

# Povezanost polimorfizma gena sustava HLA razreda I i II s oboljevanjem od multiple skleroze u sjeverozapadnoj Hrvatskoj

---

Jagnjić, Sandra

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:823479>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Sandra Jagnjić

**POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA  
SUSTAVA HLA RAZREDA I i II S  
OBOLJEVANJEM OD MULTIPLE  
SKLEROZE U SJEVEROZAPADNOJ  
HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO–MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Sandra Jagnjić

**POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA  
SUSTAVA HLA RAZREDA I i II S  
OBOLJEVANJEM OD MULTIPLE  
SKLEROZE U SJEVEROZAPADNOJ  
HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović  
Doc. dr. sc. Katarina Štingl Janković

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Sandra Jagnjić

**ASSOCIATION OF HLA CLASS I AND II  
GENES POLYMORPHISM WITH  
MULTIPLE SCLEROSIS IN NORTHWEST  
CROATIA**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Jasna Bingulac-Popović, PhD, scientific adviser

Asst. Prof. Katarina Štingl Janković, PhD

Zagreb, 2021

Ovaj je doktorski rad izrađen u Odjelu za molekularnu dijagnostiku te u Odjelu za eritrocitnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, pod vodstvom dr. sc. Jasne Bingulac-Popović i doc. dr. sc. Katarine Štingl Janković u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O MENTORU

Mentorica, dr. sc. Jasna Bingulac-Popović, je specijalistica medicinske biokemije te voditeljica Odjela za molekularnu dijagnostiku pri Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu. Nakon završenog Farmaceutsko biokemijskog fakulteta (FBF) na Sveučilištu u Zagrebu, magistrirala je 1990. na FBF te doktorirala 2000. s temom projekta vođenog tijekom trogodišnjeg boravka na Institutu za biologiju "Max-Planck" u Tübingenu, Baden-Württemberg, Njemačka: "Organizacija gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti u vrste *Brachydanio rerio* (Buchanan)" na Biološkom Odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Osim stručnog rada na području molekularne dijagnostike virusa, genotipizacija krvnih grupa i ID-NAT testiranja dobrovoljnih davatelja u HZTM, bavi se i znanstvenim radom kao mentor brojnim diplomandima i doktorandima te kao suradnik pri dizajnu studija i objavi radova kao znanstvena savjetnica u znanstvenom području biomedicine i zdravstva.

U posljednjih 5 godina objavila je slijedeće znanstvene radove:

1. **Bingulac-Popović J**, Babić I, Đogic V, Kundid R, Simović-Medica J, Mišković B, Jukić I (2021) Prenatal RHD genotyping in Croatia: preliminary results. *Transfus Clin Biol* 28: 38-43.
2. Safic Stanic H, Dogic V, Herceg I, Jagnjic S, **Bingulac-Popovic J**, Babic I, Corusic A, Jukic I (2021) D variants in the population of D-negative blood donors in the north-eastern region of Croatia. *Transfus Med* 31: 43-47.
3. Jagnjić S, **Bingulac-Popovic J**, Đogic V, Vladić A, Štingl Janković K, Kruhonja Galić Z, Hećimović A, Jukić I (2021) HLA II alleles and susceptibility to multiple sclerosis in Croatia. *Acta Clin Croat*, prihvaćeno za objavu 2020.
4. Kruhonja Galic Z, Jagnjic S, **Bingulac-Popovic J**, Planinc Peraica A, Hecimovic A, Strauss Patko M, Jukic I (2020) Warm red blood cell autoantibodies and clinical diagnoses in patients with or without autoimmune hemolysis. *Transfus Clin Biol* 27: 25-29.
5. Lampalo M, Jukić I, **Bingulac-Popović J**, Safić Stanić H, Ferara N, Popović-Grle S (2020) ABO blood group genotypes and ventilatory dysfunction in patients with allergic and nonallergic asthma. *Med Glas (Zenica)* 17: 369-374.
6. Sreter KB, Popovic-Grle S, Lampalo M, Konjevod M, Tudor L, Nikolac Perkovic M, Jukic I, **Bingulac-Popovic J**, Safic Stanic H, Markeljevic J, Pivac N, Svob Strac D

- (2020) Plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) concentration and BDNF Val66Met gene polymorphism in Croatian adults with asthma. *J Pers Med* 10: 189.
7. Pisk SV, Vuk T, Ivezić E, Jukić I, **Bingulac-Popović J**, Filipčić I (2019) ABO blood groups and psychiatric disorders: a Croatian study. *Blood Transfus* 17: 66-71.
  8. Miletić M, **Bingulac-Popović J**, Stojić Vidović M, Hećimović A, Berendika M, Babić I, Đogić V, Samardžija M, Barišić K, Jukić I, Mihaljević I (2019) Anti-HBc prevalence among Croatian blood donors in a 14-year period (2004-2017): Assessment of trends, risks and need for implementing routine testing. *Transfus Clin Biol* 26: 257-262.
  9. Lampalo M, Jukić I, **Bingulac-Popović J**, Safić Stanić H, Barišić B, Popović-Grle S (2019) The role of cigarette smoking and alcohol consumption in pulmonary tuberculosis development and recurrence. *Acta Clin Croat* 58: 590-594.
  10. Lukacevic Krstic J, Dajak S, **Bingulac-Popovic J**, Dogic V, Mratinovic-Mikulandra J (2018) Anti-D reagents should be chosen accordingly to the prevalence of D variants in the obstetric population. *J Clin Lab Anal* 32: e22285.
  11. Lampalo M, Jukić I, **Bingulac-Popović J**, Safić H, Ferara N, Popović-Grle S (2018) The Role of PAI-1 Gene 4g/5g Polymorphism and Diagnostic Value of Biomarkers in Allergic and Non-Allergic Asthma Phenotype. *Acta Clin Croat* 57: 96-102.
  12. Vince A, Židovec Lepej S, **Bingulac-Popović J**, Miletić M, Kuret S, Sardelić S, Vrakela IB, Kurelac I (2018) Distribution of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Croatia: 2008-2015. *Cent Eur J Public Health* 26: 159-163.
  13. Jukić I, **Bingulac-Popović J**, Samardžija M, Lampalo M, Hećimović A, Đogić V, Strauss Patko M (2017) Raspodjela glavnih alela sustava ABO krvnih grupa u hrvatskoj populaciji. *Acta Med Croatica* 71: 235-240.
  14. Babić I, Maslović M, Vuk T, Safić Stanić H, Topic Sestan P, Kursar M, **Bingulac-Popović J**, Dogić V, Jukić I (2017) Detection of three blood donors with multiple myeloma by routine viral individual-donor nucleic acid testing screening. *Transfusion* 57: 2813-2814.
  15. Safić Stanić H, Babić I, Maslović M, Đogić V, **Bingulac-Popović J**, Miletić M, Juraković-Lončar, Vuk T, Strauss-Patko M, Jukić I (2017) Three-Year Experience in NAT Screening of Blood Donors for Transfusion Transmitted Viruses in Croatia. *Transfus Med* 44: 415-420.
  16. Vuk T, **Bingulac-Popović J**, Očić T, Mayer Lj, Milošević M, Jukić I (2017) Combined cell index in assessing blood donor iron stores. *Transfus Med* 27: 16-24.

17. Lampalo M, Jukić I, **Bingulac-Popović J**, Marunica I, Petlevski R, Pavliša G, Popović-Grle S (2017) Polymorphism 4G/5G of the plasminogen activator inhibitor 1 gene as a risk factor for the development of allergic rhinitis symptoms in patients with asthma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 274: 2613-2619.

#### INFORMACIJE O KOMENTORU

Komentorica, doc. dr. sc. Katarina Štingl Janković je diplomirala je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (Biološki odsjek, smjer Molekularna biologija) 2000.g. Titulu doktora znanosti stekla je 2009.g. (doktorski studij “Biomedicina i zdravstvo”, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu). U periodu od 2001. do 2010. godine bila je znanstveni novak na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na projektima Odjela za tipizaciju tkiva KBC Zagreb, a od 2010.g. do danas radi kao molekularni biolog u istom odjelu. Usavršavala se je tijekom 2005. godine u Department of Internal Medicine III, Division of Clinical Endocrinology & Metabolism, Allgemeines Krankenhaus, Medical University of Vienna. Od 2009.g. sudjeluje u izvođenju nastave kolegija “Transplantacijska imunologija” (Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Izabrana je u zvanje znanstvenog suradnika 2012.g. (područje Prirodnih znanosti za znanstveno polje biologija na Sveučilištu u Zagrebu, PMF Zagreb), te u zvanje naslovnog docenta 2017.g. (područje Prirodnih znanosti za znanstveno polje biologija na Poslijediplomskom interdisciplinarnom sveučilišnom studiju Molekularne bioznanosti Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku). Njeno glavno područje rada i interesa je sustav HLA te njegova uloga u dijagnostici bolesti i transplantaciji krvotvornih matičnih stanica i solidnih organa.

U posljednjih 5 godina objavila je slijedeće znanstvene radove:

1. Grubic Z, **Štingl Janković K**, Maskalan M, Serventi-Seiwerth R, Mikulic M, Nemet D, Burek Kamenaric M, Labar B, Zunec R (2016) The effect of HLA allele and haplotype polymorphisms on donor matching in hematopoietic stem cell transplantation - Croatian experience. *Hum Immunol* 77(12):1120-1127.
2. Grubic Z, **Štingl Janković K**, Kelecic J, Batinic D, Dubravcic K, Zunec R (2016) A case of maternal-foetal chimerism identified during routine histocompatibility testing for hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Immunogenet* 43(1):1-7.
3. **Štingl Janković K**, Hudolin T, Kastelan Z, Zunec R, Grubic Z (2016) The possible role of the tumour necrosis factor polymorphisms and human leucocyte antigens in the development of prostate cancer. *Int J Immunogenet* 43(3):143-50.



4. Grubic Z, Maskalan M, Svilicic D, **Stingl Jankovic K**, Zunec R (2016) Determination of HLA-A, -B, and -DRB1 Allele and Haplotype Frequencies in the Croatian Population Based on a Family Study. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64(1):83-88.
5. Maskalan M, Grubic Z, **Jankovic KS**, Cepulic BG, Zunec R (2016) Identification of the novel HLA-A\*01:200 allele by sequence-based typing in a Croatian individual. *HLA* 87(5):381-382.
6. Grubic Z, Maskalan M, **Stingl Jankovic K**, Zvecic S, Dumic Kubat K, Krnic N, Zunec R, Ille J, Kusec V, Dumic M (2016) Association of HLA alleles and haplotypes with CYP21A2 gene p. V282L mutation in the Croatian population. *HLA* 88(5):239-244.
7. Burek Kamenaric M, **Stingl Jankovic K**, Grubic Z, Serventi Seiwert R, Maskalan M, Nemet D, Mikulic M, Zunec R (2016) The impact of KIR2DS4 gene on clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Immunol* 78(2):95-102.
8. Burek Kamenaric M, Maskalan M, Grubic Z, Mikulic M, Serventi Seiwert R, Durakovic N, Vrhovac R, **Stingl Jankovic K**, Zunec R (2017) HLA-DPB1 matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantation program contributes to a higher incidence of disease relapse. *Hum Immunol* 78(11-12):665-671.
9. Grubic Z, Maskalan M, Radmanic L, **Stingl Jankovic K**, Burek Kamenaric M, Zunec R (2018) The distribution of the DRB4\*01:03:01:02N null allele in HLA-DRB1~DQB1 haplotypes in the Croatian population. *HLA* 91(1):23-28.
10. Dumic KK, Grubic Z, Yuen T, Wilson RC, Kusec V, Barisic I, **Stingl K**, Sansovic I, Skrabac V, Dumic M, New MI (2017) Molecular genetic analysis in 93 patients and 193 family members with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 165:51-56.
11. **Stingl Jankovic K**, Grubic Z, Jakupic J, Burek Kamenaric M, Maskalan M, Zunec R (2018) The distribution of HLA-DRB3 alleles among HLA-DRB1\*03:01-positive haplotypes. *HLA* 92(3):160-163.
12. Grubic Z, Rojnic Putarek N, Maskalan M, Zunec R, **Stingl Jankovic K**, Burek Kamenaric M, Knezevic-Cuca J, Spehar Uroic A, Dumic M (2018) Human Leukocyte Antigen class II polymorphisms among Croatian patients with type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome type 3 variant. *Gene* 674:93-97.
13. **Stingl Jankovic K**, Maskalan M, Burek Kamenaric M, Zunec R, Durakovic N, Serventi-Seiwert R, Vrhovac R, Grubic Z (2019) Quantitative polymerase chain reaction

technology in chimerism monitoring after hematopoietic stem cell transplantation: One center experience. *HLA* 94 Suppl 2:16-20.

14. Grubic Z, Burek Kamenaric M, Kljajic J, **Stingl Jankovic K**, Maskalan M, Zunec R (2020) Impact of HLA polymorphisms among cadaveric donors on kidney graft allocation. *Transpl Immunol* 62:101318.
15. Burek Kamenaric M, Maskalan M, Grubic Z, **Stingl Jankovic K**, Zunec R (2020) Detection of novel and confirmation of very rare and rare HLA alleles by next generation sequencing in Croatia. *HLA* 96(1):70-75.
16. Maskalan M, Grubic Z, Serventi Seiwert R, Vrhovac R, Mikulic M, Burek Kamenaric M, **Stingl Jankovic K**, Durakovic N, Zunec R (2020) The MHC gamma block matching: Impact on unrelated hematopoietic stem cell transplantation outcome. *Hum Immunol* 81(1):12-17.
17. Grubic Z, Maskalan M, **Stingl Jankovic K**, Burek Kamenaric M, Zunec R (2021) Mapping the Human Leukocyte Antigen Diversity among Croatian Regions: Implication in Transplantation. *J Immunol Res* 6670960.

## ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Jasni Bingulac-Popović na stručnoj potpori i na motivaciji koju mi je pružala u ovim teškim i izazovnim trenucima, te na korisnim savjetima i entuzijazmu koje mi je nesebično davala posebno pri završetku izrade i pisanja doktorske disertacije

Zahvaljujem komentorici doc. dr. sc. Štingl Janković na kritičkom osvrtu, stručnoj pomoći, razumijevanju i spremnosti da pomogne u svakom trenutku.

Želim zahvaliti i prim. Vesni Đogić, dr. med. na pomoći kod osmišljavanja teme te nacрта istraživanja. Zahvaljujem joj za sve savjete, znanje i vrijeme koje mi je davala.

U ovoj zahvali moram spomenuti i doc. dr. sc. Antona Vladića, dr. med. na pomoći oko sakupljanja uzoraka kao i podršci prilikom pisanja rada.

Zahvaljujem i doc. dr. sc. Ireni Jukić, dr. med. na pruženoj prilici da upišem i završim poslijediplomski studij, na svakodnevnom poticanjima na rad i ohrabrenjima u svladavanju prepreka.

Zahvaljujem dr.sc. Ani Hećimović, dr. med. za pomoć u statističkoj obradi podataka.

Djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku želim zahvaliti za pomoć prilikom testiranja, a posebno Višnjici Kirin, med. lab. ing. i Renati Kuidid, med. lab. ing.

Zahvaljujem i djelatnicima Odjela za eritrocitnu dijagnostiku, a posebno dr. sc. Zrinki Kruhonja-Galić, dr. med. na razumijevanju i podršci da se ovaj radi napravi do kraja.

Posebna zahvala Miljani Stojić Vidović, dr. med. na prijateljskoj i kolegijalnoj potpori te na riječima ohrabrenja u najtežim trenucima.

Naposljetku, želim zahvaliti svojoj obitelji jer sam, uz njihovu ljubav i bezuvjetnu podršku, sve prepreke na koje sam naišla tijekom ovog dugog puta savladala.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

### **POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA SUSTAVA HLA RAZREDA I i II S OBOLJEVANJEM OD MULTIPLE SKLEROZE U SJEVEROZAPADNOJ HRVATSKOJ**

Sandra Jagnjić

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

Multipla skleroza (MS) je autoimuni poremećaj središnjeg živčanog sustava uzrokovan međudjelovanjem genetičkih i okolišnih čimbenika rizika. Genetička predispozicija za razvoj MS povezana s genima HLA razreda I i II. Cilj rada je bio istražiti povezanost alela, genotipova te haplotipova HLA razreda I i II s podložnošću za nastanak multiple skleroze (MS) u populaciji sjeverozapadne Hrvatske metodom istraživanja parova. HLA genotipizacija je učinjena kod 173 pacijenta s relapsno-remitirajućim oblikom MS i 205 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi bez povijesti demijelinizacijskih bolesti kao kontrolnom skupinom. Geni HLA razreda I i II su testirani komercijalnom PCR-SSP metodom (CareDx AB, Švedska). Aleli *HLA-DRB1\*15:01*, *HLA-DQB1\*06:02* i haplotip *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* su statistički učestaliji u oboljelih od MS u odnosu na kontrolnu skupinu. Među MS bolesnicima je smanjena zastupljenost alela *HLA-DRB1\*11:01*, *HLA-DQA1\*05:01* te haplotipa *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01*. U zaključku, naši rezultati ukazuju da aleli HLA razreda I i II utječu na podložnost ili pokazuju zaštitu u nastanku MS u hrvatskoj populaciji.

(125 stranica, 22 slike, 30 tablica, 276 literaturnih navoda, jezik izvornika - hrvatski)

*Ključne riječi: Multipla skleroza; HLA aleli razreda I; HLA aleli razreda II; Podložnost; Zaštita*

*Mentor: Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović, znanstveni savjetnik*

*Komentor: Doc. dr. sc. Katarina Štingl Janković*

*Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Renata Žunec*

*Izv. prof. dr. sc. Ana Galov*

*Doc. dr. sc. Anton Vladić*

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral thesis

**ASSOCIATION OF HLA CLASS I AND II GENES POLYMORPHISM WITH  
MULTIPLE SCLEROSIS IN NORTHWEST CROATIA**

Sandra Jagnjić

Croatian Institute for Transfusion medicine

Multiple sclerosis (MS) is a heterogeneous autoimmune disease of central nervous system caused by a combination of genetic and environmental risk factors. Genetic susceptibility for MS is associated with alleles of the human leukocyte antigen system (HLA) class I and II. The aim of the present study was to evaluate associations between HLA-class I and II alleles, genotypes and haplotypes to multiple sclerosis (MS) susceptibility in Croatian population. HLA genotyping was performed on a group of 173 relapsing-remitting MS patients and 205 healthy voluntary blood donors. HLA class II genes were analyzed using PCR-SSP method (CareDx AB, Sweden). Our results demonstrated positive association for alleles *HLA-DRB1\*15:01*, *HLA-DQB1\*06:02* and haplotype *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02*. A protective effect against MS was shown by alleles *HLA-DRB1\*11:01* and *HLA-DQA1\*05:01* and haplotype *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01*. In conclusion, our results confirm that HLA class I and II alleles and their interactions modulate MS susceptibility and protection in Croatian population. (125 pages, 22 figures, 30 tables, 276 references, original in Croatian)

*Key words: Multiple sclerosis; HLA class I alleles; HLA class II alleles; Susceptibility; Protection*

*Supervisor: Jasna Bingulac-Popović, PhD, scientific adviser*

*Co-Supervisor: Asst. Prof. Katarina Štingl Janković, PhD*

*Reviewers: Asst. Prof. Renata Žunec, PhD*

*Assoc. Prof. Ana Galov, PhD*

*Asst. Prof. Anton Vladić, PhD*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. LITERATURNI PREGLED .....	4
2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti .....	4
2.1.1. Povijest sustava HLA .....	4
2.1.2. Značajke sustava HLA .....	6
2.1.3. Organizacija sustava HLA .....	7
2.1.4. Organizacija gena i molekula HLA razreda I.....	9
2.1.5. Građa gena i molekula HLA razreda II.....	11
2.1.6. Prerađivanje i predočavanje antigena molekulama HLA razreda I.....	12
2.1.7. Prerađivanje i predočavanje antigena molekulama HLA razreda II .....	13
2.1.8. T- stanično prepoznavanje kompleksa molekule HLA i peptida .....	14
2.1.9. Nazivlje sustava HLA .....	15
2.2. Multipla skleroza.....	17
2.2.1. Uvod.....	17
2.2.2. Etiologija MS .....	17
2.2.3. Epidemiologija MS .....	19
2.2.4. Imunopatogeneza MS.....	23
2.2.5. Patologija MS.....	26
2.2.6. Klinička slika MS.....	26
2.2.7. Dijagnostički aspekti MS .....	28
2.2.8. Liječenje MS .....	30
2.3. HLA sustav i bolesti.....	30
2.3.1. Mehanizam nastanka autoimunih bolesti povezan s molekulama HLA .....	31
2.3.2. HLA i MS.....	34
2.4. Zemljopisni i povijesni podaci o sjeverozapadnoj Hrvatskoj .....	44
2.4.1. Zemljopisni podaci.....	44
2.4.2. Povijesni podaci koji su utjecali na današnji genski sastav stanovništva SZ Hrvatske .....	44
3. ISPITANICI I METODE .....	47
3.1. Ispitanici.....	47

3.2. Metode.....	47
3.2.1. Tipizacija HLA.....	47
3.2.2. Izolacija genomske DNA iz leukocita pomoću testnog paketa.....	47
3.2.3. Umnožavanje ciljne sekvence lančanom reakcijom polimerazom sa specifičnim početnicama za sekvencu (PCR-SSP).....	49
3.2.4. Gel elektroforeza.....	51
3.2.5. Interpretacija nalaza.....	52
3.3. Statističke metode.....	52
4. REZULTATI.....	53
4.1. Značajke ispitanika.....	53
4.2. Raspodjela učestalosti gena/alela HLA razreda I i II u kontrolnoj skupini dobrovoljnih darivatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske.....	54
4.2.1. Određivanje Hardy-Weinberg ravnoteže za lokuse <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> , <i>-C</i> , <i>-DQA1</i> , <i>-DQB1</i> , <i>-DRB1</i> .....	54
4.2.2. Raspodjela učestalosti gena HLA razreda I u kontrolnoj skupini.....	54
4.2.3. Usporedba učestalosti gena kontrolne skupine sjeverozapadne Hrvatske na lokusima <i>HLA-A</i> , <i>-B</i> i <i>-C</i> kontrolne skupine sjeverozapadne Hrvatske s drugim studijama.....	57
4.3. Usporedba učestalosti gena/alela HLA razreda I i II između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine.....	67
4.3.1. Usporedba gena HLA razreda I između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine.....	67
4.3.2. Usporedba učestalosti alela HLA razreda II između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine.....	69
4.3.3. Usporedba haplotipova koju čine geni/aleli HLA razreda I i II između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine.....	74
4.3.4. Analiza po spolu i dobi nastanka MS u bolesnika prema prisutnosti alela <i>HLA-DRB1*15:01</i> .....	80
4.3.5. Usporedba alela sa statistički značajnom povezanosti s MS ovisno o <i>HLA-DRB1*15:01</i> statusu kod pacijenata s MS i kod kontrolne skupine.....	81
5. RASPRAVA.....	83
7. POPIS LITERATURE.....	101

6. ŽIVOTOPIS .....	125
--------------------	-----



# 1. UVOD

Multipla skleroza (MS) je bolest koju karakterizira kronična upala i demijelinizacija u središnjem živčanom sustavu. Premda je etiologija nepoznata, pretpostavlja se da zajedno genetički i okolišni čimbenici doprinose patogenezi što pokazuju podatci studija. Pojava MS s niskom i visokom učestalošću u različitim etničkim skupinama, povećana učestalost u obiteljima te visoka učestalost među jednojajčanim blizancima upućuju na nasljednu sklonost prema razvoju MS (1).

Vrijeme pojavljivanja bolesti je u dobi između 20-te i 50-te godine života. Kod žena je MS tri puta češća u odnosu na muškarce (2).

Postoje četiri oblika MS: relapsno-remitirajući, sekundarno-progresivni, primarno-progresivni i progresivno-relapsni (3). Najčešći je relapsno-remitirajući oblik koji se pojavljuje u 85 % oboljelih od MS, dok su ostali oblici rjeđi (3).

Prva istraživanja o povezanosti sustava HLA i MS sežu u davnu 1972. godinu kada su Naito i sur., Jersild i sur. te Bertrams i sur. objavili radove koji ukazuju na povećanu učestalost antigena HLA razreda I, a posebno antigena HLA-A3, -A10, -B7 i B35 u skupini bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu (4–6).

Kasnije, kad je uspostavljena metoda za serološko određivanje antigena HLA razreda II, i taj se sustav dovodi u vezu s povećanim rizikom za MS. Uslijedila su mnogobrojna istraživanja koja su pokazala da aleli HLA razreda II primarno utječu na podložnost za MS (7). Novu dimenziju istraživanjima su dale cjelogenomske asocijacijske studije (engl. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS) (8). GWAS studije su identificirale više od 200 lokusa povezanih s rizikom od nastanka MS, no najveći rizik se ipak povezuje s HLA regijom, preciznije s lokusom *HLA-DRB1*, posebno s *HLA-DR15* haplotipom (*HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02*) i *HLA-DRB1\*15:01* alelom kao najznačajnijim podložnim alelom za MS, uglavnom među ispitanicima europskog podrijetla (9, 10).

I drugi *HLA-DRB1* aleli se navode u istraživanjima kod bolesnika s MS provedenim u različitim etničkim grupama: aleli *HLA-DRB1\*13:03*, *HLA-DRB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*08:01*, *HLA-DRB1\*04:05*, *HLA-DRB1\*15:03* se povezuju s povećanom podložnosti za MS, dok su *HLA-DRB1\*01*, *HLA-DRB1\*07*, *HLA-DRB1\*11:01*, *HLA-DRB1\*14*, *HLA-DRB\*13* geni/aleli nađeni kao zaštitni čimbenici za MS (11–15). Na lokusu *HLA-DQB1* je alel *HLA-DQB1\*06:02* značajno učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na zdrave osobe (13, 15). Međutim, veliki polimorfizam alela i snažna neravnoteža udruživanja (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) kod

*DRB1\*15~DQB1\*06:02* haplotipa otežavaju određivanje primarnog podložnog alela. U brazilskih pacijenata afričkog porijekla s MS *HLA-DQB1\*06:02* alel u odnosu na *HLA-DRB1\*15:01* igra primarnu ulogu za podložnost prema MS (16). Nasuprot tome, u radovima kod Amerikanaca afričkog porijekla nije utvrđena povezanost *HLA-DQB1* alela i MS (12).

U mnogim istraživanjima je uočeno da je podložnost za MS više povezana s genotipovima i haplotipovima u odnosu na povezanost s pojedinačnim alelima. Dok je MS povezana s *HLA-DRB15* haplotipom u većine europskih populacija (17–23), u regiji Mediterana se i drugi *HLA-DRB1~DQB1* haplotipovi povezuju s podložnošću za MS: *DRB1\*13:03~DQB1\*03:01*, *DRB1\*04:05~DQB1\*03:01*, *DRB1\*04~DQB1\*03:02* i *DRB1\*03:01~DQB1\*02:01* (22, 24).

### Znanstveni doprinos

U Hrvatskoj je do sada provedeno jako malo istraživanja o utjecaju alela HLA razreda I i II na podložnost za MS i to na malom broju uzoraka bolesnika s MS i zdrave kontrolne skupine. Budući da naše istraživanje parova obuhvaća znatno veću skupinu ispitanika hrvatske populacije (bolesnika s MS i zdravih osoba) očekujemo dobivanje statistički vrijednijih rezultata. Time ćemo dobiti i precizniju sliku o povezanosti gena HLA te malih genetičkih varijanti i potvrditi pretpostavke o njihovom utjecaju na podložnost za MS u ispitanoj populaciji. Znanstveni doprinos ove studije bi dakle bio utvrditi rizični alel(e) i haplotip(ove) za pojavu MS kao i prisutnost protektivnih alela u populaciji sjeverozapadne Hrvatske. Povezanost alela sustava HLA s obolijevanjem potvrdila bi tako uključenost sustava HLA kao jednog od genetičkih čimbenika koji doprinose razvoju multiple skleroze.

### Ciljevi

1. Analizirati alele i haplotipove HLA razreda I (lokusi *HLA-A*, *-B*, *-C*) te razreda II (lokusi *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1*) u kontrolnoj skupini koju čine dobrovoljni darivatelji krvi (DDK) bez povijesti demijelinizacijskih bolesti s područja sjeverozapadne (SZ) Hrvatske.
2. Usporediti dobivene rezultate o učestalosti alela i haplotipova HLA kod DDK s istraživanjem provedenim u Hrvatskoj, sa rezultatima okolnih zemalja te drugih nama povijesno povezanih zemalja Europe.
3. Analizirati alele i haplotipove HLA razreda I (lokus *HLA-A*, *-B*, *-C*) te razreda II (lokus *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1*) kod bolesnika s MS s područja sjeverozapadne Hrvatske.

4. Usporediti alele i haplotipove HLA između skupine bolesnika s MS i kontrolne skupine, te odrediti potencijalno podložne kao i zaštitne alele, genotipove i haplotipove HLA za nastanak MS.

5. Analizirati alele HLA razreda I i II u odnosu na dob i spol te početak simptoma MS u skupini bolesnika s MS i odrediti povezanost između tih varijabli i potencijalno podložnih i zaštitnih alela HLA za MS.

#### Metode

U svrhu određivanja gena HLA razreda I i II koristili smo metodu lančane reakcije polimerazom koja koristi alel-specifične oligonukleotidne početnice (primere) za određene sekvence pojedinih alela HLA (engl. PCR-SSP, *Sequence-Specific Primers*). Polazni materijal za metodu tipizacije HLA je genomska DNA. Izolacija genomske DNA napravljena je pomoću silikatnih membrana koristeći komercijalni kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Njemačka).

Za HLA tipizaciju uporabljeni su komercijalni HLA-SSP kitovi za nisko i visoko razlučivanje pojedinih lokusa HLA (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*) (CareDx AB, Švedska).

Umnožene sekvence u obliku PCR-SSP produkta provjeravat će se metodom elektroforeze na komercijalnom Clearose gelu (AL-Labortechnik, Austrija) uz molekularni biljeg od 100 pb. Specifičnost i veličinu svakog umnoženog ulomka provjeravat ćemo pomoću tablica za interpretaciju, koje su priložene uz svaki komercijalni HLA-SSP set ili pomoću HELMBERG SCORE Software-a (CareDx AB, Švedska).

#### Hipoteza

Hipoteza istraživanja je da određeni aleli, genotipovi i haplotipovi HLA razreda I i II doprinose podložnosti za razvoj MS, dok drugi vrše zaštitnu ulogu od razvoja MS na području sjeverozapadne Hrvatske.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Glavni sustav tkivne podudarnosti

Glavni sustav tkivne podudarnost (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) čine geni koji kodiraju površinske peptide važne za stečeni imunološki odgovor u svih kralježnjaka koji je odgovoran za prepoznavanje i razlikovanje vlastitog od stranog (25).

Funkcija molekula MHC je vezanje peptidnih ulomaka patogena te njihovo predočavanje na površini stanica odgovarajućim limfocitima T. Posljedica toga je gotovo uvijek nepovoljna za patogene, stanice zaražene virusom su uništene, makrofazi su aktivirani da bi uništili bakterije u svojim unutarstaničnim vezikulama, a limfociti B su aktivirani da bi mogli proizvesti protutijela koja će odstraniti ili neutralizirati izvanstanične patogene (26).

U ljudi je MHC nazvan sustav HLA (engl. *Human Leukocyte Antigens*), sustav glavnih antigena tkivne snošljivosti. Pojam „leukocitni“ u nazivu proizlazi iz činjenice da su prvi put otkriveni na bijelim krvnim stanicama (27).

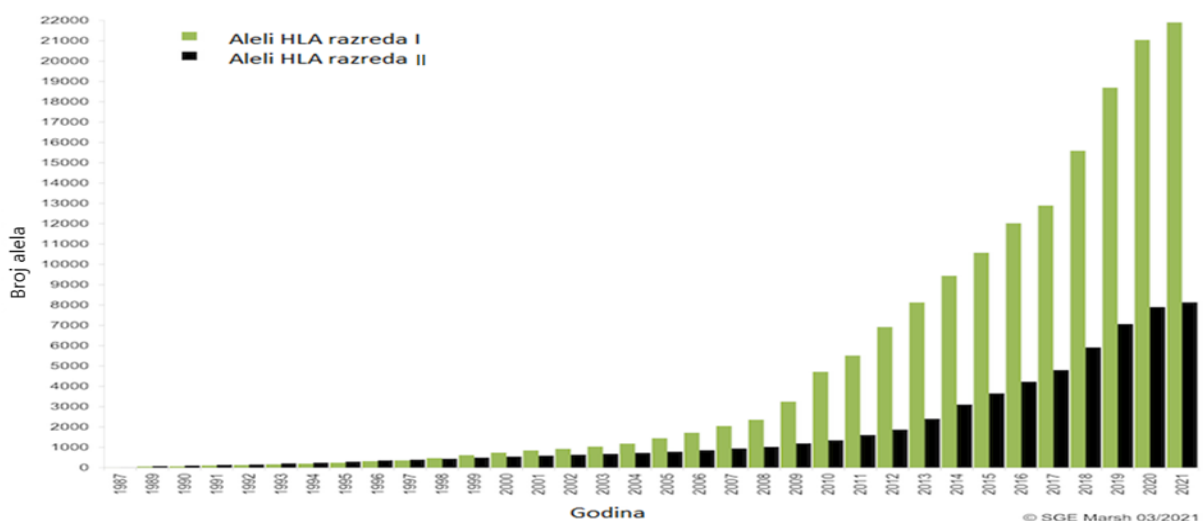
#### 2.1.1. Povijest sustava HLA

Povijest sustava HLA zapravo počinje otkrićem antigena tkivne podudarnosti i H-2 kompleksa u miševa. Britanski liječnik i patolog Gorer je 1936. godine otkrio antigen zaslužan za odbacivanje alogeničnog tumorskog presatka kod genetički identičnih miševa (nazvao ga je antigen II) (28). U isto vrijeme u Americi genetičar Snell je također istraživao gene koji su kod miševa zaslužni za rezistenciju na tumorske presatke i nazvao ih H (engl. *Histocompatibility*) geni. Nakon zajedničkih pokusa sa serumima protiv antigena II, otkrili su prvi alel na H lokusu te su lokus nazvali *H-2* (29). Snell i suradnici su dalje utvrdili da *H-2* lokus kodira antigene koji uzrokuju brzu i snažnu reakciju odbacivanja, pa su ga nazvali glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Locus*), a otkrićem i drugih alela *H-2* lokus postaje H-2 sustav (engl. *Major Histocompatibility Complex*) (30).

MHC, koji je u ljudi kasnije nazvan sustav leukocitnih antigena, HLA, otkrio je 1952. god. nobelovac Dausset koji je uočio da serumi osoba koji su više puta primili transfuziju sadrže protutijela koja aglutiniraju bijele krvne stanice (31). Dausset je aloantigenima prisutnim na ljudskim leukocitima dao prvobitno ime MAC u čast volonterima u njegovim istraživanjima (27). Antigen MAC (kasnije HLA-A2) bio je prisutan u otprilike 60 % ispitanika. Za svoje istraživanje Dausset je 1980. godine (skupa s Snellom i Benaceraftom) dobio Nobelovu nagradu.

Van Rood i Payne su, svaki za sebe, 1958. godine dokazali leukocitne aglutinine u serumu trudnica (32, 33). Van Rood je 1962. god. definirao leukocitni antigen 4a/4b (kasnije HLA-Bw4 i HLA-Bw6), a dvije godine kasnije Payne, skupa s bračnim parom Bodmer, LA1 (kasnije HLA-A1) te LA2 (kasnije HLA-A2) antigene (34, 35). Nakon njih su uslijedila otkrića i drugih antigena i alela HLA. 1967. godine Ceppellini je uveo pojam haplotip HLA za gensku informaciju koju nose obadvije kromosomske regije HLA, a Klein je uveo pojam HLA razred I za A, B i C antigene te HLA razred II da bi opisao DR, DQ i DP antigene (36). 1974. god. Zinkernagel i Doherty su u svojim istraživanjima pokazali da proteini koji su kodirani genima HLA imaju temeljnu ulogu u stečenoj imunosti prezentirajući antigene limfocitima T, a Don Wiley i sur. su 1987. god. strukturalnim studijama pokazali da različiti proteini HLA predočavaju različite ulomke antigena (37, 38).

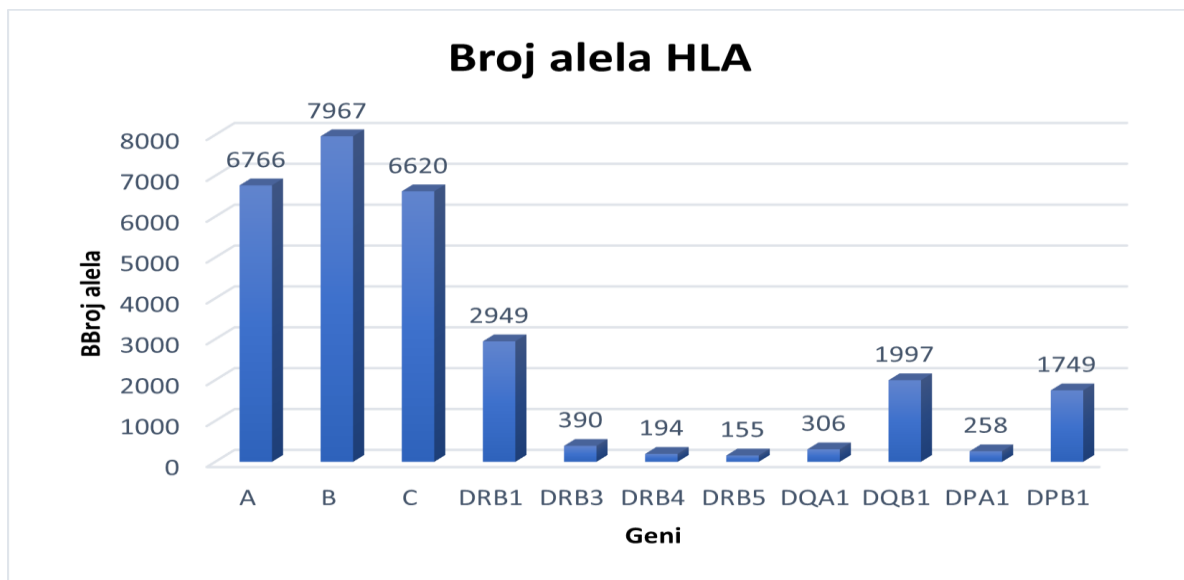
Vežu između različitih leukocitnih antigena koji su bili otkriveni, kao i njihov polimorfizam i nasljeđivanje, bilo je teško dokučiti, pogotovo uzimajući u obzir samo rezultate pojedinačnih laboratorija. Stoga su već rano ustanovljene međunarodne radionice (engl. *International Histocompatibility Workshops*, IHWs) gdje su znanstvenici uspoređivali reagense, tehnike i rezultate te raspravljali o novim otkrićima (29). Radionice su se počele održavati od 1964. godine, a prva takva je održana na inicijativu britansko-američkog imunologa Amosa (29). Nedugo nakon trećeg IHWs 1968. godine osnovan je Odbor za nazivlje HLA (engl. *HLA Nomenclature Committee*) koji je, djelujući još i danas, zadužen za HLA nazivlje tj. nomenklaturu (29). Na Slici 1. je vidljivo koliko je u zadnjih 30 godina kontinuirano raslo otkrivanje novih alela HLA razreda I i II u tom iznimno polimorfnom sustavu.



