA tijekom interakcije s NK receptorima, cirkuliraju u serumu u tekućoj formi, te mogu biti uvučene kroz staničnu membranu i zatim prezentirane kao antigeni. Važno je imati na umu da HLA tip/haplotip nije dovoljan niti neophodan za razvoj bolesti (18).

U proteklih 30-ak godina brojna istraživanja prikazala su povezanost HLA s očnim upalnim bolestima. Nađena je povezanost HLA-B\*27 s AAU-om (18, 19, 20, 21, 22). Također je poznata i jaka pozitivna povezanost HLA-B\*27 s ankilozantnim spondilitisom (23), Reiterovim sindromom (24), upalnom bolesti crijeva (25, 26) i psorijatičnim artritisom (27). Studije ukazuju na to da značajan broj oboljelih od AAU-a obolijeva i od seronegativnog spondiloartritisa (16, 18). Nadalje HLA-A\*29 je prisutan u čak 95 % pacijenata s Birdshot retinochoroidopatijom (BCR), očnom bolesti autoimmune etiologije (28, 29). Najčešće prednji uveitis, rjeđe intermedijarni i stražnji, može biti prva manifestacija Behçetove bolesti (BD) koja se povezuje s HLA- B\*51 i HLA-B\*52 (16, 30, 31, 32). Literaturni podatci ukazuju na snažnu povezanost Voght-Koyanagi-Harada (VKH) s HLA-DRB1\*01 (33, 34).

Kod oboljelih od tubulointersticijskog nefritisa s uveitisom (TINU) zabilježena je povezanost s HLA-DQA1\*01, HLA-DQB1\*05 (35) i HLA-DRB1\*01 (19).

Simpatička oftalmija povezana je s haplotipom HLA DRB1\*04-DQA1\*03 (36).

Pars planitis pokazuje povezanost s HLA-DR2, -DR15, HLA-DR51 i HLA-DR17 (37).

Uveitis se pojavljuje u juvenilnom idiopatskom artritisu zastupljenošću 10-20 %, a prema nekim autorima i do 40 %. Studije su pokazale povezanost kroničnog prednjeg uveitisa i JIA kod djece s pozitivnim nalazom HLA-DRB1\*11:04, dok djeca pozitivna na HLA-B\*27 razvijaju akutni prednji uveitis (16).

## 2. Ciljevi

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Odrediti učestalost gena HLA razreda I (HLA-A, HLA-B) i razreda II (HLA-DRB1, HLA-DQB1) u skupini oboljelih od uveitisa u populaciji istočne Hrvatske
2. Rezultate usporediti s ranije objavljenim podacima za kontrolnu zdravu populaciju Hrvatske.

### 3. Ispitanici i metode

#### 3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao retrospektivna studija (39).

#### 3.2. Ispitanici

Skupina ispitanika sastoji se od 38 pacijenata (18 ženskih, 20 muških) s područja istočne Hrvatske koji su imali uputnu dijagnozu uveitisa. Ispitanicima je molekularna tipizacija HLA razreda I i II učinjena od 2007. do 2017. godine u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek. Svim ispitanicima uzeto je 5 mL pune krvi u epruvetu s EDTA antikoagulansom. Pacijenti nisu aktivno sudjelovali u istraživanju. Istraživanje je provedeno od siječnja do srpnja 2018. godine. Korišteni podatci prikupljeni su iz računalne baze podataka laboratorija za molekularnu i HLA dijagnostiku KBC-a Osijek. Studiju je odobrilo etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek. Kontrolnu skupinu predstavljali su ranije objavljeni rezultati molekularne tipizacije HLA 4000 dobrovoljnih nesrodnih davatelja koštane srži iz hrvatske populacije (40) i 141 zdravih nesrodnih osoba opće populacije Hrvatske (41).

#### 3.3. Metode

##### 3.3.1. Izolacija DNA

Genomska DNA izolirana je iz 200 mL uzorka pune krvi bolesnika. Za izolaciju DNA korišten je komercijalni set *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača. Ukratko, stanice iz krvi liziraju se kratkom inkubacijom s puferom za razgradnju i proteinazom K u prisutnosti kaotropne soli (gvanin-HCl) koja inaktivira nukleaze. Molekule DNA oslobođene iz jezgre vežu se na staklenu mrežicu u kolonici gdje se nizom koraka ispiranja i centrifugiranja pročišćavaju. ([https://www.lifescience.roche.com/global\\_en/brands/magnapu10re.html#overview](https://www.lifescience.roche.com/global_en/brands/magnapu10re.html#overview)) (42).

Za optimalnu vizualizaciju umožjenih produkata PCR-a dobivenih metodom PCR-SSP (engl. Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers) potrebna koncentracija izolirane

DNA je 30 ng/ $\mu$ L, dok bi omjer apsorbancija A260/A280 trebao biti 1,6 - 2,0. Koncentracija uzoraka DNA i njihova čistoća određeni su pomoću UV/VIS nano-spektrofotometra. Pri mjerenju je kao slijepa proba (blank) korišten pufer u kojem su uzorci DNA otopljeni (eluacijski pufer iz komercijalnog seta za izolaciju DNA). Nakon mjerenja, u svakom se uzorku koncentracija DNA prilagodi na 30 ng/ $\mu$ L te se uzorak skladišti na -20°C do postupka tipizacije HLA.

#### 3.3.2. Tipizacija gena HLA-A, -B, -DRB1 i -DQB1 metodom PCR-SSP

Za tipizaciju gena HLA-A, -B, -DRB1 i -DQB1 korišteni su komercijalni setovi Olerup SSP HLA-A low resolution screening, Olerup SSP HLA-B low resolution screening i Olerup SSP DQ-DR Combi Tray prema uputama proizvođača (Olerup, Stockholm, Švedska) (<https://www.olerup-ssp.com>) (43). Korišteni setovi niskog su razlučivanja te omogućuju tipizaciju na razini gena. Za metodu su karakteristične oligonukleotidne početnice čiji je slijed baza komplementaran određenoj skupini alela HLA. Set za tipizaciju za svaki pojedini lokus HLA sastoji se od određenog broja reakcija. U svakoj se PCR reakciji testira prisutnost specifične skupine alela HLA. Svaka PCR reakcija sadrži:

- a) Par početnica veličine 15 - 25 pb čiji su 3' krajevi komplementarni specifičnoj skupini alela
- b) Kontrolni par početnica za kontrolu valjanosti PCR reakcije.
- c) Smjesa deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- d) Taq DNA polimeraza (5 u/ $\mu$ L), termostabilan enzim iz bakterije *Thermus aquaticus*, aktivan na temperaturi od oko 90° C
- e) Pufer u kojemu se odvija reakcija (pH 8,3) sastoji se od odgovarajuće koncentracije KCl, Tris-HCl i MgCl<sub>2</sub>
- f) Genomska DNA ispitanika koncentracije 30  $\mu$ g/mL.