Slika 1. Otkrivanje alela kroz povijest (preuzeto i prilagođeno prema (39)).

### 2.1.2. Značajke sustava HLA

Najvažnije značajke sustava HLA, koje patogenima otežavaju izbjegavanje imunološkog odgovora, su veliki broj različitih gena te njihov veliki polimorfizam. Tako je tom je sustavu otkriveno više od 250 različitih gena od kojih oko 40 % ima ulogu povezanu s imunološkim sustavom (40). To znači da svaki pojedinac posjeduje skup molekula MHC s velikim rasponom veznih mjesta za različite peptide. Polimorfizam znači da postoje mnogobrojne varijante unutar istog gena nazvane alelima te su zbog toga geni MHC najpolimorfiji dosad poznati genski sustav (26). Prema IPD-IMGT/HLA bazi podataka (39) najpolimorfiji lokus HLA razreda I je *HLA-B* s do sada otkrivenih 7967 različitih alela, a slijedi *HLA-A* s 6766 alela. Među alelima HLA razreda II najpolimorfiji je lokus *HLA-DRB1* s otkrivenih 2949 alela, a slijedi *HLA-DQB1* s 1997 alela (Slika 2.).



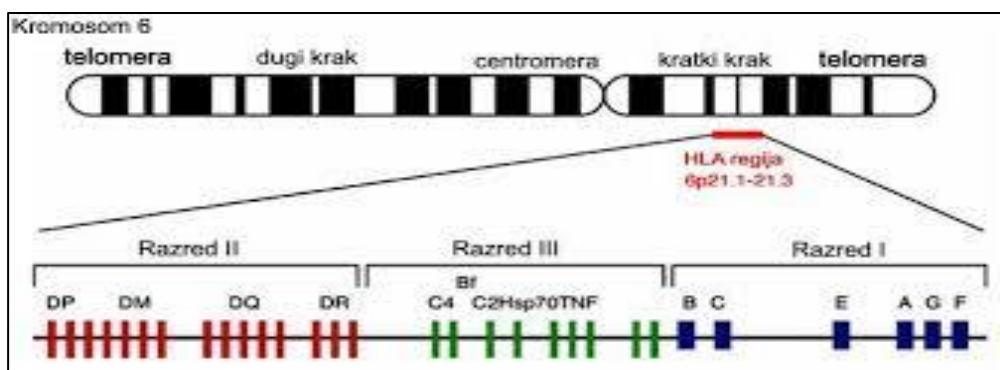
Slika 2. Raspodjela alela na lokusima HLA (prema (39)).

Većina HLA alela je srazmjerno učestala u populaciji pa je mala šansa da odgovarajući genski lokusi smješteni na oba homologna kromosoma neke osobe imaju iste alele (26). Zbog toga su većina osoba heterozigoti za gene koji kodiraju molekule HLA razreda I i II. Specifična kombinacija HLA alela nađen na jednom kromosomu se naziva haplotip. Jedna od osobitosti sustava HLA je i visok stupanj neravnoteže udruživanja zbog koje se različiti aleli dva ili više usko vezanih lokusa HLA javljaju češće u istom haplotipu HLA, nego što je to očekivano na osnovu njihovih pojedinačnih učestalosti (41, 42).

Geni HLA se nasljeđuju kodominantno što znači da pojedinac istovremeno na svojim stanicama izražava antigene koji potječu od gena naslijeđenih od oba roditelja (43). Nekoliko genetičkih mehanizama pridonosi stvaranju novih alela. Novi aleli nastaju točkastim mutacijama te zamjenom gena kada je tijekom mejoze sekvenca jednog gena zamijenjena sekvencom drugog gena (26). Kao rezultat svega navedenog teško je naći dva pojedinca koja nisu u srodstvu, a da imaju isti skup gena HLA.

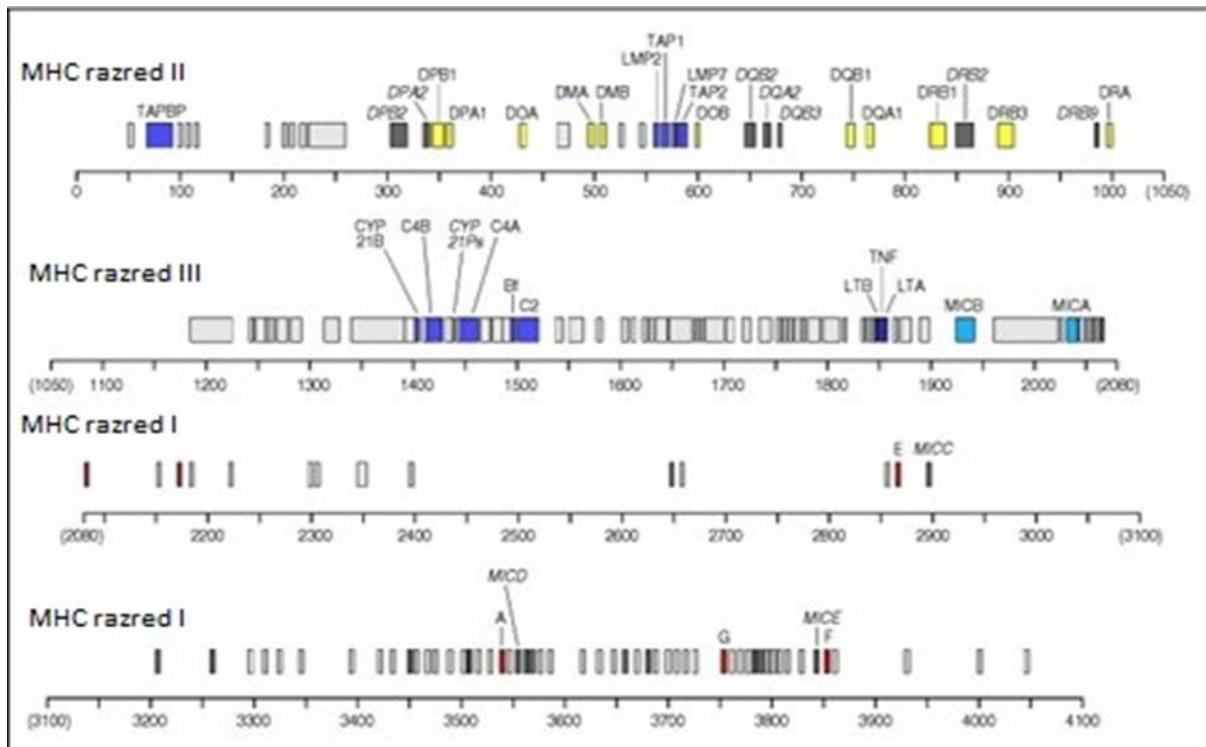
### 2.1.3. Organizacija sustava HLA

Geni HLA su smješteni na kraćem kraku kromosoma 6 na odsječku 6p21.3 gdje zauzimaju područje od četiri milijuna parova baza, što čini 0,13 % ljudskog genoma te sadrže 0,5 % (>150) od 32 000 poznatih gena koji kodiraju proteine (Slika 3.) (44).



Slika 3. Organizacija gena HLA na kromosomu 6. Prilagođeno prema (44).

Geni sustava HLA podijeljeni su u tri osnovne genske regije (45). Regija HLA razreda I, smještena na telomeričnom kraju sustava, sadržava klasične i neklasične gene HLA razreda I. Skupinu klasičnih gena HLA razreda I tvore geni HLA-A, -B i -C, čije molekule HLA odlikuje velika raznovrsnost i tkivna zastupljenost. Geni HLA-E, -F i -G dio su skupine neklasičnih gena HLA razreda I koji se tako zovu jer, za razliku od klasičnih gena HLA razreda I, njihovi produkti ne sudjeluju u predočavanju peptida limfocitima T. Oni su manje polimorfni i mnogi od tih gena se sada nazivaju HLA razred Ib (26).



Slika 4. Detaljni prikaz svih lokusa MHC (HLA). Preuzeto i prilagođeno prema (26).

Regija gena HLA razreda II nalazi se na suprotnom, centromeričnom kraju sustava i sadržava gene koji kodiraju *HLA-DR* (*DRA*, *DRB1* i, ovisno o haplotipu, *DRB3*, *DRB4*, ili *DRB5*), *HLA-DQ* (*DQA1*, *DQB1*) i *HLA-DP* (*DPA1*, *DPB1*) gene (Slika 4.) (45). Tu se nalaze i dva *TAP* (engl. *Transporter associated with antigen processing*) gena koja leže unutar regije gena razreda II blizu *PSMB8* i *PSMB9* (engl. *Proteasome 20S Subunit Beta 8, 9*) gena, dok gen koji kodira tapasin (*TAPB*) leži na rubu najbliže centromeri. (Slika 4.). Genska povezanost s genima MHC I (čiji produkti dostavljaju citosolne peptide na površinu stanice) s genima za TAP, tapasin i za proteosome (*PSMB* i *LPM*) (čiji produkti dostavljaju peptide iz citosola u endoplazmatski retikulum) pokazuju da je cijela regija MHC bila odabrana tijekom evolucije za obradu antigena te njihovo predočavanje (26). Geni *HLA-DMA* i *-DMB* kodiraju podjedinice HLA-DM molekula koje ubrzavaju vezanje peptida na molekule MHC razreda II, dok *HLA-DOA* i *-DOB* kodiraju molekule HLA-DO koje imaju regulatornu ulogu u tom procesu (43). Regija gena HLA razreda III, smještena između gena razreda I i II, sadržava velik broj gena različitih funkcija, kao npr. gene koji kodiraju komponente komplekta (C2, C4 i faktor B), čimbenike tumorske nekroze (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF) TNF  $\alpha$  i  $\beta$ , proteine toplinskog šoka (geni *HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPAIL*) te gene za steroidnu 21-hidroksilazu (45).



Sve stanice s jezgrom nose klasične molekule HLA razreda I. One su u velikim količinama izražene na mijeloidnim i limfoidnim stanicama, nešto manje na jetri, plućima i bubrezima, a najrjeđe na moždanim stanicama i mišićima skeleta (40). Kod ljudi, na površini citotrofoblasta posteljice nema antigena HLA-A i -B premda su se pojavili novi dokazi da bi se antigeni HLA-C možda mogli nalaziti na posteljici. No, na posteljici su izraženi HLA-G antigeni koji se još samo nalaze na epitelu timusa i na monocitima nakon aktivacije s  $\gamma$ -interferonom (40). Uloga HLA-G antigena na posteljici nije do kraja razjašnjena, pretpostavlja se da oni služe kao zamjena za alodeterminante koje nose klasične molekule HLA razreda I ili sudjeluju u preusmjeravanju potencijalno štetnog Th1 odgovora u Th2 tip odgovora (46).

Molekule HLA razreda II se nalaze samo na antigen-predočnim stanicama (APS) (limfocitima B, dendritičkim stanicama, makrofazima i epitelu timusa). Iako su molekule HLA razreda I izražene na stanicama s jezgrom, njihova ekspresija se može povećati interferonima tipa I (INF- $\alpha$  i INF- $\beta$ ) koji se stvaraju tijekom ranog prirodnog imunološkog odgovora na mnoge viruse (45, 47). INF- $\gamma$  može povećati ekspresiju molekula HLA razreda II na APS, a na stanicama kapilarnog endotela i mnogim drugim epitelnim stanicama potaknuti ekspresiju molekula HLA-razreda II i povećati količinu molekula HLA razreda I (48).

## 2.1.4. Organizacija gena i molekula HLA razreda I

### 2.1.4.1. Geni HLA razreda I

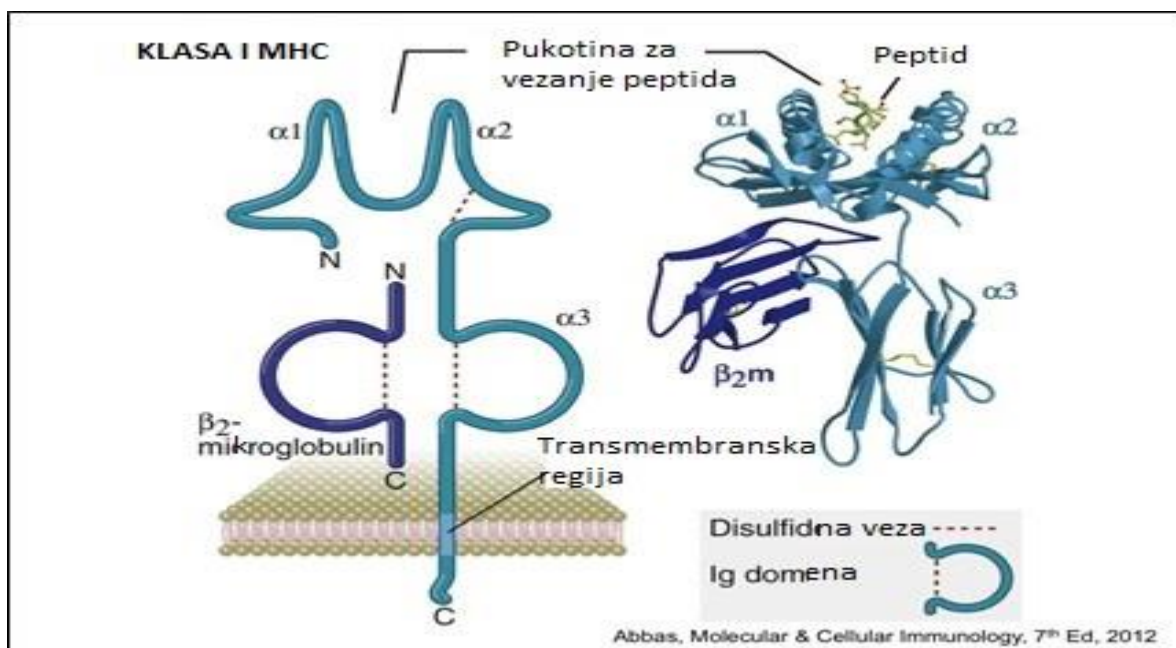
Geni koji kodiraju teški lanac molekule HLA razreda I imaju karakterističnu strukturu u kojoj su različite domene proteina kodirane s različitim egzonima (Slika 5.) (43). Na 5' kraju vodeći egzon kodira kratki signalni peptid koji olakšava umetanje  $\alpha$  lanca u endoplazmatski retikulum (engl. *Endoplasmic Reticulum*, ER) i koji se uklanja proteolitičkim enzimima prije nego što je molekula izražena na površini stanice. Nakon toga slijede tri izvanstanične domene ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ) kodirane egzonima 2, 3 i 4. Transmembranski dio peptida je kodiran egzonom 5, citoplazmatski kraj s egzonom 6 i 7, a 3' netranslacijski kraj s egzonom 8 (49).



Slika 5. Organizacija gena HLA razreda I. Kratice: L - vodeći slijed,  $\alpha 1$  - domena  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ -domena  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  - domena  $\alpha 3$ , TM - transmembranska regija; CYT - citoplazmatska regija. Preuzeto i prilagođeno prema (49).

### 2.1.4.2. Organizacija molekula HLA razreda I

Molekule HLA I razreda su građene od dva nekovalentno vezana polipeptidna lanca: teškog  $\alpha$  lanca od 45 kilodaltona (kDa) i lakog lanca  $\beta_2$  mikroglobulina od 12 kDa (Slika 6.) (43). Teški  $\alpha$  lanac građen od 350 aminokiselina, kodiran je genima MHC i sastoji se od tri dijela: karboksiterminalnog citoplazmatskog, kratkog hidrofobnog transmembranskog i izvanstaničnog s tri domene  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$ . Amino-terminalni  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  segment  $\alpha$  lanca stvaraju platformu od osam antiparalelnih  $\beta$  nabora razapetih između dvije duge paralelne  $\alpha$ -zavojnice. Takva struktura čini pukotinu s dugim  $\alpha$  spiralnim naborom sa strane te  $\beta$  pločom na dnu (50).



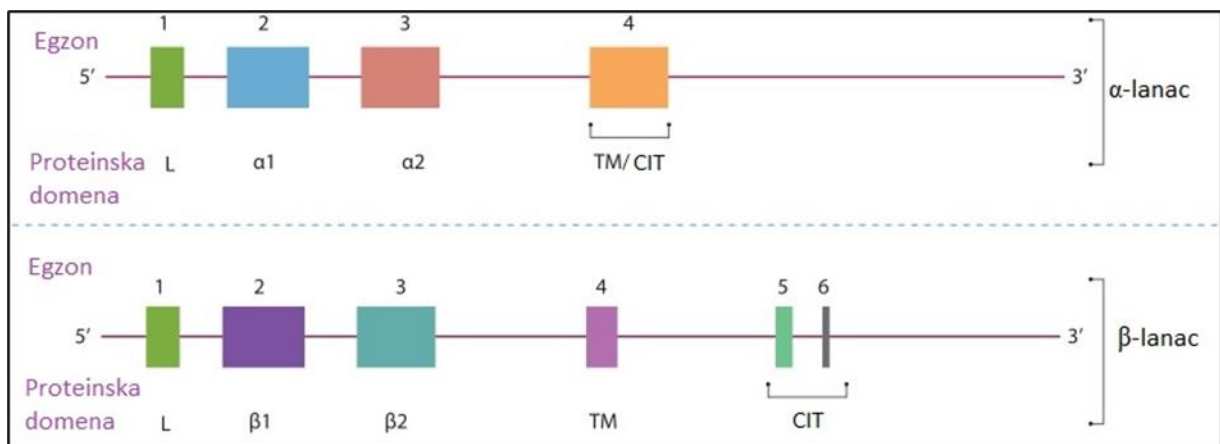
Slika 6. Shematska građa molekule HLA razreda I. Preuzeto i prilagođeno prema (45).

Ova pukotina za vezivanje peptida je smještena na površini molekule HLA razreda I i može vezati peptide veličine od 8 do 10 aminokiselina koji će biti predloženi limfocitima T te je upravo ona odgovorna za veliki polimorfizam molekula HLA razreda I (49). Geni za  $\beta_2$  mikroglobulin smješteni su na kromosomu 15.  $\beta_2$  mikroglobulin ne sadrži transmembransku regiju i nekovalentno je vezan za  $\alpha$  lanac molekule HLA razreda I.  $\beta_2$  mikroglobulin i  $\alpha_3$  domena su strukturno slični konstantnoj regiji imunoglobulina.  $\alpha_3$  domene sadrže sekvence koje reagiraju snažno s CD8 površinskim molekulama nađenim na citotoksičnim limfocitima T (51). Potpuno sastavljena molekula HLA razreda I je trimer koji se sastoji od  $\alpha$  lanca,  $\beta_2$  mikroglobulina te vezanog peptida i za stabilnu ekspresiju molekule potrebna je prisutnost sve tri komponente kompleksa (45).

## 2.1.5. Građa gena i molekula HLA razreda II

### 2.1.5.1. Organizacija gena HLA razreda II

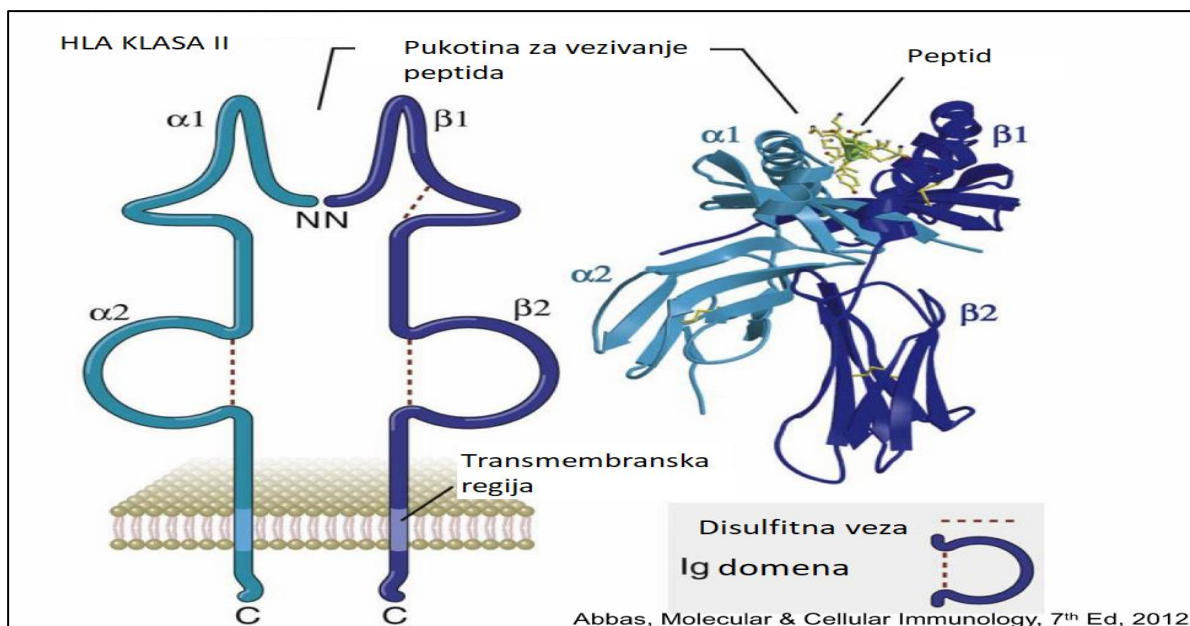
Molekule HLA razreda II su heterodimeri sastavljeni od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca. Organizacija gena HLA razreda II je slična organizaciji gena razreda I te su različite domene proteina kodirane s različitim egzonima (Slika 7.) (49). Geni  $\alpha$  i  $\beta$  lanca imaju sličnu strukturu: egzon 1 kodira vodeći protein, a egzoni 2 i 3 određuju dvije izvanstanične domene. Kod gena  $\beta$  lanca, egzon 4 određuje transmembransku domenu, a egzon 5 citoplazmatski kraj. Kod  $\alpha$  lanca, transmembranski i citoplazmatski kraj je kodiran egzonom 4 (52).



Slika 7. Organizacija gena HLA razreda II. Kratice: L- vodeći slijed;  $\alpha 1$  - domena  $\alpha 1$ ;  $\alpha 2$  - domena  $\alpha 2$ ;  $\beta 1$  - domena  $\beta 1$ ;  $\beta 2$  - domena  $\beta 2$ ; TM - transmembranska regija; CIT - citoplazmatska regija. Preuzeto i prilagođeno prema (49).

### 2.1.5.2. Građa molekula HLA razreda II

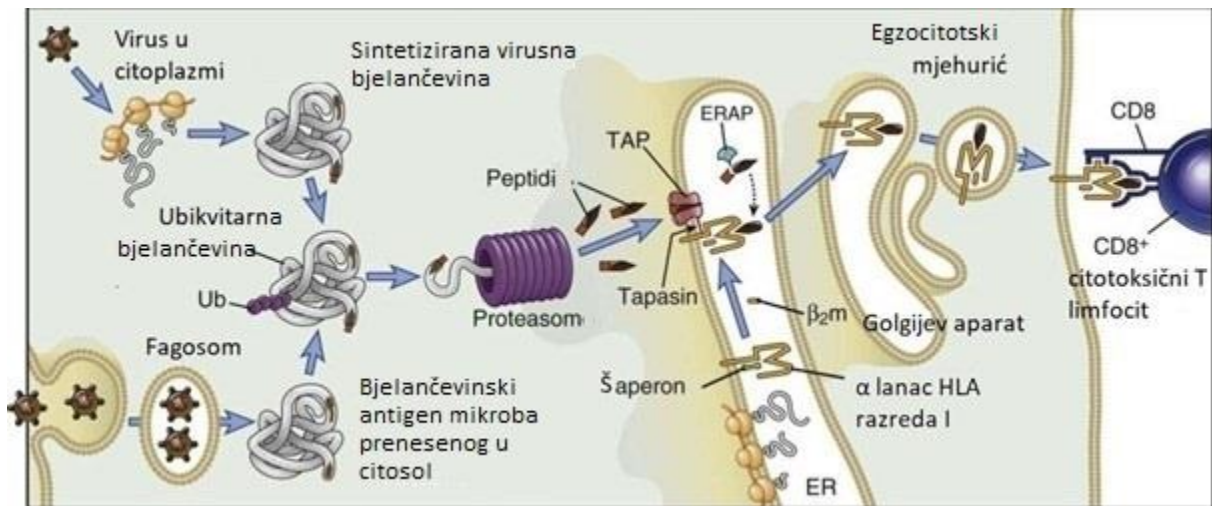
Molekule HLA razreda II se sastoje od dva različita polipeptidna lanca,  $\alpha$  lanca od 33 kDa i drugog  $\beta$  lanca od 28 kDa koji su povezani nekovalentnim vezama (Slika 8.) (53). Kao i kod molekula HLA razreda I, molekule razreda II su membranski vezani glikoproteini koji sadrže vanjsku domenu, transmembranski dio i citoplazmatski sidreni dio. Svaki lanac molekule HLA razreda II sadrži dvije vanjske domene:  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  na jednom, a  $\beta 1$  i  $\beta 2$  domene na drugom lancu.  $\alpha 2$  i  $\beta 2$  domene imaju imunoglobulinima sličnu strukturu te pripadaju imunoglobulinskoj superporodici.  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  domene formiraju pukotinu za vezivanje peptida. Kao i kod razreda I, pukotina za vezivanje peptida se sastoji od baze koju čini 8 usporednih  $\beta$  linija i stranice koje čine  $\alpha$  zavojnice. Budući da su krajevi pukotine koja veže peptid u molekuli HLA razreda II otvoreni, u njega se mogu smjestiti i peptidi veći od 30 aminokiselina (54).



Slika 8. Shematska građa molekule HLA razreda II. Preuzeto i prilagođeno prema (45).

### 2.1.6. Prerađivanje i predočavanje antigena molekulama HLA razreda I

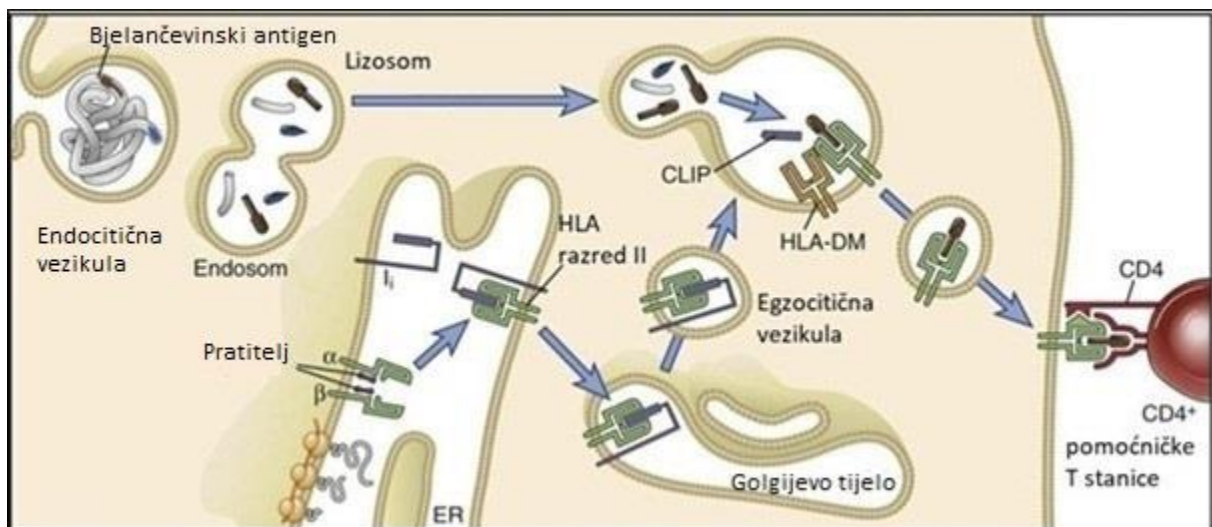
Molekule HLA razreda I vežu peptide i predočuju ih CD8<sup>+</sup> limfocitima T (40). Peptidi nastaju od bjelančevina mikroba (najčešće virusa) koji se repliciraju i preživljavaju u citosolu, izvanstaničnih bakterija koje ubacuju bjelančevine u citosol, bjelančevina oštećenih u staničnom stresu ili pogrešno sintetiziranih te starijih bjelančevina koji su na kraju svog staničnog ciklusa (55). Bjelančevine razgrađuju veliki enzimski kompleksi proteosomi u peptide koji se nakon toga prenose iz citosola u ER pomoću dimerne prijenosne bjelančevine nazvane TAP (Slika 9.) (56). Na luminalnoj strani membrane ER bjelančevina tapasin pomaže vezanju TAP bjelančevine s molekulom HLA razreda I. Nakon što aminopeptidaza ERAP (engl. *ER - resident aminopeptidase*) završno skрати polipeptid na prikladnu veličinu, on ulazi u pukotinu molekule HLA razreda I koja gubi afinitet za tapasin te se kompleks molekule HLA razreda I i peptida kroz Golgijev aparat prenosi u egzocitotskom mjehuriću na površinu stanice gdje će biti prepoznata od T- staničnih receptora (engl. *T Cell Receptor*, TCR) specifičnih CD8<sup>+</sup> limfocita T (57).



Slika 9. Put predočavanja unutarstaničnih proteina degradiranih u lizosomima molekulama HLA razreda I. Preuzeto i prilagođeno prema (45).

### 2.1.7. Prerađivanje i predočavanje antigena molekulama HLA razreda II

Većina peptida povezanih s molekulama HLA razreda II nastala su od bjelančevinskih antigena razgrađenih u endosomima i lizosomima antigen-predočnih stanica. Bjelančevine koji se na takav način unose u stanicu su: izvanstanični proteini uhvaćeni pomoću endocitoze, pinocitoze i fagocitoze; bjelančevine na površini stanica te unutarstanične bjelančevine uključene u autofagosome tijekom rutinskog procesa autofagocitoze (55) (Slika 10.).



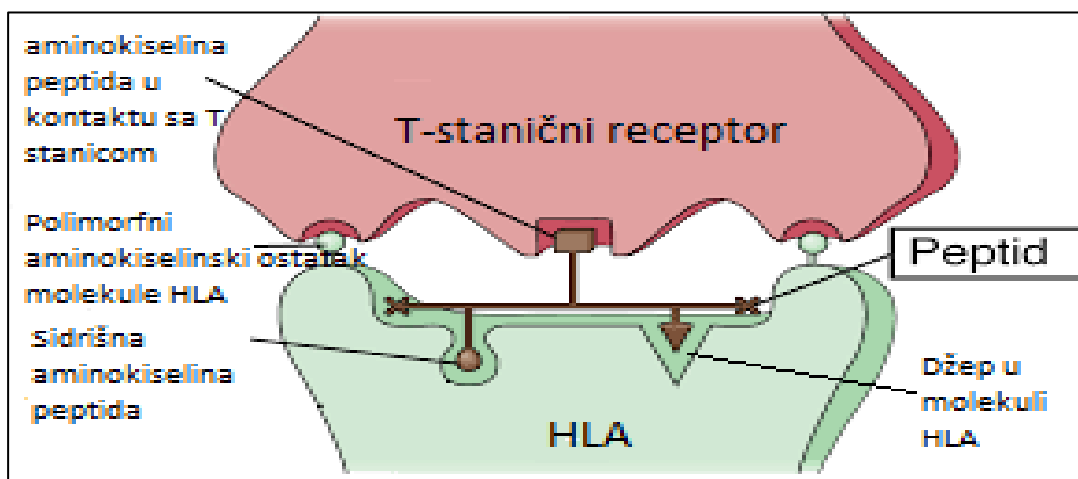
Slika 10. Predočavanje molekulama HLA razreda II. Preuzeto i prilagođeno prema (45).

Unesene bjelančevine enzimski se razgrađuju u kasnim lizosomima i endosomima kako bi se stvorili peptidi koji se mogu vezati u pukotine na molekulama HLA razreda II (45). Molekule

HLA razreda II su sintetizirane u ER i povezane s nepromjenjivim lancem (Ii) koji stabilizira molekulu HLA razreda II i sprječava vezanje peptida unutar ER. Kompleks molekule HLA i Ii lanca se usmjerava u Golgijev aparat, a zatim i u kasne endosome koji se nazivaju MIIC odjeljak (engl. *MHC Class II Compartment*). Tamo se trimerni Ii lanac cijepa pomoću katepsina, ostavljajući peptid CLIP (engl. *Class II-Associated Invariant Peptide*) koji je povezan s molekulom razreda II u peptid-vezujućoj puktni (58). CLIP se zamjenjuje s visoko afinitetnim antigenim peptidom pomoću molekule HLA-DM koja je također kodirana unutar MHC i ima strukturu sličnu molekulama HLA razreda II. HLA-DM nisu polimorfne i ne izražavaju se na površini stanica nego djeluju kao peptidni izmjenjivači, ubrzavajući odstranjivanje CLIP-a i zamjenu s peptidom antigena koji ima veći afinitet. Nakon što su molekule HLA razreda II stabilizirane peptidima koje su vezale, dostavljaju se na površinu APC gdje su predočene CD4<sup>+</sup> limfocitima T (59).

### 2.1.8. T- stanično prepoznavanje kompleksa molekule HLA i peptida

Specifično prepoznavanje kompleksa molekule HLA i peptida je posredovano  $\alpha\beta$  TCR na CD8<sup>+</sup> limfocitima T koji vežu molekule HLA razreda I te TCR na CD4<sup>+</sup> limfocitima T koji vežu molekule HLA razreda II. Većina limfocita T prepoznaje peptide, ali ne i druge molekule jer se peptidi vežu za molekule HLA. Stanice T prepoznaju linearne peptide jer se konformacijske determinante bjelančevinskih antigena gube tijekom stvaranja tih peptida (45).



Slika 11. Model T-staničnog prepoznavanja kompleksa molekule HLA i peptida. Preuzeto i prilagođeno prema (45).

Kod većine molekula HLA  $\beta$  nabori na dnu pukotine sadržavaju džepove u koje se umeću aminokiselinski ostaci peptida, a druge peptidne aminokiseline mogu sadržavati postranične lance koji se vežu u specifične džepove molekule HLA i nazivaju se sidrišnim aminokiselinama (Slika 11.) (45). Svaki peptid ima jednu do dvije takve sidrišne aminokiseline i to vjerojatno povećava veću varijabilnost ostalih aminokiselinskih ostataka koje zapravo prepoznaju specifični limfociti T (40).

Budući da su molekule HLA vrlo polimorfne, razlike u molekulama HLA među različitim osobama utječu na vezivanje peptida kao i na prepoznavanje stanicama T. Između velikog broja različitih molekula HLA, pojedinačni limfocit T može prepoznati specifični peptid koji predočuje samo jedna molekula HLA. Tu pojavu nazivamo spregnuto prepoznavanje ili spregnutost na molekule HLA (43). TCR prepoznaje nekoliko struktura: dio peptida koji strši iz otvorenog gornjeg dijela pukotine molekule HLA te polimorfne aminokiselinske ostatke molekule HLA (Slika 11.). Peptid je odgovoran za finu specifičnost prepoznavanja antigena, dok su polimorfni aminokiselinski ostaci molekula HLA odgovorni za spregnuto prepoznavanje (26).

### **2.1.9. Nazivlje sustava HLA**

Već u počecima istraživanja je uočeno da su geni koji kodiraju HLA molekule vrlo polimorfni i da postoji potreba za sistematizacijom nazivlja (60). Za imenovanje novih gena odnosno alela osnovan je Odbor za imenovanje Svjetske zdravstvene organizacije WHO (engl. *HLA Nomenclature Committee*). Odbor se prvi put sastao 1968. godine i uspostavio kriterije za redovite sastanke. Do sada je izdano 19 izvješća u kojima su dokumentirani antigeni, geni i aleli HLA (60).

Nazivlje sustava HLA se definira prema metodama koje se upotrebljavaju. Antigeni HLA, utvrđeni serološkim metodama označavaju se nazivom genskog lokusa (npr. HLA-A, HLA-DR), zatim slijedi brojana oznaka antigena (npr., HLA-A1, HLA-DR1). U nazivlju za C lokus se nalazi i slovo "w" (npr. HLA-Cw1, HLA-Cw2) da bi se razlikovao od komponenti komplementa (49).

Svaki naziv alela HLA ima jedinstveni broj koji se sastoji do četiri skupa znamenki odvojenih dvotočkom (Tablica 1.) (39). Nomenklatura za alele HLA razlikuje se prema razredu. Za alele HLA razreda I oznaka *HLA-A*, *HLA-B*, i *HLA-C* se upotrebljava da se označe genski lokusi. Zvezdica (\*) znači da je određivanje provedeno molekularnom metodom na razini DNA (npr. *HLA-A\**), a nakon toga slijede 2 do 8 znamenki: prve dvije znamenke predstavljaju pojedini

gen odnosno alelnu skupinu, (npr. *HLA-A\*02*). Treća i četvrta znamenka se odnose na specifični alel (npr. *HLA-A\*02:01*). Peta i šesta znamenka opisuju alelne varijacije, a sedma i osma predstavljaju varijacije u intronima (49).

Nazivlje za alele razreda II nije potpuno isto kao i za alele HLA razreda I. Nakon oznake HLA i genskog lokusa, slovo "A" ili "B" predstavljaju polimorfni  $\alpha$  i  $\beta$  lanac (npr. *HLA-DQA*, *HLA-DRB*, *HLA-DPB*). Budući da neki lokusi imaju nekoliko gena za  $\alpha$  i  $\beta$  lanac, svaki lokus se označava pripadajućim brojem (npr. *HLA-DQB1*). Slijedi 4 do 8 znamenki nakon (\*) (npr. *HLA-DQB1\*03:01*) s istim značenjem kao i kod HLA razreda I (49).

Pored jedinstvenog broja, postoje dodatni sufiksi koji se mogu dodati alelu kako bi označili da li je izražen ili ne. Aleli za koje se pokazalo da nisu izraženi - "null" aleli - dobili su sufiks 'N'. Aleli za koje se pokazalo da su alternativno izraženi mogu imati sufiks 'L', 'S', 'C', 'A' ili 'Q': aleli s niskom ekspresijom (L), topivi aleli (S), aleli koji se mogu naći u citoplazmi (C), oni s upitnom ekspresijom (Q) ili pak aleli s aberantnom ekspresijom (A) (Tablica 1.) (39).

Tablica 1. Nazivlje HLA sustava. Prevedeno prema (39).

Nazivlje HLA sustava	
HLA	HLA regija i prefiks za gene HLA
<i>HLA-DRB1</i>	pojedinačni HLA lokus npr. DRB1
<i>HLA-DRB1*13</i>	Grupa alela koja kodira DR13 antigen ili sekvenca homologna drugim <i>DRB1*13</i> alelima
<i>HLA-DRB1*13:01</i>	Specifični alel HLA
<i>HLA-DRB1*13:01:02</i>	Alel koji se razlikuje od <i>DRB1*13:01:01</i> alela po istoznačnoj mutaciji
<i>HLA-DRB1*13:01:01:02</i>	Alel koji sadrži mutaciju izvan kodirajuće regije <i>DRB1*13:01:01:01</i>
<i>HLA-A*24:09N</i>	„Null“ alel - alel koji nema ekspresiju
<i>HLA-A*30:14L</i>	Alel koji kodira protein sa značajno niskom ekspresijom na površini stanice
<i>HLA-A*24:02:01:02L</i>	Alel koji kodira protein sa značajno niskom ekspresijom na površini stanice, pri čemu je mutacija izvan kodirajuće regije
<i>HLA-B*44:02:01:02S</i>	Alel koji kodira protein koji je izražen samo kao topiva molekula
<i>HLA-A*32:11Q</i>	Alel čija mutacija od prije dokazano ima značajan utjecaj na ekspresiju na površini stanice, te je njegova ekspresija upitna (engl. <i>Questionable</i> )



## **2.2. Multipla skleroza**

### **2.2.1. Uvod**

Multipla skleroza (MS) je najčešća netraumatska kronična upalna bolest središnjeg živčanog sustavu (SŽS) koja pogađa mlađu odraslu populaciju (61). Kod žena je učestalost tri puta veća nego kod muškaraca, kod postavljanja dijagnoze medijan dobi je 30 godina, a otprilike 5 % pacijenata je ispod 19 i isto toliko preko 50 godina (62, 63). MS je složena bolest i pretpostavlja se da genski čimbenici skupa s okolišnim, doprinose etiopatogenezi ove kompleksne i heterogene bolesti, iako potpuna uzročno posljedična veza nije do kraja razjašnjena (64).