PCR-SSP set za tipizaciju lokusa HLA-A sastoji se od 24 reakcije (reakcijske tubice), HLA-B od 48 reakcija, a za tipizaciju lokusa HLA-DRB1 i -DQB1 korišten je kombi-set od 46 reakcijskih tubica.

**Tablica 1.** Volumeni sastojaka potrebnih za pripremu reakcijske smjese za tipizaciju PCR-SSP metodom

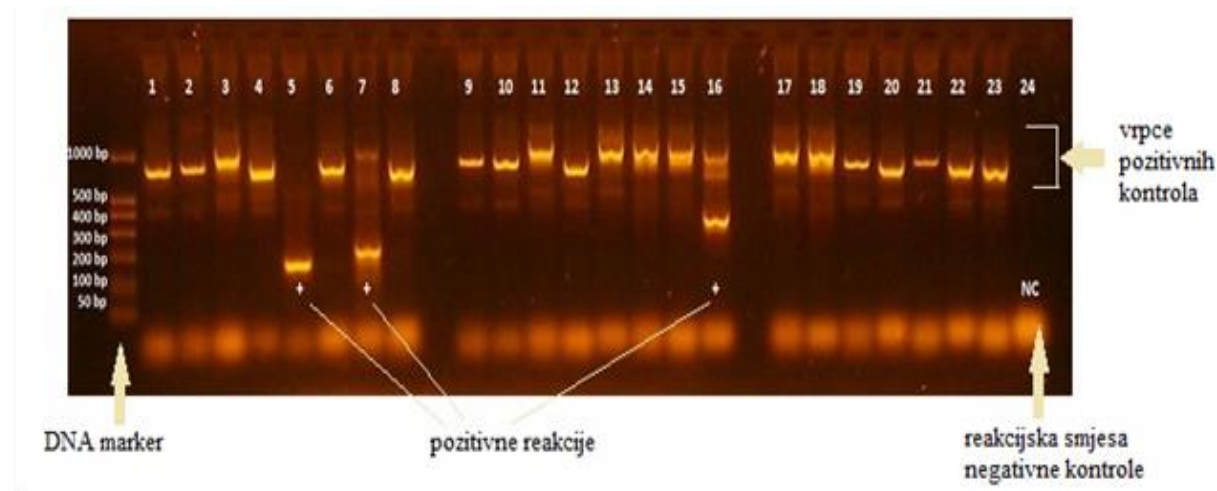
PCR-SSP Olerup set	H <sub>2</sub> O (PCR čistoće, µL)	PCR pufer (µL)	Taq DNA polimeraza (µL)	DNA (µL)
HLA-A	132,8	81	2,2	54
HLA-B	265,7	162	4,3	108
HLA-DQDR	177,1	108	2,9	72

Slijedom uputa proizvođača izvodi se tipizacija lokusa HLA-A, -B, -DRB1 i -DQB1. Odgovarajući volumen (Tablica 1.) PCR pufera, destilirane vode i Taq DNA polimeraze otpipetira se u tubicu volumena 2 mL (nekorištenu, slobodnu od nukleinskih kiselina i nukleaza). Iz nje se u reakcijsku tubicu negativne kontrole (za svaki PCR-SSP tipizacijski set) otpipetira po 10 µL reakcijske smjese. Nakon toga, u tubicu s reakcijskom smjesom dodaje se odgovarajući volumen genomske DNA (Tablica 1.). Zatim se po 10 µL reakcijske smjese otpipetira u svaku reakcijsku tubicu, osim u negativnu kontrolu. Unaprijed pripremljenom adhezivnom folijom prekriju se reakcijske tubice. PCR reakcija odvija se u uređaju za umnažanje DNA u odgovarajućim uvjetima (Tablica 2.).

**Tablica 2.** Program za umnažanje odsječaka gena HLA metodom Olerup HLA-SSP

korak	broj ciklusa	temperatura	vrijeme
1.	1	94 °C	2 min
2.	10	94 °C	10 s
		65 °C	60 s
3.	20	94 °C	10 s
		61 °C	50 s
		72 °C	30 s
4.	kraj	RT ili 4 °C	< 8 h > 8 h

Umnoženi produkti PCR-a razdvojeni su metodom agarozne gel elektroforeze. Za pripremu agaroznoga gela (2 %) izvagano je 2,64 g agaroze u okruglu staklenu tikvicu i pomiješano s 132 mL pufera 1 x TAE. Smjesa je zagrijana do vrenja i potpunoga otapanja agaroze (4 min) u mikrovalnoj pećnici do približno 60 °C. Ohlađenoj, tekućoj agarozni dodano je 80 µL GelRed boje (Olerup, Stockholm, Švedska), a smjesa je zatim izlivena u pripremljeni kalup s češljevima za jažice. Nakon 30 minuta na sobnoj temperaturi agarozni gel je polimeriziran, češljevi su izvađeni i gel je uronjen u kadnicu za elektroforezu napunjenu puferom 1 x TAE. Iz svake reakcijske tubice, nakon postupka PCR-a, otpipetirano je po 10 µL reakcijske smjese u jažice gela, pazeći pri tome na redosljed stavljanja uzoraka u jažice. Za određivanje veličine umnoženih fragmenata gena HLA u prvu jažicu svakoga reda stavljen je DNA marker koji sadrži fragmente DNA poznatih veličina (50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 pb). Nakon razdvajanja elektroforezom, vizualizacija umnoženih fragmenata DNA učinjena je pomoću boje GelRed, koja pod djelovanjem UV svjetla fluorescira, ako je vezana na fragmente DNA (Slika 5.). Svaki gel je fotografiran, a svaka je fotografija obilježena, analizirana u programu Helmerg-SCORE™ 5 te arhivirana.