MS je povijesno klasificirana kao autoimuna bolest posredovana limfocitima T. Međutim, uspješnost terapije usmjerene na limfocite B mijenja ustaljenu dogmu o T-limfocitima posredovanoj autoimunosti. Pretpostavlja se da je autoimuna patogeneza bolesti obilježena migracijom perifernih T i B limfocita u SŽS gdje reagiraju na jedan ili više nepoznatih mijelinskih ili neuronskih antigena uzrokujući upalu koja uzrokuje demijelinizaciju, gubitak aksona i kraj neuronalne dehidracije (65). Tradicionalno se smatra bolešću s dva stadija: oštra upala odgovorna za relapsno–remitirajući oblik te odgođena neurodegeneracija koja uzrokuje nerelapsirajuću progresiju kao npr. u sekundarno i primarno-progresivnoj MS (66).

### **2.2.2. Etiologija MS**

Iako točan uzrok MS nije poznat, obzervacijska istraživanja su pokazala da okolišni čimbenici igraju značajnu ulogu u patogenezi MS uključujući izlaganje ultraljubičastom B zračenju, smanjenu količinu vitamina D u plazmi, infekcije, posebno Epstein–Barr virusnu infekciju, prekomjernu tjelesnu težinu, pušenje te povećan unos soli (67).

Od okolišnih čimbenika još se spominju i zemljopisna širina - prevalencija i incidencija rastu s većom zemljopisnom širinom koja se odnosi na sezonske izmjene izloženosti suncu, a time i vitaminu D (68). Migracijska istraživanja su također pokazala da utjecaj okoliša doprinosi mogućem nastanku MS. Rizik za MS je veći u odraslih osoba nakon preseljenja iz područja s niskim rizikom u zemlju s visokim rizikom za nastanak MS, a još je veći kod njihovog potomstva ako od početka žive u zemlji s visokim rizikom za MS (69).

Istraživanja su pokazala da i dob preseljenja utječe na rizik od MS. Doseljenici koji su se preselili prije punoljetnosti stekli su rizik svoje nove domovine, dok oni koji se presele u odrasloj dobi zadržavaju rizik zemlje prije preseljenja (70).

Munger i sur. su pokazali da veći unos vitamina D (oko 700 IU dnevno) za 33 % smanjuje incidenciju MS u usporedbi s nižim unosom vitamina D. Također su i visoke vrijednosti 25-hidroksivitamina D u krvi povezane sa smanjenim rizikom i kasnijim početkom bolesti (71).

Simptomatska EBV infekcija (infektivna mononukleoza) udvostručuje šansu za razvoj MS (72). U studiji Ascheri-ja i sur. gotovo svi pacijenti s MS (> 99 %) su imali infekciju s EBV u usporedbi s kontrolnom skupinom, a relativni rizik za MS u EBV negativnih pacijenata bio je jako nizak (OR, 0,06; 95 %CI, 0,03-0,13) (73). Količina anti-EBV protutijela također ima značajnu ulogu u nastanku MS, pacijenti s većim titrom protutijela imaju i veći rizik za nastanak MS (74). I neki drugi virusi se spominju u patogenezi MS, ali za niti jedan povezanost s nastankom MS nije do kraja razjašnjena. Neki mogu djelovati kroz molekularnu mimikriju, dok drugi mogu interferirati s mehanizmom koji normalno ograničava autoreaktivne stanice T (75, 76).

Debljina i pušenje se također dovode u vezu s većim rizikom od MS. Pušenje povećava rizik za otprilike 50 %, te može objasniti za 40 % povećanje incidencije obolijevanja u žena nakon Drugog svjetskog rata (77). Istraživanja su pokazala da su organska otapala i pušenje duhana, za razliku od žvakanja, povezana s nastankom MS uspostavljajući hipotezu da ti agensi uzrokuju post-translacijsku modifikaciju kroz predočavanje antigena u plućima (77).

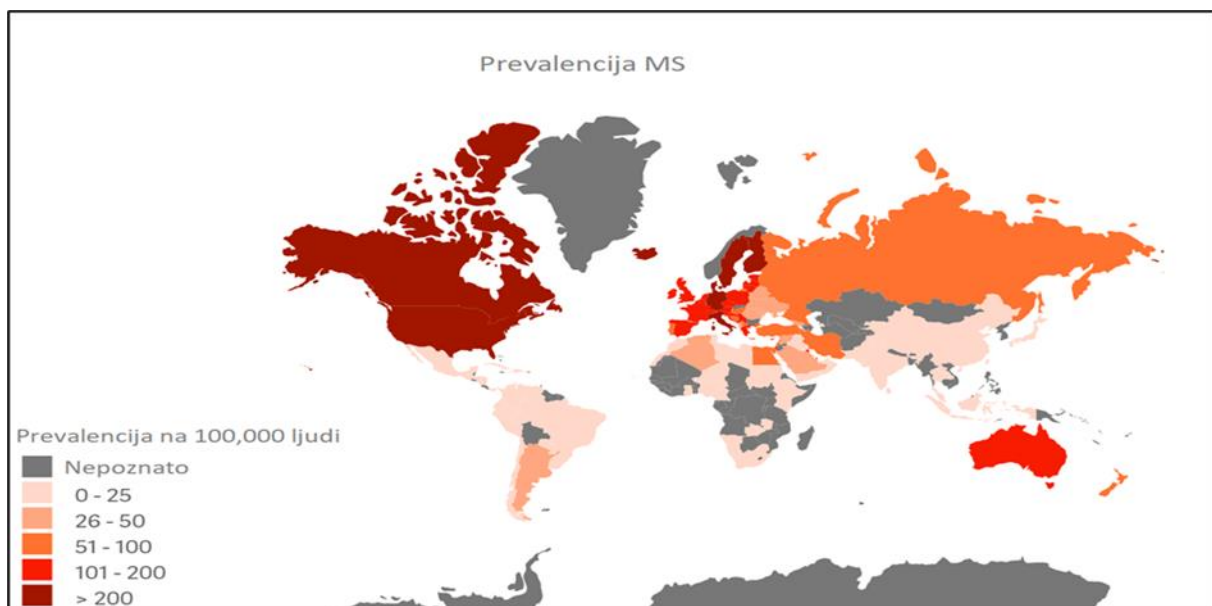
Nekoliko studija je pokazalo da pretilost u ranom djetinjstvu i pubertetu povećava podložnost za MS kod žena. U Sjedinjenim Američkim Državama te u Švedskoj su autori došli do zaključka da osobe koje imaju indeks tjelesne mase (ITM)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  u dobi od 18-20 godina imaju 2,25 puta veći rizik za razvoj MS u usporedbi s osobama koje imaju normalan ITM (78–80). Biološki mehanizmi koji povezuju pretilost i MS su nepoznati, međutim nekoliko hipoteza je predloženo. Pretilost obilježava kronična blaga upala, a kod pretilosti u pubertetu, visoka koncentracija C-reaktivnog proteina, interleukina-6 te leptin podržavaju proupalno stanje (81). Još jedna hipoteza govori o sniženim koncentracijama cirkulirajućeg vitamina D koja se često uočava kod pretilih osoba, a koja također može dovesti do povećane podložnosti za MS (82).

I vrsta prehrane utječe na rizik od pojave MS. Mateljan i sur. proučavajući incidencije i prevalencije MS u Hrvatskoj, uočili su da je incidencija u kontinentalnoj Hrvatskoj veća nego u mediteranskoj Hrvatskoj. Iznijeli su pretpostavku da mediteranska dijeta koja je obilježena većim konzumiranjem povrća, voća i ribe te maslinovog ulja povoljno utječe na smanjenje rizika od MS. Oleokantal, fenolni sastojak ekstra djevičanskog maslinova ulja povoljno djeluje inhibicijom ciklooksigenaznih enzima COX-1 i COX-2 koji pridonose demijelinizaciji (83).

O genskoj podlozi govori činjenica da jedan od osam bolesnika s MS ima obiteljsku povijest MS (84). Sadovnick i sur. su pokazali da osobe kojima ili roditelji ili braća ili sestre imaju MS imaju 3-5 % veći rizik od nastanka MS u usporedbi s 0,1 % u općoj populaciji, dok su Hansen i sur. opisali pojavu MS kod jednojajčanih blizanaca u 20-39 % slučajeva (85, 86). Genske varijacije u regiji HLA na kromosomu 6 pokazale su najjači genetički utjecaj na razvoj MS, a povezanost se događa kroz složeno međudjelovanje između gena koji povećavaju ili smanjuju rizik za obolijevanje od MS (87). GWAS studije su identificirale više od 200 genskih varijanti koji povećavaju rizik od MS, među njima je najznačajniji *HLA-DRB1\*15:01*. Većina podložnih alela su povezana s genima koji sudjeluju u imunološkom putu (8).

### 2.2.3. Epidemiologija MS

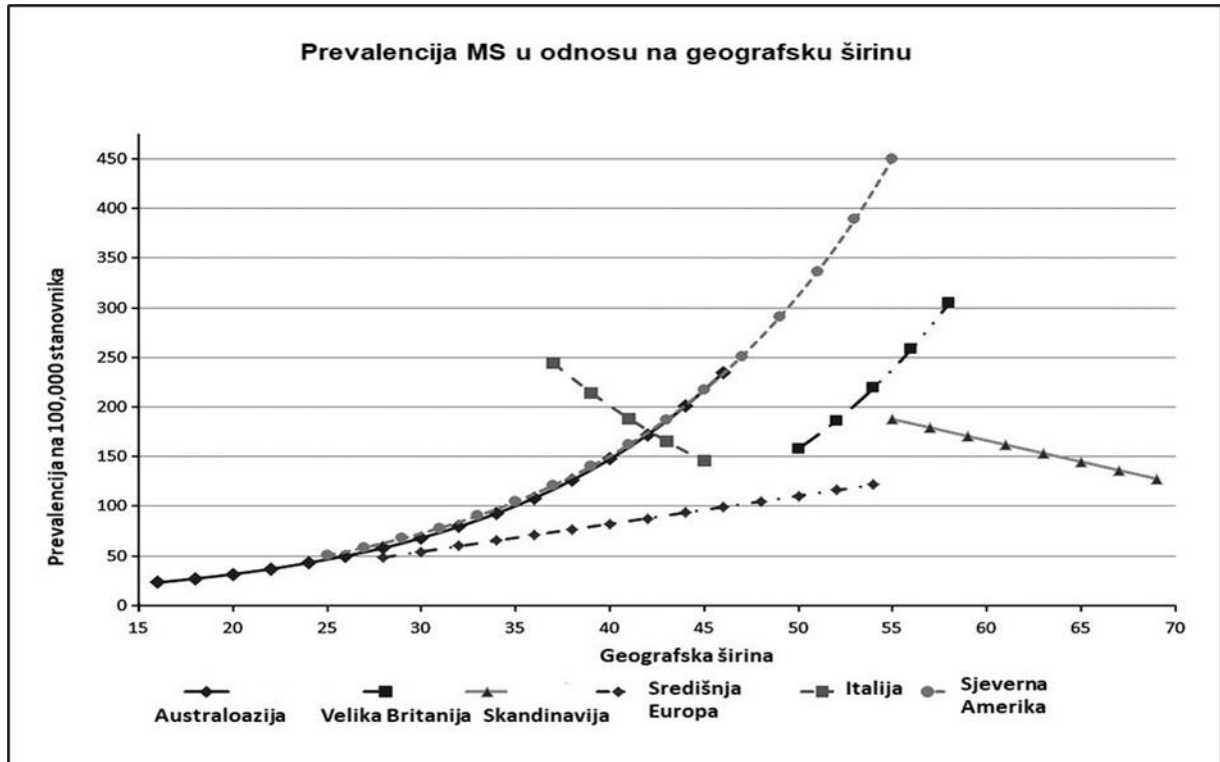
MS je bolest koja je rasprostranjena širom svijeta, međutim, podaci o incidenciji i prevalenciji se razlikuju između regija i populacija (Slika 12.). Prevalencija bolesti je u porastu kako u razvijenim tako i u zemljama u razvoju (66).



Slika 12. Prevalencija MS u svijetu. Preuzeto iz (88) (<https://www.atlasofms.org> )

Globalna prevalencija MS je 36 na 100,000 ljudi te se iz toga pretpostavlja da je na svijetu u 2020. godine 2,8 milijuna ljudi bolovalo od MS (89). Rezultati meta-analiza pokazuju da se incidencija MS s vremenom povećava te je 2013. godine taj broj iznosio 2,3 milijuna oboljelih od MS. Povećanje se najviše odnosi na povećanje incidencije prvenstveno kod žena (35–37). Prevalencija MS varira ovisno o zemljopisnoj širini, etničkim grupama te rasi (90, 91). Velik

broj studija pokazao je da prevalencija raste kako se udaljavamo od ekvatora prema zapadu ili jugu. Dijelovi Azije, Afrike i Južne Amerike koji leže na ekvatoru imaju najnižu prevalenciju MS, dok Kanada i Škotska imaju najveću (Slika 13.).



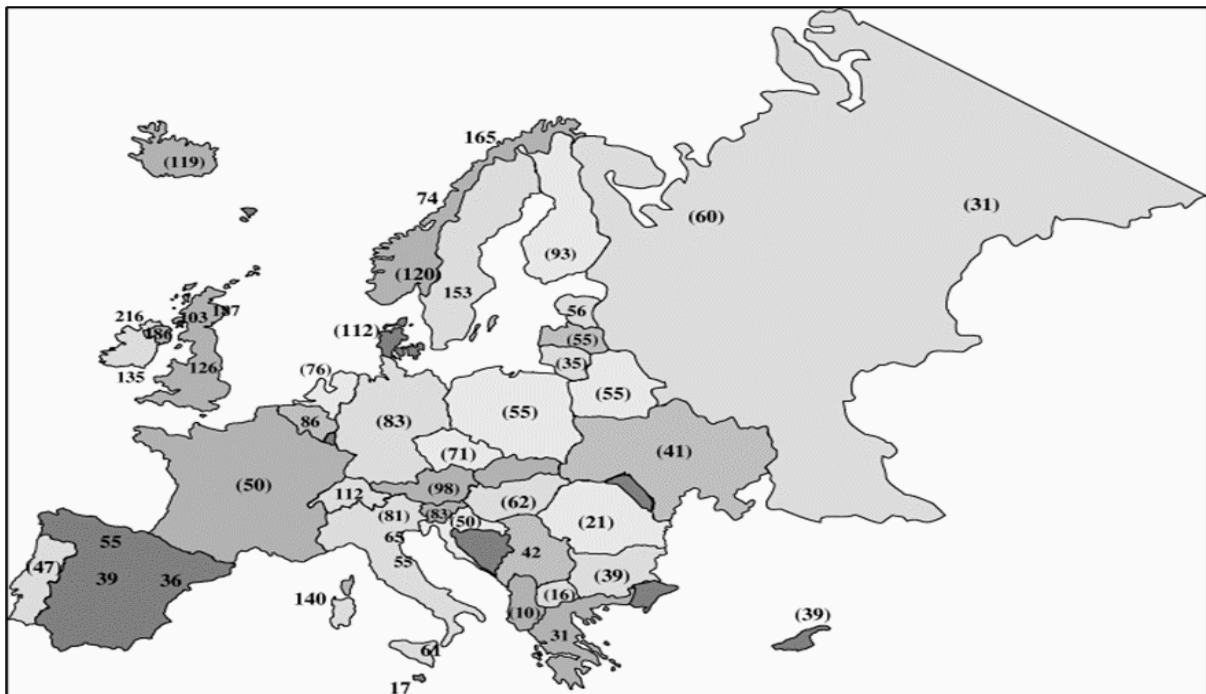
Slika 13. Prevalencija MS u odnosu na zemljopisnu širinu (preuzeto iz (91))

Pretpostavlja se, kako je već rečeno, da ljudi koji žive na većim geografskim širinama mogu primiti manju količinu sunčevog zračenja te zbog toga imaju manje količine vitamina D (91). To su potvrdile studije iz Australije, Novog Zelanda, Japana, Europe i Sjeverne Amerike, dok je u istraživanjima u mediteranskoj Europi među stanovnicima Sardinije, narodom Parsi u Indiji i kod Palestinaca nađena veća prevalencija, a u zapadnoj Skandinaviji među Sammi narodom u Finskoj, Norveškoj i Švedskoj, Kineza, Japanaca, Afroamerikanaca te Maora na Novom Zelandu, manja prevalencija nego što bi se očekivalo u odnosu na zemljopisnu širinu (90, 92–99). Pregledni članci iz 2003., 2008. i 2010. godine su također dali suprotne zaključke. Zivadinov i sur. su 2003. godine te Koch-Henriksen i Sørensen 2010. godine došli do zaključka da ne postoji povezanost između incidencije i geografske širine, dok Alonso i Herman 2008. godine uočavaju statistički značajnu razliku između incidencije i zemljopisne širine (68, 100, 101).

U velikoj meta-analizi 2011. godine Simpson i sur. obrađuju 650 podataka o prevalencijama analizirajući i prethodne meta-analize, razloge različitih zaključaka o povezanosti te donose zaključak da ipak postoji statistički značajna povezanost između incidencije i prevalencije MS i geografske širine dok Rosati i sur. ukazuju da osim geografske širine i različite rasne i etničke osobine utječu na pojavu MS u nekoj regiji (90, 102).

### 2.2.3.1. Prevalencija MS u Europi

Europa se smatra regijom s visokom prevalencijom MS u kojoj živi nešto više od polovice svih bolesnika koji boluju od MS (103). Najveću prevalenciju imaju zapadni dijelovi Velike Britanije te skandinavske zemlje te ona opada što se približavamo jugu Europe (Slika 14.) (103).



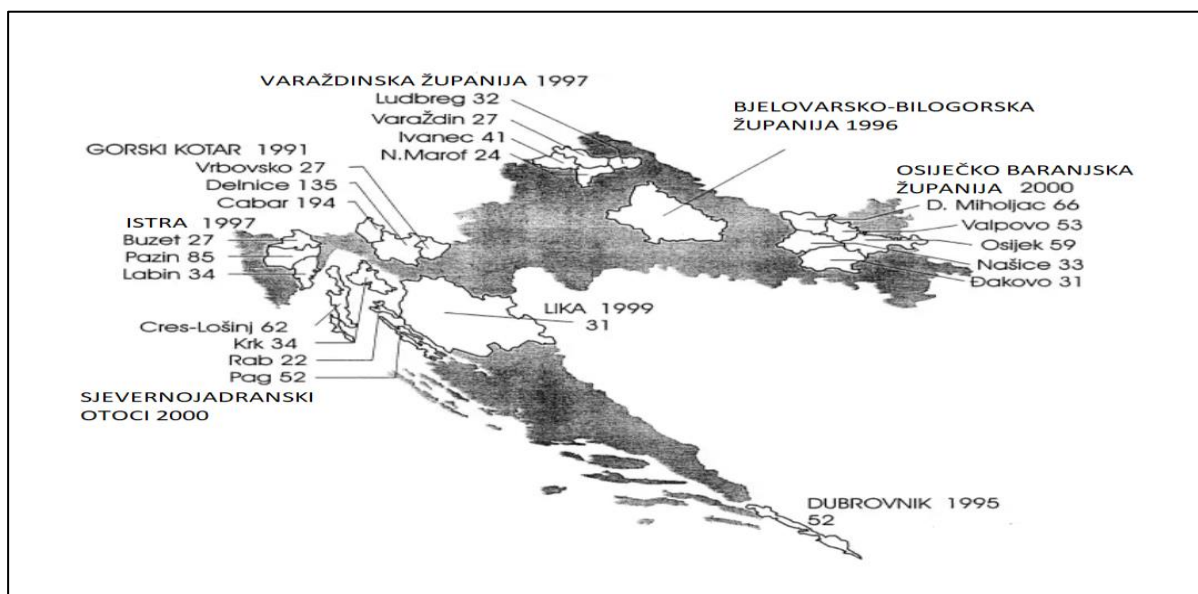
Slika 14. Prevalencija MS u Europi (preuzeto iz (103))

U Italiji se prevalencija MS kreće od 15,78 na 100,000 stanovnika do 197,8 na 100,000 stanovnika s najvećima varijacijama prevalencije na Siciliji (104, 105). Na Sardiniji je zabilježena najveća prevalencija u odnosu na ostatak Italije koja je bila iznad 100 na 100,000 stanovnika (106, 107). Što se tiče Britanskih otoka, prevalencija se kreće od 96/100,000 na otocima Guernsey i Jersey pa do 200/100,000 stanovnika u Škotskoj i Sjevernoj Irskoj (108–110). Najveća prevalencija MS (preko 200/100,000) u zemljama nordijske regije je zabilježena u zapadnom dijelu Finske te sjevernim seoskim područjima Švedske (111, 112). Novija

istraživanja iz Norveške, Danske i Švedske govore o prevalenciji 150/100,000 (113–115). Na Pirenejskom poluotoku najranije studije iz 1980. godine su ukazivale na prevalenciju 15/100,000 na Kanarskim otocima te u španjolskom gradu Valenciji, međutim prevalencija je rasla tijekom godina te je u istraživanjima iz 2003. i 2007. godine iznosila 72 i 77 na 100,000 stanovnika (116–119). U Belgiji je prevalencija 80/100,000 dok je prosječna prevalencija u Francuskoj 94,7/100,000 stanovnika (92, 120). Prevalencija MS u zemljama središnje Europe (Švicarska, Njemačka, Austrija i Mađarska) se kreće od 62/100,000 u Mađarskoj do 128/100,000 u Njemačkoj (121–125). U zemljama južne Europe prevalencija se kreće od 20/100,000 u Rumunjskoj, 39/100,000 u Bugarskoj dok je u Grčkoj prevalencija porasla s 38,9/100,000 prema istraživanju Piperidou iz 2003. god. na 120/100,000 kako navodi istraživanje iz 2008. godine (126–128). U susjednoj Bosni i Hercegovini prevalencija iznosi 27 i 30,9/100,000 stanovnika (129, 130) dok je zajedničko istraživanje obiteljskog oblika MS iz 2006. provedeno u Hrvatskoj (Gorski Kotar) i susjednoj pokrajini Kočevje u Sloveniji pokazalo prevalenciju od 151,9 na 100,000 stanovnika (131).

### 2.2.3.2. Prevalencija u Hrvatskoj

Podaci o prevalenciji MS u Hrvatskoj se baziraju na nekoliko manjih studija provedenih od 1991. do 2002. godine koje su pobrojali Materljan i suradnici i u kojima se uočava da je raspodjela MS heterogena s najvećom prevalencijom u regiji Gorskog kotara 122,4/100,000 (132) (Slika 15.).



Slika 15. Prevalencija MS u Hrvatskoj od 1991.-2000. Preuzeto i prilagođeno prema (132).

U Osječko-Baranjskoj županiji je prevalencija iznosila 49,9/100,00 stanovnika, u Varaždinskoj županiji 29,4/100,000, na sjevernojadranskim otocima 48/100,000, u Lici 30,6/100,000, u Istri 53,3/100,000 te u Dubrovačko-neretvanska županija 24,5/100,000 stanovnika (133–136).

Benjak i sur. su 2018. godine proveli istraživanje MS u Hrvatskoj analizirajući podatke iz nacionalnih registara pacijenata (Centralni zdravstveni informacijski sustav Republike Hrvatske, podaci Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo te Saveza društava multiple skleroze Hrvatske) (137). Oni su utvrdili da je ukupna prevalencija MS u Hrvatskoj 143,8 na 100,000 ljudi što čini Hrvatsku zemljom s visokom prevalencijom.

### **2.2.3.3. Povezanost MS sa spolom**

Što se tiče razdiobe prema spolu, u većini studija u Europi je učestalost veća u žena s omjerom 3:1 (2). U studiji provedenoj u Hrvatskoj Benjak i sur. su 2018. godine, među 6160 pacijenata koji boluju od MS, našli da je 72 % bilo žena (omjer žene/muškaraci 2,49) (137).

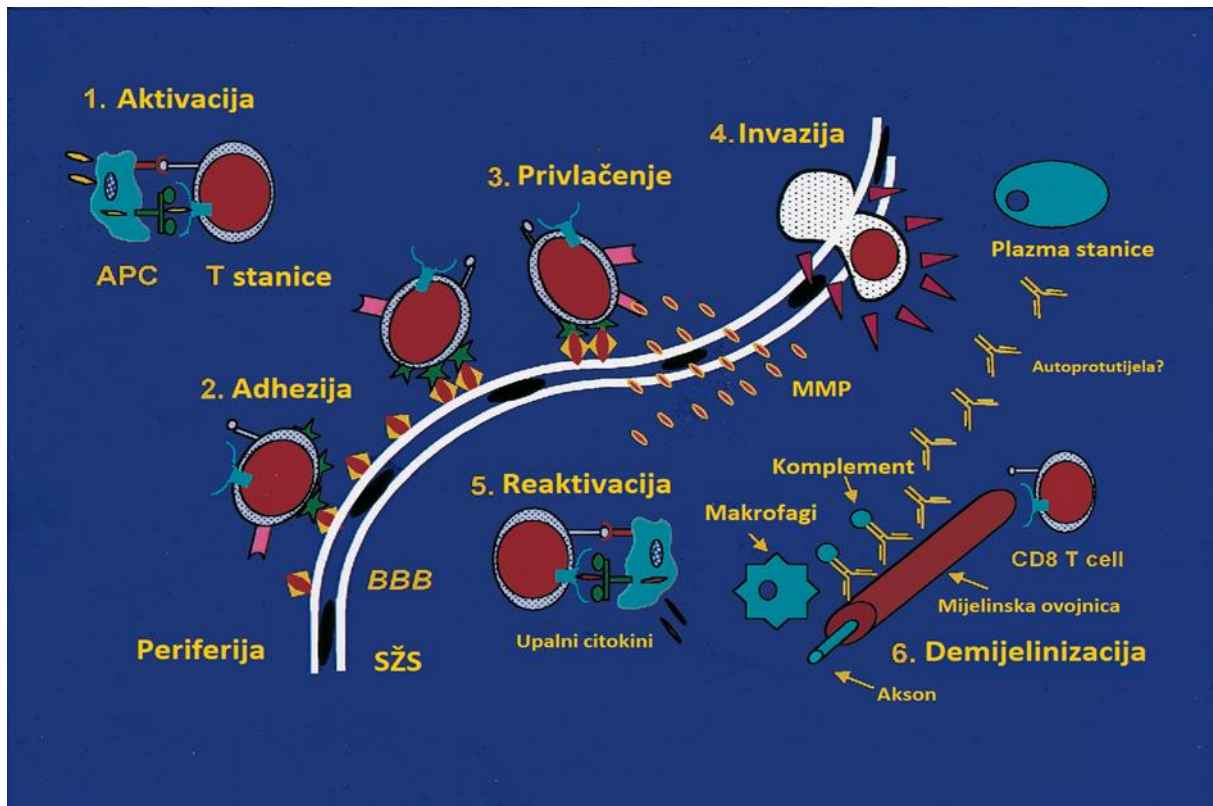
### **2.2.4. Imunopatogeneza MS**

Sastav plakova, odgovor na terapiju i životinjski model eksperimentalnog alergijskog encefalitisa (engl. *Experimental Allergic Encephalomyelitis*, EAE) ukazuju da je ključni događaj u patogenezi MS aktivacija autoreaktivnih mijelin specifičnih CD4<sup>+</sup> limfocita T (138). Nije poznat uzrok aktivacije autoreaktivnih limfocita T. Pretpostavlja se da su mijelinski bazični protein (MBP), mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (engl. *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*, MOG) i proteolipidni protein glavni antigeni na koje su usmjereni autoreaktivni CD4<sup>+</sup> limfociti T (3).

Pomoćnički limfociti T tipa 1 (Th1) i tipa 17 (Th17) CD4<sup>+</sup> stanica T imaju glavnu ulogu na molekularnom nivou kao geni kandidati za razvoj MS zahvaljujući polimorfizmu gena koji kodiraju ključne regulatorne molekule NF-κB (nuklearni čimbenik kapa-B) signalnog puta (139).

Aktivirani autoreaktivni limfociti T izražavaju na svojoj površini adhezivne molekule koje im omogućuju vezanje na endotelno-moždanu barijeru (engl. *Endothelium-Brain Barrier*, EBB) (Slika 16.) (140). U isto vrijeme aktivirani limfociti T proizvode enzime matriks metaloproteinaze (MMP) koji uzrokuju otvore u EBB, ometajući polupropusnost i posljedično omogućavaju aktivaciju limfocita T u moždanom parenhimu (141). Mikroglije u SŽS predočavaju mijelinski bazični protein (MBP) aktiviranim limfocitima T koji uslijed

reaktivacije otpuštaju proupalne citokine koji pridonose daljnjom pogoršanju polupropusnosti EBB i nastanku upalnih lezija (142).



Slika 16. Imunopatogeneza MS. Preuzeto i prilagođeno prema (141).

Iako se HSV-6, virus herpes zoster, John Cunningham virus (JCV), *Mycoplasma pneumoniae* i *Chlamydia pneumoniae* dovode u vezu s MS, EBV se ipak najčešće spominje (143) kako je već opisano u pod-poglavlju 2.2.2. Analiza imunološkog odgovora pokazala je prisutnost limfocita T koji pokazuju specifičnost za MBP kao i za EBV jezgreni antigen 1 (engl. *EBV nuclear antigen 1*, EBVNA1) (144). Lang i sur. su pokazali da T stanični receptor kod pacijenata s MS prepoznaje molekulu HLA-DR15 (u kojoj je  $\beta$  lanac kodiran alelom HLA-DRB1\*15:01) koja prezentira MBP kao i molekulu HLA-DR52 (u kojoj je  $\beta$  lanac kodiran alelom HLA-DRB5\*01:01) koja prezentira peptid EBV (145). Određivanje kristalne strukture ova dva kompleksa molekula HLA i virusnih peptida je otkrilo sličnu strukturu površine koja se prezentira. Ovo pruža dokaz da je jedan od uzroka nastanka imunološkog odgovora mimikrija koja uključuje molekule HLA. Pomoćnički limfociti T izolirani iz SŽS pacijenta s MS su bili u stanju prepoznati vlastite stanice B promijenjene Epstein-Barr virusom (146). Paroni i sur. su pokazali da se Th1/Th17 središnje memorijske stanice koje uobičajeno migriraju



putem kimokinskog gradijenta u SŽS nalaze u povećanoj koncentraciji u perifernoj krvi (147). Ove stanice snažno reagiraju protiv antigena JCV ili autoantigena mijelinskog podrijetla. Za pretpostaviti je da TCR autoreaktivnih limfocita dijeli sličan afinitet za MBP i peptid mikroba zbog koje se događa križna reaktivnost. Međutim, afinitet autoreaktivnih TCR je niži za mikrobne antigene nego za MBP (148). Pretpostavlja se da nakon početne aktivacije na mikrobne antigene, autoreaktivni limfociti T s niskoafinitetnim TCR te posljedično upala u SŽS, oštećenje potaknuto interferonom- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleukinom-17 (IL-17) i faktorom stimulacije kolonije granulocita-makrofaga (engl. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF) vode nakupljanju klonova autoreaktivnih limfocita T s većim afinitetom za vlastite antigene (149).

Nekoliko starijih studija koje su uključivale EAE su pokušale definirati specifičnost, ekspresiju T staničnih receptora, spregu s HLA molekulama i funkcionalni profil mijelin - reaktivnih stanica T. Temelje su postavili Madsen i sur. koji su su u radu na animalnom modelu pokazali da transgenični rekombinaza-deficijentan (Rag $^{-/-}$ ) miš kod kojeg je izražen HLA-DR2 i ljudski MBP specifični TCR razvije bolest (150). Taj rad je dokazao da su transgenični limfociti T specifični za HLA-DR2-vezani MBP peptid dovoljni za razvoj bolesti (150).

Genain i sur. su u EAE studiji našli autoreaktivna protutijela i stanice B specifične za MOG koja utječu na strukturni integritet mijelinskog omotača dok su Voskuhl i sur. pokazali da su Th1 pomoćnički limfociti T dominantna podvrsta koja je specifična za imunodominantnu regiju MBP (151, 152).

Iako se u patogenezi MS najčešće navodi dominantna uloga limfocita T, Duddy i sur. te Bar-Or i sur. su pokazali da i limfociti B doprinose nastanku MS kroz predočavanje antigena stimulirajući autoreaktivne limfocite T te su izvor autoprotutijela na različite dijelove mijelina, aksona i neurona. Oni nadalje oblikuju T-stanični odgovor otpuštajući različite citokine koji aktiviraju regulatorne limfocite T (153, 154). Prisutnost oligoklonskih vrpca IgG u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) bolesnika s MS upućuje na to da su limfociti B uključeni u patogenezu MS (155). No osim MS, i u drugim stanjima kao npr. u diseminiranom encefalomijelitisu ili u neuroboreliozu se mogu naći oligoklonske vrpce IgG u cerebrospinalnoj tekućini. Međutim nakon detekcije u CSF-u bolesnika s MS, oligoklonske vrpce IgG perzistiraju zauvijek dok kod drugih bolesti većinom nestaju nakon nekoliko tjedana ili mjeseci (156).

### **2.2.5. Patologija MS**

Patološki koncept MS kao diseminirajuće plakovima slične skleroze (engl. *Plaque - Like Sclerosis*) je utemeljen prije više od 150 godina (157). I zaista, demonstracija diseminacije u prostoru (promjene u mnogim djelovima SŽS, uključujući bijelu tvar, sivu tvar, moždano deblo, kralježničnu moždinu i vidni živac) i vremenu (mnogobrojne epizode razvoja lezija kroz vrijeme) i danas predstavlja osnovu dijagnoze MS (158).

Lezije u MS mogu se pojaviti po cijelom SŽS, ali se najlakše mogu uočiti u bijeloj tvari kao žarišna područja demijelinizacije, upale i glijalne reakcije. Dokazi iz magnetske rezonance i biopsija ukazuju da je najraniji stadij demijelinizacije bijele moždane tvari heterogen i razvija se tijekom mjeseci (159). Prema specifičnom imunološkom obrascu rane demijelinizacije, analiza aktivnih lezija kroz vrijeme i mjesto, ukazuje da pojedinačni efektorni imuni mehanizam dominira kod svake osobe. Lucchinetti i sur. su opisali četiri najčešća temeljna obrasca demijelinizacije koja se temelje na gubitku proteina mijelina, smještaju i rasprostranjenosti plakova, načinu oligodendrocitne destrukcije i imunopatološkog dokaza aktivacije komplementa (159).

Mijelin nije prisutan samo u bijeloj tvari nego se demijelinizacija u MS događa i u sivoj tvari (160). Oko trećina kortikalnih lezija su perivaskularne. Često je upala oko krvnih žila blizu leukokortikalnog spoja te demijelinizacija pogađa i sivu i bijelu tvar (158). Kortikalne lezije su manje obuhvaćene upalom nego njihovi odgovarajući analozi u bijeloj tvari i imaju značajno manju krvno-moždanu propusnost (161). Lezije u leđnoj moždini su glavni klinički uzrok invaliditeta. Perivaskularne i cirkumferencijalne demijelinizacije su često visoko upalne i mogu zahvatiti sivu tvar (162). Atrofija leđne moždine je posljedica žarišne upalne demijelinizacije i udaljene neuroaksonalne degeneracije (163).

Optički živac je isto glavna meta u MS te je gubitak graničnih retinalnih ganglija dobro opisan. Oštećenje mrežnice se procjenjuje optičkom koherentnom tomografijom koja pokazuje značajno razrjeđenje živčanih vlakana mrežnice i slojeva ganglijskih stanica u unutrašnjem mrežastom sloju unatoč nedostatku mijelina (164).

### **2.2.6. Klinička slika MS**

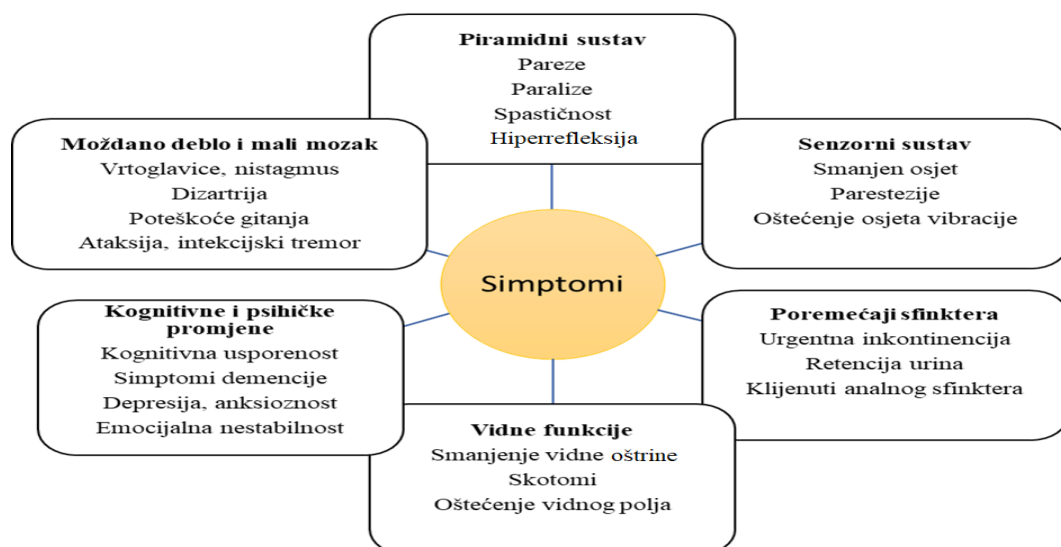
MS se klasificira na temelju kliničkog tijeka, aktivnosti bolesti i neuropatoloških nalaza u specifičnim dijelovima SŽS. 1990. godine uspostavljena je podjela MS na četiri klinička fenotipa: relapsno-remitirajući, sekundarno-progresivni, primarno-progresivni i progresivno-relapsni (165). 2013. godine je izdana revizija podjele MS koja je ugradila zajedno upalni

(aktivni/relapsni oblik MS) te neurodegenerativni (progresivni) aspekt sa stalnim pogoršanjem kliničke neurološke disfunkcije/invaliditeta bez oporavka (166). Takva podjela razlikuje klinički izolirani sindrom i relapsno-remitirajući oblik koji mogu biti aktivni i neaktivni. U drugu skupinu pripadaju primarno-progresivni i progresivni poslije početnog relapsnog oblika koji se dijele na aktivni s progresijom, aktivni oblik bez progresije, neaktivni oblik s progresijom te neaktivni oblik bez progresije (166).

Većina pacijenata (85 %) razvije relapsno-remitirajući oblik MS (RRMS) koji je karakteriziran epizodama žarišnih neuroloških ispada koji mogu trajati od 24 sta do nekoliko mjeseci prije povlačenja simptoma (167, 168). Ponavljanjem novih relapsa, sve se intenzivnije oštećuju aksoni što dovodi do sve težih neuroloških ispada (168). Kod jednog određenog broja pacijenata, nakon jednog ili dva desetljeća, događa se smanjenje novih egzacerbacija, ali s daljnjom progresijom bolesti te takvi pacijenti mogu razviti sekundarno-progresivni oblik bolesti (61). Primarno-progresivan oblik bolesti je rjeđi, a karakterizira ga postupno pogoršanje bolesti bez relapsa (168).

Kliničke manifestacije bolesti su različite te mogu uključivati razne sustave (Slika 17.) (61, 168):

- osjetilni sustav
- piramidni sustav
- moždano deblo i mali mozak
- vid
- kognitivne i psihičke funkcije
- poremećaji sfinktera



Slika 17. Najčešći simptomi kod MS, prema (168).

### 2.2.7. Dijagnostički aspekti MS

MS se dijagnosticira na temelju kliničkih simptoma, magnetske rezonance (MR), MR u kojoj se primjenjuje kontrast - gadolinij, neurofizioloških parametara koji uključuju vidne evocirane potencijale i nalaza oligoklonskih vrpca IgG u likvoru (167). Do sada su korišteni različiti kriteriji u dijagnostici MS. Od 1983. do 2001. godine su se upotrebljavali Poserovi kriteriji, a od 2001. McDonaldovi kriteriji koji su do sada doživjeli nekoliko revizija (Tablica 2) (169, 170).

Tablica 2. McDonaldovi kriteriji za dijagnozu MS

Klinička prezentacija	Drugi kriteriji potrebni za postavljanje dijagnoze
$\geq 2$ napadaja, objektivni klinički dokaz $\geq 2$ lezije ili objektivni klinički dokaz 1 lezije s razumnim povijesnim dokazom prethodnog napadaja	Nisu potrebni
$\geq 2$ napadaja; objektivni klinički dokaz 1 lezije	Diseminacija u prostoru: $\geq 1$ T2 lezije u najmanje 2 od 4 tipične regije SŽS (periventrikularna, jukstakortikalna, infratentorijska ili oštećenja leđne moždine) ili novi klinički napadaji koji zahvaćaju druge lokacije
$\geq 1$ napadaj; objektivni klinički dokaz $\geq 2$ lezije	Diseminacija u vremenu: Istovremena prisutnost asimptomatskih lezija koje se imbibiraju/ne imbibiraju gadolinijem kroz bilo koje vrijeme; ili nova(e) T2 lezija(e) koja se imbibira gadolinijem utvrđena MR-om, bez obzira na vrijeme u odnosu na početni pregled ili drugi klinički napadaj

Tablica 2. - nastavak

<p>≥1 napadaj; objektivni klinički dokaz 1 lezije (monosimptomatski, klinički izolirani sindrom - <i>engl. clinically isolated syndrome, CIS</i>)</p>	<p>Diseminacija u vremenu i prostoru u MR-u:</p> <p>a) Za diseminaciju u prostoru: ≥1 T2 lezija u najmanje 2 od 4 tipične regije SŽS (periventrikularna, jukstakortikalna, infratentorijska ili oštećenja leđne moždine), ili novi klinički ispadi koji zahvaćaju druge lokacije</p> <p>b) Za diseminaciju u vremenu:</p> <p>Istovremena prisutnost asimptomatskih lezija koje se imbibiraju/ne imbibiraju gadolinijem kroz bilo koje vrijeme, ili nove T2 lezija(e) i/ili oštećenje(a) koje(a) se imbibiraju gadolinijem utvrđena MR-om bez obzira na vrijeme u odnosu na početni pregled ili drugi klinički napadaj</p>
<p>Podmukla progresija od početka bolesti (PPMS)</p>	<p>1 godina pogoršanja bolesti (retrospektivno ili prospektivno određena) i 2 od 3 slijedeća kriterija:</p> <p>a) Dokaz diseminacije u prostoru temeljen na ≥1 T2 lezije u regijama SŽS karakterističnim za MS (periventrikularna, jukstakortikalna, infratentorijska ili oštećenja leđne moždine)</p> <p>b) Dokaz diseminacije u prostoru u kralježničnoj moždini koja se temelji na ≥2 oštećenja na moždini</p> <p>c) Pozitivan likvorski nalaz (ologoklonalne vrpce u livoru (ne i u serumu) ili povećan IgG indeks.</p>

Oni uključuju demonstraciju diseminacije lezija u prostoru (promjene u više neuroanatomskih lokacija koje su povezane s bolešću) ili vremenu (više epizoda ili razvoj lezija kroz vrijeme) (170).

U postavljanju dijagnoze važnu ulogu ima i isključivanje drugih stanja koja mogu zahvatiti CNS; infekcije, zloćudne, cerebrovaskularne, metaboličke i toksične bolesti (168).

### **2.2.8. Liječenje MS**

U akutnoj fazi bolesti liječenje se provodi kortikosteroidima, dok se za prevenciju novih relapsa i progresije bolesti tj. za smanjenje demijelinizacijskih oštećenja vidljivih u MR koristi imunomodulacijsko liječenje (eng. *Disease Modifying Therapy*, DMT). Terapiju dijelimo na lijekove prve i druge linije. Prvu liniju terapije čine interferon beta, glatiramer acetat, teriflunomid i dimetil fumarat. Drugu liniju terapije čine natalizumab, fingolimod, alemtuzumab, okrelizumab i kladribin (171). Imunoglobulini nisu u široj uporabi i obično se koriste u težim oblicima bolestima, posebno u akutnim relapsima koji ne reagiraju na kortikosteroidnu terapiju (168).

### **2.3. HLA sustav i bolesti**

Geni HLA se prvi put povezuju s bolestima otkrićem povezanosti između *HLA-B* i Hodgkinovog limfoma 1967. godine (172). No glavna revolucija u genetičkoj epidemiologiji je započela 1972. kad su Falchuk i sur. opazili jaku povezanost između *HLA-B8* i celijakije, a Russell i sur. su pokazali povezanost *HLA-A13* i psorijaze (173, 174). Nakon toga u slijedećim desetljećima različite genomske analize MHC su bile uspješne u pronalasku velikog broja gena unutar regije HLA koji su povezani s nastankom određenih bolesti, a posebno autoimunih (175). To se i očekivalo jer geni iz te regije kodiraju proteine ključne za imunitet, uključujući nekoliko kontrola obrade i prezentacije antigena (176). No, poznato je i da gene HLA, osim velikog broja, karakterizira i visoki polimorfizam te jaka neravnoteža udruživanja koja otežava pronalazak gena odgovornih za nastanak bolesti (177). Klasični geni HLA razreda I i II se najčešće dovode u vezu s bolestima, a najvažnija uloga molekula HLA razreda I i II je predočavanje različitih antigenih peptida limfocitima T omogućujući imunološkom sustavu razlikovanje vlastitog od stranog (177). Specifično prepoznavanje različitih HLA-peptid kombinacija je posredovano  $\alpha\beta$  T staničnim receptorom (TCR) na  $CD8^+$  limfocitima T koji se vežu na molekule HLA razreda I te na  $CD4^+$  limfocitima T koji se vežu na molekule HLA

razreda II. TCR se sastoji od  $\alpha$  i  $\beta$  lanca koji imaju varijabilni dio odgovoran za prepoznavanje antigena te konstantni dio (45).

Specifičnost HLA-peptid-TCR međudjelovanja je okosnica stečene obrane u rješavanju infekcija i tumora zadržavajući pritom toleranciju prema vlastitom te sprječavajući autoimune bolesti (43).

### 2.3.1. Mehanizam nastanka autoimunih bolesti povezan s molekulama HLA

Predloženo je nekoliko međusobno povezanih mehanizama koji objašnjavaju povezanost molekula HLA s autoimunim bolestima (Slika 18.) (177):

- a) *Konvencionalno spajanje.*  $\alpha$  i  $\beta$  lanci TCR su smješteni dijagonalno u odnosu na peptid čime se osigurava maksimalna pokrivenost površine koju čini kompleks HLA - peptid. Kod alternativnog spajanja  $\alpha$  i  $\beta$  lanci TCR su smješteni okomito u odnosu na os peptida čime se ograničava potpuno prekrivanje površine kompleksa HLA-peptid. Time je smanjen afinitet TCR za HLA-peptid i izbjegnuta negativna selekcija u timusu. Primjer takvog spajanja je nađen kod MS. Ob.1A12 TCR koji je izoliran iz  $CD4^+$  limfocita pacijenta s MS prepoznaje aminokiselinske ostatke 85-99 imunodominantog peptida MBP predanog molekulama HLA-DR15. Ob.1A12 TCR se spaja sa strane preko amino-terminalnog dijela HLA-peptidne strukture (150).
- b) *Nisko-afinitetno posredovanje bijegu iz timusa.* 1E6 TCR koji je izoliran iz  $CD8^+$  limfocita T kod pacijenta s dijabetesom tipa I posreduje uništavanje  $\beta$  stanica gušterače prepoznavanjem aminokiselina 15-25 preproinzulinske (PPI) signalne molekule predane pomoću molekula HLA-A2 (*HLA-A\*02:01*) (178). Iako je vezanje konvencionalno s cijelom površinom, afinitet 1E6 TCR za kompleks HLA-peptid je vrlo nizak i može biti ispod granice negativne selekcije u timusu, ali dovoljan da potakne stanično ubijanje  $\beta$  stanica gušterače  $CD8^+$  limfocitima T (178). Razina molekule PPI koja može biti predana je pod utjecajem promjenjivog broja uzastopnih ponavljanja (engl. *Variable Number of Tandem Repeats*, VNTRs) na 5' kraju regulatorne regije gena *INS* (179). Prisutnost nekoliko VNTRs je snažni rizični čimbenik za dijabetes tipa I i povezan je s niskom razinom PPI kodirajuće transkripcije mRNA u timusu (179).
- c) *TCR stabilizacija slabog HLA-peptidnog kompleksa.* Takav mehanizam se također spominje kao jedan od mogućih razloga nastanka MS. MS2-3C8 TCR je izoliran iz  $CD4^+$  limfocita u pacijenta s relapsno-remitirajućim oblikom MS koji veže peptid MBP predan molekulama HLA-DR4. MS2-3C8 TCR  $CD4^+$  limfocita su preneseni u HLA-

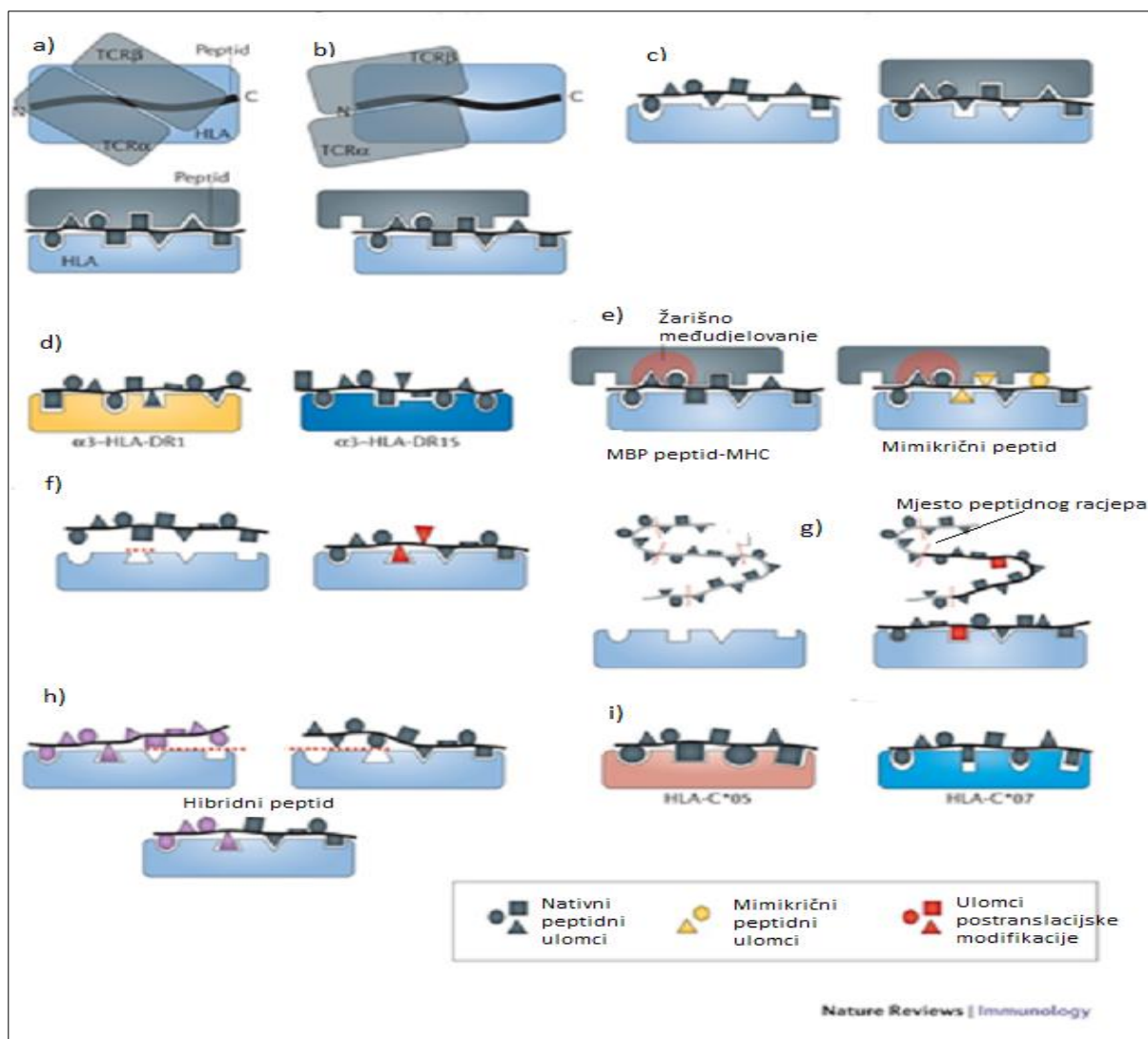
DR4 transgeničnog miša koji je razvio bolest SŽS (180). Kako je kompleks HLA-DR4-MBP peptid vrlo nestabilan, niska količina autoantigena u timusu može spriječiti MS2-3C8 TCR limfocita T da prime dovoljan signal za negativnu selekciju u timusu (181). Međutim na periferiji (u SŽS) gdje je gustoća antigena veća, jača je i aktivacija limfocita T s TCR MS2-3C8 kompleksom (182).

- d) *Varijacije u pukotinama molekula HLA* - mogu dovesti do prednosti u predočavanju samo određenog ograničenog skupa samopeptida ili samopeptidi niskog afiniteta mogu omogućiti autoreaktivnim limfocitima T da izbjegnu toleranciju i uđu u periferiju. Kao posljedicu imamo populaciju Th i T regulatornih (T reg) stanica koje ne prepoznaju sve molekule vlastitog organizma (183).
- e) *Molekularna mimikrija*. Otkriveno je da su u pacijenata s MS TCR križnorektivni prema HLA-DR15 vezanim MBP i peptidnim ulomcima EBV-a (148, 184).
- f) *Posttranslacijska modifikacija (PTM)*. PMT kroz deamidaciju, citrulinizaciju, glikozilaciju ili fosforilaciju može stvarati neoantigene (185) Na taj je način HLA posredovano predočavanje neoantigena još jedan mehanizam kako limfociti T mogu djelovati na vlastite stanice. U celijakiji HLA-DQ2.5 i HLA-DQ8 molekule predočavaju glijadine (peptide glutena) koji podliježu reakcijama deamidacije pod utjecajem transglutaminaze 2 (186).
- g) *Hibridni peptidi*. Stvaranje hibridnih vlastitih peptida u perifernom tkivu predstavlja još jedan mehanizam za stvaranje neoantigena. Proizvodnja peptida proteosomalnom degradacijom unutarstaničnih bjelančevina koje trebaju biti predočene molekulama HLA razreda II može rezultirati stvaranjem spojenih epitopa (187). Kod dijabetesa tipa 1, molekule HLA razreda II mogu predočavati takve hibridne antigene nastale kovalentnim križnim spajanje peptida (188). Patogenični CD4<sup>+</sup> limfociti T izolirani iz mišjih modela za dijabetes tipa I prepoznaju proinzulinske hibridne peptide prisutne u sekretornim granulama  $\beta$  stanica gušterače (188).
- h) *Stabilnost HLA*. Post-translacijska regulacija stabilnosti HLA također bi mogla biti razlog autoreaktivnosti. Tapasin stabilizira konformaciju molekule HLA razreda I koja na sebe još nije vezala peptidni ulomak, povećavajući mogućnost da se na molekulu veže peptid sa što većim afinitetom. Postoje različiti stabilni ili manje stabilni alotipovi proteina pojedinih alela. Tako su kod molekula HLA-DQ proteini povezani s nastankom dijabetesa tip 1 nestabilni, dok su alotipovi povezani sa zaštitom od dijabetesa tip 1 stabilni (189). Relativna nestabilnost određenih proteina HLA razreda II bi mogla



djelomično objasniti zašto su isti aleli HLA povezani s rizikom za jednu, a zaštitom za drugu autoimunu bolest (190). Na primjer haplotip *HLA-DRB1\*15:01~HLA-DQB1\*06:02*, koji kodira zajedno manje stabilan protein HLA-DR15 i intrinzični stabilni protein HLA-DQ6, zaštitni je za dijabetes tip 1, autoimuni poliglandularni sindrom i imunoglobulin IgA deficijenciju, a podložan za MS i narkolepsiju (11, 191).

- i) Polimorfni ostaci na površini molekula HLA izloženih TCR-u mogli bi odabrati autoreaktivne T stanice ili ne bi odabrali dobru T reg populaciju. Predloženo je da bi zaštitni učinci uočeni kod specifičnih molekula HLA mogli biti posljedica stvaranja T reg stanica koje su u stanju zadržati autoreaktivne stanice T i spriječiti autoimunost (39). Studije kod reumatskog artritisa (RA) pokazuju da populacije T reg-a ne drže pod kontrolom autoreaktivne limfocite T što sugerira da bi RA mogao biti povezan s neuspjehom u zaštiti, a ne sa sklonošću bolesti (192).
- j) *Prezentacija endogenih antigena HLA razreda II*. Iako molekule HLA razreda II tradicionalno predočavaju egzogene antigene, a razred I endogene antigene, to ne mora uvijek biti tako i može se vidjeti prezentacija endogenih antigena molekulama HLA razreda II i egzogenih antigena molekulama HLA razreda I. To može promijeniti način prezentacije antigena imunološkom sustavu i biti pokretač autoimunosti (193).



Slika 18. HLA-ovisni molekularni mehanizmi vezanja peptida i T staničnih receptora. a) konvencionalno vezanje, b) alternativno vezanje, c) TCR stabilizacija slabog HLA-peptidnog kompleksa, d) varijacije u pukotinama HLA, e) molekularna mimikrija, f) postranlacijska modifikacija - izmijenjeno HLA vezanje, g) postranlacijska modifikacija- izmijenjeno predočavanje antigena, h) HLA predočavanje hibridnih peptida, i) Stabilnost HLA. Preuzeto i prilagođeno prema (177).

### 2.3.2. HLA i MS

Kao što je u prethodnim poglavlju rečeno, razlike u molekulama HLA kod bolesnika i zdravih ispitanika imaju za posljedicu i sklonost prema određenim bolestima pa tako i MS kroz predočavanje različitih antigena autoreaktivnim limfocitima T (7). Mnogi polimorfizmi molekula HLA utječu na promjene aminokiselinskih ostataka koji su smješteni u pukotinama za vezanje antigena, a te sitne varijacije u redosljedju mogu značiti i razliku između mogućnosti

ili nemogućnosti predočavanja specifičnih peptida autoreaktivnim limfocitima T (194). Jedan od dobro proučenih primjera je i međudjelovanje MBP (pretpostavljeni autoantigen u MS) i molekuli HLA-DR15 (čiji β lanac kodira alel *HLA-DRB1\*15:01*) koje počiva na aminokiselini valinu na poziciji 86 β1 lanca. Taj valin je prisutan i kod molekule HLA-DR15 kodirane alelom *HLA-DRB1\*15:03* koji se također spominje kao podložan za MS, ali nije prisutan kod alela *HLA-DRB1\*15:02* za kojeg nije dokazan učinak na rizik od MS (194).

Prva istraživanja koja su pokušala naći povezanost između polimorfizma alela HLA razreda I i rizika od nastanka MS su provedena 1972. godine. Bertrams i sur. te Naito i sur. su našli, koristeći serološko određivanje antigena HLA na leukocitima, da je antigen HLA-A3 više zastupljen u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu (4, 195). Nakon toga se antigeni HLA-B7 te HLA-DRw2 dovode u vezu s podložnošću prema MS (5, 196, 197).

Međutim, naknadno se uspostavilo da za ove povezanosti HLA s MS nisu direktno odgovorni pojedinačni navedeni antigeni HLA, već su posljedica jake neravnoteže udruživanja gena koji ih kodiraju (1).

Poslije su istraživanja pokazala i vezu alela HLA razreda II s rizikom od MS (Tablica 3.). Najveći broj istraživanja je ukazao na povezanost polimorfizma lokusa *HLA-DRB1* s nastankom MS (198). U populaciji europskog podrijetla primarni rizični čimbenik je *HLA-DRB1\*15:01*, otprilike 60 % osoba europskog porijeklanosi ovaj alel u usporedbi s 20-25 % etnički podudarnih zdravih ispitanika (7). Taj alel je dio haplotipa *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02-DQB1\*06:02* također povezanog s podložnošću za MS, a koji kodira stanične površinske glikoproteine koji mogu predočavati peptide antigena limfocitima T (1).

Kod ispitanika afričkog podrijetla alel *HLA-DRB1\*15:03* doprinosi riziku od MS (12, 198, 199). Gen *HLA-DRB1\*03* i alel *HLA-DRB1\*13:03* također doprinose riziku od MS, dok *HLA-DRB1\*08:01* u prisutnosti *HLA-DRB1\*15:01* povećava rizik od MS (9, 200, 201). Na Sardiniji, u Australiji, kod Amerikanaca afričkog porijekla te u Japanu *HLA-DRB1\*04:05* se povezuje s podložnošću prema MS (12, 22, 24, 202, 203). Alel *HLA-DRB1\*03:01* je povezan s nastankom MS na Sardiniji te kod drugih ispitanika europskog podrijetla (11, 22, 24).

Kod lokusa *HLA-DQB1*, alel *HLA-DQB1\*06:02* se povezuje s nastankom MS u Sjevernoj Americi, dok studije kod Amerikanaca afričkog porijekla nisu našle povezanost *HLA-DQB1\*06:02* s MS bez prisutnosti *HLA-DRB1\*15* (16, 198). Većina istraživanja su zapravo pokazala da aleli *HLA-DQA1* i *-DQB1* doprinose riziku od nastanka MS kroz epistatska međudjelovanja putem genotipskih i haplotipskih povezanosti (7, 9, 11, 17, 18).

Osim podložnosti za nastanak MS, aleli HLA imaju i zaštitni učinak od MS (Tablica 3.). Najčešće spominjani zaštitni alel HLA razreda I je *HLA-A\*02:01*, a istraživanja su pokazala da ima zaštitni efekt neovisno o alelima HLA razreda II (9, 11, 219). Među alelima lokusa *HLA-B*, u studiji Moutsinias i sur. i u velikoj GWAS studiji *HLA-B\*44:02* se pokazao kao zaštitni alel (9, 11). Međutim kasnija istraživanja su pokazala da je u LD s genom *HLA-C\*05* koji je također u istraživanjima pokazao zaštitu za nastanak MS neovisno o *HLA-DRB1* rizičnim alelima (208). Kad su nasljeđeni skupa, *HLA-C\*05* povećava zaštitni efekt gena *HLA-A\*02* (219).

Najčešći geni/aleli HLA razreda II koji su više zastupljeni u zdravih ispitanika u odnosu na bolesnike s MS su: *HLA-DRB1\*14*, *HLA-DRB1\*07:01*, *HLA-DRB1\*04*, *HLA-DRB1\*11* (13, 14, 210, 214, 217). Zaštita posredovana genom *HLA-DRB1\*14* se pretpostavlja da je dominantna, poništavajući sklonost za MS koja se povezuje s alelom *HLA-DRB1\*15:01* (14).

Tablica 3. Aleli, genotipovi, i haplotipovi HLA povezani s sklonošću za MS – pregled svjetske literature.

<Populacija	Podložni aleli, genotipovi i haplotipovi HLA	Zaštitni aleli, genotipovi i haplotipovi HLA	Reference
Ispitanici europskog podrijetla	<p>-DRB1*03,                      -DRB1*15,                      -DRB1*15:01,                      -DRB1*13:03,                      -DQB1*06:02,                      -DRB1*03:01,                      -DRB1*08:01,                      -DQB1-03:02,                      -DRB1*15:01/08:01,                      -DRB1*15:01~DQB1*06:02,                      -DQA1*01:01~DRB1*15:01,                      -DQB1*03:01~DQB1*03:02</p>	<p>-A*02:01,                      -B*44:02,                      -B*38:01,                      -B*55:01,                      -DRB1*14,                      -DRB1*07</p>	(9, 11, 14, 201)
Sami (populacija u Norveškoj)	<p>-DRB1*08:01~DQB1*04:02,                      -DRB1*15:01~DQB1*06:02</p>		(204)
Belgijanci	<p>-B*07,                      -DRB1*15,                      -DQB1*06,                      -DRB1*15~DQB1*06</p>	<p>-A*02,                      -B*44,                      -DRB1*04,                      -DRB1*07</p>	(21)

Tablica 3. - nastavak

Skandinavci	-B*14, -DRB1*15:01,	-A*02, -B*12, -DRB1*01, -DRB1*07	(208)
Litvanci	-DRB1*08, -DRB1*15	-DRB1*01, -DRB1*03, -DRB1*16	(209)
Slovaci	-DRB1*03, -DRB1*15, -DQB1*06, -DRB1*15/*15, -DQB1*06/*06, -DRB1*15~DQB1*06	-DRB1*07, -DRB1*13, -DQB1*03, -DRB1*13/*11, -DQB1*05/*03, -DQB1*03/*03, -DRB1*13~DQB1*06, -DRB1*11~DQB*03	(20)

Tablica 3. - nastavak

Španjolci	<p>-DRB1*15,          -DRB1*03,          -DRB1*04:02,          -DRB1*13:03,          -DRB1*15:01,          -DQA1*01:02,          -DQB1*03:01,          -DQB1*06:02,          -DRB1*15:01~DQA1*01:02~DQB1*06:02,          -DRB1*04:02~DQA1*03:01~DQB1*03:02,          -DRB1*013~DQA1*05~DQB1*03:01</p>	<p>-DRB1*11,          -DRB1*16,          -DRB1*01:01,          -DQA1*01:01,          -DQB1*03:03,          -DQB1*05:01          -DRB1*01:01~DQA1*01:01~DQB1*05:01</p>	(17, 18, 210)
Talijani	-C*05	-A*02	(219)
Talijani (regija Friuli-Venecija- Giulija)	<p>-DRB1*15:01,          -DQB1*03:01,          -DQB1*03:02,          -DQB1*06:02,          -DQB1*06:03</p>		(211)

Tablica 3. - nastavak

Talijani (regija Sardinija)	-DRB1*13:03~DQB1*03:01, -DRB1*04:05~DQB1*03:01, -DRB1*03:01~DQB1*02:01, -DRB1*15:01~DQB1*06:02, -DRB1*04:05~DQB1*03:02	-DRB1*07:01~DQB1*02:01, -DRB1*16:01~DQB1*05:02, -DRB1*14:01-4~DQB1*05:031, -DRB1*04:03~DQB1*03:04, -DRB1*15:02~DQB1*06:01	(22, 24)
Talijani (regija Sicilija)	-DRB1*15:01, -DRB1*04, -DQB1*03:02, -DRB1*04:00~DQB1*03:02		(23)
Austrijanci	-DRB1*15:01		(212)
Hrvati (regija Gorski Kotar)	-DRB1*15, -DRB1*04, -DQB1*03:03, -DQB1*06:02, -DRB1*15~DQAI*01:02~DQB1*06:02	-A2, -B27, -DQAI*05:05, -DQB1*02:01, -DQB1*05:02, -DRB1*07~DQAI*02:01~DQB1*02:02	(213)
Grci	-DRB1*15:01, -DQB1*06:02, -DQAI*01:02, -DRB1*15:01~DQB1*06:02~DQAI*01:02		(19)



Tablica 3. - nastavak

Maltežani	<i>HLA-DRB1*15</i>	<i>HLA-DRB1*11</i>	(214)
Kolumbijci	<i>-DRB1*15,</i> <i>-DRB1*15:01,</i> <i>-DRB1*15:03,</i> <i>-DRB1*01:03,</i> <i>-DQB1*06,</i> <i>-DQB1*06:02</i>	<i>-DRB1*14,</i> <i>-DRB1*04,</i> <i>-DRB1*07:01</i>	(13, 206)
Amerikanci afričkog porijekla	<i>-DRB1*15:01,</i> <i>-DRB1*03:01,</i> <i>-DRB1*04:05,</i> <i>-DRB1*15:03</i>	<i>-A*02:01</i>	(12, 198, 199)
Brazilici	<i>-DRB1*15:01,</i> <i>-DRB1*15:03,</i> <i>-DQA1*02:01,</i> <i>-DQA1*03:01,</i> <i>-DQB1*03:01,</i> <i>-DQB1*03:03,</i> <i>-DQB1*04:01,</i> <i>-DQB1*06:04</i>		(207)

Tablica 3. - nastavak

Australci	-DRB1*15:01, -DRB1*04:05, -DRB1*11:04, -DRB1*13:03	-DRB1*07:01, -DRB1*04:07, -DRB1*09:01	(202)
Aškenazi i ne-Aškenazi Židovi	-DRB1*15:01, -DRB1*08:01, -DRB1*13:03, -DRB1*03:011, -DQA1*01:02, -DQA1*04:01~DQB1*06:02, -DRB1*15:01~DQA1*01:02~DQB1*06:02, -DRB1*13:03~DQA1*05~DQB1*03:01		(205)
Japanci	-DRB1*04:05, -DRB1*15:01	-DRB1*01:01, -DRB1*09:01, -DRB1*13:02, -DRB1*15:02	(203)
Kinezi	-DRB1*15	-DRB1*09:01	(215)

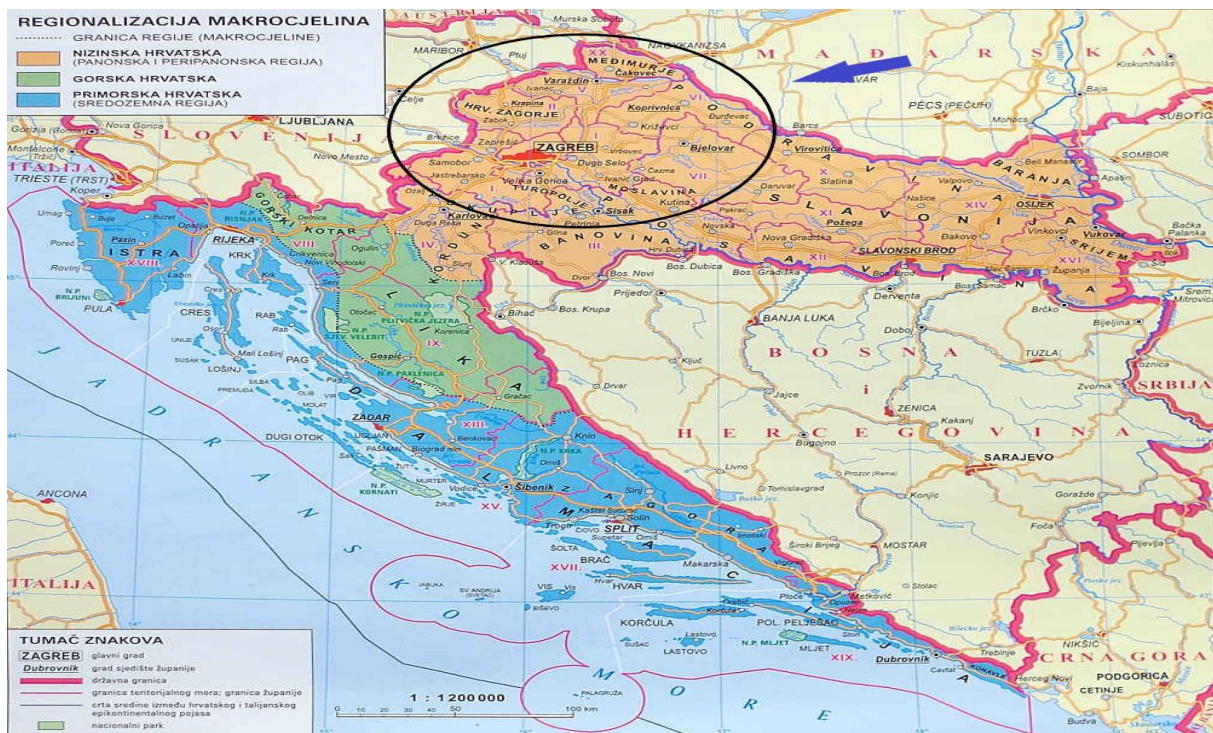
Tablica 3. - nastavak

Iranci	<p><i>-DRB1*15:01,</i>  <i>-DRB1*03,</i>  <i>-DQB1*03:03,</i>  <i>-DRB1*11/15,</i>  <i>-DRB1*15:01/07:01-</i></p>	<p><i>-DRB1*01:1,</i>  <i>-DRB1*10:01,</i>  <i>-DQB1*03:03</i></p>	(216, 217)
Saudijski	<p><i>-DRB1*15:01,</i>  <i>-DQB1*02:01,</i>  <i>-DQB1*06:02,</i>  <i>-DQB1*06:03</i></p>	<p><i>-DQB1*02:02,</i>  <i>-DQB1*05:03,</i>  <i>-DQB1*06:14</i></p>	(218)

## 2.4. Zemljopisni i povijesni podaci o sjeverozapadnoj Hrvatskoj

### 2.4.1. Zemljopisni podaci

Sjeverozapadna Hrvatska je jedno od tri statistička područja Hrvatske koje je odredio Državni zavod za statistiku (DZS) 2008. godine (220) (Slika 19.).



Slika 19. Karta Republike Hrvatske. Preuzeto iz (221).

Crnim krugom je označen prostor sjeverozapadne Hrvatske prema Klasifikaciji prostornih jedinica za statistiku, DZS, 2008. godine (220).

Sastoji se od ovih županija: Grad Zagreb, Zagrebačka županija, Krapinsko-zagorska županija, Varaždinska županija, Koprivničko-križevačka županija te Međimurska županija (220). Sjeverozapadna Hrvatska na sjeverozapadu graniči sa Slovenijom, a na sjeveru s Mađarskom. Prema zadnjem popisu stanovništva iz 2011. god. na području SZ Hrvatske je živjelo 1 645 854 stanovnika (222).

### 2.4.2. Povijesni podaci koji su utjecali na današnji genski sastav stanovništva SZ Hrvatske

Prostor SZ Hrvatske su kroz povijest naseljavali različiti narodi koji su mogli pridonijeti današnjem polimorfizmu gena sustava HLA (223). U razdoblju od početka 1. tisućljeća pr. Kr., na području današnje Hrvatske se počinju se oblikovati različita ilirska plemena (224). U

području SZ Hrvatske su obitali panonski Iliri: Breuci, Oserijati i Jasi. Oko prve polovice IV. st. pr. Kr. Kelti dolaze na to područje iz sjeverne Italije i s Alpa (225). Panonija dolazi pod rimsku vlast nakon Oktavijanovog pohoda 35. – 33. g. pr. Kr. (226). Rimska vladavina prostorima današnje sjeverozapadne Hrvatske završava prodorom barbara Gota u III. stoljeću (226). U V. stoljeću područje sjeverozapadne Hrvatske naseljava istočno germanski narod Langobardi (227).

U ranom srednjem vijeku, nakon povlačenja Langobarda, područje sjeverozapadne Hrvatske počinju naseljavati Avari i slavenski narod Hrvati. Najpoznatija i najprihvatljivija teorija o porijeklu Hrvata govori da su oni, prije seobe, nastanjivali plodne srednjoeurotske krajeve koji se nalaze između rijeka Visle, Dnjepra, Desne, Zapadne Dvine i Karpata (226). Tako je etnografski sastav Sjeverozapadne Hrvatske, poslije doseljavanja Hrvata obuhvaćao još rimske koloniste i poromanjene starosjedioce (Ilire). 796. godine nakon niza ratova taj prostor pada pod franačku vlast koja uspostavlja Donjopanonsku kneževinu (227). Početkom 10. stoljeća uslijed mađarskih napada franačka vladavina doživljava svoj konačni pad. Godine 1091. Ladislav I., mađarski kralj s vojskom prelazi Dravu i zauzima gotovo cijelo Hrvatsko kraljevstvo te se osniva i Zagrebačka biskupija. Nakon izumiranja domaće dinastije Trpimirovića, Sabor (parlament) je izglasao personalnu uniju Hrvatske i Ugarske (1102. – 1300. i 1307. – 1526.). Arpadovići daruju mađarskim, njemačkim (pretežno iz Štajerske) i češkim plemićima zemlju/posjede? te na taj način do 13. stoljeća traje naseljavanje područja sjeverozapadne Hrvatske (227).

Za vrijeme turskih osvajanja između 15. i 18. stoljeća ponovo se mijenja sastav stanovništva SZ Hrvatske. Da se obrane od Turaka Hrvati ulaze 1527. godine u sastav Habsburške monarhije sve do njezina raspada 1918. godine (228). U 16. stoljeću se na području Hrvatske osniva Vojna krajina koja je podijeljena na dva dijela, u slavonskom koji je obuhvaćao i dijelove SZ Hrvatske naseljava se velik broj vojnika s njemačkoga govornog područja (229). Njemačko-hrvatski jezični dodiri nastavljaju se zatim doseljavanjem velikog broja obitelji s njemačkoga govornog područja za vrijeme vladavine Marije Terezije (1763. – 1770.) te Josipa II. (1782. – 1788.) posebno u SZ Hrvatsku (228). Budući da su veliki dijelovi Hrvatske bili pod turskom vlašću u 16. i 17. stoljeću se na prostor SZ Hrvatske doseljavaju Hrvati iz područja sjeverne Dalmacije, Like, Krbave i drugih hrvatskih zemalja pokorenih od strane Turaka te Srbi u Hrvatsku vojnu krajinu (228). Iseljavanja prema Sjeverozapadnoj Hrvatskoj se nastavljaju za vrijeme prvog svjetskog rata 1914.- 1918.

Godine 1918. je propala Austro-Ugarska monarhija i proglašena Država Slovenaca, Hrvata i Srba, 1921. godine Kraljevina Srba, Hrvata i Slovenaca, a 1929. i Kraljevina Jugoslavija (230). Nova država provodi 1921. kolonizaciju rubnih dijelova SZ Hrvatske.

U periodu 1941.-1945. uspostavlja se Nezavisna Država Hrvatska te se doseljavaju opet Nijemci i pripadnici Islamske vjerske zajednice iz Bosne i Hercegovine (230).

Od 1945. do 1948. godine u sklopu Jugoslavije odvija se djelomično i kolonizacija SZ Hrvatske stanovništvom iz područja Dalmacije, Like, Korduna i Hrvatskog primorja (230). Pedesetih godina prošlog stoljeća sastav stanovništva SZ Hrvatske se opet mijenja uslijed procesa repatrijacije Mađara, Čeha i Slovaka, dok su se Nijemci iselili u posljednjim ratnim godinama ili neposredno nakon rata (231). Događa se i stihijsko napuštanje sela, ubrzana industrijalizacija i napučivanje gradova.