**Slika 5.** Fotografija gela agarozne gel elektroforeze molekularne tipizacije lokusa HLA-A pomoću Olerup SSP komercijalnog seta

### 3.4. Statistička obrada podataka

Učestalost genskih varijanti lokusa HLA-A, -B, -DRB1 i -DQB1 određena je direktnim brojanjem. Ako je uzorak na testiranom lokusu imao jednu HLA gensku varijantu, smatran je homozigotom za taj gen. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software verzija 18.5 (<https://www.medcalc.org/>). Razlike u frekvenciji genskih varijanti ispitane su uporabom Fischer Exact test za p. Usporedba raspodjele genskih varijanti između skupine ispitanika i kontrolne skupine opisana je omjerom izgleda (OR, engl. odds ratio) i 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (95 % CI, engl. confidence interval). Statistički značajna razlika između učestalosti genskih varijanti u oboljelih i u kontrolnoj skupini smatrana je ona kod koje je  $p < 0,05$ . Sve p vrijednosti su dvostrane.



## 4. Rezultati

Metodom molekularne tipizacije HLA analizirano je 38 ispitanika s uputnom dijagnozom uveitisa. Ispitivana skupina sastojala se od 20 muškaraca (52,63 %) i 18 žena (47,37 %). Prosječna dob ispitanika (mean  $\pm$  SD) pri uzorkovanju prikazana je u Tablici 3. Uočava se podjednaka zastupljenost bolesti u oba spola, te su ispitanici obaju spolova mlađe do srednje životne dobi.

**Tablica 3.** Ispitanici po spolu i dobi

ispitanici (n)	38	
spol, n (%)	M	Ž
	20 (52,63)	18 (47,37)
Dob (godine) mean $\pm$ SD	39,1 $\pm$ 14,6	39,1 $\pm$ 17,6
	39,1 $\pm$ 15,6	

### 4.1. Raspodjela gena HLA-A

Raspodjela gena HLA-A u ispitivanoj skupini oboljelih od uveitisa i kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 4. U skupini ispitanika utvrđena je prisutnost 11 različitih genskih varijanti HLA-A među kojima su najučestaliji geni HLA-A\*02 (33,78 %), HLA-A\*03 (14,86 %), HLA-A\*01 (12,16 %) i HLA-A\*24 (10,81 %). Povećana učestalost u ispitivanoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu uočava se za gene HLA-A\*29 (OR 1,48), HLA-A\*11 (OR 1,41), HLA-A\*32 (OR 1,39), HLA-A\*25 (OR 1,3), HLA-A\*03 (OR 1,23) i HLA-A\*02 (OR 1,18). Razlika u učestalosti navedenih gena HLA-A nije bila statistički značajna. Gen HLA-A\*68 je statistički značajno ( $p = 0,049$ ) učestaliji u kontrolnoj skupini (OR 0,14), s učestalošću 4,61 % u odnosu na 0,00 % u skupini oboljelih od uveitisa.

**Tablica 4.** Usporedba učestalosti genskih varijanti HLA-A u skupini ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu

HLA-A	učestalost u skupini ispitanika (%)	učestalost u kontrolnoj skupini (%) <sup>#</sup>	<i>p</i>	OR	CI (95%)
*01	12,16	12,46	1,000	0,97	0,48-1,96
*02	33,78	31,32	0,526	1,18	0,72-1,19
*03	14,86	12,42	0,481	1,23	0,65-2,34
*11	9,46	6,91	0,356	1,41	0,64-3,08
*23	2,70	2,50	0,708	1,08	0,26-4,45
*24	10,81	11,39	1,000	0,94	0,45-1,97
*25	4,05	3,14	0,506	1,30	0,41-4,17
*26	4,05	4,81	1,000	0,84	0,26-2,67
*29	1,35	0,91	1,000	1,49	0,20-10,85
*30	1,35	1,71	1,000	0,79	0,11-5,69
*31	0,00	2,31	0,419	0,29	0,02-4,58
*32	5,41	3,93	0,538	1,39	0,51-3,86
*33	0,00	2,05	0,407	0,32	0,02-5,18
*34	0,00	0,04	1,000	0,00	0,00-264,11
*36	0,00	0,01	1,000	0,00	0,00-4216,22
*66	0,00	0,39	1,000	0,00	0,00-13,93
*68	0,00	4,61	<b>0,049</b>	0,14	0,01-2,24
*69	0,00	0,09	1,000	0,00	0,00-76,23
*74	0,00	0,01	1,000	0,00	0,00-4216,22
*80	0,00	0,07	1,000	0,00	0,00-93,22

<sup>#</sup> Kontrolna skupina (40).

## 4.2. Raspodjela gena HLA-B

Učestalost gena HLA-B u ispitivanoj skupini i u kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 5. U skupini ispitanika utvrđeno je 16 gena HLA-B lokusa. U ispitivanoj skupini oboljelih od uveitisa najučestalije varijante gena HLA-B su HLA-B\*44 (15,79 %), HLA-B\*27 (11,84 %), HLA-B\*35 (11,84 %), HLA-B\*51 (11,84 %) i HLA-B\*08 (9,21 %). Veća učestalost u odnosu na kontrolnu skupinu može se uočiti za gene HLA-B\*52 (OR 2,77), HLA-B\*50 (OR 2,75), HLA-B\*27 (2,03), HLA-B\*44 (OR 1,83), HLA-B\*57 (OR 1,50), HLA-B\*56 (OR 1,34) i HLA-B\*08 (OR 1,21). Razlike u frekvenciji između skupina nisu statistički značajne, no vrlo je blizu statističke značajnosti razlika za HLA-B\*27 ( $p = 0,054$ ) i HLA-B\*44 ( $p = 0,071$ ).