Struktura stanovništva se ponovo promijenila od 1991. do 1995. godine, za vrijeme rata u Hrvatskoj kad su prognanici iz okupiranih dijelova Hrvatske, a 1992. i izbjeglice iz susjedne Bosne i Hercegovine dolazili na prostor SZ u kojem je jedan dio tih ljudi ostao živjeti (232).

## **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. Ispitanici**

U istraživanju parova smo analizirali uzorke 173 pacijenta s relapsno-remitirajućim podtipom MS koja je dijagnosticirana na temelju McDonaldovih kriterija iz 2010. godine (170) koji su opisani u poglavlju 2.2.6. Dijagnostički aspekti MS. Pacijenti su obrađeni na Klinici za neurologiju Kliničke bolnice „Sveti Duh“.

Kontrolna skupina je sastavljena od uzoraka 205 zdravih osoba bez autoimunih bolesti koju čine dobrovoljni darivatelji krvi (DDK) Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu bez simptoma neuroloških bolesti. Sudionicima kontrolne skupine su do 2003. godine određeni genotipovi i aleli HLA razreda I i II. Dio rezultata prikazan je u radovima Dražić i sur. iz 2000. i 2001. godine (233, 234). Dodatno molekularno testiranje polimorfizama lokusa visoke rezolucije razreda II (*HLA-DRB1* i *HLA-DQA1*) zbog otkrića novih alela provedeno je 2017. godine.

Ispitanici studije (pacijenti s MS i kontrolna skupina) su stanovnici sjeverozapadne Hrvatske. Etička odobrenja za ovaj rad dali su Etičko povjerenstvo KB „Sveti Duh“, Etičko povjerenstvo HZTM-a te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Svi sudionici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u ovom istraživanju. Slijedeće varijable su zabilježene za svakog ispitanika: spol, dob kod uključivanja u studiju za pacijente s MS i kontrolnu skupinu te dob početka bolesti za pacijente.

### **3.2. Metode**

#### **3.2.1. Tipizacija HLA**

Geni HLA razreda I i II određeni su lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) koristeći alel-specifične oligonukleotidne početnice (engl. *Single Specific Primers*, SSP) za određene sekvence pojedinih alela HLA (PCR-SSP). Polazni materijal za metodu tipizacije HLA je genomska DNA.

#### **3.2.2. Izolacija genomske DNA iz leukocita pomoću testnog paketa**

Izolacija dezoksiribonukleinskih kiselina iz biološkog materijala pomoću silika-gel membrane temeljena je na postupku vezanja-ispiranja-eluiranja. Nukleinske kiseline se adsorbiraju na silika-gel membranu u prisutnosti kaotropnih soli koje uklanjaju vodu iz hidratiziranih

molekula u otopini. Svi ostali stanični dijelovi koji po sastavu nisu nukleinske kiseline, kao što su polisaharidi i proteini se ne adsorbiraju, te se uklanjaju ispiranjem. Nakon ispiranja, pročišćena nukleinska kiselina visokog prinosa se eluira s kolone u malom volumenu pufera ili bidestilirane vode i spremna je za uporabu u molekularnim metodama.

Svim je ispitanicima uzet uzorak periferne krvi sa EDTA, u epruvete Vacutainer (Becton-Dickinson, Njemačka) od 3 ml. Uzorci su centrifugirani tijekom 10 min na 2500 okretaja, a zatim je izdvojen leukocitno-trombocitni međusloj (eng. *Buffy Coat*) u čistu epruvetu.

### **3.2.2.1. Izolacija DNA iz leukocita pomoću QIAamp DNA Blood Mini kita**

Priprema reagensa

- Radna otopina proteinaze; u bočicu sa liofiliziranom proteinazom dodati proteinaza otapalo prema uputi na naljepnici bočice. Otopljeni sadržaj promiješati, alikvotirati i pohraniti na -20 °C do uporabe.
- Pufer AW1; dodati apsolutni etanol u pufer AW1 prema uputi na naljepnici bočice.
- Pufer AW2; dodati apsolutni etanol u pufer AW2 prema uputi na naljepnici bočice.

Postupak izolacije

- U epruvetu od 1,5 mL dodati 20 µL proteinaze i 200 µL leukocitno-trombocitnog međusloja
- Zatim dodati 200 µL lizirajućeg pufera (AL) i mućkati pomoću mućkalice 15 s. Uzorak inkubirati 10 minuta na 56 °C.
- Dodati 200 µL apsolutnog etanola (96-100 %) i snažno mućkati pomoću mućkalice 15 s.
- Mješavinu dodati na kolonu postavljenu u epruvetu od 2 mL i centrifugirati 1 minutu na 11500 okretaja u minuti.
- Kolonu prenijeti u novu epruvetu od 2 mL, a epruvetu s filtratom baciti. Dodati 500 µL pufera za ispiranje kolone (pufer AW1). Centrifugirati 1 min na 11500 okretaja/min.
- Odbaciti epruvetu s eluatom, a kolonu prenijeti u novu epruvetu. Dodati 500 µL pufera za ispiranje na kolonu (AW2). Centrifugirati 3 min na 14000 okretaja.
- Eluat baciti. Kolonu postaviti na istu praznu epruvetu i ponovo centrifugiranjem kroz jednu minutu na maksimalnom broju okretaja, odstraniti ostatke pufera za ispiranje kolone.

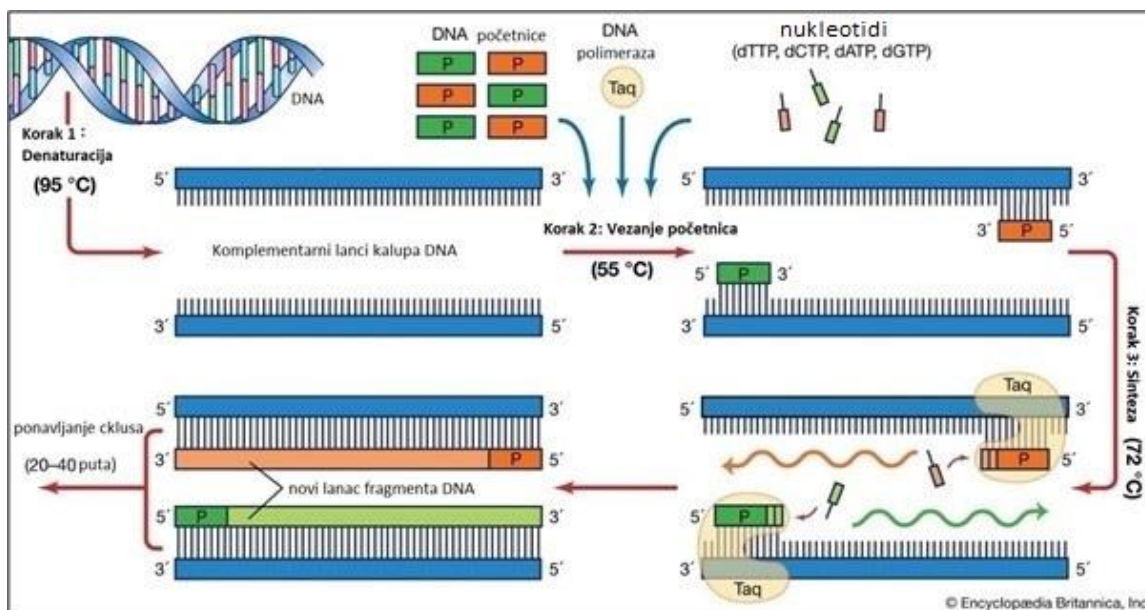


- Epruvetu s eluatom odbaciti, a kolonu postaviti u novu epruvetu od 1,5 mL i dodati pažljivo izravno na kolonu 300  $\mu$ L pufera za eluciju (AE pufer) ili bidestilirane vode.
- Ostaviti stajati na sobnoj temperaturi 5 min.
- Centrifugirati 1 min na 11500 okretaja/min.
- Ponovljenim dodavanjem AE pufera ili bidestilirane vode, te centrifugiranjem tijekom 1 minute može se povećati prinos DNA za 15-20 %.
- Elucija se može provesti i s TE puferom pH 8,0 ili bidestiliranom vodom.

Prema preporukama proizvođača prinos DNA izolirane iz Buffy coata je 15-25  $\mu$ g/ mL, što odgovara preporučenom prinosu za umnožavanje PCR-SSP metodom (Product Insert, Instructions for Use, Olerup SSP, CareDx AB).

### **3.2.3. Umnožavanje ciljne sekvence lančanom reakcijom polimerazom sa specifičnim početnicama za sekvencu (PCR-SSP)**

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je *in vitro* reakcija umnožavanja ciljnog dijela DNA pomoću enzima Taq polimeraze, koristeći specifične početnice koje prepoznaju i komplementarno se vežu na dijelove DNA kalupa (Slika 20.). PCR-SSP metoda (CareDx AB, Švedska) je inačica lančane reakcije polimerazom u kojoj se koriste gen specifične (nisko razlučivanje) ili alel specifične početnice (visoko razlučivanje tipizacije HLA). Slijedi postupak umnožavanja DNA, u tijeku kojeg se u ciklusima denaturacije, vezanja početnica i produljenja lanca, umnažavaju ciljni slijedovi gena. Preduvjet za izvođenje reakcije je poznavanje slijeda nukleotida rubnih dijelova odsječka DNA koji se želi umnožiti, na temelju kojeg se konstruiraju početnice i postojanje početne molekule DNA koja u reakciji ima ulogu kalupa tj. predloška za lanac nukleotida u nastanku. PCR-SSP metoda se zasniva na nemogućnosti Taq polimeraze da popravi neslaganje u jednoj bazi na 3' kraju DNA početnice. Dakle, kada je nukleotid na 3' kraju početnice komplementaran sekvenci na kraju alela doći će do umnožavanja ulomka. Kada 3' nukleotid početnice nije komplementaran kalupu, neće doći do umnožavanja sekvence ili će se umnožiti u vrlo maloj količini. U svakoj SSP reakciji istodobno se radi umnožavanje ulomka ubikviternog gena, u ovom slučaju je to ulomak gena za humani hormon rasta, (engl. *Human Growth Hormone*, HGH), koji služi kao interna pozitivna kontrola, da bi se potvrdila prisutnost DNA u reakcijskoj smjesi.



Slika 20. Prikaz PCR-SSP metode. Preuzeto iz (235)

(<https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction> ).

Za tipizaciju HLA korišteni su komercijalni HLA-SSP kitovi za nisko razlučivanje pojedinih lokusa HLA (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*), a za lokuse *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* učinjena je i tipizacija na razini visokog razlučivanja radi određivanja pojedinih alela.

### 3.2.3.1. Protokol za pripravljanje PCR-mješavine (po jednoj PCR reakciji, a broj reakcija ovisi o broju početnica) – prema uputstvu proizvođača koje se nalazi u svakom kompletu

U epruvetu od 2 mL treba dodati:

- 6 µL master-mix-a (sadržanog u SSP kitovima)
- 9,45 µL aqua pro injectione
- 4 µL DNA
- 0,15 µL Taq DNA polimeraze

U svaku jažicu PCR pločice treba dodati 10 µL priređene PCR mješavine i zatvoriti ju.

Svi postupci pripreme za PCR izvode se u kabinetu s laminarnim protokom zraka (Iskra PIO, Slovenija).

### 3.2.3.2. Lančana reakcija polimerazom

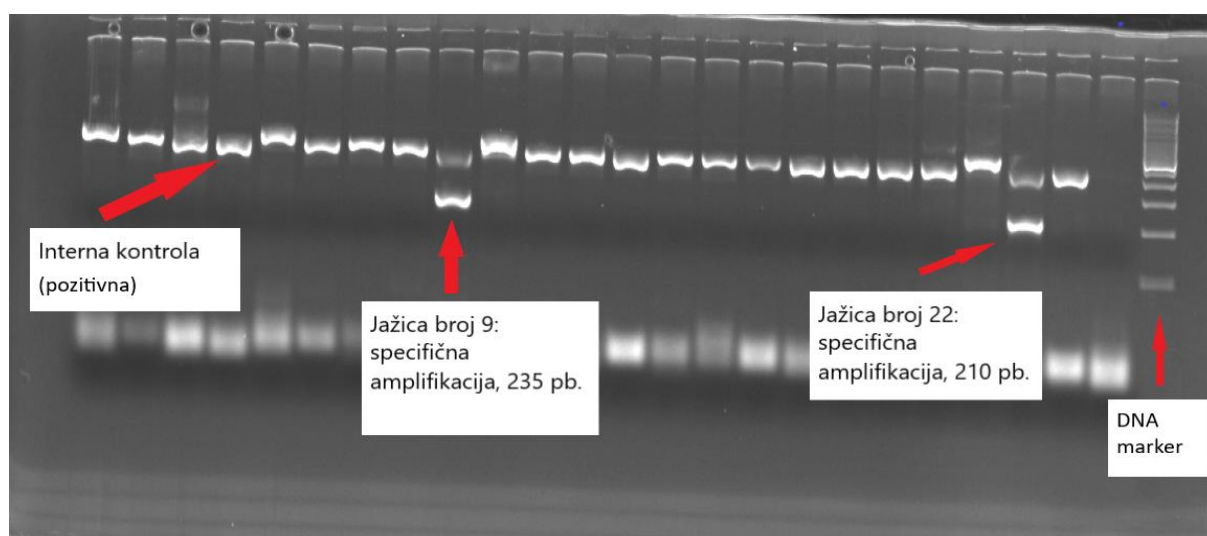
- Smjestiti pločicu u PCR uređaj ( Applied Biosystems, SAD).
- Izabrati određeni program i uključiti uređaj. Program umnožavanja je prikazan u Tablici 4.

Tablica 4. Program za umnožavanje odsječaka DNA metodom PCR-SSP

Korak	Broj ciklusa	Temperatura	Vrijeme umnožavanja
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.	održavanje	4°C	∞

### 3.2.4. Gel elektroforeza

Detekcija produkata PCR-SSP umnožavanja se vrši pomoću elektroforeze na gotovim PCR CheckIT Wide Mini kliroznom gelovima 4X25 uz etidijev bromid (AL-Diagnostic GMBH, Austrija). Cjelokupni sadržaj (10 µL) svake pojedine jažice se otpipetira na gel. Etidijev bromid je supstancija koja se umrežava u niti DNA, a obasjana UV svjetlom svijetli. Nakon završene elektroforeze, gel se pogleda pod UV iluminatorom na 312 nm i dokumentiraju umnožene vrpce pomoću fotografiranja kamerom (Slika 21.).



Slika 21. Elektroforeza na agaroznom gelu za *HLA-DRB1\*07* (vlasništvo HZTM). Interna kontrola je gen HGH, veličina fragmenta 515 pb, 430 pb ovisno o jažici.

### 3.2.5. Interpretacija nalaza

Specifičnost svake pojedine PCR amplifikacije provjeravamo pomoću tablica za interpretaciju, koje se nalaze priložene u svakom komercijalnom HLA SSP setu i pomoću HELMBERG SCORE Software-a (CareDx AB, Švedska).

### 3.3. Statističke metode

Računalni program Arlequin 3.11 koristila sam za procjenu uočene heterozigotnosti i očekivane heterozigotnosti te za testiranje Hardy-Weinberg ravnoteže (HWE) pri čemu je korišten algoritam Markovljevi lanci (Markov Chain) (236). Učestalosti alelnih skupina i alela HLA kod pacijenata s MS i kontrolne skupine su izračunate izravnim brojanjem. Medijan, standardna devijacija (SD), aritmetička sredina te interkvartilni raspon su izračunati za demografske karakteristike svih ispitanika. Usporedba između pacijenata s MS i kontrolne skupine za kategorije spola je napravljena pomoću  $\chi^2$  testa, a za prosječnu dob kod uključivanja u istraživanje pomoću Mann-Whitney testa. Za usporedbu učestalosti alela, genotipova i haplotipova HLA između bolesnika i kontrolne skupine je upotrijebljen  $\chi^2$  test ili Fisher-ov egzaktni test (gdje je bilo <5 ispitanika) te je određen omjer izgleda (engl. *Odds Ratio*, OR) s 95 % intervalom pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*, CI). Sve *P*-vrijednosti < 0,05 se smatraju značajne. Da bi izbjegli potencijalne smetnje uzrokovane malim brojem uzoraka, analizirali smo samo one alele koji su uočeni kod najmanje pet ispitanika kod kontrolne ili skupine bolesnika. Bonferronijeva korekcija za višestruka testiranja je primijenjena množenjem izračunate *P*-vrijednosti s brojem usporedba za svaki lokus (*P* korigirana, *P*kor.). Učestalosti haplotipova su izračunate pomoću programa Arlequin 3.11 (236).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Značajke ispitanika

Demografski podaci o ispitivanoj populaciji su prikazani u Tablici 5. Od 173 bolesnika oboljela od multiple skleroze, 132 (76,30 %) su ženskog, a 41 (23,70 %) muškog spola. Prosječna dob bolesnika je  $43,04 \pm 11,59$  godina, dok je prosječna dob kod koje su nastali simptomi MS  $36,34 \pm 11,04$  godina. Kontrolna skupina dobrovoljnih darivatelja krvi se sastojala od 149 muškaraca (72,68 %) i 56 žena (27,32 %) s prosječnom dobi  $40,03 \pm 11,36$  godina. Iako je postojala statistička značajna razlika u raspodjeli prema spolu između bolesnika oboljelih od MS, dobiveni podaci su korišteni samo za usporedbu između učestalosti alela, genotipova te haplotipova HLA kod pacijenata i kontrola.

Tablica 5. Demografske značajke pacijenata s MS i kontrolne skupine. Kvalitativni podaci su prikazani kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom.

	Bolesnici (N = 173)	Kontrole (N = 205)	<i>P-vrijednost</i>
Spol, ženski, n (%)	132 (76,30)	56 (27,32)	< 0,001
Spol muški, n (%)	41 (23,70)	149 (72,68)	< 0,001
Dob, aritmetička sredina, SD (IQR)	$43,04 \pm 11,59$ (34-51)	$40,03 \pm 11,36$ (32-49)	0,024
Dob kod pojave simptoma, aritmetička sredina, SD (IQR)	$36,34 \pm 11,04$ (27-44)	/	

Kratice: IQR = interkvartilni raspon; SD = standardna devijacija.

## 4.2. Raspodjela učestalosti gena/alela HLA razreda I i II u kontrolnoj skupini dobrovoljnih darivatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske

### 4.2.1. Određivanje Hardy-Weinberg ravnoteže za lokuse *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DQA1*, *-DQB1*, *-DRB1*

Za svaki od ispitivanih lokusa (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DQA1*, *-DQB1*, *-DRB1*) izračunata je uočena te očekivana heterozigotnost. Nijedan lokus nije pokazao značajnu devijaciju od Hardy-Weinberg ravnoteže (Tablica 6.).

Tablica 6. Hardy-Weinberg ravnoteža za lokuse HLA razreda I i II.

	Uočena heterozigotnost	Očekivana heterozigotnost	<i>P</i> -vrijednost
<i>HLA-A</i>	0,8734	0,8205	0,137
<i>HLA-B</i>	0,9612	0,9308	0,174
<i>HLA-C</i>	0,8725	0,8617	0,748
<i>HLA-DQA1</i>	0,8276	0,8538	0,469
<i>HLA-DQB1</i>	0,8781	0,8800	0,953
<i>HLA-DRB1</i>	0,9512	0,9320	0,408

### 4.2.2. Raspodjela učestalosti gena HLA razreda I u kontrolnoj skupini

U Tablici 7. prikazana je analiza učestalosti gena na lokusima *HLA-A*, *-B* i *-C*. Na lokusu *HLA-A* našli smo šesnaest različitih gena. Trinaest gena *HLA-A* je zastupljeno s učestalošću većom od 1 %. Najučestaliji aleli su: *HLA-A\*02* (30,24 %), *-A\*03* (16,59 %), *-A\*24* (11,22 %), *-A\*01* (10,24 %) te *-A\*11* (7,80 %). Lokus *HLA-B* je bio zastupljen kod zdrave kontrolne skupine s dvadeste pet različitih gena od kojih je sedamnaest učestalo više od 1 %. Među genima na lokusu *HLA-B* najučestaliji su *HLA-B\*51* (12,19 %), *-B\*35* (10,24 %), *-B\*07* (9,27 %), *-B\*18* (9,27 %) te *-B\*44* (7,56 %). Kod lokusa *HLA-C* smo našli petnaest različitih gena. U Tablici 7. su prikazani samo geni čija je učestalost > 1 %. Najučestaliji je *HLA-C\*07* (25,85 %), slijede *HLA-C\*12* (17,80 %), *-C\*04* (10,49 %), *-C\*02* (9,51 %) i *-C\*03* (8,29 %) geni.

Tablica 7. Raspodjela gena na lokusima *HLA-A*, *-B* i *-C* u kontrolnoj skupini (N = 210).

<i>HLA-A</i>		<i>HLA-B</i>			<i>HLA-C</i>
Gen	Učestalost (%)	Gen	Učestalost (%)	Gen	Učestalost (%)
<b>*01</b>	10,24	<b>*07</b>	9,27	<b>*01</b>	3,90
<b>*02</b>	30,24	<b>*08</b>	5,61	<b>*02</b>	9,51
<b>*03</b>	16,59	<b>*13</b>	2,68	<b>*03</b>	8,29
<b>*11</b>	7,80	<b>*14</b>	2,19	<b>*04</b>	10,49
<b>*23</b>	1,71	<b>*15</b>	4,39	<b>*05</b>	3,41
<b>*24</b>	11,22	<b>*18</b>	9,27	<b>*06</b>	6,82
<b>*25</b>	3,66	<b>*27</b>	6,82	<b>*07</b>	25,85
<b>*26</b>	3,90	<b>*35</b>	10,24	<b>*08</b>	1,95
<b>*30</b>	1,46	<b>*38</b>	5,12	<b>*12</b>	17,80
<b>*31</b>	1,95	<b>*39</b>	3,66	<b>*14</b>	3,66
<b>*32</b>	3,41	<b>*40</b>	4,88	<b>*15</b>	4,39
<b>*33</b>	2,19	<b>*44</b>	7,56		
<b>*68</b>	3,66	<b>*49</b>	3,41		
		<b>*50</b>	1,95		
		<b>*51</b>	12,19		
		<b>*52</b>	1,95		
		<b>*56</b>	1,71		

Prikazani su samo geni čija je učestalost > 1 %.

U kontrolnoj skupini dobrovoljnih darivatelja krvi napravljena je i analiza haplotipova sastavljenih od dva (*HLA-A* i *-B*) i tri (*HLA-A*, *-B* i *-C*) lokusa (Tablica 8.).

Tablica 8. Analiza haplotipskih veza između lokusa *HLA-A*, *-B* i *-C* u populaciji zdravih ispitanika kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-A~B</i> haplotip	N, učestalost (%)	<i>HLA-A~B~C</i> haplotip	N, učestalost (%)
*02~*51	24 (5,87)	*01~*08~*07	17 (4,00)
*03~*07	16 (3,88)	*03~*07~*07	16 (3,90)
*01~*08	16 (3,83)	*02~*27~*02	14 (3,32)
*02~*27	15 (3,52)	*25~*18~*12	12 (3,00)
*25~*18	14 (3,49)	*24~*07~*07	10 (2,26)
*03~*35	13 (3,25)	*02~*40~*03	9 (2,21)
*02~*44	13 (3,18)	*11~*35~*04	8 (1,94)
*02~*18	13 (3,14)	*02~*18~*07	8 (1,94)
*24~*07	12 (2,82)	*02~*51~*14	7 (1,70)
*02~*40	11 (2,27)	*02~*15~*03	7 (1,70)
*02~*15	9 (2,18)	*02~*44~*05	6 (1,46)
*11~*35	9 (2,18)	*02~*07~*07	6 (1,46)
*26~*38	9 (2,18)	*24~*52~*12	6 (1,46)
*02~*07	8 (1,77)	*32~*40~*02	5 (1,25)
*03~*18	7 (1,65)	*68~*35~*04	5 (1,25)
*02~*35	7 (1,63)	*02~*51~*02	5 (1,25)
*02~*39	6 (1,44)	*33~*14~*08	5 (1,22)

Prikazani su samo haplotipovi čija je učestalost > 1 %.

Kod haplotipa *HLA-A~B* nađeno je ukupno 189 pretpostavljenih haplotipova. Sedamnaest pretpostavljenih haplotipova je uočeno kod minimalno 1 % ispitanika kontrolne skupine. Najučestaliji su *HLA-A\*02~B\*51* (5,87 %), *HLA-A\*03~B\*07* (3,88 %), *HLA-A\*01~B\*08* (3,83 %), *HLA-A\*02~B\*27* (3,52 %), *HLA-A\*25~B\*18* (3,49 %), *HLA-A\*03~B\*35* (3,25 %) i *HLA-A\*02~B\*44* (3,18 %).

Među *HLA-A~B~C* haplotipovima *HLA-A\*01~B\*08~C\*07* je najčešće zastupljen u kontrolnoj skupini (4,00 %), a slijede *HLA-A\*03~B\*07~C\*07* (3,90 %), *HLA-A\*02~B\*27~C\*02* (3,32 %), *HLA-A\*25~B\*18~C\*12* (3,0 %) i *HLA-A\*24~B\*07~C\*07* (2,26 %).



#### **4.2.3. Usporedba učestalosti gena kontrolne skupine sjeverozapadne Hrvatske na lokusima *HLA-A*, *-B* i *-C* kontrolne skupine sjeverozapadne Hrvatske s drugim studijama**

U Tablicama 9., 10. i 11. usporedili smo učestalosti gena lokusa *HLA-A*, *-B* i *-C* u kontrolnoj skupini sjeverozapadne Hrvatske s učestalostima alela u drugim studijama iz Hrvatske: istraživanje iz 2014. godine na 4000 darivatelja krvotvornih matičnih stanica (KMS) - Hrvatska 2 za gene na lokusima *HLA-A* i *-B* te istraživanje Žunec i Grubić na 120 darivatelja solidnih organa - Hrvatska 3 za gene na lokusu *HLA-C* (237, 238). Usporedili smo također učestalosti gena na lokusima *HLA-A*, *-B* i *-C* u kontrolnoj skupini našeg istraživanja s učestalosti alela u susjednim zemljama te u nekim nama bližim zemalja Europe (učestalosti su preuzete sa stranice <http://www.allelefrequencies.net/> (237) te iz originalnih radova autora iz tih zemalja).

Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti gena između našeg rada i između populacija Hrvatska 2 te Hrvatska 3 na sva tri lokusa (Tablica 9., 10., i 11.).

Tablica 9. Usporedba učestalosti gena na lokusu *HLA-A* u kontrolnoj skupini Sjeverozapadne Hrvatske s učestalostima alela u susjednim zemljama, nekim državama Europe te u skupini Hrvatska 2.

<i>HLA-A</i> *	Hrvatska - naša studija (N = 205) (%)	Hrvatska 2 (N = 4000) (%) (238)	Slovenija‡ (N = 130) (%) (239)	Italija (N = 674) (%) (237)	Njemačka‡ (N = 11.407) (%) (237)	Srbija (N = 1992) (%) (240)	BIH (N = 134) (%) (237)	Austrija (N = 200) (%) (237)	Mađarska (N = 1644) (%) (241)
<b>01</b>	10,24	12,46	9,30	11,70	14,97	14,26	13,43	14,50	15,2
<b>02</b>	30,24	31,32	26,10	26,80	29,21	29,47	34,70	31,20	29,2
<b>03</b>	16,59	12,42	15,00	11,80	15,40	11,32†	15,67	15,20	11,8†
<b>11</b>	7,80	6,91	7,20	5,30	5,13	6,13	4,85	3,20†	6,0
<b>23</b>	1,71	2,50	3,10	3,20	2,43	2,23	2,23	2,20	3,0
<b>24</b>	11,22	11,39	9,70	10,90	9,50	11,09	10,07	10,50	8,9
<b>25</b>	3,66	3,14	2,00	1,10†	2,27	2,64	2,23	2,20	4,0
<b>26</b>	3,90	4,81	5,10	5,90	3,40	6,02	4,10	4,20	5,3
<b>30</b>	1,46	1,71	2,00	5,00†	2,27	2,11	0,37	3,80	2,8
<b>31</b>	1,95	2,31	3,10	2,80	2,32	1,93	1,86	2,00	1,4
<b>32</b>	3,41	3,93	3,90	3,90	3,77	4,77	1,49	2,80	3,6
<b>33</b>	2,19	2,05	2,00	2,70	1,30	2,54	0,37	1,00	1,5
<b>68</b>	3,66	4,61	4,30	4,00	4,13	4,22	6,71	4,13	4,2

‡Učestalost pojedinih gena je izračunata na temelju učestalosti fenotipova pretpostavljajući da je populacija pod Hardy-Weinbergovim proporcijama.

† P<0.05

Tablica 10. Usporedba učestalosti gena lokusa *HLA-B* u kontrolnoj skupini sjeverozapadne Hrvatske s učestalosti alela u skupini Hrvatska 2 te susjednih zemalja i nekih nama bližim država Europe.

<i>HLA-B</i> *	Hrvatska - naša studija (N = 205) (%)	Hrvatska 2 (N = 4000) (%) (238)	Slovenija‡ (N = 130) (%) (239)	Italija (N=159311) (%) (242)	Njemačka N = 1140 (%) (237)	Makedonija (N = 286) (%) (243)	BIH (N= 134) (%) (237)	Austrija (N = 2736) (%) (244)	Mađarska N = 1644 (%) (241)	Srbija N = 1992 (%) (240)
<b>07</b>	9,27	7,09	13,20	5,70†	13,10	6,29	6,71	11,61	8,1	4,97†
<b>08</b>	5,61	7,78	7,60	5,90	10,00†	5,94	8,20	7,92	10,3†	8,63
<b>13</b>	2,68	3,77	3,50	3,40	3,20	3,15	1,11	3,10	4,0	3,29
<b>14</b>	2,19	2,47	1,20	3,60	2,53	2,45	1,11	2,44	3,0	3,16
<b>15</b>	4,39	4,81	3,50	5,20	7,96	1,22	3,35	7,96	4,7	3,66
<b>18</b>	9,27	8,18	8,00	9,70	4,60†	14,69	8,20	6,57	9,6	9,89
<b>27</b>	6,82	6,21	6,40	1,90†	4,34	4,02	4,85	4,42	4,7	5,00
<b>35</b>	10,24	13,19	12,30	15,90†	10,00	16,08	9,32	10,00	11,3	13,13
<b>38</b>	5,12	4,39	4,70	3,50	2,22	3,32	4,10	2,51	4,1	5,62
<b>40</b>	4,88	3,77	4,70	2,70	6,56	4,95	5,50	6,6	4,4	3,61
<b>44</b>	7,56	9,30	9,70	9,20	12,76†	7,87	14,92†	12,95†	12,2†	9,12
<b>51</b>	12,19	11,36	7,60	10,40	6,19†	14,69	10,82	8,18	6,8	12,85
<b>57</b>	1,5	2,66	3,50	4,90†	3,61	1,40	2,98	3,57	2,5	

‡Učestalost pojedinih gena je izračunata na temelju učestalosti fenotipova pretpostavljajući da je populacija pod Hardy-Weinbergovim proporcijama. † P<0.05

Tablica 11. Usporedba učestalosti gena lokusa *HLA-C* u kontrolnoj skupini sjeverozapadne Hrvatske s učestalosti alela u skupini Hrvatska 3 te susjednih zemalja i nekih nama bližih država Europe.

<i>HLA-C</i> *	Hrvatska - naša studija (N = 205) (%)	Hrvatska 3 (N = 120) (%) (237)	Slovenija ‡ (N = 130) (%) (239)	Italija Sjeverna Pavia (N = 685) (%) (237)	Srbija (N = 1992) (%) (240)	Makedonija (N = 256) (%) (242)	Grčka (N = 759) (%) (237)	Austrija (N = 1368) (%) (244)
<b>01</b>	3,90	8,75	4,30	5,60	6,92	4,37	3,78	4,47
<b>02</b>	9,51	7,08	8,50	6,80	6,92	6,82	7,77	7,26
<b>03</b>	8,29	4,58	11,00	2,50†	5,97	4,55	5,50	10,24
<b>04</b>	10,49	12,08	14,50	20,40†	13,52	18,36†	17,68†	12,52
<b>05</b>	3,41	3,75	4,70	1,20†	3,46	4,85	3,92	6,96
<b>06</b>	6,82	10,00	10,10	1,90†	10,06	6,12	9,42	9,94
<b>07</b>	25,85	22,8	28,20	24,10	24,84	27,97	19,19	29,02
<b>08</b>	1,95	1,67	1,20	3,10	4,08	2,80	3,37	1,89
<b>12</b>	17,80	10,42	12,80	5,60†	13,52	12,76	14,51	8,25†
<b>14</b>	3,66	2,08	0,80	2,50	3,77	3,50	3,58	1,789
<b>15</b>	4,39	4,17	3,10	1,20†	4,71	6,82	6,05	3,677

‡Učestalost pojedinih gena je izračunata na temelju učestalosti fenotipova pretpostavljajući da je populacija pod Hardy-Weinbergovim proporcijama.

† P<0.05

#### 4.2.3.1. Raspodjela učestalosti alela HLA razreda II u kontrolnoj skupini

U Tablici 12. je prikazana raspodjela alela na lokusima *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1*. Ukupno smo našli trideset četiri alela *HLA-DRB1* u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika. Devetnaest alela ima učestalost veću od 1 % te čine ukupno 93,55 % svih *HLA-DRB1* alela.

Tablica 12. Raspodjela alela na lokusima *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* u kontrolnoj skupini (N = 205).

<i>HLA-DRB1</i> *	N (%)	<i>HLA-DQA1</i> *	N (%)	<i>HLA-DQB1</i> *	N (%)
<b>01:01</b>	39 (9,51)	<b>01:01</b>	46 (11,97)	<b>02:01</b>	44 (10,73)
<b>01:02</b>	6 (1,46)	<b>01:02</b>	103 (24,87)	<b>02:02</b>	23 (5,61)
<b>03:01</b>	42 (10,24)	<b>01:03</b>	29 (7,07)	<b>03:01</b>	97 (23,65)
<b>04:01</b>	13 (3,17)	<b>01:04</b>	17 (4,14)	<b>03:02</b>	22 (5,36)
<b>04:02</b>	7 (1,71)	<b>01:05</b>	6 (1,46)	<b>03:03</b>	5 (1,22)
<b>04:04</b>	8 (1,95)	<b>02:01</b>	26 (6,34)	<b>04:02</b>	15 (3,65)
<b>07:01</b>	27 (6,58)	<b>03:01</b>	24 (5,61)	<b>05:01</b>	54 (13,17)
<b>08:01</b>	14 (3,41)	<b>03:03</b>	10 (2,68)	<b>05:02</b>	48 (11,71)
<b>08:04</b>	7 (1,71)	<b>04:01</b>	16 (3,91)	<b>05:03</b>	14 (3,41)
<b>10:01</b>	6 (1,46)	<b>05:01</b>	46 (10,98)	<b>06:01</b>	4 (1,00)
<b>11:01</b>	40 (9,75)	<b>05:05</b>	83 (20,24)	<b>06:02</b>	34 (8,29)
<b>11:04</b>	30 (7,31)			<b>06:03</b>	28 (6,82)
<b>12:01</b>	9 (2,19)			<b>06:04</b>	10 (2,43)
<b>13:01</b>	27 (6,58)				
<b>13:02</b>	16 (3,90)				
<b>14:54</b>	9 (2,19)				
<b>15:01</b>	35 (8,53)				
<b>16:01</b>	43 (10,48)				
<b>16:02</b>	6 (1,46)				

Prikazani su samo aleli čija je učestalost > 1 %.

Najučestaliji je alel: *HLA-DRB1*\*16:01 (10,48 %), slijede *HLA-DRB1*\*03:01 (10,24 %), *-DRB1*\*11:01 (9,75 %), *-DRB1*\*01:01 (9,51 %), *-DRB1*\*15:01 (8,53 %) i *-DRB1*\*11:04 (7,31 %). Najučestaliji među 16 analiziranih alela na lokusu *HLA-DQA1* su *HLA-DQA1*\*01:02 (24,87 %), *-DQA1*\*05:05 (20,24 %), *-DQA1*\*01:01 (10,97 %), *-DQA1*\*05:01 (10,98 %) te

*-DQA1\*01:03* (7,07 %). Na lokusu *HLA-DQB1* smo našli šestanest različitih alela. Među njima je 13 alela s učestalošću > 1 %. Među njima najučestaliji alel je *HLA-DQB1\*03:01* (23,65 %), zatim slijede *HLA-DQB1\*05:01* (13,17 %), *-DQB1\*05:02* (11,71 %), *-DQB1\*02:01* (10,73 %) i *-DQB1\*06:02* (8,29 %).

#### **4.2.3.2. Usporedba učestalosti alela na lokusima *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* iz kontrolne skupine sjeverozapadne Hrvatske s drugim studijama**

U Tablicama 13., 14. i 15. usporedili smo učestalosti alela na lokusima *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* u kontrolnoj skupini sjeverozapadne Hrvatske s učestalostima alela u drugim studijama iz Hrvatske: istraživanje iz 2014. godine na 4000 darivatelja KMS- Hrvatska 2 za alele na lokusu *HLA-DRB1*, istraživanje iz 2000. godine Grubić i sur. - Hrvatska 4 za alele na lokusima *HLA-DQA1* te na istraživanje Grubić i sur. iz 1995. za *HLA-DQB1* alele - Hrvatska 5 (223, 238, 245). Usporedili smo također učestalosti alela na lokusima *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* u kontrolnoj skupini s učestalostima u susjednim zemljama te u nama bližim zemljama Europe (učestalosti su preuzete sa stranice <http://www.allelefrequencies.net/> (237) te iz originalnih radova autora iz tih zemalja). Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti alela između našeg rada i između populacija Hrvatska 2 te Hrvatska 4 u svim analiziranim alelima na lokusima *HLA-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* osim kod alela *HLA-DQB1\*04:02* gdje je učestalost tog alela kontrolne skupine iz našeg istraživanja iznosila 3,7 % dok je u skupini Hrvatska 4 bila 0,84 %.

Tablica 13. Usporedba učestalosti najčešćih alela lokusa *HLA-DRB1* u našoj kontrolnoj skupini s učestalostima u susjednim zemljama, nekih država Europe te u skupini Hrvatska 2.

<i>HLA-DRB1</i> *	Hrvatska - naša studija (N = 205) (%)	Hrvatska 2 (N = 4000) (%) (238)	Slovenija* (N = 140) (%) (237)	Italija (N = 975) (%) (242)	Njemačka (N = 39689) (%) (237)	Makedonija (N = 158) (%) (237)	Njemačka‡ (N = 1028) (%) (246)	Austrija (N = 200) (%) (237)
<b>01:01</b>	9,51	9,79	12,25	6,40	8,90	8,20	9,73	12,10
<b>03:01</b>	10,24	10,01	11,68	9,30	10,20	6,70	10,75	11,80
<b>04:01</b>	3,17	2,96	2,89	1,70	6,84	1,30	3,26	6,80
<b>07:01</b>	6,58	9,78	13,39†	12,50†	12,24†	7,30	10,36	13,40†
<b>08:01</b>	3,41	2,94	3,61	2,10	2,66	1,90	3,45	1,50
<b>11:01</b>	9,75	7,88	7,42	12,00	7,95	9,20	5,89†	9,00
<b>11:04</b>	7,31	7,66	6,19	10,00	3,60	13,90	6,86	3,80
<b>13:01</b>	6,58	6,44	6,19	5,40	7,80	7,30	6,03	6,20
<b>13:02</b>	3,90	4,41	3,61	4,80	4,18	3,20	4,38	6,20
<b>15:01</b>	8,53	8,71	8,56	5,60	12,85	4,40	10,26	12,70
<b>16:01</b>	10,48	9,41	2,89†	4,90	2,60†	14,90	8,12	2,50†

\*Učestalost pojedinih alela je izračunata na temelju učestalosti fenotipova pretpostavljajući da je populacija pod Hardy-Weinbergovim proporcijama.