**Tablica 5.** Usporedba učestalosti genskih varijanti HLA-B u skupini ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu

HLA-B	učestalost u skupini ispitanika (%)	učestalost u kontrolnoj skupini (%) <sup>#</sup>	<i>p</i>	OR	CI (95 %)
*07	5,26	7,09	0,820	0,73	0,26-1,99
*08	9,21	7,78	0,664	1,21	0,55-2,63
*13	0,00	3,77	0,119	0,17	0,01-2,69
*14	1,32	2,47	1,000	0,53	0,07-3,80
*15	3,95	4,81	1,000	0,81	0,26-2,59
*18	7,89	8,18	1,000	0,95	0,41-2,19
*27	11,84	6,21	<b>0,054</b>	2,03	1,00-4,09
*35	11,84	13,91	0,739	0,83	0,41-1,67
*37	0,00	0,94	1,000	0,69	0,04-11,18
*38	2,63	4,39	0,774	0,59	0,14-2,41
*39	2,63	3,09	1,000	0,85	0,21-3,46

**Tablica 5.** Usporedba učestalosti genskih varijanti HLA-B u skupini ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu - (nastavak)

HLA-B	učestalost u skupini ispitanika (%)	učestalost u kontrolnoj skupini (%) #	<i>p</i>	OR	CI (95 %)
*40	2,63	3,77	1,000	0,69	0,17-2,83
*44	15,79	9,3	<b>0,071</b>	1,83	0,98-3,41
*45	0,00	0,19	1,000	0,00	0,00-29,94
*47	0,00	0,14	1,000	0,00	0,00-42,75
*48	0,00	0,14	1,000	0,00	0,00-42,75
*49	0,00	1,93	0,406	0,33	0,02-5,39
*50	3,95	1,47	0,105	2,75	0,85-8,84
*51	11,84	11,36	0,856	1,05	0,52-2,11
*52	3,95	1,46	0,103	2,77	0,86-8,92
*53	0,00	0,68	1,000	0,95	0,06-15,59
*54	0,00	0,03	1,000	0,00	0,00-564,27
*55	0,00	1,25	1,000	0,52	0,03-8,36
*56	1,32	0,99	0,532	1,34	0,18-9,75
*57	3,95	2,66	0,458	1,50	0,47-4,81
*58	0,00	1,05	1,000	0,61	0,04-9,97
*73	0,00	0,09	1,000	0,00	0,00-74,28

# Kontrolna skupina (40).

### 4.3. Raspodjela gena HLA-DRB1

U Tablici 6. prikazana je raspodjela gena HLA-DRB1 u skupini oboljelih od uveitisa i u kontrolnoj skupini. Kod oboljelih ispitanika je na lokusu HLA-DRB1 nađeno 10 genskih varijanti.

U skupini ispitanika najučestaliji su geni HLA-DRB1\*11 (18,42 %), HLA-DRB1\*16 (15,79 %), HLA-DRB1\*15 (14,47 %) i HLA-DRB1\*03 (10,53 %). S većom su učestalošću u oboljelih prisutni HLA-DRB1\*16 (OR 1,58), HLA-DRB1\*15 (OR 1,50) i HLA-DRB1\*11 (OR 1,11). Razlike učestalosti gena HLA-DRB1 između ispitivane i kontrolne skupine nisu statistički značajne.

**Tablica 6.** Usporedba učestalosti genskih varijanti HLA-DRB1 u skupini ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu

HLA-DRB1	učestalost u skupini ispitanika (%)	učestalost u kontrolnoj skupini (%) #	<i>p</i>	OR	CI (95 %)
*01	9,21	11,30	1,000	0,91	0,42-1,98
*03	10,53	10,10	0,849	1,04	0,49-2,18
*04	7,89	9,58	0,700	0,79	0,34-1,83
*07	6,58	9,78	0,439	0,64	0,26-1,59
*08	0,00	3,43	1,000	0,75	0,18-3,08
*09	0,00	0,26	1,000	0,00	0,00-20,32
*10	0,00	1,04	1,000	0,61	0,04-9,94
*11	18,42	16,68	0,758	1,11	0,62-1,99
*12	1,32	1,54	1,000	0,84	0,12-6,10
*13	9,21	12,05	0,595	0,73	0,33-1,59
*14	3,95	3,88	1,000	1,00	0,32-3,19
*15	14,47	10,02	0,249	1,50	0,79-2,85
*16	15,79	10,43	0,137	1,58	0,85-2,95

# Kontrolna skupina (40).

#### 4.4. Raspodjela gena HLA-DQB1

Raspodjela gena HLA-DQB1 (Tablica 7.) pokazuje da su u skupini oboljelih ispitanika najučestalije genske varijante HLA-DQB1\*05 (30,26 %), HLA-DQB1\*03 (DQ7) (23,68 %) i HLA-DQB1\*06 (22,37 %). U odnosu na kontrolnu skupinu, gen za HLA-DQB1\*03(DQ9) (OR 3,22) češće je prisutan u oboljelih ispitanika. Razlike učestalosti gena HLA-DQB1 između ispitivane i kontrolne skupine nisu statistički značajne.

**Tablica 7.** Usporedba učestalosti genskih varijanti HLA-DQB1 u skupini ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu

HLA-DQB1	učestalost u skupini ispitanika (%)	učestalost u kontrolnoj skupini (%) <sup>#</sup>	<i>p</i>	OR	CI (95 %)
*05	30,26	28,14	0,771	1,11	0,63-1,95
*06	22,37	20,57	0,748	1,11	0,59-2,08
*02	13,16	13,44	1,000	0,98	0,46-2,09
*03 (DQ7)	23,68	23,53	1,000	1,01	0,55-1,85
*03 (DQ8)	5,26	3,78	0,523	1,41	0,42-4,73
*03 (DQ9)	3,95	1,26	0,155	3,22	0,64-16,29
*04	1,32	1,68	1,000	0,78	0,09-7,09

<sup>#</sup> Kontrolna skupina (41).

## 5. Rasprava

Uveitis je uzrok ozbiljnih poremećaja vida i izaziva 10 – 25 % slučajeva sljepoće u svijetu. Često je uveitis povezan s nizom sistemskih poremećaja, okularnih sindroma i infekcija. Razvojem dijagnostičkih molekularnih metoda otkrivene su povezanosti HLA gena s razvojem bolesti (17, 18).

U ovom istraživanju analizirani su rezultati molekularne tipizacije gena HLA razreda I i II učinjene od 2007. do 2017. godine za skupinu od 38 pacijenata oboljelih od uveitisa. Ispitanici su iz širokog područja istočne Hrvatske upućeni ambulantno, kao i bolesnici hospitalizirani u Kliničkom bolničkom centru Osijek. Ispitanici su upućeni na molekularnu tipizaciju gena HLA s dijagnozom uveitisa bez dodatnih anamnestičkih naputaka o udruženosti s drugim sistemskim odnosno autoimunim procesima. Rezultati istraživanja uspoređeni su s rezultatima molekularne tipizacije zdravih nesrodnih osoba iz hrvatske populacije (40, 41).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju povećanu učestalost HLA-A\*29 u oboljelih u odnosu na kontrolnu skupinu (OR 1,49). Iako razlika u ovom istraživanju nije statistički značajna rezultat možemo usporediti sa studijama koje su pokazale snažnu pozitivnu povezanost HLA-A\*29 sa Birdshot korioretinopatijom (28, 29)..