‡Registar donora KMS - bosansko-hercegovačka manjina.

† $P < 0.05$

Tablica 14. Usporedba učestalosti najčešćih alela lokusa *HLA-DQA1* u našoj kontrolnoj skupini s učestalosti u susjednim zemljama, u nekim državama Europe te u skupini Hrvatska 4.

<i>HLA-DQA1</i> *	Hrvatska -naša studija N = 205 (%)	Hrvatska 4 (N = 210) (%) (245)	Slovenija ** (N = 140) (%) (237)	Italija (N = 179) (%) (237)	Njemačka ** (N = 111) ( %) (237)	Makedonija (N = 103) (%) (237)	Grčka N = 500 (%) (237)
<b>01:01</b>	10,97	15,7	19,37	10,00	9,44	12,10	6,30
<b>01:02</b>	24,87	29,0	23,84	13,70†	21,70	29,60	24,80
<b>01:03</b>	7,07	6,2	1,81	6,70	6,51	5,30	5,80
<b>01:04</b>	4,14	-	-	3,90	3,66	-	5,90
<b>02:01</b>	6,34	7,9	12,59†	15,40†	13,51†	2,90	8,00
<b>03:01</b>	5,61	‡	6,67	4,70	11,96	16,00†	7,80
<b>04:01</b>	3,91	3,8	3,61	1,90	3,20	0	0,30†
<b>05:01</b>	10,98	27,6†	31,88†	40,80†	26,44†	32,50†	6,80
<b>05:05</b>	20,24	-	-	-	-	-	32,50†

\*\*Učestalost pojedinih alela je izračunata na temelju učestalosti fenotipova pretpostavljajući da je populacija pod Hardy-Weinbergovim proporcijama.

‡U studiji Grubić i sur. iz 2000. godine prikazana je frekvencija alela *HLA-DQA1\*03* koja je bila 10,0 %.

† $P < 0.05$



Tablica 15. Usporedba učestalosti najčešćih alela lokusa *HLA-DQB1* u našoj kontrolnoj skupini s učestalostima iz susjednih zemalja, u nekim državama Europe te u skupini Hrvatska 4.

<i>HLA-DQB1</i> *	Hrvatska -naša studija (N = 205) (%)	Hrvatska 5 (N = 238) (%) (223)	Slovenija‡ (N = 140) (%) (237)	Italija (N = 2087) (%) (242)	Njemačka (N = 174) (%) (237)	Makedonija (N = 172) (%) (237)	Njemačka** (N = 4856) (%) (246)	Austrija (N = 200) (%) (237)
<b>02:01</b>	10,73	13,44	22,54†	7,79	18,70†	- <sup>a</sup>	16,46†	12,80
<b>02:02</b>	5,61	-	-	7,71	0,60†	- <sup>a</sup>	-	9,80
<b>03:01</b>	23,65	23,53	23,84	30,33†	21,00	25,00	27,32	19,70
<b>03:02</b>	5,36	3,78	4,39	5,92	5,20	6,40	11,39†	7,20
<b>04:02</b>	3,65	0,84†	3,61	3,14	2,90	1,50	2,17	1,50
<b>05:01</b>	13,17	12,18	14,21	11,79	13,20	7,30	8,69	13,80
<b>05:02</b>	11,71	10,92	4,39	7,00	2,60†	17,20	6,63†	3,00†
<b>05:03</b>	3,41	5,04	4,76	6,88	3,20	5,80	5,70	2,50
<b>06:02</b>	8,29	8,82	8,89	3,45†	16,70	6,90	5,07	12,50
<b>06:03</b>	6,82	6,72	6,67	5,70	9,20	5,80	5,74	6,50
<b>06:04</b>	2,43	3,79	3,61	3,31	2,40	1,70	3,01	5,50

‡Učestalost pojedinih alela je izračunata na temelju učestalosti fenotipova pretpostavljajući da je populacija pod Hardy-Weinbergovim proporcijama.

<sup>a</sup>Na stranici <http://www.allelefrequencies.net/> autori iz Makedonije su upisali učestalost *HLA-DQB1*\*02 alela 15,40 %.

\*\*Registar donora KMS - turska manjina.

† $P < 0.05$

U Tablici 16. su prikazani najučestaliji haplotipovi u kontrolnoj skupini koji uključuju dva lokusa *HLA-DRB1* i *HLA-DQB1* te tri lokusa *HLA-DRB1*, *HLA-DQA1* i *HLA-DQB1*.

Tablica 16. Učestalost *HLA-DRB1~DQB1* i *HLA-DRB1~DQA1~DQB1* haplotipova u kontrolnoj skupini (N = 205).

Haplotipovi <i>HLA-DRB1~DQB1</i>	Učestalost N (%)	Haplotipovi <i>HLA-DRB1~DQA1~DQB1</i>	Učestalost N (%)
<i>*01:01~*05:01</i>	36 (9,51)	<i>*01:01~*01:01~*05:01</i>	38 (9,27)
<i>*03:01~*02:01</i>	42 (10,24)	<i>*03:01*05:01~*02:01</i>	37 (8,99)
<i>*07:01~*02:02</i>	23 (5,61)	<i>*04:01~*03:01~*03:02</i>	6 (1,46)
<i>*08:01~*04:02</i>	9 (2,20)	<i>*04:02~*03:01~*03:02</i>	5 (1,22)
<i>*10:01~*05:01</i>	6 (1,46)	<i>*04:04~*03:01~*03:02</i>	5 (1,22)
<i>*11:01~*03:01</i>	40 (9,76)	<i>*07:01~*02:01~*02:02</i>	21 (5,12)
<i>*11:04~*03:01</i>	27 (6,59)	<i>*08:01~*04:01~*04:02</i>	8 (1,95)
<i>*13:01~*06:03</i>	25 (6,10)	<i>*10:01~*01:05~*05:01</i>	6 (1,46)
<i>*13:02~*06:04</i>	10 (2,44)	<i>*11:01~*05:05~*03:01</i>	38 (9,27)
<i>*15:01~*06:02</i>	32 (8,29)	<i>*11:04~*05:05~*03:01</i>	27 (6,59)
<i>*16:01~*05:02</i>	39 (9,51)	<i>*13:01~*01:03~*06:03</i>	24 (5,85)
		<i>*13:02~*01:02~*06:04</i>	10 (2,44)
		<i>*14:54~*01:04~*05:03</i>	9 (2,2)
		<i>*15:01~*01:02~*06:02</i>	31 (7,60)
		<i>*16:01~*01:02~*05:02</i>	39 (9,51)

Među *HLA-DRB1~DQB1* haplotipovima najučestaliji je *HLA-DRB1\*03:01~DQB1\*02:01* (10,24 %), slijede ga *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01* (9,76 %), *HLA-DRB1\*16:01~DQB1\*05:02* (9,51 %), *HLA-DRB1\*01:01~DQB1\*05:01* (9,51 %) te *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* (8,29 %).

Najučestaliji *HLA-DRB1~DRB1~DQB1* haplotipovi u našem istraživanju su: *HLA-16:01~DQA1\*01:02~DQB1\*05:02* (9,51 %), *HLA-DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01* (9,27 %), *HLA-DRB1\*11:01~DQA1\*05:05~DQB1\*03:01* (9,27 %), *HLA-DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01* (8,99 %) i *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* (7,60 %).

### 4.3. Usporedba učestalosti gena/alela HLA razreda I i II između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine

#### 4.3.1. Usporedba gena HLA razreda I između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine

U skupini bolesnika smo našli petnaest različitih gena *HLA-A*. Najučestaliji su geni *HLA-A\*02* (24,28 %), *-A\*03* (18,50 %), *-A\*24* (13,58 %) te *-A\*01* (13,29 %) (Tablica 17.). Kod zdravih ispitanika kontrolne skupine gen *HLA-A\*02* je učestaliji (30,24 %) u usporedbi sa skupinom bolesnika s MS (24,28 %), ali ne postoji statistička značajnost ( $P = 0,206$ ). Geni *HLA -A\*03* (18,50 % vs. 16,59 %), *-A\*24* (13,58 % vs. 11,22 %) te *-A\*01* (13,29 % vs. 10,24 %) su učestaliji kod pacijenata s MS, ali također bez statističke značajnosti između ispitivanih skupina.

Tablica 17. Raspodjela gena na lokusu *HLA-A* kod pacijenata s MS (N = 173) i zdrave kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-A*</i>	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	<i>P-vrijednost</i>
<b>01</b>	46 (13,29)	42 (10,24)	NZ
<b>02</b>	84 (24,28)	124 (30,24)	NZ
<b>03</b>	64 (18,50)	68 (16,59)	NZ
<b>11</b>	25 (7,23)	32 (7,80)	NZ
<b>23</b>	3 (0,87)	7 (1,71)	NZ
<b>24</b>	47 (13,58)	46 (11,22)	NZ
<b>25</b>	12 (3,47)	15 (3,66)	NZ
<b>26</b>	11 (3,18)	16 (3,90)	NZ
<b>30</b>	7 (2,02)	6 (1,46)	NZ
<b>31</b>	7 (2,02)	8 (1,95)	NZ
<b>32</b>	16 (4,62)	14 (3,41)	NZ
<b>33</b>	7 (2,02)	9 (2,19)	NZ
<b>68</b>	11 (3,18)	15 (3,66)	NZ

Kratice: MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno.

Prikazani su samo geni koji su zastupljeni >1 % u skupini MS ili u kontrolnoj skupini.

Ukupno su nađena dvadeset četiri gena *HLA-B* kod bolesnika s MS. Osamnaest gena *HLA-B* ima učestalost > 1 % (Tablica 18.) Kod bolesnika s MS, geni *HLA-B\*35* (14,74 % vs. 10,24 %), -*B\*18* (12,72 % vs. 9,27 %) i -*B\*07* (11,27 % vs. 9,27 %) su učestaliji u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti. U zdravoj populaciji *HLA-B\*51* (12,27 % vs. 11,27 %) je učestaliji u odnosu na skupinu bolesnika s MS, ali također bez statističke značajnosti.

Tablica 18. Učestalost gena na lokusu *HLA-B* kod pacijenata s MS (N = 173) i zdrave kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-B*</i>	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	<i>P-vrijednost</i>
<b>07</b>	39 (11,27)	38 (9,27)	NZ
<b>08</b>	22 (6,35)	23 (5,61)	NZ
<b>13</b>	8 (2,31)	11 (2,68)	NZ
<b>14</b>	11 (3,17)	9 (2,19)	NZ
<b>15</b>	17 (4,91)	18 (4,39)	NZ
<b>18</b>	44 (12,72)	38 (9,27)	NZ
<b>27</b>	16 (4,62)	28 (6,82)	NZ
<b>35</b>	51 (14,74)	42 (10,24)	NZ
<b>38</b>	11 (3,18)	21 (5,12)	NZ
<b>39</b>	10 (2,89)	15 (3,66)	NZ
<b>40</b>	13 (3,77)	20 (4,88)	NZ
<b>44</b>	26 (7,51)	31 (7,56)	NZ
<b>49</b>	5 (1,45)	14 (3,41)	NZ
<b>50</b>	1 (0,3)	8 (1,95)	NZ
<b>51</b>	39 (11,27)	50 (12,19)	NZ
<b>52</b>	5 (1,45)	8 (1,95)	NZ
<b>56</b>	5 (1,45)	7 (1,71)	NZ
<b>57</b>	7 (2,02)	6 (1,46)	NZ

Kratice: MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno.

Prikazani su samo geni koji su zastupljeni >1 % u skupini MS ili u kontrolnoj skupini.

Kod bolesnika s MS nađeno je ukupno trinaest gena *HLA-C*, dok je njih jedanaest zastupljeno s učestalošću > 1 % (Tablica 19.). Najučestaliji geni kod oboljelih od MS su *HLA-C\*07* (30,06 %), *-C\*04* (16,47 %), *-C\*06* (7,23 %), Gen *HLA-C\*04* je jedini učestaliji u skupini bolesnika s MS s graničnom značajnošću ( $P = 0,05$ ), dok učestalost ostalih gena nema statističku značajnost. U kontrolnoj skupini geni *HLA-C\*02* (9,51 %), *-C\*03* (8,29 %) *-C\*12* (17,80 %) su učestaliji nego kod bolesnika s MS, Samo je *HLA-C\*12* statistički više zastupljen u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu bolesnika s MS ( $P = 0,004$ ). Kada se primjeni korekcija za 13 testiranih gena dobivamo graničnu statističku značajnost ( $P_{kor} = 0,052$ ).

Tablica 19. Raspodjela gena na lokusu *HLA-C* kod pacijenata s MS (N = 173) i kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-C*</i>	MS N (%)	Kontrole N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
<i>01</i>	18 (5,20)	16 (3,90)		NZ
<i>02</i>	22 (6,36)	39 (9,51)		NZ
<i>03</i>	25 (7,23)	34 (8,29)		NZ
<i>04</i>	57 (16,47)	43 (10,49)	1,58 (0,98-2,55)	0,05
<i>05</i>	16 (4,62)	14 (3,41)		NZ
<i>06</i>	25 (7,23)	28 (6,82)		NZ
<i>07</i>	104 (30,06)	106 (25,85)		NZ
<i>08</i>	11 (3,18)	8 (1,95)		NZ
<i>12</i>	41 (11,85)	73 (17,80)	0,51 (0,32-0,81)	0,004
<i>14</i>	10 (2,89)	15 (3,66)		NZ
<i>15</i>	12 (3,47)	18 (4,39)		NZ

Kratice: CI = interval pouzdanosti, NZ = nije statistički značajno, MS = multipla skleroza, OR = omjer izgleda.

Geni sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

Prikazani su samo aleli koji su zastupljeni >1 % u skupini MS ili u kontrolnoj skupini.

#### 4.3.2. Usporedba učestalosti alela HLA razreda II između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine

Na lokusu *HLA-DRB1* je nađeno ukupno trideset četiri alela od kojih dvadeset ima učestalost > 1 %. Raspodjela alela na lokusu *HLA-DRB1* kod pacijenata s MS i kontrolne skupine je prikazana u Tablici 20. *HLA-DRB1\*15:01* je statistički značajno češći kod bolesnika s MS u usporedbi s kontrolnom skupinom i nakon Bonferronijeve korekcije za 34 testirana alela ( $P < 0,0001$ ,  $P_{kor} =$

0,0034, OR = 3,17). *HLA-DRB1\*11:01* alel je nađen manje zastupljen u bolesnika oboljelih od MS u odnosu na kontrolnu skupinu, ali se statistička značajnost gubi nakon korekcije *P* vrijednosti (*P* = 0,004, *P*<sub>kor</sub> = 0,136, OR = 0,39).

Tablica 20. Raspodjela alela *HLA-DRB1* među pacijentima s MS (N = 173) i kontrolnom skupinom (N = 205).

<i>HLA-DRB1*</i>	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
<i>01:01</i>	30 (8,67)	39 (9,51)		NZ
<i>01:02</i>	3 (0,87)	6 (1,46)		NZ
<i>03:01</i>	29 (8,38)	42 (10,24)		NZ
<i>04:01</i>	11 (3,21)	13 (3,17)		NZ
<i>04:02</i>	12 (3,47)	7 (1,71)		NZ
<i>04:03</i>	6 (1,73)	2 (0,49)		NZ
<i>04:04</i>	5 (1,44)	8 (1,95)		NZ
<i>07:01</i>	25 (7,22)	27 (6,58)		NZ
<i>08:01</i>	10 (2,89)	14 (3,41)		NZ
<i>08:04</i>	1 (0,29)	7 (1,71)		NZ
<i>10:01</i>	5 (1,44)	6 (1,46)		NZ
<i>11:01</i>	16 (4,62)	40 (9,75)	0,39 (0,21-0,74)	0,004
<i>11:03</i>	6 (1,73)	3 (0,73)		NZ
<i>11:04</i>	21 (6,07)	30 (7,31)		NZ
<i>12:01</i>	4 (1,16)	9 (2,19)		NZ
<i>13:01</i>	28 (8,09)	27 (6,58)		NZ
<i>13:02</i>	10 (2,89)	16 (3,90)		NZ
<i>14:01</i>	5 (1,44)	4 (0,97)		NZ
<i>14:54</i>	4 (1,16)	9 (2,19)		NZ
<i>15:01</i>	69 (19,94)	35 (8,53)	3,17 (1,95-5,17)	<0,0001†
<i>15:02</i>	7 (2,02)	4 (0,97)	2,12 (0,61-7,36)	NZ
<i>16:01</i>	22 (6,36)	43 (10,48)	0,60 (0,34-1,06)	NZ
<i>16:02</i>	2 (0,58)	6 (1,46)	0,39 (0,08-1,95)	NZ

Aleli sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

†*P* vrijednost ostaje statistički značajna nakon Bonferronijeve korekcije za 34 *HLA-DRB1* alela.

Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

Učestalost alela *HLA-DQB1* kod pacijenta s multiplom sklerozom i kontrolne skupine je prikazana u Tablici 21.

Tablica 21. Raspodjela *HLA-DQB1* alela među pacijentima s MS (N = 173) i kontrolnom skupinom (N = 205).

<i>HLA-DQB1</i> *	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
<b>02:01</b>	31 (8,96)	44 (10,73)		NZ
<b>02:02</b>	14 (4,05)	23 (5,61)		NZ
<b>03:01</b>	57 (16,47)	97 (23,65)	0,59 (0,38-0,90)	0,014
<b>03:02</b>	33 (9,54)	22 (5,36)	2,07 (1,15-3,72)	0,016
<b>03:03</b>	12 (3,47)	5 (1,22)		NZ
<b>04:02</b>	7 (2,02)	15 (3,65)		NZ
<b>05:01</b>	38 (10,98)	54 (13,17)		NZ
<b>05:02</b>	29 (8,38)	48 (11,71)		NZ
<b>05:03</b>	9 (2,60)	14 (3,41)		NZ
<b>06:01</b>	6 (1,73)	4 (1,00)		NZ
<b>06:02</b>	66 (19,07)	34 (8,29)	2,87 (1,76-4,69)	<0,0001†
<b>06:03</b>	30 (8,67)	28 (6,82)		NZ
<b>06:04</b>	10 (2,89)	10 (2,43)		NZ

Aleli sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

†*P* vrijednost ostaje statistički značajna nakon Bonferronijeve korekcije za 18 *HLA-DQB1* alela.

Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

U bolesnika s MS, na *HLA-DQB1* lokusu, otkriveno je osamnaest različitih alela. Najučestaliji su *HLA-DQB1*\*06:02 (19,07 %), *HLA-DQB1*\*03:01 (16,44 %), *HLA-DQB1*\*05:01 (10,98 %) i *HLA-DQB1*\*02:01 (8,96 %). *HLA-DQB1*\*06:02 i *HLA-DQB1*\*03:02 su bili statistički značajno više prisutni u skupini bolesnika oboljelih od MS, ali je samo *HLA-DQB1*\*06:02 ostao i dalje značajan nakon Bonferronijeve korekcije za 18 alela ( $P < 0,0001$ ,  $P_{kor} = 0,002$ , OR = 2,87). *HLA-DQB1*\*03:01 ( $P = 0,014$ ,  $P_{kor} = 0,252$ , OR = 0,59) alel je statistički manje učestao u pacijenata s MS, ali samo prije Bonferronijeve korekcije.

U usporedbu učestalosti *HLA-DQA1* alela pacijenta oboljelih od MS i zdravih DDK kontrolne skupine uključeno je 11 alela koji imaju učestalost veću od 1 % od ukupno 12 nađenih alela na lokusu *HLA-DQA1* (Tablica 22.). *HLA-DQA1*\*01:02 ( $P = 0,021$ ) i *HLA-DQA1*\*03:01 ( $P =$

0,011) su statistički značajno učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu DDK. *HLA-DQA1\*05:05* je statistički učestaliji u kontrolnoj skupini DDK tj. ima zaštitni efekt na obolijevanje od MS ( $P = 0,04$ ). Nakon Bonferonijeve korekcije za 12 testiranih alela statističku značajnost gube sva tri alela.

Tablica 22. Učestalost *HLA-DQA1* alela kod pacijenata s MS (N = 173) i zdravim ispitanicima (N = 205).

<i>HLA-DQA1*</i>	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
<b>01:01</b>	33 (9,54)	42 (11,22)		NZ
<b>01:02</b>	106 (30,64)	89 (25,12)	1,61 (1,07-2,43)	0,021
<b>01:03</b>	33 (9,54)	29 (7,07)		NZ
<b>01:04</b>	9 (2,60)	17 (4,14)		NZ
<b>01:05</b>	5 (1,44)	6 (1,46)		NZ
<b>02:01</b>	25 (7,25)	26 (6,34)		NZ
<b>03:01</b>	34 (9,83)	22 (5,85)	2,14 (1,2,-3,85)	0,011
<b>03:03</b>	9 (2,60)	10 (2,43)		NZ
<b>04:01</b>	9 (2,60)	16 (3,91)		NZ
<b>05:01</b>	31 (8,96)	45 (11,21)		NZ
<b>05:05</b>	49 (14,16)	78 (20,24)	0,64 (0,41-0,98)	0,04

Aleli sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

Među *HLA-DRB1* genotipovima, *HLA-DRB1\*01:01/\*13:01* ( $P = 0,033$ ) i *HLA-DRB1\*07:01/\*15:01* ( $P = 0,045$ ) su nađeni statistički značajnije učestaliji kod pacijenata s MS u odnosu na kontrolnu skupinu (Tablica 23.). Među genotipovima *HLA-DQB1*, povećana učestalost genotipa *HLA-DQB1\*03:02/\*06:02* ( $P = 0,0315$ ) je nađena kod pacijenata s MS. Međutim, sve navedene asocijacije su izgubile statističku značajnost nakon Bonferonijeve korekcije za 9 uključenih *HLA-DRB1* i 17 *HLA-DQB1* genotipova.



Tablica 23. Raspodjela *HLA-DRB1* i *HLA-DQB1* genotipova u pacijenata s MS (N = 173) i kontrolne skupine (N = 205).

HLA genotipovi	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
<i>DRB1</i> genotipovi				
<b>*01:01/*13:01</b>	10 (5,8)	3 (1,5)	4,13 (1,12-15,26)	0,033
<b>*03:01/*15:01</b>	9 (5,2)	3 (1,5)		NZ
<b>*03:01/*13:01</b>	1 (0,6)	8 (3,9)		NZ
<b>*03:01/*16:01</b>	2 (1,2)	6 (2,9)		NZ
<b>*07:01/*15:01</b>	7 (4,0)	1 (0,5)	8,60 (1,05-70,62)	0,045
<b>*07:01/*16:01</b>	0	6 (2,9)		NZ
<b>*11:01/*11:04</b>	2 (1,2)	5 (2,4)		NZ
<b>*11:01/*15:01</b>	4 (2,3)	5 (2,4)		NZ
<b>*11:01/*16:01</b>	3 (1,7)	5 (2,4)		NZ
<i>DQB1</i> genotipovi				
<b>*02:01/*03:01</b>	4 (2,3)	14 (6,8)		NZ
<b>*02:01/*03:02</b>	6 (3,5)	0 (0)		NZ
<b>*02:01/*06:02</b>	9 (5,2)	3 (1,5)		NZ
<b>*02:01/*06:03</b>	1 (0,6)	7 (3,4)		NZ
<b>*02:02/*03:01</b>	1 (0,6)	8 (3,9)		NZ
<b>*03:01/*03:01</b>	5 (2,9)	10 (4,9)		NZ
<b>*03:01/*03:02</b>	2 (1,2)	8 (3,9)		NZ
<b>*03:01/*05:01</b>	8 (4,6)	7 (3,4)		NZ
<b>*03:01/*05:02</b>	8 (4,6)	10 (4,9)		NZ
<b>*03:01/*06:02</b>	10 (5,8)	12 (5,9)		NZ
<b>*03:01/*06:03</b>	5 (2,9)	4 (2,0)		NZ
<b>*03:02/*06:02</b>	8 (4,6)	1 (0,5)	9,89 (1,22-79,89)	0,031
<b>*05:01/*06:02</b>	4 (2,3)	6 (2,9)		NZ
<b>*05:01/*06:03</b>	10 (5,8)	5 (2,4)		NZ
<b>*05:02/*05:02</b>	5 (2,9)	6 (2,9)		NZ
<b>*05:03/*06:02</b>	5 (2,9)	2 (1,0)		NZ

Genotipovi sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

Prikazani su samo genotipovi s učestalošću > 1 %. Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

### 4.3.3. Usporedba haplotipova koju čine geni/aleli HLA razreda I i II između pacijenata oboljelih od MS i kontrolne skupine

Kod kontrolne skupine i bolesnika s MS je napravljena analiza učestalosti haplotipova sastavljenih od dva lokusa (*HLA-A~B*, *HLA-A~DRB1*, *HLA-B~DRB1*, *HLA-DRB1~DQB1*, *HLA-DQA1~DQB1*), tri lokusa (*HLA-A~B~C* i *HLA-DRB1~DQA1~DQB1*) te šest lokusa (*HLA-A~B~C~DRB1~DQA1~DQB1*) te je uspoređena učestalost svih navedenih haplotipova u pacijenta oboljelih od MS i zdravih DDK kontrolne skupine. U Tablicama 24., 25., 26. i 27. su prikazane samo one kombinacije haplotipova za koje je pronađena statistički značajna razlika u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine.

U kontrolnoj skupini dobrovoljnih darivatelja najučestaliji HLA-A~DRB1 haplotipovi su *HLA-A\*01~DRB1\*03:01* (4,69 %), *HLA-A\*02~DRB1\*01:01* (4,20 %), *HLA-A\*02~DRB1\*03:01* (3,62 %) te *HLA-A\*02~DRB1\*07:01* (3,23 %) (Tablica 24.). Najveću učestalost u bolesnika s MS imaju *HLA-A\*02~DRB1\*15:01* (6,45 %), *HLA-A\*03~DRB1\*15:01* (5,63 %) te *HLA-A\*01~DRB1\*03:01* (3,92 %) haplotipovi. Haplotipovi *HLA-A\*02~DRB1\*15:01* i *HLA-A\*03~DRB1\*15:01* su statistički učestaliji u bolesnika nego u kontrolnoj skupini. Međutim samo je *HLA-A\*02~DRB1\*15:01* haplotip zadržao statističku značajnost nakon korekcije *P* vrijednosti za 15 haplotipova koji su uzeti za daljnju analizu (*P*<sub>kor</sub> = 0,0045), Rezultati pokazuju da je haplotip *HLA-A\*02~DRB1\*07:01* statistički značajno učestaliji u kontrolnoj skupini u odnosu na učestalost kod bolesnika s MS (*P* = 0,019), ali prije korekcije (*P*<sub>kor</sub> = 0,285). Haplotip *HLA-A\*03~DRB1\*11:01* nije nađen u bolesnika dok je prisutan u kontrolnoj skupini s granično statistički značajnom razlikom u učestalosti (*P* = 0,05).

Tablica 24. Učestalost *HLA-A~DQB1* haplotipova u bolesnika s MS (N = 173) i kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-A~DRB1</i> haplotip	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
<i>A*01~DRB1*03:01</i>	14 (3,92)	19 (4,69)		NZ
<i>A*02~DRB1*12:01</i>	1 (0,87)	6 (1,54)		NZ
<i>A*02~DRB1*03:01</i>	6 (1,72)	15 (3,62)		NZ
<i>A*02~DRB1*15:01</i>	22 (6,45)	3 (0,68)	9,81 (2,88-33,38)	0,0003†
<i>A*02~DRB1*16:01</i>	6 (1,85)	17 (4,18)	0,40 (0,15-1,03)	0,06
<i>A*02~DRB1*01:01</i>	12 (3,52)	17 (4,20)		NZ
<i>A*02~DRB1*07:01</i>	4 (1,08)	13 (3,23)	0,09 (0,01-0,66)	0,019
<i>A*02~DRB1*11:01</i>	1 (0,73)	13 (3,22)		NZ
<i>A*03~DRB1*15:01</i>	19 (5,63)	11 (2,58)	2,18 (1,00-4,71)	0,040
<i>A*24~DRB1*13:01</i>	10 (2,95)	3 (0,82)	4,13 (1,12-15,26)	0,033
<i>A*02~DRB1*04:01</i>	6 (2,17)	9 (2,21)		NZ
<i>A*03~DRB1*13:01</i>	5 (1,52)	7 (1,63)		
<i>A*03~DRB1*11:01</i>	0	9 (2,25)	0,06 (0,0034-1,03)	0,050
<i>A*03~DRB1*11:04</i>	6 (1,74)	8 (1,64)		NZ
<i>A*24~DRB1*11:04</i>	0	8 (1,63)		NZ

Haplotipovi sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

†*P* vrijednost ostaje statistički značajna nakon Bonferronijeve korekcije za 15 *HLA-A~DRB1* haplotipova.

Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

U Tablici 25. su prikazani rezultati analize povezanosti *HLA-DRB1~DQB1* haplotipova s rizikom od nastanka MS. Uključeni su samo oni haplotipovi koji su zastupljeni u najmanje 1 % uzoraka bilo pacijenata ili zdravih ispitanika. Za tri haplotipa je nađeno da su statistički značajno povezani s obolijevanjem od MS: *HLA-DRB1\*04:02~DQB1\*03:02* (OR = 4,13, *P* = 0,034), *HLA-DRB1\*07:01~DQB1\*03:03* (OR = 6,23, *P* = 0,019) i *HLA-DQB1\*15:01~DRB1\*06:02* (OR = 2,75, *P* < 0,0001); *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01* (OR = 0,42, *P* = 0,037) ima zaštitni učinak na obolijevanje od MS. Međutim, samo *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* haplotip je ostao statistički značajno učestaliji kod bolesnika oboljelih od MS nakon Bonferronijeve korekcije za 15 haplotipova uključenih u analizu (*P*<sub>kor</sub> = 0,0015).

Tablica 25. Učestalost *HLA-DRB1~DQB1* haplotipova u bolesnika s MS (N = 173) i kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-DRB1~DQB1</i> haplotipovi	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> -vrijednost
<i>*01:01~*05:01</i>	29 (8,38)	36 (9,51)		NZ
<i>*03:01~*02:01</i>	29 (8,38)	42 (10,24)		NZ
<i>*04:01~*03:02</i>	10 (2,89)	8 (1,95)		NZ
<i>*04:02~*03:02</i>	12 (3,47)	5 (1,22)	2,98 (1,03-8,64)	0,044
<i>*07:01~*02:02</i>	13 (3,76)	23 (5,61)		NZ
<i>*07:01~*03:03</i>	11 (3,18)	4 (0,98)	3,41 (1,07-10,92)	0,038
<i>*08:01~*04:02</i>	5 (1,45)	9 (2,20)		NZ
<i>*10:01~*05:01</i>	5 (1,45)	6 (1,46)		NZ
<i>*11:01~*03:01</i>	15 (4,62)	40 (9,76)	0,39 (0,21-0,73)	0,0037
<i>*11:04~*03:01</i>	20 (6,07)	27 (6,59)		NZ
<i>*13:01~*06:03</i>	26 (7,51)	25 (6,10)		NZ
<i>*13:02~*06:04</i>	9 (2,60)	10 (2,44)		NZ
<i>*15:01~*05:02</i>	4 (1,16)	1 (0,24)		NZ
<i>*15:01~*06:02</i>	63 (18,21)	34 (8,29)	2,88 (1,78-4,66)	< 0,001 <sup>†</sup>
<i>*16:01~*05:02</i>	22 (6,36)	39 (9,51)		NS

Haplotipovi sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

<sup>†</sup>*P* vrijednost ostaje statistički značajna nakon Bonferronijeve korekcije za 15 *HLA-DRB1~DQB1* haplotipova.

Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

Kod bolesnika s MS najučestaliji *HLA-A~B~C* haplotipovi su *HLA-A\*01~B\*08~C\*07\** (5,18 %), *HLA-A\*03~B\*07~C\*07* (4,77 %), *HLA-A\*11~B\*35~C\*04* (4,54 %) te *HLA-A\*11~B\*35~C\*04* (4,0 %) (Tablica 26.). Haplotip *HLA-A\*24~B\*35~C\*04* je statistički učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu DDK (*P* = 0,046) gdje nije uočen niti jedan takav haplotip. U kontrolnoj skupini haplotip *HLA-A\*02~B\*40~C\*03* je značajno učestaliji (*P* = 0,039) u odnosu na skupinu bolesnika s MS, ali prije korekcije *P* vrijednosti za 14 analiziranih haplotipova.

Tablica 26. Usporedba učestalosti haplotipova *HLA-A~B~C* u populaciji bolesnika s MS (N = 173) i kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-A~B~C</i> haplotipovi	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95% CI)	<i>P</i> -vrijednost
<i>*01~*08~*07</i>	18 (5,18)	17 (4,00)		NZ
<i>*02~*15~*03</i>	5 (1,55)	7 (1,70)		NZ
<i>*02~*18~*07</i>	5 (1,44)	8 (1,94)		NZ
<i>*02~*18~*12</i>	7 (1,88)	2 (0,05)		NZ
<i>*02~*27~*02</i>	6 (1,59)	14 (3,32)		NZ
<i>*02~*40~*03</i>	1 (0,27)	10 (2,45)	0,11(0,01-0,08)	0,039
<i>*02~*51~*14</i>	0	7 (1,75)		NZ
<i>*03~*07~*07</i>	17 (4,77)	16 (3,9)		NZ
<i>*03~*18~*07</i>	7 (2,00)	3 (0,07)		NZ
<i>*03~*35~*04</i>	16 (4,54)	10 (2,44)		NZ
<i>*11~*35~*04</i>	14 (4,00)	8 (1,91)		NZ
<i>*24~*07~*07</i>	2 (0,048)	10 (2,26)		NZ
<i>*24~*35~*04</i>	8 (2,13)	0	18,51 (1,05-326,54)	0,046
<i>*25~*18~*12</i>	9 (2,60)	12 (3,00)		NZ

Haplotipovi sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

Prikazani su samo haplotipovi koji su zastupljeni >1 % u skupini MS ili u kontrolnoj skupini.

Među *HLA-DRB1~DQA1~DQB1* haplotipovima, 20 haplotipova je zastupljeno s više od 1 % učestalosti među bolesnicima s MS ili kontrolnom skupinom (Tablica 27.).

Tablica 27. Učestalost *HLA-DRB1~DQA1~DQB1* haplotipova u bolesnika s MS (N = 173) i kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-DRB1~DQA1~DQB1</i> haplotipovi	MS N (%)	Kontrolna skupina N (%)	OR (95 % CI)	<i>P</i> - vrijednost
<i>*01:01~*01:01~*05:01</i>	28 (8,14)	35 (9,27)		NZ
<i>*03:01~*05:01~*02:01</i>	29 (8,43)	37 (8,99)		NZ
<i>*04:01~*03:01~*03:02</i>	8 (2,33)	6 (1,46)		NZ
<i>*04:02~*03:01~*03:02</i>	8 (2,33)	5 (1,22)		NZ
<i>*04:03~*03:01~*03:02</i>	6 (1,74)	0	15,96 (0,89-285,51)	0,059
<i>*04:04~*03:01~*03:02</i>	4 (1,16)	5 (1,22)		NZ
<i>*07:01~*02:01~*02:02</i>	12 (3,49)	21 (5,12)		NZ
<i>*07:01~*02:01~*03:03</i>	11 (3,20)	4 (0,98)	3,41 (1,07-10,93)	0,038
<i>*08:01~*04:01~*04:02</i>	4 (1,16)	8 (1,95)		NZ
<i>*10:01~*01:05~*05:01</i>	5 (1,45)	6 (1,46)		NZ
<i>*11:01~*05:05~*03:01</i>	14 (4,36)	38 (9,25)	0,39 (0,20-0,74)	0,004
<i>*11:03~*05:05~*03:01</i>	6 (1,74)	2 (0,49)		NZ
<i>*11:04~*05:05~*03:01</i>	19 (5,81)	27 (6,59)		NZ
<i>*13:01~*01:03~*06:03</i>	26 (7,56)	24 (5,85)		NZ
<i>*13:02~*01:02~*06:04</i>	9 (2,62)	10 (2,44)		NZ
<i>*14:54~*01:04~*05:03</i>	4 (1,16)	9 (2,2)		NZ
<i>*15:01~*01:02~*06:02</i>	56 (17,73)	31 (7,60)	2,70 (1,64-4,45)	0,0001†
<i>*15:02~*01:03~*06:01</i>	6 (1,74)	4 (0,98)		NZ
<i>*16:01~*01:02~*05:02</i>	21 (6,10)	39 (9,51)		NZ

Haplotipovi sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom.

†*P* vrijednost ostaje statistički značajna nakon Bonferronijeve korekcije za 20 *HLA-DRB1~DQA1~DQB1* haplotipova.

Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

Haplotipovi *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* ( $P = 0,0001$ ) i *HLA-DRB1\*07:01~DQA1\*02:01~DQB1\*03:03* su statistički učestaliji kod bolesnika s MS u odnosu na zdrave osobe kontrolne skupine ( $P = 0,038$ ). Nakon korekcije *P* vrijednosti za 20 analiziranih haplotipova samo *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* ostaje statistički značajan ( $P_{kor} = 0,002$ ). Naprotiv, haplotip *HLA-DRB1\*11:01~DQA1\*05:05~DQB1\*03:01* ( $P = 0,004$ )

je statistički učestaliji u kontrolnoj skupini, ali samo prije Bonferronijeve korekcije za 20 uključenih haplotipova.

U Tablici 28. su prikazani rezultati analize povezanosti *HLA-A~B~C~DRB1~DQA1~DQB1* haplotipova s rizikom od nastanka MS. Uključeni su samo oni haplotipovi koji su zastupljeni u najmanje 1 % uzoraka bilo pacijenata ili zdravih ispitanika.

Tablica 28. Učestalost *HLA-A~B~C~DRB1~DQA1~DQB1* haplotipova u bolesnika s MS (N = 173) i kontrolne skupine (N = 205).