Povećana učestalost u skupini oboljelih u odnosu na zdrave, kontrolne ispitanike, bez statističke značajnosti, uočena je za gene HLA-A\*02 (OR 1,18), -A\*03 (OR 1,23), -A\*11 (OR 1,41), -A\*25 (OR 1,30), -A\*32 (OR 1,39). Pozitivna povezanost tih genskih varijanti HLA-A lokusa s manifestacijama uveitisa zabilježena je u kliničkim istraživanjima u Kini, Japanu i Španjolskoj (30, 44, 45).

Gen HLA-A\*68 statistički je značajno učestaliji u kontrolnoj skupini  $p = 0,049$  OR 0,14), dok u skupini oboljelih ispitanika nije prisutan, te mu stoga možemo pripisati moguću zaštitnu ulogu.

Analizirajući raspodjelu varijanti gena HLA-B, u ispitivanoj skupini pacijenata i kontrolnih ispitanika, statistički značajna razlika u frekvenciji pojedinih genskih varijanti nije zabilježena. Ipak, u skupini oboljelih, zabilježena je veća pojavnost gena HLA-B\*27 i HLA-B\*44 u odnosu na zdrave ispitanike, a utvrđena razlika nalazi se na granici statističke značajnosti. Gen HLA-B\*27 ( $p = 0,054$ ; OR 2,03) pokazao se kao potencijalni rizičan čimbenik za obolijevanje od uveitisa u populaciji istočne Hrvatske. Provedeno istraživanje je u skladu sa studijama koje predstavljaju Chang J. H. i suradnici (21) i Pthanapitoon i suradnici (22). Nekoliko

asocijacijskih studija navodi prisutnost HLA-B\*27 u oko 40 % oboljelih od prednjeg uveitisa (15, 20, 21, 22, 23, 58, 59), dok je u našoj skupini oboljelih zastupljenost HLA-B\*27 samo 11,84 %. Ta razlika može biti posljedica heterogenosti skupine ispitanika koja osim oboljelih od prednjeg uveitisa sadrži i oboljele od drugih tipova uveitisa.

Trend povećane učestalosti gena HLA-B\*44 u oboljelih od uveitisa, također je primjećen i u našoj populaciji. ( $p = 0,071$ ; OR 1,83). U literaturi je opisana neravnoteža zajedničkog udruživanja gena HLA-B\*44 i HLA-A\*29, što je i moguće objašnjenje povezanosti HLA-B\*44 s uveitisom, ali i drugim sistemskim i autoimunim bolestima (18, 46).

Iz rezultata ovoga istraživanja možemo uočiti da mogući doprinos genetičkom riziku razvoja uveitisa imaju i genske varijante HLA-B\*52 (OR 2,77) i HLA-B\*50 (OR 2,75), a u nešto manjoj mjeri i HLA-B\*57 (OR 1,50), HLA-B\*56 (OR 1,34) i HLA-B\*08 (OR 1,21), iako razlike u njihovoj frekvenciji u odnosu na kontrolnu skupinu nisu statistički značajne. HLA-B\*57 navodi se kao rizični faktor za Behçetovu bolest u multicentričnim studijama provedenim u Španjolskoj (31, 45) i Velikoj Britaniji (32).

Analizirajući raspodjelu genskih varijanti HLA-DRB1 u skupini ispitanika opaža se veća učestalost HLA-DRB1\*11 (18,42 %;  $p = 0,758$ ; OR 1.11) u odnosu na kontrolnu skupinu (16,68 %). U velikom istraživanju na devet europskih i američkih populacija koje su proveli Ombrello i suradnici HLA-DRB1\*11 pokazao se kao predisponirajući genetički čimbenik u sklopu haplotipa DRB1\*11-DQA1\*05-DQB1\*03 (49).

Nadalje, u istraživanoj su skupini oboljelih povećanu učestalost, no bez statistički značajne razlike, pokazali HLA-DRB1\*15 (OR 1,50), i HLA-DRB1\*16 (OR 1,58) u odnosu na kontrolnu skupinu. Za HLA-DRB1\*15 i -DRB1\*16 pozitivna je povezanost s uveitisom zabilježena u talijanskim (20, 50), danskim (51) i britanskim studijama (52).

Podjednaka raspodjela gena HLA-DRB1\*03 zabilježena je u skupini oboljelih (10,53 %, OR 1,04) i u kontrolnoj skupini (10,10 %), što ne ukazuje na povezanost s pojavom bolesti. Za razliku od naših rezultata u literaturi je HLA-DRB1\*03 opisan kao potencijalno rizičan čimbenik u razvoju autoimunih bolesti, te u sklopu haplotipa A1-B8-DR3 povezan s razvojem uveitisa. (20).

Levinson i suradnici (35), navode HLA-DQB1\*05 u sastavu haplotipa HLA-DRB1\*01-DQA1\*01-DQB1\*0 kao potencijalno rizičan genetički čimbenik u razvoju TINU (engl. *Tubulointerstitial nephritis and uveitis*). U našem istraživanju nije utvrđena pozitivna



povezanost uveitisa s genom HLA-DQB1\*05 (OR 1,04). Suprotno, u odnosu na kontrolnu skupinu, u oboljelih ispitanika zabilježena je veća je učestalost genske varijante HLA-DQB1\*03(DQ9) (oboljeli vs zdravi; 3,98% vs 1,26%; OR=3,22), no bez statistički značajne razlike. Frekvencija genske varijante HLA-DQB1\*06 skoro je jednaka u skupini oboljelih (22,37 %; OR 0,96) i u kontrolnih ispitanika (22,40 %). Za razliku od našeg istraživanja koje ukazuje na neutralnu ulogu HLA-DQB1\*06 u uveitisu, Islam i suradnici (33) ističu moguću zaštitnu ulogu HLA-DQB1\*06 za pojavu Vogt-Koyanagi-Harada bolesti.

Učestalost genske varijante HLA-DQB1\*04 (1,32 %; OR 0,35) niža je u ispitivanoj skupini oboljelih u odnosu na kontrolnu, no bez statistički značajne razlike, što je u suprotnosti s nađenom jakim pozitivnom povezanosti gena HLA-DRB1\*04 s obolijevanjem od Vogt-Koyanagi-Harada bolesti (33).

Izostanak rezultata koji govori u prilog povezanosti gena HLA-DRB1\*04 i -DRB1\*06 s uveitisom u našoj populaciji, vjerojatno je rezultat etničke i geografske različitosti hrvatske i japanske populacije i relativno male skupine ispitanika u ovom istraživanju. Također, ne treba zanemariti potencijalni utjecaj drugih autoimunih bolesti koje se u komorbiditetu s uveitisom učestalo pojavljuju, a čiji je učinak, radi nedostupnih anamnestičkih podataka, ostao nepoznat u ovom istraživanju.

Poznavanje i razumijevanje povezanosti sustava HLA s rizikom razvoja uveitisa može dati bolji uvid u imunopatogenezu bolesti. Stoga, HLA tipizacija ima važnu ulogu u pravovremenom postavljanju dijagnoze, u identifikaciji kliničkih oblika bolesti, te u kreiranju novih terapijskih pristupa u liječenju uveitisa.

## 6. Zaključak

Na temelju provedene analize raspodjele gena HLA razreda I i II u skupini oboljelih od uveitisa na području istočne Hrvatske i usporedbom dobivenih rezultata s kontrolnim skupinama utvrđeno je sljedeće:

1. U skupini oboljelih od uveitisa u odnosu na kontrolnu skupinu povećana je učestalost gena HLA-A\*02, -A\*03, -A\*11, -A\*25, -A\*29, -A\*32, -B\*08, -B\*27, -B\*44, -B\*50, -B\*51, -B\*52, -B\*56, -B\*57, -DRB1\*03, -DRB1\*11, -DR1B\*15, -DRB1\*16, -DQB1\*01, -DQB1\*03(DQ7), -DQ1B\*03(DQ8) i -DQB1\*03(DQ9). Statistički značajnoj granici vrlo su blizu HLA-B\*27 i HLA-B\*44, što ukazuje na njihovu moguću pozitivnu povezanost s uveitisom u populaciji istočne Hrvatske.
2. Gen HLA-A\*68 statistički je značajno učestaliji u skupini zdravih ispitanika u odnosu na skupinu oboljelih od uveitisa, što ukazuje na moguću zaštitnu ulogu za razvoj uveitisa u populaciji istočne Hrvatske.
3. Dobiveni rezultati za gene HLA-A\*29, HLA-B\*27, HLA-B\*44 i HLA-B\*57 u skladu su s izvješćima istraživanja provedenih u europskim, bliskoistočnim, azijskim i američkim populacijama.

## 7. Sažetak

**Cilj istraživanja:** Odrediti učestalost genskih varijanti lokusa HLA razreda I (HLA-A, -B) i II (HLA-DRB1, -DQB1) oboljelih od uveitisa u populaciji istočne Hrvatske i rezultate usporediti s podacima za kontrolnu zdravu populaciju Hrvatske.

**Ispitanici i metode:** Skupina ispitanika sastojala se od 38 bolesnika (20 M, 18 Ž) s uputnom dijagnozom uveitisa kojima je molekularna tipizacija HLA učinjena u periodu od 2007. do 2017. godine metodom PCR-SSP niskog razlučivanja. Kontrolnu skupinu predstavljali su ranije objavljeni podaci molekularne tipizacije HLA zdravih nesrodnih osoba iz populacije Hrvatske.

**Rezultati:** Povećana učestalost u skupini oboljelih u odnosu na kontrolnu skupinu nađena je za gene: HLA-A\*29 (OR 1,48), -A\*11 (OR 1,41), -A\*32 (OR 1,39), -A\*25 (OR 1,3), -A\*03 (OR 1,23), -A\*02 (OR 1,18), HLA-B\*52 (OR 2,77), -B\*50 (OR 2,75), -B\*27 (2,03), -B\*44 (OR 1,83), -B\*57 (OR 1,50), -B\*56 (OR 1,34), -B\*08 (OR 1,21), HLA-DRB1\*16 (OR 1,58), -DRB1\*15 (OR 1,50), -DRB1\*11 (OR 1,11) i HLA-DQB1\*03(DQ9) (OR 3,22). Razlika u učestalosti navedenih gena HLA nije bila statistički značajna osim za HLA-B\*27 ( $p=0,054$ ) i -B\*44 ( $p=0,071$ ). Gen HLA-A\*68 bio je statistički značajno učestaliji u kontrolnoj skupini ( $p=0,049$ , OR 0,14).

**Zaključak:** Geni HLA-B\*27 i HLA-B\*44 u ovom su se istraživanju pokazali susceptibilni, a gen HLA-A\*68 zaštitni za razvoj uveitisa u populaciji istočne Hrvatske. Dobiveni rezultati za gene HLA-A\*29, HLA-B\*27, HLA-B\*44 i HLA-B\*57 u skladu su s izvješćima istraživanja provedenih u europskim, blisko-istočnim, azijskim i američkim populacijama.

**Ključne riječi:** HLA, istočna Hrvatska, uveitis

## 8. Summary

### Association of HLA class I and II with occurrence of uveitis in Eastern Croatia

**Objectives:** The aim of this study was to determine HLA class I (HLA-A, -B) and II (HLA-DRB1, -DQB1) gene frequencies in a group of patients affected with uveitis in the population of Eastern Croatia and to compare results with data from healthy population of Croatia.

**Participants and methods:** A total of 38 patients (20 M, 18 F) were HLA typed at low resolution level using PCR-SSP method in the period 2007-2017. The control group represents previously published data of molecular typing of HLA for healthy unrelated persons from the Croatian population.

**Results:** Increased frequencies in tested group compared to control group were found for: HLA-A\*29 (OR 1,48), -A\*11 (OR 1,41), -A\*32 (OR 1,39), -A\*25 (OR 1,3), -A\*03 (OR 1,23), -A\*02 (OR 1,18), HLA-B\*52 (OR 2,77), -B\*50 (OR 2,75), -B\*27 (2,03), -B\*44 (OR 1,83), -B\*57 (OR 1,50), -B\*56 (OR 1,34), -B\*08 (OR 1,21), HLA-DRB1\*16 (OR 1,58), -DRB1\*15 (OR 1,50), -DRB1\*11 (OR 1,11) and HLA-DQB1\*03(DQ9) (OR 3,22). The difference in the frequency of these HLA genes was not statistically significant except for HLA-B\*27 ( $p=0,054$ ) and -B\*44 ( $p=0,071$ ). HLA-A\*68 was more frequent in the control group ( $p=0,049$ , OR 0,14).