<i>HLA-A~B~C~DRB1~DQA1~DQB1</i> haplotipovi	MS, N (%)	Kontrolna skupina, N (%)	<i>P-vrijednost</i>
<i>*01~*08~*07~*03:01~*05:01~*02:01</i>	11 (3,16)	12 (2,93)	NZ
<i>*01~*08~*07~*15:01~*01:02~*06:02</i>	6 (1,73)	0	0,05 <sup>a</sup>
<i>*02~*07~*07~*15:01~*01:02~*06:02</i>	5 (1,45)	3 (0,73)	NZ
<i>*02~*07~*07~*13:01~*01:03~*06:03</i>	5 (1,45)	0	NZ
<i>*02~*15~*03~*04:01~*03:01~*03:02</i>	4 (1,16)	3 (0,73)	NZ
<i>*02~*18~*07~*11:04~*05:05~*03:01</i>	5 (1,45)	4 (0,98)	NZ
<i>*02~*18~*12~*15:01~*01:02~*06:02</i>	6 (1,73)	0	0,05 <sup>a</sup>
<i>*02~*27~*02~*01:01~*01:01~*05:01</i>	1 (0,29)	5 (1,22)	NZ
<i>*02~*27~*02~*16:01~*01:02~*05:02</i>	2 (0,58)	6 (1,46)	NZ
<i>*03~*07~*07~*15:01~*01:02~*06:02</i>	10 (2,91)	8 (1,95)	NZ
<i>*03~*35~*04~*01:01~*01:01~*05:01</i>	4 (1,16)	3 (0,61)	NZ
<i>*03~*35~*04~*15:01~*01:02~*06:02</i>	5 (1,45)	0	NZ
<i>*11~*35~*04~*01:01~*01:01~*05:01</i>	8 (2,31)	2 (0,37)	0,04 <sup>b</sup>
<i>*24~*07~*07~*15:01~*01:02~*06:02</i>	1 (0,29)	6 (1,46)	NZ
<i>*25~*18~*12~*15:01~*01:02~*06:02</i>	2 (0,58)	4 (1,00)	NZ

Haplotipovi sa značajnom razlikom u učestalosti između bolesničke i kontrolne skupine su označeni plavom bojom. Kratice: CI = interval pouzdanosti, MS = multipla skleroza, NZ = nije statistički značajno, OR = omjer izgleda.

<sup>a</sup> OR (95 % CI) = 15,94 (0,89-285,18)

<sup>b</sup> OR (95 % CI) = 4,92 (1,03-23,49)

U kontrolnoj skupini je nađeno ukupno šest haplotipova koji imaju učestalost  $\geq 1\%$ . Među njima je najučestaliji *HLA-A\*01~B\*08~C\*07~DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01* (2,93 %), a slijede ga *HLA-A\*03~B\*07~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* (1,95 %) te *HLA-A\*02~B\*27~C\*02~DRB1\*16:01~DQA1\*01:02~DQB1\*05:02* i *HLA-A\*24~B\*07~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* koji svaki ima učestalost 1,46 %.

U skupini bolesnika s MS nađeno jedanaest haplotipova s učestalošću  $\geq 1\%$ . Najučestaliji su *HLA-A\*01~B\*08~C\*07~DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01* (3,16 %) te *HLA-A\*03~B\*07~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* (2,91 %). Na trećem i četvrtom mjestu su *HLA\*11~B\*35~C\*04~DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01* (2,31 %) i *HLA\*01~B\*08~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* (1,73 %). Haplotip *HLA\*11~B\*35~C\*04~DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01* je statistički učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P = 0,04$ ), ali samo prije Bonferronijeve korekcije za 15 analiziranih haplotipova. Haplotipovi *HLA-A\*01~B\*08~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* i *HLA-A\*02~B\*18~C\*12~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* su statistički granično učestaliji u skupini bolesnika s MS dok u kontrolnoj skupini nisu uočeni ti pretpostavljeni haplotipovi.

#### 4.3.4. Analiza po spolu i dobi nastanka MS u bolesnika prema prisutnosti alela *HLA-DRB1\*15:01*

U Tablici 29. je prikazana razdioba po spolu i dobi bolesnika s MS i kontrolne skupine s obzirom na prisutnost alela *HLA-DRB1\*15:01*.

Tablica 29. Usporedba dobi i spola prema prisutnosti alela *HLA-DRB1\*15:01* u bolesnika s MS

	<i>HLA-DRB1*15:01</i> pozitivni N = 64	<i>HLA-DRB1*15:01</i> negativni N = 109	<i>P-vrijednost</i>
Žene	52 (81,25 %)	80 (73,40 %)	0,255*
Muškarci	12 (18,75)	29 (26,60)	
Dob nastanka bolesti, aritmetička sredina, SD (interkvartilni raspon)	35,6±11,0 (26-46)	36,0±11,1 (27-43)	0,735**

\*  $\chi^2 = 1,295$

\*\*z = 0,339

Kratice: SD = standardna devijacija



Nije nađena statistički značajna razlika po spolu između *HLA-DRB1\*15:01* pozitivnih i bolesnika koji ne nose *HLA-DRB1\*15:01* alel. Dob nastanka bolesti u bolesnika koji su nosioci *HLA-DRB1\*15:01* alela je niža (35,6 godina) u odnosu na prosječnu dob pri kojoj su nastali simptomi kod bolesnika bez *HLA-DRB1\*15:01* alela (36,0 godina), ali bez statističke značajnosti.

#### 4.3.5. Usporedba alela sa statistički značajnom povezanosti s MS ovisno o *HLA-DRB1\*15:01* statusu kod pacijenata s MS i kod kontrolne skupine

U Tablici 30. su analizirani aleli za koje je pronađena statistički značajna razlika u učestalosti među bolesnicima s MS u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tablica 30. Usporedba gena/alela sa statistički značajnom povezanosti s MS ovisno o *HLA-DRB1\*15:01* statusu kod pacijenata s MS i kod kontrolne skupine

<i>HLA-</i>	<i>HLA-DRB1*15:01</i> pozitivni			<i>HLA-DRB1*15:01</i> negativni		
	MS bolesnici (N = 64)	Kontrolna skupina (N = 33)	<i>P</i> -vrijednost	MS bolesnici (N = 109)	Kontrolna skupina (N = 172)	<i>P</i> - vrijednost
<i>C*12</i>	18	7	0,025	25	66	0,401
<i>DRB1*11:01</i>	4	5	0,165	12	40	0,012
<i>DQA1*01:02</i>	22	13	0,198	86	90	<0,0001
<i>DQA1*03:01</i>	8	1	0,161	26	23	0,012
<i>DQA1*05:05</i>	10	11	0,119	39	72	0,501
<i>DQB1*03:01</i>	0	0	0	57	97	0,678
<i>DQB1*03:02</i>	0	0	0	33	24	0,001
<i>DQB1*06:02</i>	55	30	0,484	12	5	0,001

Aleli statistički značajno učestaliji su obojani plavom bojom .

Kratice: MS = multipla skleroza

Nakon što su ispitanici podijeljeni u dvije skupine: *HLA-DRB1\*15:01* pozitivni i *HLA-DRB1\*15:01* negativni, aleli *HLA-DQB1\*06:02*, *HLA-DQB1\*03:02* i *HLA-DQA1\*03:01* su ostali statistički učestaliji u bolesnika s MS negativnih za alel *HLA-DRB1\*15:01*. Alel *HLA-DRB1\*11:01* je ostao statistički učestaliji u kontrolnoj skupini kod *HLA-DRB1\*15:01* negativnih

ispitanika. Gen *HLA-C\*12* je ostao statistički značajno učestao samo u skupini bolesnika s *HLA-DRB1\*15:01* alelom dok je alel *HLA-DQA1\*01:02*, nakon razdvajanja na *HLA-DRB1\*15:01* pozitivne i negativne ispitanike postao statistički značajno učestaliji u kontrolnoj skupini *HLA-DRB1\*15:01* negativnih ispitanika ( $P = 0,0001$ ). Aleli *HLA-DQA1\*05:05* i *HLA-DQB1\*03:01* su izgubili statističku značajnost kod *HLA-DRB1\*15:01* pozitivnih i *HLA-DRB1\*15:01* negativnih ispitanika kontrolne skupine.

## 5. RASPRAVA

Multipla skleroza je bolest čiji uzrok nije do kraja razjašnjen, ali se pretpostavlja da okolišni, genski i imunološki čimbenici utječu na podložnost nastanka MS. Od genskih čimbenika najviše se spominje sustav HLA, posebno geni HLA razreda I i II (247).

Hrvatska se ubraja među zemlje s najvećom prevalencijom MS (prevalencija veća od 100 bolesnika na 100.000 stanovnika) koja prema istraživanju iz 2018. iznosi 143,8 na 100.000 stanovnika (137). Mnoge dosadašnje studije su pokazale da prevalencija raste od juga prema sjeveru s najvećom stopom među zapadnoeuropskim stanovništvom (248). Budući da je Hrvatska zemlja središnje i jugoistočne Europe, prema tim bi spoznajama trebala imati puno manju prevalenciju.

Cilj ovog istraživanja parova je bio analizirati raspodjelu gena sustava HLA razreda I i II u bolesnika s MS i kontrolne skupine dobrovoljnih davatelja krvi te utvrditi potencijalno rizične i zaštitne alele, genotipove i haplotipove HLA za pojavu MS na području sjeverozapadne Hrvatske.

Sjeverozapadna Hrvatska se sastoji se od ovih županija: Grad Zagreb, Zagrebačka županija, Krapinsko-zagorska županija, Varaždinska županija, Koprivničko-križevačka županija te Međimurska županija (220).

Kroz povijest su ovo područje nastanjivali različiti narodi te je genska raznolikost ovog područja posljedica mnogobrojnih migracija. Tako su u razdoblju prije Krista ovaj prostor naseljavali Iliri, Kelti, Grci i Rimljani, u srednjem vijeku Avari i Slaveni, a u 7. stoljeću poslije Krista dolaze Hrvati. Povijest tih prostora su obilježile i migracije tijekom unije s Mađarima, turska osvajanja u drugoj polovici 15. i 16. stoljeća, unija s Austrijom te u novije vrijeme migracije unutar bivše Jugoslavije te za vrijeme rata u Hrvatskoj (230, 249).

U našem istraživanju smo nakon provedene genotipizacije za lokuse *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DQA1*, *-DQB1* te *-DRB1* izračunali odstupanja od Hardy-Weinbergovog zakona ravnoteže upotrebljavajući ukupni heterozigotni genotip za svaki lokus. Analiza dobivenih rezultata pokazala je da ne postoji statistička značajna razlika u broju uočenih i očekivanih genotipova za svih šest ispitivanih lokusa. Slične rezultate su dobili i autori istraživanja provedenog Hrvatskoj na 4000 dobrovoljnih davatelja krvotvornih matičnih stanica (238).

U kontrolnoj skupini smo kod lokusa *HLA-A* našli šesnaest različitih gena. Najučestaliji su geni *HLA-A\*02* (30,24 %), *-A\*03* (16,59 %), *-A\*24* (11,22 %), *-A\*01* (10,24 %) te *-A\*11* (7,80 %). Istraživanje provedeno u Hrvatskoj 2014. godine kod darivatelja KMS je također pokazalo da su

najučestaliji geni *HLA-A\*02* (31,32 %), *-A\*03* (12,42 %), *-A\*24* (11,39 %), *-A\*01* (12,46 %) te *A\*11* (6,91 %) (238). Slične učestalosti gena lokusa *HLA-A* su nađene u susjednim državama Sloveniji, Italiji, Njemačkoj, Srbiji, Bosni i Hercegovini, Austriji te Mađarskoj (236, 240–244, 250). Jedino su statistički značajno učestaliji gen *HLA-A\*30* u Italiji, dok je značajno manja učestalost gena *HLA-A\*25* bila u istraživanjima u Italiji, *-A\*03* u Srbiji i Mađarskoj te *-A\*11* alela u Austriji (237, 240, 241).

Kod *HLA-B* lokusa dva najučestalija gena u našoj kontrolnoj skupini su *HLA-B\*51* (12,19 %) i *-B\*35* (10,24 %). Isti geni su najučestaliji u Italiji, Srbiji i u prethodnom istraživanju iz Hrvatske, s tim da je kod tih istraživanja gen *HLA-B\*35* na prvom mjestu (238, 240, 242).

U Makedoniji najučestaliji su *HLA-B\*35* te *B\*51* i *-B\*18* koji dijele drugo mjesto, u Sloveniji *-B\*07* i *-B\*35*, u Njemačkoj *-B\*07* i *-B\*44*, u Austriji *-B\*44* i *-B\*07*, a u Bosni i Hercegovini *-B\*44* i *-B\*51* (236,242,244,250). U našem istraživanju na trećem i četvrtom mjestu po učestalosti su *HLA-B\*07* (9,27 %) i *-B\*18* (9,27 %). Statistički značajne razlike u učestalosti gena lokusa *HLA-B* između našeg istraživanja i istraživanja u susjednim i nama povijesno bliskim zemljama su: Italija i Srbija imaju značajno manju zastupljenost gena *HLA-B\*07*, Njemačka *-B\*18* i *-B\*51*, a Italija *-B\*27* u odnosu na našu kontrolnu skupinu (237, 240, 241). Zemlje koje imaju značajno višu učestalost gena iz lokusa *HLA-B* su Njemačka i Austrija za gen *HLA-B\*08*, Italija za *-B\*35* i *-B\*57*, a Njemačka, Austrija, Mađarska i BIH za *HLA-B\*44* (237, 241, 242, 244).

*HLA-C\*07* (25,85 %) je najučestaliji gen među *HLA-C* lokusom kod kontrolne skupine iz našeg istraživanja što je u skladu s rezultatima svih istraživanja u nama susjednim europskim zemljama te s prethodnim istraživanjem iz Hrvatske na 120 davatelja solidnih organa (237, 241, 243, 244, 250). *HLA-C\*12* je drugi najčešće zastupljen gen (17,80 %) dok je u svim analiziranim radovima on bio na trećem mjestu iza *HLA-C\*04* (237, 240, 242, 244, 250). U našoj studiji *HLA-C\*04* je treći po zastupljenosti na lokusu *HLA-C*. U skladu s našim istraživanjem su rezultati studije iz nama susjedne pokrajine Vojvodine na 400 ispitanika (*HLA-C\*07* [24,20 %], *-C\*12* [16,70 %] i *-C\*04* [12,20 %]) (237).







































Geni *HLA-C\*03*, *\*05*, *\*06*, *\*12* i *-C\*15* su statistički manje učestali u Italiji, *-C\*12* u Austriji dok je *HLA-C\*04* statistički učestaliji u Italiji, Makedoniji i Grčkoj u odnosu na naše istraživanje kontrolne skupine (237, 242, 244).

Proveli smo, među zdravim ispitanicima sjeverozapadne Hrvatske, analizu učestalosti alela *HLA* razreda II. Kod *HLA-DRB1* lokusa najučestaliji alel je *HLA-DRB1\*16:01* (10,48 %), slijede *HLA-DRB1\*03:01* (10,24 %), *-DRB1\*11:01* (9,75 %), *-DRB1\*01:01* (9,51 %), *-DRB1\*15:01* (8,53 %) i *-DRB1\*11:04* (7,31 %). *HLA-DRB1\*16:01* je najučestaliji alel u Makedonaca dok je

statistički manje zastupljen u populaciji iz Slovenije, Njemačke i Austrije (237, 243). Drugi po učestalosti u našoj studiji je *HLA-DRB1\*03:01* koji je na prvom mjestu po učestalosti u studiji provedenoj u Hrvatskoj na 4000 darivatelja matičnih krvotvornih stanica, u populaciji Slovenaca, Talijana, Nijemaca i Austrijanaca kao i u bosansko-hercegovačkoj manjini koja živi u Njemačkoj (237, 238, 244, 248). U hrvatskoj studiji su Grubić i sur. naglasili da su aleli *HLA-DRB1\*11:01* i *-DRB1\*11:04* slično zastupljeni među ispitanicima i da je to u skladu s padajućom učestalosti alela *HLA-DRB1\*11:04* od juga do zapada Europe, što je u skladu s našom studijom gdje je učestalost *HLA-DRB1\*11:04* (7,31 %) manja od učestalosti alela *HLA-DRB1\*11:01* (9,8 %) (238). Nasuprot tome, alel *HLA-DRB1\*11:01* je statistički manje zastupljen među bosanskohercegovačkom manjinom u Njemačkoj u odnosu na našu kontrolnu skupinu (246).

U istraživanjima iz Slovenije, Italije i Njemačke alel *HLA-DRB1\*07:01* je statistički učestaliji u tim populacijama u odnosu na našu kontrolnu skupinu (237, 242).

U našoj studiji najučestaliji alel *HLA-DQA1* lokusa je *HLA-DQA1\*01:02* (24,87 %), što je u skladu s prethodnim istraživanjem u Hrvatskoj (245). U slovenskoj, njemačkoj i makedonskoj populaciji najučestaliji je alel *HLA-DQA1\*05:01*, a slijedi ga *-DQA1\*01:01* (237). U našem istraživanju na drugom mjestu je *HLA-DQA1\*05:05* koji nije zabilježen u prethodnoj studiji Grubić i sur. (245) U studiji provedenoj u Gorskom Kotaru u Hrvatskoj na 63 ispitanika učestalost tog alela je bila 2.4 % (213). Inače, podaci o učestalosti alela *HLA-DQA1\*05:05* na razini Europe i svijeta su oskudni. U Europi je tek nekoliko istraživanja zabilježeno na stranici Allele Frequency Net Database (Slika 22 .)

Line	Allele	Population	% of individuals that have the allele	Allele Frequency (in_decimals)	Sample Size	IMGT/HLA <sup>1</sup> Database	Distribution <sup>2</sup>	Haplotype <sup>3</sup> Association	Notes <sup>a</sup>
1	DQA1*05:05	 Azores Terceira Island		0.1480	130	See			
2	DQA1*05:05	 Croatia Gorski Kotar Region		0.0240	63	See			
3	DQA1*05:05	 Czech Republic pop 3	37.8	0.2060	180	See			
4	DQA1*05:05	 England pop 2		0.1010	114	See			
5	DQA1*05:05	 Greece pop 5		0.3250	500	See			
6	DQA1*05:05	 Italy Bergamo	47.5	0.3100	101	See			
7	DQA1*05:05	 Italy North pop 3	49.5	0.3050	97	See			
8	DQA1*05:05	 Italy Rome	52.6	0.2960	100	See			
9	DQA1*05:05	 Netherlands pop 2	29.0	0.1573	155	See			
10	DQA1*05:05	 Portugal Azores Terceira Island	27.2	0.1447	130	See			
11	DQA1*05:05	 Spain Murcia		0	173	See			
12	DQA1*05:05	 Spain Valencia	28.1	0.1520	577	See			

Slika 22 . Učestalosti HLA-DQA1\*05:05 alela  
(preuzeto iz (237), <http://www.allelefreqencies.net/> )

Pretpostavka je da su studije s kojima smo radili usporednu analizu za lokus *HLA-DQA1* koristile metode koja nisu razlikovala *HLA-DQA1\*05:05* od *HLA-DQA1\*05:01*. Pera i sur. su u svom istraživanju koristili metodu sekvenciranja za određivanje alela *HLA-DQA1* lokusa koja je uključivala i analizu egzona 1 i 3 koji su bitni za razlikovanje alela *HLA-DQA1\*05:01* i – *DQA1\*05:05*. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je od 94 uzorka, prethodno određenih kao *HLA-DQA1\*05:01* PCR-SSP metodom (Dynal, Oslo, Norveška), samo njih 29 doista i i bilo pozitivno za alel *HLA-DQA1\*05:01*, dok se za preostala 65 ispitanika pokazalo da nose alel *HLA-DQA1\*05:05* (251).

Istraživači iz Grčke koju su unijeli učestalosti alela *HLA-DQA1\*05:05* na stranicu <http://www.allelefrequencies.net/> su dobili da je navedeni alel statistički učestaliji u Grčkoj u odnosu na naše istraživanje (237). Alel *HLA-DQA1\*02:01* je statistički značajno učestaliji u Sloveniji, Italiji i Njemačkoj, *-DQA1\*03:01* u Makedoniji, dok je alel *-DQA1\*04:01* statistički manje učestao u Grčkoj u odnosu na kontrolnu skupinu iz našeg istraživanja (237).

Kod lokusa *HLA-DQB1* u zdravih ispitanika sjeverozapadne Hrvatske je najučestaliji alel *HLA-DQB1\*03:01* (23,65 %) što je u skladu s rezultatima ostalih studija u susjedstvu i ranije studije u Hrvatskoj (223, 237, 242, 243, 244). Slijedeći po učestalosti u našoj studiji je *HLA-DQB1\*05:01* (13,17 %) kao i u istraživanjima među talijanskom i austrijskom populacijom (237, 242) dok je u prethodnoj studiji iz Hrvatske na 238 ispitanika, u Sloveniji na 140, u Njemačkoj na 174 te među turskom manjinom u Njemačkoj na 4856 ispitanika alel *HLA-DQB1\*02:01* bio drugi po učestalosti među alelima *HLA-DQB1* lokusa (223, 237, 242, 246).

U našem radu alel *HLA-DQB1\*02:02* je statistički učestaliji u odnosu na istraživanje iz Njemačke, *-DQB1\*05:02* u odnosu na radove iz Njemačke, Austrije i među turskom manjinom u Njemačkoj, a *-DQB1\*06:02* je statistički učestaliji među populacijom SZ Hrvatske u odnosu na ispitanike iz Italije (237, 242, 246). U populaciji zdravih ispitanika SZ Hrvatske alel *HLA-DQB1\*02:01* je značajno manje učestao u odnosu na radove iz Slovenije, Njemačke i među turskom manjinom koja živi u Njemačkoj te je alel *HLA-DQB1\*03:01* učestaliji u radu iz Italije, a *HLA-DQB1\*03:02* među turskom manjinom koja živi u Njemačkoj u odnosu na naše istraživanje (237, 242, 246).

U kontrolnoj skupini zdravih ispitanika smo analizirali i *HLA-A~B* te *HLA-A~B~C* haplotipove. Analiza haplotipova *HLA-A~B* je pokazala da je najučestaliji haplotip *HLA-A\*02~B\*51* (5,87 %). Slična učestalost je zabilježena i u studiji iz 2000. godine provedenoj na 210 hrvatskih ispitanika iz 105 obitelji serološkim određivanjem antigena HLA-A i -B te u studijama iz Makedonije i Grčke (237, 243, 245). Slijedeći po učestalost su bili *HLA-A\*03~B\*07* (3.88 %) i

*HLA-A\*01~B\*08* (3.83 %) s nižom učestalosti u odnosu na raniju studiju iz Hrvatske (5.0 % i 6 %), a s višom učestalosti u odnosu na studiju iz Makedonije u kojoj je obuhvaćeno 286 ispitanika (243, 245). Najučestaliji haplotip u koji su uključena tri lokusa *HLA-A*, *-B* i *-C* u našoj studiji je *HLA-A\*01~B\*08~C\*07* (4 %). Slične učestalosti za taj haplotip su nađene u Makedoniji i Kataloniji (Španjolska) dok je na Sardiniji učestalost bila značajno snižena u odnosu na našu studiju (1 %) (237, 243).

U kontrolnoj skupini sjeverozapadne Hrvatske, među haplotipovima sastavljenim od lokusa *HLA-DRB1* i *HLA-DQB1* najučestaliji su *HLA-DRB1\*03:01~DQB1\*02:01* (10,24 %), *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01* (9,76 %), *-DRB1\*16:01~DQB1\*05:02* (9,51 %), *-DRB1\*01:01~DQB1\*05:01* (9,51 %) te *-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* (8,29 %). U radu Grubić i sur. u hrvatskoj studiji najučestaliji haplotip *HLA-DRB1~DQB1* je *HLA-DRB1\*16:01~DQB1\*05:02* (9,32 %), a slijede ga *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* (8,90 %) i *HLA-DRB1\*01:01~DQB1\*05:01* (8,90 %) koji u našem istraživanju dijeli treće i četvrto mjesto s *HLA-DRB1\*16:01~DQB1\*05:02* s učestalošću od 9,51 % (223). U Italiji je *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01* zastupljen sa sličnom učestalošću kao i našem istraživanju (242).

Među haplotipovima *HLA-DRB1~DQA1~DQB1* u kontrolnoj skupini iz našeg rada najučestaliji su haplotipovi *HLA-DRB1\*16:01~DQA1\*01:02~DQB1\*05:02* i *HLA-DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01*, što je u skladu s istraživanjem Klitz i sur. na velikoj skupini Amerikanaca koji su europskog porijekla (252).

I na kraju, kod kontrolne skupine u našem istraživanju, analizirane su učestalosti haplotipova sastavljenih od 6 lokusa *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1*. Među njima je najučestaliji *HLA-A\*01~B\*08~C\*07~DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01* (2,93 %). Radi o tzv. očuvanom haplotipu (engl. *Ancestral Haplotype*, AH 8.1) koji je jedan od najučestalijih haplotipova uopće, a pogotovo u populacijama europskog porijekla (253). Slijede ga *HLA-A\*03~B\*07~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* (1,95 %) te *HLA-A\*02~B\*27~C\*02~DRB1\*16:01~DQA1\*01:02~DQB1\*05:02* i *HLA-A\*24~B\*07~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02*. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Grubić i sur. provedenim 2000. u hrvatskoj populaciji (245).

Usporedili smo učestalosti gena i alela na lokusima *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* između bolesnika koji imaju relapsno-remitirajući oblik MS i kontrolne skupine dobrovoljnih darivatelja krvi. U našem istraživanju među genima lokusa *HLA-A* niti jedan od gena nije bio statistički značajno učestaliji bilo u skupini bolesnika s MS ili u skupini zdravih ispitanika. *HLA-A\*02* gen je potvrđen kao najučestaliji zaštitni alel u ispitivanju provedenom na populacijama

pacijenata iz Italije (OR = 0,61,  $P < 5,8 \times 10^{-9}$ ), Švedske (OR = 0,63,  $P = x10^{-12}$ ), Belgije (OR = 5,6,  $P = 0,03$ ) i Tasmanije (OR = 0,51;  $P = 0,05$ ) (21, 254–256). *HLA-A\*02* gen je učestaliji u našoj studiji (30.2 %) kod zdravih ispitanika u odnosu na skupinu bolesnika s MS (24,3 %), ali ne postoji statistička značajnost ( $P = 0,2061$ ). Od podložnih gena za MS u literaturi se navodi *HLA-A\*03* (257, 258). U našoj studiji je *HLA-A\*03* također učestaliji kod bolesnika s MS, ali bez statističke značajnosti. Nasuprot tome Chao i sur. te Lincoln i sur. su na velikom uzorku pacijenata iz Kanade i Finske pokazali da niti jedan gen iz lokusa HLA-A nije povezan sa zaštitnom ulogom ili podložnošću za MS što je u skladu s našom studijom (259, 260).

Među genima lokusa *HLA-B* u našoj studiji, nismo našli statistički podložan ili zaštitni gen za nastanak MS. Gen *HLA-B\*07* je nešto učestaliji u skupini bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu (11,27 % nasuprot 9,27 %) kao i *HLA-B\*35* i *-B\*18*, ali bez statističke značajnosti. *HLA-B\*51* je učestaliji u kontrolnoj skupini, ali bez statističke značajnosti. *HLA-B\*07* se pokazao kao podložni gen u nekoliko studija, ali samo u kombinaciji s genom *HLA-DRB1\*15* (21, 257, 258). U skandinavskoj populaciji su *HLA-B\*12* i *-B\*18* bili učestaliji u skupini bolesnika s MS, no samo kada su *HLA-DRB1\*15* pozitivni ispitanici isključeni iz analize (208). U istraživanju SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*) na 17.465 bolesnika i 30.385 kontrola europskog podrijetla zaštitni aleli su uključivali *HLA-A\*02:01* (OR = 0,67), *HLA-B\*44:02* (OR = 0,78), *HLA-B\*38:01* (OR = 0,48) i *HLA-B\*55:01* (OR = 0,63) (11). Healy i sur. su kod 532 pacijenata iz Sjeverne Amerike našli da gen *HLA-B\*44* smanjuje podložnost za MS te da je kod pacijenta koji imaju taj alel sporija progresija bolesti (261).

Kod lokusa *HLA-C* u kontrolnoj skupini iz naše studije gen *HLA-C\*12* je statistički učestaliji u odnosu na u bolesnike s MS (OR = 0,52,  $P = 0,004$ ). Istraživanje provedeno u Švedskoj i Norveškoj je pokazalo da je *HLA-C\*12* učestaliji u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu s MS, ali samo ako se analiziraju *HLA-DRB1\*15* pozitivni ispitanici (208).

Najčešći zaštitni gen *HLA-C\*05* utvrđen u više studija (255, 262, 263) nije uočen u našoj studiji. Slične rezultate su dobili autori studije iz Južnog Brazila gdje nije nađena značajna učestalost u frekvencijama gena *HLA-C\*05* između skupine bolesnika i kontrolne skupine (263).

Prije analize podložnih i zaštitnih alela HLA razreda II u našem istraživanju, treba ponovo naglasiti da se podložnost za MS najčešće povezuje s *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* haplotipom. Međutim, izraženi LD u regiji HLA razreda II, otežava prepoznavanje primarnog alela podložnosti za MS jer su navedeni aleli gotovo uvijek prisutni zajedno na haplotipu DR2 (9, 10).



Među alelima *HLA-DRB1* lokusa, našli smo statistički značajnu povezanost između *HLA-DRB1\*15:01* alela i podložnosti za MS u pacijenata sjeverozapadne Hrvatske ( $P_{kor} = 0,034$ ). Prethodna studija iz Gorskog Kotara na 42 pacijenta i 63 zdrave osobe je također pokazala statistički značajnu povezanost između *HLA-DRB1\*15* alelne skupine i MS (213). Alel *HLA-DRB1\*15:01* je istaknut kao podložan za razvoj MS u mnogim zemljama u našem susjedstvu. U studiji iz Austrije analizirano je 39 SNP kod 883 pacijenta i 972 ispitanika iz kontrolne skupine. Rs 3135388 (*HLA-DRB1\*15:01*) je nađen učestaliji kod bolesnika ( $p < 0,01$ ) (212). Slične rezultate su dobili tipizacijom *HLA-DRB1* Ballerini i sur. u kontinentalnoj Italiji te Saruhan-Direskeneli i sur. u Turskoj (264, 265). Alel *HLA-DRB1\*15:01* je nađen kao primarni rizični čimbenik za MS i kod drugih europskih populacija: Grčke, Slovačke i Malte (19, 20, 214) te u preglednom članku Zhanga i sur. među bolesnicima europskog porijekla (14). Autori iz Malte su analizirali prevalencije MS i učestalosti alela *HLA-DRB1\*15:01* prema zemljopisnoj širini (od Norveške do Kanarskih otoka) te istaknuli da populacije Južne Europe (Sicilija, Sardinija, Grčka i Bugarska), kad se usporede s drugim europskim zemljama, imaju veću prevalenciju MS (do 150 na 100.000 stanovnika) nego što bi se očekivalo u odnosu na učestalosti *DRB1\*15* gena (od 4,3-6 %) (214). Ta spoznaja se može odnositi i na našu studiju jer smo kod bolesnika oboljelih od MS našli učestalost alela *HLA-DRB1\*15:01* od 8,5 % sličnu zemljama južne Europe, dok je prevalencija MS (143.8/100.000) (137) usporediva sa zemljama Zapadne Europe kao npr. u Skandinavskim zemljama i Ujedinjenom Kraljevstvu (150/100.000 ili viša) (247).

Jačina asocijacija *DRB1\*15:01* alela s MS u našoj studiji je slična jačini asocijacija iz većine drugih europskih studija te nositelji ovog alela imaju tri puta veći rizik od obolijevanja od MS (266).

Budući da je većina studija o povezanosti alela *DRB1\*15:01* rađena u Europi, rezultati za druge populacije su malobrojni. Istraživanja provedena u kineskoj, iranskoj, afričko-američkoj te afričko-brazilskoj populaciji su pokazala višu prevalenciju *DRB1\*15:01* alela u bolesnika s MS (198, 207, 215, 217). Meta-analiza Mohajera i sur. je pokazala da je u zemljama Bliskog istoka i Sjeverne Afrike alelna skupina *HLA-DRB1\*15* povezana s rizikom od nastanka MS, ali je prosječna snaga asocijacija u toj regiji manja nego u studijama provedenim među ispitanicima europskog porijekla ( $OR = 1,6$  u grupi s analiziranim frekvencijama alela i  $OR = 2,51$  u grupi s analiziranim fenotipovima) (267). U sjevernoj Aziji ( $OR = 1,81$ ) te u Amerikanaca afričkog porijekla je također *HLA-DRB1\*15:01* statistički značajno učestaliji ( $OR = 1,93$ ) u bolesnika s MS, uz manju prosječnu snagu asocijacije u odnosu na studije iz Europe (12, 268). Autori su naglasili da je, budući su aleli *DRB1\*15:01* i *DQB1\*06:02* u uskoj neravnoteži udruživanja (LD)

u europskim populacijama, teško razlučiti koji je od navedenih alela zapravo primarni čimbenik povezan s podložnošću za MS. Međutim, u afričkoameričkoj populaciji, zbog nižeg LD između ovih alela, jasno je da je to alel *DRB1\*15:01* (12, 268).

*HLA-DRB1\*11:01* je jedini alel kod HLA-DRB1 lokusa koji se pokazao kao zaštitni čimbenik za MS ( $P = 0.004$ ;  $OR = 0.39$ ), iako povezanost nije bila značajna nakon korekcije  $P$  vrijednosti za višestruka ponavljanja. U našoj studiji, učestalost alela *HLA-DRB1\*11:01* je bila statistički značajno niža u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u suglasnosti s prethodnim istraživanjima u Italiji i Malti (214, 264). Zaštitna uloga *HLA-DRB1\*11* je istaknuta u meta-analizi Zhang i sur. u bolesnika europskog porijekla kao i kod stanovnika zapadne Australije te Kanade (14, 202, 269). Wu i sur. su izvijestili o zaštitnoj ulozi *HLA-DRB1\*11:01* ako se istraživanje provodi s genotipizacijom visokog razlučivanja u odnosu na tipizaciju niskog razlučivanja, a takav nalaz je sukladan s rezultatima naše studije (202). Autori navedenog istraživanja su naglasili da tipizacija HLA visokog razlučivanja omogućava pouzdanije prepoznavanje kako podložnih tako i zaštitnih alela za razliku od tipizacije niskog razlučivanja budući se unutar iste alelne skupine mogu nalaziti i podložni i zaštitni aleli (202). Pregledni rad Mohajera i sur. je također pokazao da među stanovnicima Bliskog istoka i Sjeverne Afrike *DRB1\*11* alelna skuoina ima zaštitnu ulogu u nastanku MS (267).

Za rizični gen *HLA-DRB1\*04*, koji se navodi u istraživanju Crnić-Martinović i sur. 2010. godine u regiji Gorskog kotara koje je područje visokog rizika za razvoj MS, u našoj studiji nije pronađena povezanost s MS (213).

U našem istraživanju na lokusu HLA-DQA1, aleli *HLA-DQA1\*01:02* ( $OR = 1.61$ ,  $P = 0.021$ ) i *HLA-DQA1\*03:01* ( $OR = 2.14$ ,  $P = 0.011$ ) su statistički značajno učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu prije korekcije  $P$  vrijednosti.

Alel *HLA-DQA1\*01:02* je češći u bolesnika s MS u provinciji Baskiji na sjeveru te Malagi na jugu Španjolske (17, 18) što je u skladu s našom studijom. Istraživanje na velikom broju ispitanika u Kanadi ( $N = 3008$ ) pokazalo je da *HLA-DQA1\*01:02* povećava rizik od nastanka MS kada je prisutan i *HLA-DRB1\*15:01* alel (270). Za razliku od tih istraživanja, Alves-Leon i suradnici su našli povećanu učestalost *HLA-DQA1\*02:01* kod bolesnika oboljelih od MS u brazilskoj populaciji (207).

Od zaštitnih alela na lokusu *HLA-DQA1*, statistički je značajan *HLA-DQA1\*05:05* alel ( $P = 0,04$ ;  $OR = 0,64$ ), no nakon korekcije za 12 nađenih alela, gubi statističku značajnost.

Pandit i suradnici su 2016. godine objavili da je u njihovom istraživanju *HLA-DQA1\*05:01* učestaliji u ispitanika kontrolne skupine ( $P = 0,04$ ), ali samo prije korekcije  $P$  vrijednosti (268).

Rezultati analize *HLA-DQB1* alela kod pacijenata s relapsno-remitirajućim oblikom MS i zdravih ispitanika kontrolne skupine u našoj studiji su pokazali da su aleli *HLA-DQB1\*06:02* i *-DQB1\*03:02* učestaliji kod bolesnika s MS, dok je *HLA-DQB1\*03:01* alel učestaliji kod zdravih ispitanika. *HLA-DQB1\*06:02* je statistički značajno povezan s rizikom od MS i nakon Bonferronijeve korekcije za 18 testiranih alela (OR = 2.87, *P*<sub>kor</sub> = 0.002). Slične zaključke je donijelo istraživanje Crnić-Martinović i sur. u prethodnoj studiji iz Hrvatske (213).

Fernandez i sur. su pokazali da su aleli *DRB1\*15:01*, *DQA1\*01:02* i *DQB1\*06:02* učestaliji kod pacijenata s MS u odnosu na kontrolnu skupinu, ali je *HLA-DQB1\*06:02* jedini alel koji je ostao značajan i nakon multivarijantne logističke regresije u studiji iz Malage, Španjolska (17). Istraživanja u Grčkoj, Slovačkoj i Belgiji su također pokazala da je *HLA-DQB1\*06:02* statistički učestaliji u bolesnika s MS (19–21).

Studija provedena među brazilskim pacijentima afričkog porijekla je pokazala da *HLA-DQB1\*06:02* alel povećava rizik nastanka MS kod bolesnika koji nemaju *HLA-DRB1\*15:01* alel te su zbog toga autori zaključili da je *HLA-DQB1\*06:02* neovisan rizični čimbenik za MS (16). Nasuprot tome, istraživanja provedena kod Amerikanaca afričkog porijekla i pacijenata iz Sicilije su pokazala da je *HLA-DRB1\*15:01* alel povezan s povećanim rizikom za MS bez ikakve povezanosti s *HLA-DQB1\*06:02* alelom (12, 23).

I studijama na miševima transgeničnim za HLA se htjelo razgraničiti da li je primarni alel podložnosti za MS iz *DRB1* ili *DQB1* lokusa. Kaushanski i sur. su u takvoj jednoj studiji na miševima pokazali da je podložnost za MS sličnoj bolesti izazvanoj mijelin oligodendrocitičnim bazičnim proteinom ili proteolipidnim proteinom određena *HLA-DQB1\*06:02* umjesto *HLA-DRB1\*15:01* alelom (271).

U našoj studiji smo našli veću frekvenciju *HLA-DQB1\*03:01* u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu pacijenata s MS (23,65 % nasuprot 16,47 %, *P* = 0,014), dok je *HLA-DQB1\*03:02* bio učestaliji u pacijenata s MS (9,54 % nasuprot 5,36 %, *P* = 0,016). Sve su te *HLA-DQB1\*03* asocijacije izgubile značajnost nakon Bonferronijeve korekcije za 18 alela. U literaturi smo našli nekoliko radova koji govore o povezanosti *HLA-DQB1\*03:01* alela s rizikom od obolijevanja od MS. U studijama Wernecka i sur. i Kolae i sur. nađena je smanjena prevalencija *HLA-DQB1\*03:01* alela u pacijenata s MS u odnosu na zdrave osobe iz kontrolne skupine (8,8 % prema 19,1 % te 20 % prema 29,02 %) (217, 263). Nasuprot tome, *HLA-DQB1\*03:01* je identificiran kao podložan alel u pacijenata s MS iz Španjolske provincije Baskije, ali samo prije korekcije *P* vrijednosti (18). Rezultati analize SNP podataka iz 11 kohorta sastavljenih od pacijenata s MS europskog podrijetla su pokazali da je *HLA-DQB1\*03:02* dominantni podložni

alel, ali njegov rizični efekt može biti poništen međudjelovanjem s alelom *HLA-DQB1\*03:01*(11). U studiji iz Slovačke kod 282 pacijenta sa sporadičnim oblikom MS rađena je *HLA-DRB1* i *-DQB1* genotipizacija niskog razlučivanja te je utvrđen *HLA-DQB1\*03* gen s višom učestalošću u bolesnika s MS (OR = 2,8 *P*kor = 0,003), ali nakon eliminacije nositelja *HLA-DRB1\*15* gena (20).