**Conclusion:** In this study the HLA-B\*27 and HLA-B\*44 were positively associated with uveitis unlike the HLA-B\*68 which was protective for development of uveitis in population of Eastern Croatia. The results obtained for HLA-A\*29, HLA-B\*27, HLA-B\*44 and HLA-B\*57 are in concordance with research reports conducted in European, Middle East, Asian and American populations.

**Keywords:** HLA, Eastern Croatia, uveitis

## 9. Literatura

1. Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. New York: Wiley and Sons; 1986.
2. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*. 2009;74:101–116.
3. Kerhin-Brkljačić V, Grubić Z. Glavni sustav tkivne snošljivosti u ljudi. U: Grgičević D, i sur. urednici. *Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str.254-258.
4. Marušić M, Grčević D. Glavni kompleks molekula tkivne podudarnosti. U: Taradi M, urednik. *Imunologija*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 98-113.
5. Žunec R. Molekularna tipizacija HLA, primjena u transplantaciji i dijagnostici. U: Sertić J, i sur.urednik. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika*. Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str. 292-300.
6. Nei M, Gu X, Sitnikova T. Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *PNAS*. 1997;94(15):7799-7806.
7. Kropshofer H, Hämmerling GJ, Vogt AB. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev*.1999;172:267-278.
8. Ting JP-Y, Trowsdale J. Genetic Control of MHC Class II Expression. *Cell*. 2002; 109(2):S21-S33.
9. Meyer D, Aguiar C, Bitarello VR, Brandt BD, Nunes K. A genomic perspective on HLA evolution. *Immunogenetics*. 2018;70(1):5-27.
10. Lahita RG, Tsokos G, Buyon J, Koike T. *Systemic lupus erythematosus*. 4. izd. London: Academic Press; 2011.str. 3.
11. Trowsdale J. Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes. *Immunity*. 2001;15(3):363-374.
12. hla.allele.org. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases *Nucleic Acids Research* 2015. Dostupno na: <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html> Datum pristupa 01.07.2018.

13. Marsh SGE, Albert ED, Domer WF, Bontrop RE, Dupton B, Erlich HA i sur. Nomenclature for factors of HLA system. *Tissue Antigens*. 2010;75:291-455.
14. Mandić Z. i sur. *Oftalmologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str.316-325.
15. Vukojević N. Oko u reumatskim bolestima. *Reumatizam*. 2011;58(2):13-23.
16. Vukojević N. Oftalmološke manifestacije u reumatskim bolestima. U: Jelušić M, Malčić I i sur.urednik. *Pedijatrijska reumatologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str.316-325.
17. Zagora SL, Symes R, Yeung A, Yates W, Wakefield D, McCluskey PJ. Etiology and Clinical Features of Ocular Inflammatory Diseases in a Tertiary Referral Centre in Sydney, Australia. *Ocul Immunol Inflamm*. 2017;25(1):S107-S114.
18. Levinson RD. Immunogenetics of Ocular Inflammatory Disease. *Tissue Antigens*. 2007;69:105-112.
19. Wallace GR & Niemczyk. Genetics in Ocular Inflammation-Basic Principles. *Ocul Immunol Inflamm*. 2011;19(1):10-18.
20. Guarene M, Capittini C, De Silvestri A, Pasi A, Badulli C, Sbarsi I, i sur. "Targeting the Immunogenetic Diseases with the Appropriate HLA Molecular Typing: Critical Appraisal on 2666 Patients Typed in One Single Centre," *Biomed Res Int*. 2013; 904247.
21. Chang J.H., McCluskey P.J., Wakefield D. "Acute anterior uveitis and HLA-B27". *Surv Ophthalmol*. 2005;50(4):364-388.
22. Pathanapitoon K, Dodds EM, Cunningham ET Jr., Rothova A. Clinical Spectrum of HLA-B27-associated Ocular Inflammation. *Ocul Immunol Inflamm*. 2017; 25(4):569-576.
23. Grubić Z. Gen HLA-B27: polimorfizam, evolucija, raspodjela i povezanost sa spondiloartropatijama. *Reumatizam*. 2006;53(1):5-10.
24. Szamocki, S., Martyn-Hemphill, C. and Green, J. S. Reactive arthritis: can't see, can't pee, can't climb a tree.... *Trends Urology & Men Health*. 2016;7:17-20.
25. Lyons, J. L., Rosenbaum, J. T. Uveitis associated with inflammatory bowel disease compared with uveitis associated with spondyloarthropathy. *J. Ophthalmol*. 1997;15(1):61-64

26. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP. Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: Clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology*. 2002;123(3):714–718.
27. Haroon, M., O'Rourke, M., Ramasamy, P., Murphy, C. C., FitzGerald, O. A novel evidence-based detection of undiagnosed spondyloarthritis in patients presenting with acute anterior uveitis: the DUET (Dublin Uveitis Evaluation Tool). *Ann. Rheum. Dis.* 2015; 74 (11):1990-1995
28. Herbort CP, Pavésio C, LeHoang P, Bodaghi B, Fardeau C, Kestelyn P. i sur. „, Why birdshot retinochoroiditis should rather be called „HLA-A29 uveitis? “. *Brit. J. Ophthalmol.* 2017;101:851-855.
29. Zucchiatti I., Miserocchi E., Sacconi R., Bandello, F., Modorati, G. “HLA-A29-Positive Uveitis: Birdshot Chorioretinopathy, What Else?”. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2013;4(3):287–293.
30. Kang EH, Kim JY, Takeuchi F, Kim JW, Shin K, Lee EY, i sur. Associations between the HLA-A polymorphism and the clinical manifestations of Behcet's disease “. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(2):R49.
31. Montes-Cano MA, Conde-Jaldón M, García-Lozano JR, Ortiz-Fernández L, Ortego-Centeno N, Castillo-Palma MJ, i sur. HLA and non-HLA genes in Behçet's disease: a multicentric study in the Spanish population. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5), R145.
32. Ahmad T, Wallace GR, James T, Neville M, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, i sur. Mapping the HLA association in Behçet's disease: A role for tumor necrosis factor polymorphisms? *Arthritis Rheum.*2003;48:807-13.
33. Islam SM, Numaga J, Fujino Y, Hirata R, Matsuki K, Maeda H, i sur. HLA class II genes in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1994;35(11):3890-3896.
34. Abad, S., Monnet, D., Caillat-Zucman, S., Mrejen, S., Blanche, P., Chalumeau, M., I sur. Characteristics of Vogt-Koyanagi-Harada disease in a French cohort: ethnicity, systemic manifestations, and HLA genotype data. *Ocul. Immunol.Inflamm.* 2008;16 (1-2):3-8.
35. Levinson RD, Park MS, Ridders SM, Reed EF, Smith JR, Martin TM, i sur. Strong Associations between Specific HLA-DQ and HLA-DR Alleles and the Tubulointerstitial Nephritis and Uveitis Syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003;44(2):653-657.

36. Atan, D., Turner, S. J., Kilmartin, D. J., Forrester, J. V., Bidwell, J., Dick, A. D., i sur. Cytokine gene polymorphism in sympathetic ophthalmia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005;46(11):4245-4250.
37. Oruc, S., Duffy, B. F., Mohanakumar, T., & Kaplan, H. J. The association of HLA class II with pars planitis. *AmJ Ophthalmology.* 2001;131(5):657-659.
38. Trowsdale J., Knight J.C.: Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:1:301-323.
39. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4 izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2008.
40. Grubić Z, Burek Kamenarić M, Mikulić M, Štingl Janković K, Maskalan M, Žunec R. HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *Int J Immunogenet.* 2014;41:211-221.
41. Grubić Z, Žunec R, Naipal A, Kaštelan A, Giphart MJ. Molecular analysis of HLA class II polymorphism in Croats. *Tissue Antigens* 1995;46:293-298.
42. Hoffmann LaRoche&Co.Roche high pure kits. Dostupno na:  
<https://www.roche.com/products/product-details.htm?productId=1f663044-6dba-47d89162-ac0d440bc7ff> Datum pristupa 01.07.2018.
43. Olerup SSP. Dostupno na: <http://www.olerup-ssp.com> Datum pristupa 01.07.2018
44. Zhao J, Zhu T, Chen W, Fan BJ, He L, Yang B, i sur. Human Leukocyte Antigens-B and C-Loci Associated with Posner-Schlossman Syndrome in a Southern Chinese Population. *PloS one.* 2015;10(7):e0132179.
45. Ortiz-Fernández L, Carmona F-D, Montes-Cano M-A, García-Lozano J-R, Conde-Jaldón M, Ortego-Centeno N, i sur. Genetic Analysis with the Immunochip Platform in Behçet Disease. Identification of Residues Associated in the HLA Class I Region and New Susceptibility Loci. *PLoS one.* 2016;11(8):e0161305.
46. Ueta M, Kannabiran C, Wakamatsu TH, Kim MK, Yoon K-C, Seo K Y, i sur. Trans-ethnic study confirmed independent associations of HLA-A\*02:06 and HLA-B\*44:03 with cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe ocular surface complications. *Scientific Reports.*2014;4,5981.



47. Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, Stanford MR. Behçet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *Brit. J. Ophthalmol.* 2003;87:1175-1183.
48. Shenavandeh S, Jahanshahi KA, Aflaki E, Tavassoli A. Frequency of HLA-B5, HLA-B51 and HLA-B27 in patients with idiopathic uveitis and Behçet's disease: a case-control study. *Reumatologia.* 2018;56(2):67-72.
49. Ombrello MJ, Remmers EF, Tachmazidou I, Grom I, Foell D, Haas J-P, i sur. HLA-DRB1\*11 and variants of the MHC class II locus are strong risk factors for systemic juvenile idiopathic arthritis. *PNAS.* 2015;112(52):15970-15975
50. Prete M, Guerriero S, Dammacco R, Fatone MC, Vacca, Dammacco F. i sur. Autoimmune uveitis: a retrospective analysis of 104 patients from a tertiary reference center. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2014;4:1-1.
51. Olsen T.G., Frederiksen J. The association between multiple sclerosis and uveitis. *Surv Ophthalmol.* 2017;62(1):89-95.
52. Petrushkin H, Thomas D, Vaughan R, Kondeatis E, Stanford MR, Edelstein C, i sur. Possession of the HLA-DRB1\*1501 Allele and Visual Outcome in Idiopathic Intermediate Uveitis. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133(4):482–483.
53. Dembic Z. Cytokines of the Immune system. London: Academic press Elsevier Inc.; 2015. str.63.
54. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IPD-IMGT/HLA Database: allele variant databases *Nucleic Acids Research* 2015.43: D423  
Dostupno na: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/intro.html>  
Datum pristupa 01.07.2018.
55. Caspi R.: A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest.* 2010; 120(9):3073–3083.
56. Malenica B. Laboratorijska imunodijagnostika reumatskih i autoimunih bolesti, te u transplantaciji tkiva i organa; U: Sertić J, i sur.urednik. *Klinička kemija i molekularna dijagnostika.* Zagreb: Medicinska naklada; 2008. str.160-185.
57. Feero WG., Gutmacher AE., Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the Multifactorial Nature of Human Autoimmune Disease. *N Engl J Med.* 2011;365(17):1612–1623

58. Rothova A, Suttorp-Van Schulten MS, Frits Treffers W, Kijlstra A. Causes and frequency of blindness in patients with intraocular inflammatory disease. *Br J Ophthalmol.* 1996;80:332–336.
59. Nashtaei EM, Soheilian M, Herbort CP, Yaseri M. Patterns of Uveitis in the Middle East and Europe. *J Ophthalmic Vis Res.* 2011;6(4):233-240.
60. Jabs DA, Nussenblatt RB, Rosenbaum JT. Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop. *Am J Ophthalmol.* 2005;140:509-516.

## 10. Životopis

IME I PREZIME: Renata Nemet-Gužvić

ADRESA: I. B. Mažuranić 7, 31000 Osijek

MOBITEL: 091 570 9403

E-MAIL: nemetguzvicrenata@gmail.com

DATUM ROĐENJA : 10. prosinca 1968.

OBRAZOVANJE: 2010. – 2013.

Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku,

Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

RADNO ISKUSTVO : lipanj 1989. – rujan 2018.

NAZIV POSLODAVCA KBC Osijek

- Klinički zavod za transfuzijsku medicinu,

Odjel laboratorijske dijagnostike i kliničke transfuzijske medicine

RADNO MJESTO: Prvostupnica medicinsko laboratorijske dijagnostike