U našoj populaciji bolesnika s MS nismo uočili veću učestalost alela *HLA-DQB1\*03:03* u bolesnika s MS kao što su opisali autori prethodne studije na području Gorskog Kotara u Hrvatskoj (213).

Nedavne studije su naglasile važnost epistatičkog međudjelovanja kod *HLA-DRB1* alela mijenjajući rizik za MS. Uzimajući u obzir ove spoznaje, istražili smo kako interakcije između alela sadržanih u pojedinim genotipovima *HLA-DRB1*, *-DQB1* određuju rizik za MS kod bolesnika sjeverozapadne Hrvatske.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da su genotipovi *HLA-DRB1\*01:01/\*13:01* (*P* = 0,033), *HLA-DRB1\*07:01/\*15:01* (*P* = 0,045) i *HLA-DQB1\*03:02/\*06:02* (*P* = 0,031) učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, gubi se statistička značajnost navedenih genotipova nakon korekcije *P* vrijednosti za broj ponavljanja.

Ramagopalan i suradnici su utvrdili da *HLA-DRB1\*07/\*15* genotip povećava rizik od MS u usporedbi s drugim alelima uključenim u *HLA-DRB1\*15* pozitivan genotip (OR = 1,28, *P* = 0,038) (269). Studija iz zapadne Australije je pokazala veću frekvenciju genotipa *HLA-DRB1\*07/\*05* kod oboljelih od MS (202). Suprotno našem istraživanju, genotip *DRB1\*15:01/\*07:01* je statistički povezan s podložnošću za MS (OR = 3.320, *P* = 0.006) u iranskoj studiji (217).

Prema dostupnoj literaturi, utjecaj *HLA-DRB1\*01:01/\*13:01* genotipa na povećani rizik za MS dosada nije još opisan. Suprotno, *HLA-DRB1\*01* i *DRB1\*13* aleli su nađeni kao zaštitni čimbenici kod bolesnika europskog porijekla (14) iako su Romero-Pinel i sur. našli da je *HLA-DRB1\*01* gen povezan s lošijom prognozom MS (210).

U ovoj studiji smo analizirali i povezanost haplotipova koji čine lokusi HLA razreda I i II sa podložnosti za MS. Najprije smo analizirali haplotipove s dva lokusa jer je većina dostupnih studija dala podatke o povezanosti haplotipa s rizikom od MS na toj razini. Među *HLA\*A~B* haplotipovima, *HLA-A\*11~B\*51* je jedini haplotip koji je bio statistički značajno učestaliji kod bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu, ali samo prije korekcije *P* vrijednosti. Budući da ni među alelima HLA-A i -B koji se najčešće povezuju s MS u literaturi (*HLA-A\*02*, *-A\*03*, -

*B\*07, B\*18, -B\*44, -B\*35 i -B\*55*) nismo našli statistički značajnu razliku na razini alela, nismo našli niti na razini njihovih združenih haplotipova.

U našem radu je analizirana i povezanost haplotipa *HLA-DRB1~DQB1* s MS. Naša studija je pokazala povezanost između podložnosti za MS i haplotipa *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* (OR = 2.75,  $P < 0.001$ ) i nakon korekcije  $P$  vrijednosti za 15 haplotipova koji su uzeti na daljnju analizu. Ovi rezultati su u skladu s drugim radovima među zapadno-europskom populacijom (Slovacima) te mediteranskim Europljanima: Grcima, Talijanima, Španjolcima (9,17–20, 22, 24).

Podložnost prema MS u našoj studiji je nađena za haplotip *HLA-DRB1\*04:02~DQB1\*03:02* (OR = 4,13,  $P = 0,034$ ). Slični zaključci su izneseni u istraživanju pacijenata iz Sicilije, Turske i Španjolske (18, 23, 265).

Mediteranski otok Sardinija je najveći talijanski otok s visokom incidencijom MS čije je obilježje jedinstveni, homogeni genetički ustroj koji je rezultat fiksacije alela i haplotipova koji su ili rijetki ili su prisutni samo na tom otoku (24). Marrosu i sur. su na Sardiniji utvrdili združenost MS s 5 različitih *DRB1~DQB1* haplotipova: *HLA-DRB1\*13:03~DQB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*04:05~DQB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*03:01~DQB1\*02:01*, *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02* i *HLA-DRB1\*04:05~DQB1\*03:02* (22).

Južni dijelovi Hrvatske pripadaju mediteranskoj regiji. Pretpostavlja se da je povezanost MS s haplotipom DR4 tipična za zemlje Mediterana te se iz toga može pretpostaviti da je veća učestalost *HLA-DRB1\*04:02~DQB1\*03:02* haplotipa u našem istraživanju posljedica migracija iz mediteranskog juga u ekonomski razvijeniji sjeverozapadni dio Hrvatske.

Haplotipovi koji su uključivali tri lokusa: *HLA-DRB1*, *-DQA1* te *-DQB1*, a statistički su učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu su: *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* (OR = 2,70,  $P = 0,0001$ ,  $P_{kor} = 0,002$ ) i *HLA-DRB1\*07:01~DQA1\*02:01~DQB1\*03:03* (OR = 3,41,  $P = 0,038$ ,  $P_{kor} = 0,76$ ).

Lincoln i sur. su u kanadskoj studiji također proučavali haplotip s tri lokusa HLA razreda II (270). Potvrdili su da je haplotip *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* podložan za razvoj MS s OR 2.6. Haplotipovi koji nose *HLA-DRB1\*15:01* bez *HLA-DQB1\*06:02* ne utječu na rizik od MS (OR = 1,1), haplotipovi u koje su uključeni *HLA-DQB1\*06:02* bez *HLA-DRB1\*15:01* također imaju neutralni utjecaj (OR = 1,2), dok haplotipovi koji sadrže *HLA-DQA1\*01:02* alele bez *HLA-DRB1\*15:01* i *-DQB1\*06:02* pokazuju zaštitnu ulogu u nastanku MS (269).

Te spoznaje su u skladu s našom studijom gdje je većina analiziranih haplotipova koji nose *HLA-DQA1\*01:02* pokazivala zaštitnu ulogu u nastanku MS, dok su nepotpuni haplotipovi bez *HLA-DRB1\*15:01* ili *-DQB1\*06:02* pokazivali neutralni utjecaj za MS.

Marrosu i sur. su u istraživanju na Sardiniji naglasili povezanost haplotipova DR3 (*HLA-DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01*) i DR4 (*HLA-DRB1\*04:05~DQA1\*05:01~DQB1\*03:01*) (272).

Prethodna studija iz Hrvatske je također naglasila haplotip *HLA-DRB1\*15~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* kao rizični čimbenik povezan s podložnošću za sekundarno progresivni oblik MS (213).

U našem istraživanju nismo našli statističku značajnu razliku između učestalosti *HLA-DRB1\*07:01* kod bolesnika s MS i kontrolne skupine kao što je nađeno u istraživanju u kontinentalnoj Italiji koje je uključivalo 609 pacijenata s MS i 836 kontrolnih ispitanika te u radu Lysandropoulos i sur. u Belgiji (21, 264). Autori prethodne studije na području Gorskog Kotara u Hrvatskoj su našli da je *HLA-DQB1\*03:03* podložan za MS, dok u našoj studiji nismo uočili takvu vrstu povezanosti (213). Međutim, kad smo u analizu uključili istodobno oba navedena alela dobili smo da su haplotipovi koji ih sadržavaju (*HLA-DRB1\*07:01~DQB1\*03:03* i *HLA-DRB1\*07:01~DQA1\*02:01~DQB1\*03:03*) statistički značajno podložni za nastanak MS. Takvi rezultati govore da je u našem radu *HLA-DRB1\*07:01* rizični čimbenik, ali samo u prisutnosti *HLA-DQB1\*03:03* alela.

Jedini haplotip koji je uključivao šest lokusa *HLA-A\*11~B\*35~C\*04~DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01* je statistički učestaliji u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P = 0,04$ ), ali samo prije Bonferronijeve korekcije za 15 analiziranih haplotipova. Analize povezanosti rizika od MS koje bi uključivale haplotipove sastavljene od 6 lokusa su oskudne. Link i sur. su napravili analizu haplotipova koji su uključivali *HLA-A*, *-B*, *-C* i *-DRB1* lokuse te su našli da su skoro svi haplotipovi koji su uključivali *HLA-DRB1\*15* alelnu skupinu bili rizični, a oni koji su imali *HLA-A\*02* bili protektivni sve dok nisu nosili *HLA-DRB1\*15* gen (208).

Potencijalno zaštitni haplotipovi za razvoj MS u našoj studiji su: *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01* (OR = 0,42,  $P = 0,013$ ), i *HLA-DRB1\*11:01~DQA1\*05:05~DQB1\*03:01* (OR = 0,40,  $P = 0,006$ ).

Isti rezultat je nađen među stanovništvom Sardinije, haplotipovi *HLA-DRB1~DQB1* koji su uključivali *HLA-DRB1\*11* su zaštitni čimbenici (24). Studija iz Slovačke koja je uključivala 282 bolesnika sa sporadičnim oblikom MS je također pokazala da je haplotip *HLA-*

*DRB1\*11~DQB1\*03* učestaliji u kontrolnoj skupini te bi se mogao smatrati zaštitnim alelom za MS (20).

Budući da je MS 2,5 puta češće zastupljena kod žena, provedene su i studije koje bi razjasnile ulogu alela HLA u češćem pojavljivanju MS kod žena (247). Hensiek i sur. su u istraživanju provedenom u Velikoj Britaniji kod 729 pacijenata s MS pokazali da je fenotip DR15 bio statistički učestaliji kod žena (66 %) u odnosu na muškarce (55 %),  $P = 0,01$ . (270). Slične rezultate su dobili Irizar i sur. u Španjolskoj (274).

Za razliku od tih istraživanja, Ballerini i sur. u Italiji nisu našli povezanost fenotipa DR15 sa spolom (264). U našem istraživanju je u skupini *HLA-DRB1\*15:01* pozitivnih žena bilo više (81,25 %) u odnosu na *HLA-DRB1\*15:01* negativnu skupinu (73,40 %), ali bez statističke značajnosti što je u skladu s prethodnom studijom iz Italije (264).

Dob kod koje se prvi put javljaju simptomi MS je jako važna jer o njoj ovisi i daljnji tijek bolesti, kao i vrijeme pojave prvih ozbiljnijih simptoma. Prethodne studije su pokazale da je alel *HLA-DRB1\*15* povezan s ranijom pojavom bolesti u Europljana i Amerikanaca afričkog porijekla (199, 273, 275, 276).

Nasuprot tome, velika studija među bolesnicima europskog porijekla koja je obuhvatila 1571 bolesnika s MS i 3098 zdravih članova obitelji nije našla povezanost između alela *HLA-DRB1\*15* i njegovih genotipova svremenom pojave prvih simptoma (201).

U našoj studiji je prosječna dob kod koje su nastali simptomi u *HLA-DRB\*15:01* pozitivnih bolesnika bila niža (35,2 godine) u odnosu na bolesnike bez alela *HLA-DRB1\*15:01* (36 godina), ali bez statističke značajnosti.

Zbog jake povezanosti *HLA-DRB\*15:01* s ostalim alelima koja može dovesti do pogrešne interpretacije učestalosti pojedinih alela i njihove povezanosti s podložnosti ili zaštitnim učinkom od MS, sve statistički značajno učestalije alele, bilo u bolesnika s MS ili u kontrolnoj skupini, analizirali smo posebno kod *HLA-DRB\*15:01* negativnih ispitanika te posebno kod *HLA-DRB1\*15:01* pozitivnih ispitanika. Aleli *HLA-DQB1\*06:02*, *-DQB1\*03:02* i *-DQA1\*03:01* su statistički učestaliji u bolesnika s MS koji nemaju alel *HLA-DRB\*15:01*, što govori u prilog tome da su ti aleli rizični čimbenici za MS, neovisno o *HLA-DRB\*15:01* statusu.

Rezultati iz rada Fernandez i sur. također pokazuju da je *HLA-DQB1\*06:02* alel ostao značajno učestaliji u bolesnika s MS nakon multivarijantne logističke regresije (17). Slične rezultate su objavili i Caballero i sur. među Brazilcima afričkog porijekla (16).

Gen *HLA-C\*12* je ostao statistički učestaliji samo u skupini koja ima *HLA-DRB1\*15:01* alel što govori u prilog tome da je gen *HLA-C\*12* podložan za MS samo u kombinaciji s alelom *HLA-*

*DRB1\*15:01*. Rezultati se slažu onima iz rada iz Švedske i Norveške koji su pokazali da je *HLA-C\*12* učestaliji u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu s MS, ali samo ako se analiziraju *HLA-DRB1\*15* pozitivni ispitanici (208).

Alel *HLA-DQA1\*01:02*, nakon razdvajanja na *HLA-DRB1\*15:01* pozitivne i negativne ispitanike, je postao statistički značajno učestaliji u kontrolnoj skupini kod *HLA-DRB1\*15:01* negativnih ispitanika ( $P = 0.0001$ ).

Link i sur. su proučavali epistazu između *HLA-DRB1* i *HLA-DQA1* lokusa kod 3.006 kanadskih ispitanika iz 689 obitelji i zaključili da *HLA-DQA1\*01:02* djeluje snažno s *HLA-DRB1\*15* u transpoziciji pojačavajući rizik od MS u prisutnosti *HLA-DRB1\*15* alela, a smanjuje rizik u odsutnosti *HLA-DRB1\*15* alela (208).

Budući da je MS heterogeni autoimuni poremećaj uzrokovan međudjelovanjem genetičkih i okolišnih čimbenika rizika analizirali smo podložne i zaštitne alele, genotipove i haplotipove za nastanak MS.

Naši rezultati odgovaraju najčešće uočenim asocijacijama HLA i MS u nama susjednim zemljama, ali smo našli i neke manje česte povezanosti koje odgovaraju podacima iz literature analiziranim i u drugim dijelovima Europe i svijeta te mogu doprinijeti boljem razumijevanju genetičke podloge MS.

Međutim, kod velikog broja studija je tipizacija HLA učinjena metodama niskog razlučivanja što otežava usporedbu naših rezultata koji su dobiveni metodom visokog razlučivanja.

Hrvatska ima veliku prevalenciju multiple skleroze (143.8 na 100.000 stanovnika) te bi daljnja istraživanja trebalo proširiti i na sve članove obitelji, na ostale kliničke oblike MS, kao i povezanost sustava HLA s tijekom i kliničkom prezentacijom MS.

Također, povezanost između podložnosti za MS i nađenih genotipova i haplotipova HLA bi trebalo potvrditi na većem broju ispitanika.



## 6. ZAKLJUČCI

1. Usporedbom rezultata učestalosti alela i gena na lokusima *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQA1* i *-DQB1* dobivenih u našem istraživanju populacije sjeverozapadne Hrvatske i dosad provedenih istraživanja u Hrvatskoj nisu utvrđene značajne razlike.
2. Učestalost većine ispitivanih gena i alela HLA razreda I i II u našem istraživanju je usporediva s učestalostima istih u susjednim i nama povijesno bliskim zemljama uz neke manje razlike, što govori u prilog tome da je imunogenetska struktura populacije sjeverozapadne Hrvatske posljedica utjecaja migracija kroz zajedničku povijest.
3. Najzastupljeniji geni HLA razreda I u kontrolnoj skupini dobrovoljnih darivatelja krvi sjeverozapadne Hrvatske su:
  - a. Na lokusu *HLA-A* geni: *HLA-A\*02*, *-A\*03*, *-A\*24*, *-A\*01* te *-A\*11*.
  - b. Na lokusu *HLA-B* geni: *HLA-B\*51*, *-B\*35*, *-B\*07*, *-B\*18* te *-B\*44*.
  - c. Na lokusu *HLA-C* geni: *HLA-C\*07* *-C\*12* i *-C\*04* i *-C\*03*.
4. Među kontrolnom skupinom dobrovoljnih darivatelja krvi najzastupljeniji aleli razreda HLA II su:
  - a. Na lokusu *HLA-DRB1* aleli: *HLA-DRB1\*16:01*, *-DRB1\*03:01*, *-DRB1\*11:01*, *-DRB1\*01:01* i *-DRB1\*15:01*.
  - b. Na lokusu *HLA-DQA1* aleli: *HLA-DQA1\*01:02*, *-DQA1\*05:05*, *-DQA1\*01:01* i *-DQA1\*05:01*.
  - c. Na lokusu *HLA-DQB1* aleli: *HLA-DQB1\*03:01*, *-DQB1\*05:01*, *-DQB1\*05:02*, *-DQB1\*02:01* i *-DQB1\*06:02*.
5. Najčešći haplotipovi HLA razreda I u kontrolnoj skupini sačinjeni od:
  - a. Dva lokusa: *HLA-A\*02~B\*51*, *HLA-A\*03~B\*07* , *HLA-A\*01~B\*08*, *HLA-A\*02~B\*27*.
  - b. Tri lokusa: *HLA-A\*01~B\*08~C\*07*, *HLA-A\*03~B\*07~C\*07*, *HLA-A\*02~B\*27~C\*02*, *HLA-A\*25~B\*18~C\*12*.
6. Najčešći haplotipovi HLA razreda II u kontrolnoj skupini sačinjeni od:

- a. Dva lokusa: *HLA-DRB1\*03:01~DQB1\*02:01*, *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01*,  
*HLA-DRB1\*16:01~DQB1\*05:02*, *HLA-DRB1\*01:01~DQB1\*05:01* i *HLA-DRB1\*15:01~DQB1\*06:02*.
- b. Tri lokusa: *HLA-16:01~DQA1\*01:02~DQB1\*05:02*, *HLA-DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01*,  
*HLA-DRB1\*11:01~DQA1\*05:05~DQB1\*03:01*, *HLA-DRB1\*03:01~DQA1\*05:01~DQB1\*02:01* i *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02*.
- c. Šest lokusa: *HLA-A\*11~B\*35~C\*04~DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01*,  
*HLA-A\*03~B\*07~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02*,  
*HLA\*11~B\*35~C\*04~DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01* i  
*HLA\*01~B\*08~C\*07~DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02*.
7. Usporedbom učestalosti alela istraživanjem parova kod bolesnika s MS i kontrolne skupine utvrdili smo potencijalno podložne alele:
- a. Među genima HLA razreda I samo je gen *HLA-C\*04* bio statistički granično značajno zastupljeniji ( $P = 0,05$ , OR = 1,58) u bolesnika s MS u odnosu na kontrolnu skupinu. Niti jedan alel na lokusima *HLA-A* i *-B* nije bio značajno povezan s rizikom od MS.
- b. Podložni aleli za nastanak MS iz HLA razreda II su: *HLA-DRB1\*15:01* ( $P < 0,0001$ , OR = 3,17), *HLA-DQB1\*06:02* ( $P < 0,001$ , OR = 2,87), *HLA-DQB1\*03:02* ( $P = 0,016$ , OR = 2,07), *HLA-DQA1\*01:02* ( $P = 0,021$ , OR = 1,61) i *HLA-DQA1\*03:01* ( $P = 0,011$ , OR = 2,14).
- c. Nakon Bonferronijeve korekcije  $P$  vrijednosti za broj analiziranih alela, samo su aleli *HLA-DRB1\*15:01* i *HLA-DQB1\*06:02* zadržali statističku značajnost.
8. Kod usporedbe genotipova *HLA-DRB1* i *HLA-DQB1* između pacijenata s MS i kontrolne skupine utvrđeno je da su genotipovi *HLA-DRB1\*01:01/\*13:01* ( $P = 0,033$ , OR = 4,13), *HLA-DRB1\*07:01/\*15:01* ( $P = 0,045$ , OR = 8,60) i *HLA-DQB1\*03:02/\*06:02* ( $P = 0,031$ , OR = 9,89) statistički značajno učestaliji kod bolesnika s MS.
9. Haplotipovi koji su značajno podložni za razvoj MS kod bolesnika sjeverozapadne Hrvatske sastavljeni od dva lokusa su: *HLA-DRB1\*04:02~DQB1\*03:02* ( $P = 0,044$ , OR = 2,98), *HLA-DRB1\*07:01~DQB1\*03:03* ( $P = 0,038$ , OR = 3,41), *HLA-DQB1\*15:01~DRB1\*06:02*

( $P < 0,0001$ , OR = 2,75), *HLA-A\*02~DRB1\*15:01* ( $P = 0,0003$ , OR = 9,81), *HLA-A\*03~DRB1\*15:01* ( $P = 0,040$ , OR = 2,18) i *HLA-A\*24~DRB1\*13:01* ( $P = 0,033$ , OR = 4,13). Samo su haplotipovi *HLA-DQB1\*15:01~DRB1\*06:02* i *HLA-A\*02~DRB1\*15:01* zadržali značajnost nakon korekcije  $P$  vrijednosti.

10. Haplotipovi koji predstavljaju rizični čimbenik za razvoj MS kod bolesnika iz sjeverozapadne Hrvatske sastavljeni od tri lokusa su: *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* ( $P = 0,0001$ , OR = 2,70), *HLA-DRB1\*07:01~DQA1\*02:01~DQB1\*03:03* ( $P = 0,038$ , OR = 3,41) i *HLA-A\*24~B\*35~C\*04* ( $P = 0,046$ , OR = 18,51) od kojih je haplotip *HLA-DRB1\*15:01~DQA1\*01:02~DQB1\*06:02* ostao statistički značajan nakon korekcije  $P$  vrijednosti.
11. Haplotip *HLA-A\*11~B\*35~C\*04~DRB1\*01:01~DQA1\*01:01~DQB1\*05:01* sastavljen od šest lokusa je značajno podložan za razvoj MS kod bolesnika sjeverozapadne Hrvatske.
12. U našem istraživanju smo identificirali i zaštitne alele te haplotipove koji smanjuju rizik razvoja MS:
  - a. Kod HLA razreda I to su geni *HLA-C\*12* i haplotip *HLA-A\*02~B\*40~C\*03* koji su značajno učestaliji u kontrolnoj skupini u odnosu na bolesnike s MS.
  - b. Među alelima HLA razreda II *HLA-DRB1\*11:01* ( $P = 0,004$ , OR = 0,39), *HLA-DQB1\*03:01* ( $P = 0,04$ , OR = 0,59) te *HLA-DQA1\*05:05* ( $P = 0,04$ , OR = 0,64) su statistički učestaliji u kontrolnoj skupini. Nakon Bonferonijeve korekcije  $P$  vrijednosti, statističku značajnost su izgubila sva tri alela. Zaštitni haplotipovi su *HLA-DRB1\*11:01~DQB1\*03:01* ( $P = 0,0037$ , OR = 0,39), *HLA-A\*02~DRB1\*07:01* ( $P = 0,019$ , OR = 0,09) i *HLA-DRB1\*11:01~DQA1\*05:05~DQB1\*03:01* ( $P = 0,004$ , OR = 0,39). Nakon korekcije  $P$  vrijednosti za broj ponavljanja, sva tri zaštitna haplotipa su izgubila statističku značajnost.
13. Nismo uočili povezanost *HLA-DRB1\*15:01* alela sa ženskim spolom te ranijim početkom MS.
14. Logičkom regresijskom analizom smo pokazali da su aleli *HLA-DQB1\*06:02*, *HLA-DQB1\*03:02* i *HLA-DQA1\*03:01* podložni za MS, neovisno o alelu *HLA-DRB1\*15:01*. *HLA-C\*12* je rizični čimbenik samo u prisustvu *HLA-DRB1\*15:01*, dok u bolesnika s MS koji nemaju alel *HLA-DRB1\*15:01* nije pokazao svoj podložni učinak. Alel *HLA-DRB1\*11:01* pokazuje zaštitni efekt samo u odsutnosti *HLA-DRB1\*15:01* dok *HLA-*

*DQA1\*05:05* koji je bio zaštitni alel, nakon razdvajanja na *HLA-DRB1\*15:01* pozitivne i *HLA-DRB1\*15:01* negativne ispitanike, gubi statističku značajnost.

## 7. POPIS LITERATURE

1. Cree BAC (2014) Multiple sclerosis genetics. *Handb Clin Neurol* 122: 193–209.
2. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk, JD, Evans C, Béland S G, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA (2013) Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: A systematic review. *BMC Neurol* 13:128.
3. Sospedra M, Martin R (2016) Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 36: 115–127.
4. Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI (1972) Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens* 2: 1–4.
5. Jersild C, Fog T (1972) Histocompatibility (HL-A) antigens associated with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 51: 377.
6. Bertrams J, Kuwert E, Liedtke U (1972) HL-A antigens and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2: 405–408.
7. Greer JM (2015) The Role of HLA in MS Susceptibility and Phenotype. *Curr Top Behav Neurosci* 26: 1–27.
8. Baranzini SE, Oksenberg JR (2017) The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. *Trends Genet* 33: 960–970.
9. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt S E, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, ... Compston A (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214–219.
10. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium\*† (2019) Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 365: eaav7188.
11. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, Shah TS, Patsopoulos NA, Alfredsson L, Anderson CA, Attfield KE, Baranzini SE, Barrett J, Binder TMC, Booth D, Buck D, Celius EG, Cotsapas C, D'Alfonso S, ... McVean G (2015) Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* 47: 1107–1113.
12. Isobe N, Gourraud P-A, Harbo HF, Caillier SJ, Santaniello A, Khankhanian P, Maiers M, Spellman S, Cereb N, Yang S, Pando MJ, Piccio L, Cross AH, De Jager PL, Cree BAC,

- Hauser SL, Oksenberg JR (2013) Genetic risk variants in African Americans with multiple sclerosis. *Neurology* 81: 219–227.
13. Rojas O-L, Rojas-Villarraga A, Cruz-Tapias P, Sánchez JL, Suárez-Escudero J-C, Patarroyo M-A, Anaya J-M (2010) HLA class II polymorphism in Latin American patients with multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 9: 407–413.
  14. Zhang Q, Lin C-Y, Dong Q, Wang J, Wang W (2011) Relationship between HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility or resistance to multiple sclerosis in Caucasians: A meta-analysis of non-family-based studies. *Autoimmun Rev* 10: 474–481.
  15. Rolim Lima TF, Lopes Braga VL, Diógenes Silva JT, Nogueira Simplício G, Abreu de Oliveira SÁ, Rodrigues Barros R, Batista Pereira J, das Neves Peixoto FS, Lima da Silva CG, Vieira dos Santos M do S, Alencar Braga H, de Matos Cassiano CJ, Rolim Neto ML, Pereira Lima E, Fontenelle Pinheiro Júnior RF (2015) The HLA-DRB1 alleles effects on multiple sclerosis: a systematic review. *Int Arch Med* 8.
  16. Caballero A, Alvés-León S, Papais-Alvarenga R, Fernández O, Navarro G, Alonso A (1999) DQB1\*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians: HLA and MS in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens* 54: 524–526.
  17. Fernández O, Fernández V, Alonso A, Caballero A, Luque G, Bravo M, Leon A, Mayorga C, Leyva L, de Ramon E (2004) DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J Neurol* 251: 440–444.
  18. Fernández O, R-Antigüedad A, Pinto-Medel MJ, Mendibe MM, Acosta N, Oliver B, Guerrero M, Papais-Alvarenga M, Fernández-Sánchez V, Leyva, L (2009) HLA class II alleles in patients with multiple sclerosis in the Biscay province (Basque Country, Spain). *J Neurol* 256: 1977–1988.
  19. Kouri I, Papakonstantinou S, Bempes V, Vasiliadis HS, Kyritsis AP, Pelidou S-H (2011) HLA associations with multiple sclerosis in Greece. *J Neurol Sci* 308: 28–31.
  20. Michalik J, Čierny D, Kantorová E, Kantárová D, Juraj J, Párnická Z, Kurča E, Dobrota D, Lehotský J (2015) The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population. *Neurol Res* 37: 1060–1067.
  21. Lysandropoulos AP, Racapé J, Holovska V, Toungouz M (2017) Human leucocyte antigen (HLA) class I and II typing in Belgian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg* 117: 61–65.
  22. Marrosu MG (2001) Dissection of the HLA association with multiple sclerosis in the founder isolated population of Sardinia. *Hum Mol Genet* 10: 2907–2916.

23. Brassat D, Salemi G, Barcellos LF, McNeill G, Proia P, Hauser SL, Oksenberg, JR, Savettieri G (2005) The HLA locus and multiple sclerosis in Sicily. *Neurology* 64: 361–363.
24. Cocco E, Murru R, Costa G, Kumar A, Pieroni E, Melis C, Barberini L, Sardu C, Lorefice L, Fenu G, Frau J, Coghe G, Carboni N, Marrosu MG (2013) Interaction between HLA-DRB1-DQB1 Haplotypes in Sardinian Multiple Sclerosis Population. *PLoS ONE* 8: e59790.
25. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, Freund C (2017) Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol.* 8:292.
26. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Walport M, Shlomchik MJ (2001) The major histocompatibility complex and its functions. U: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edn. Garland Science, New York.
27. Terasaki PI (1990) History of HLA: Ten Recollections. *UCLA Tissue Typing Laboratory* 269 p.
28. Gorer PA (1937) The genetic and antigenic basis of tumour transplantation. *J Pathol Bacteriol* 44: 691–697.
29. Thorsby E (2009) A short history of HLA. *Tissue Antigens* 74: 101–116.
30. Snell GD, Cherry M, Démant P (1971) Evidence that H-2 private specificities can be arranged in two mutually exclusive systems possibly homologous with two subsystems of HL-A. *Transplant Proc* 3: 183–186.
31. Dausset J (1958) [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol* 20: 156–166.
32. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A (1958) Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* 181: 1735–1736.
33. Payne R, Rolfs MR (1958) Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 37: 1756–1763.
34. Van Rood JJ, Van Leeuwen A (1963) Leukocyte grouping. A method and its application. *J Clin Invest* 42: 1382–1390.
35. Payne R, Tripp M, Weigle J, Bodmer W, Bodmer J (1964) A NEW LEUKOCYTE ISOANTIGEN SYSTEM IN MAN. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 29: 285–295.
36. Klein J (1977) Evolution and Function of the Major Histocompatibility System: Facts and Speculations. U: Götze D (ed) *The Major Histocompatibility System in Man and Animals*. Springer, Berlin, Heidelberg, 339–378.

37. Zinkernagel RM, Doherty PC (1997) The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 18: 14–17.
38. Strominger JL (2002) Don Craig Wiley (1944–2001): a reminiscence. *Nat Immunol* 3: 103–104.
39. IPD-IMGT/HLA Database (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>) (pristupljeno 10.05.2021.)
40. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR (2017) Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology*. 13th edn. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell.
41. Walsh EC, Mather KA, Schaffner SF, Farwell L, Daly MJ, Patterson N, Cullen M, Carrington M, Bugawan TL, Erlich H, Campbell J, Barrett J, Miller K, Thomson G, Lander ES, Rioux, JD (2003) An integrated haplotype map of the human major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet* 73: 580–590.
42. Bodmer WF (1987) The HLA system: structure and function. *J Clin Pathol* 40: 948–958.
43. Punt J, Stranford S, Jones P, Owen J (2018) *Kuby Immunology*. 8th edn. New York, W. H. Freeman.
44. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK (2009) The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 54: 15–39.
45. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2018) *Cellular and Molecular Immunology*. 9th edn. Philadelphia, PA , Elsevier
46. Clark DA (1999) Human Leukocyte Antigen-G: New Roles for Old? *Am J Reprod Immunol* 41: 117–120.
47. Keskinen P, Ronni T, Matikainen S, Lehtonen A, Julkunen I (1997) Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* 91: 421–429.
48. Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W, Ault KA, Gimbrone MA, Strominger JL, Pober, JS (1984) Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci* 81: 4917–4921.
49. Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya J-M (2013) Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation [Internet]. U: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy RA, Cervera R (ed) *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]. Bogota (Colombia), El Rosario University Press.



50. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (2005) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *J Immunol* 174: 6–19.
51. Klein J, Sato A (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 702–709.
52. Delves P, Roitt I (1998) *Encyclopedia of Immunology*. 2nd edn. Academic Press.
53. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33–39.
54. Rammensee HG (1995) Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 7: 85–96.
55. Pamer E, Cresswell P (1998) Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323–358.
56. Heemels MT, Ploegh H (1995) Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 64:463–491.
57. Williams A, Peh CA, Elliott T (2002) The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens* 59:3–17.
58. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC (1995) The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378: 457–462.
59. Morris P, Shaman J, Attaya M, Amaya M, Goodman S, Bergman C, Monaco JJ, Mellins E (1994) An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368: 551–554.
60. Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, ... Trowsdale J (2010) Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens* 75:291–455.
61. Bradshaw M, Houtchens M (2018) *Neurology Board Review: Multiple Sclerosis*.
62. Waldman A, Ness J, Pohl D, Simone IL, Anlar B, Amato MP, Ghezzi A (2016) Pediatric multiple sclerosis: Clinical features and outcome. *Neurology* 87(9 Suppl 2): S74-81.
63. Roohani P, Emiru T, Carpenter A, Luzzio C, Freeman J, Scarberry S, Beaver G, Davidson L, Parry, G (2014) Late onset multiple sclerosis: Is it really late onset? *Mult Scler Relat Disord* 3:444–449.
64. Ascherio A, Munger KL (2016) Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol* 36:103–14.
65. Matsui M (2008) Multiple sclerosis immunology for clinicians. *Neurol Asia* 13: 195– 198

66. Dobson R (2019) Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol* 26: 27–40.
67. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G (2010) Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 9: 727–739.
68. Koch-Henriksen N, Sørensen PS (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* 9: 520–532.
69. Kurtzke JF (2013) Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim’s progress. *Brain J Neurol* 136(Pt 9): 2904–2917.
70. Dean G (1967) Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J* 2: 724–730.
71. Munger KL, Zhang SM, O’Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A (2004) Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62:60–65.
72. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2013) The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler* 19:162–166.
73. Ascherio, A, Munger, KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol* 61: 288-299.
74. Levin LI (2005) Temporal Relationship Between Elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis. *JAMA* 293:2496.
75. Tracy SI, Kakalacheva K, Lünemann JD, Luzuriaga K, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA (2012) Persistence of Epstein-Barr virus in self-reactive memory B cells. *J Virol* 86:12330–12340.
76. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2011) Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PloS One* 6:e16149.
77. Palacios N, Alonso A, Brønnum-Hansen H, Ascherio A (2011) Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence. *Ann Epidemiol* 21:536–542.
78. Munger KL, Chitnis T, Ascherio A (2009) Body size and risk of MS in two cohorts of US women. *Neurology* 73:1543–1550.
79. Gianfrancesco MA, Barcellos LF (2016) Obesity and Multiple Sclerosis Susceptibility: A Review. *J Neurol Neuromedicine* 1:1–5.
80. Hedström AK, Olsson T, Alfredsson L (2012) High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women. *Mult Scler* 18: 1334–1336.

81. Kanneganti T-D, Dixit VD (2012) Immunological complications of obesity. *Nat Immunol* 13: 707–712.
82. Smotkin-Tangorra M, Purushothaman R, Gupta A, Nejati G, Anhalt H, Ten S (2007) Prevalence of vitamin D insufficiency in obese children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 20: 817–823.
83. Materljan E, Materljan M, Materljan B, Vlačić H, Barićev-Novaković Z, Sepčić J (2009) Multiple Sclerosis and Cancers in Croatia – A Possible Protective Role of the »Mediterranean Diet«. *Coll Antropol* 33: 539–545.
84. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S (2018) Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 20: 43–47.
85. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Kyvik KO, Brønnum-Hansen H (2005) Risk for multiple sclerosis in dizygotic and monozygotic twins. *Mult Scler* 11: 500–503.
86. Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH, Optiz JM, Reynolds JF (1988) Multiple sclerosis. Updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29:533–541.
87. Ramagopalan SV, Ebers GC (2009) Epistasis: multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Neurology* 72:566–567.
88. <https://www.atlasofms.org> (pristupljeno 10.05.2021.)
89. The Multiple Sclerosis International, Federation (2020) *Atlas of MS*. 3rd Edition.
90. Rosati G (2001) The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 22: 117–139.
91. Simpson S, Wang W, Otahal P, Blizzard L, van der Mei IAF, Taylor BV (2019) Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90: 1193–1200.
92. Fromont A, Binquet C, Sauleau EA, Fournel I, Bellisario A, Adnet J, Weill A, Vukusic S, Confavreux C, Debouverie M, Clerc L, Bonithon-Kopp C, Moreau T (2010) Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain J Neurol* 133(Pt 7): 1889–1899.
93. Hammond SR, McLeod JG, Millingen KS, Stewart-Wynne EG, English D, Holland JT, McCall MG (1988) The epidemiology of multiple sclerosis in three Australian cities: Perth, Newcastle and Hobart. *Brain J Neurol* 111( Pt 1): 1–25.
94. Taylor BV, Pearson JF, Clarke G, Mason DF, Abernethy DA, Willoughby E, Sabel C (2010) MS prevalence in New Zealand, an ethnically and latitudinally diverse country. *Mult Scler* 16: 1422–1431.

95. Kuroiwa Y, Shibasaki H, Ikeda M (1983) Prevalence of Multiple Sclerosis and Its North-to-South Gradient in Japan. *Neuroepidemiology* 2:62–69.
96. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE (1979) Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: 1. Race, sex, and geographic distribution. *Neurology* 29(9 Pt 1):1228–1235.
97. Melcon MO, Gold L, Carrá A, Cáceres F, Correale J, Cristiano E, Fernández Liguori N, Garcea O, Luetic G, Kremenchutzky M, Patagonia Multiple Sclerosis Research Project (2008) Argentine Patagonia: prevalence and clinical features of multiple sclerosis. *Mult Scler* 14: 656–662.
98. Poppe AY, Wolfson C, Zhu B (2008) Prevalence of multiple sclerosis in Canada: a systematic review. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol* 35: 593–601.
99. Grønlie SA, Myrvoll E, Hansen G, Grønning M, Mellgren SI (2000) Multiple sclerosis in North Norway, and first appearance in an indigenous population. *J Neurol* 247: 129–133.
100. Zivadinov R, Iona L, Monti-Bragadin L, Bosco A, Jurjevic A, Taus C, Cazzato G, Zorzon M (2003) The use of standardized incidence and prevalence rates in epidemiological studies on multiple sclerosis. A meta-analysis study. *Neuroepidemiology* 22: 65–74.
101. Alonso A, Hernán MA (2008) Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology* 71: 129–135.
102. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Mei IV der, Taylor B (2011) Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 1132–1141.
103. Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, Milanov I (2006) The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol* 13: 700–722.
104. Grasso AA, Reggio A, Marano P, Florio S, Scordino N, Cappello S, Nicoletti F (1992) Epidemiological survey of multiple sclerosis in Catania city. *Ital J Neurol Sci* 13: 301–309.
105. Nicoletti A, Lo Fermo S, Reggio E, Tarantello R, Liberto A, Le Pira F, Patti F, Reggio A (2005) A possible spatial and temporal cluster of multiple sclerosis in the town of Linguaglossa, Sicily. *J Neurol* 252: 921–925.
106. Granieri E, Casetta I, Govoni V, Tola MR, Marchi D, Murgia SB, Ticca A, Pugliatti M, Murgia B, Rosati G (2000) The increasing incidence and prevalence of MS in a Sardinian province. *Neurology* 55: 842–848.
107. Pugliatti M, Sotgiu S, Solinas G, Castiglia P, Pirastru MI, Murgia B, Mannu L, Sanna G, Rosati G (2001) Multiple sclerosis epidemiology in Sardinia: evidence for a true increasing risk. *Acta Neurol Scand* 103: 20–26.

108. Sharpe G, Price SE, Last A, Thompson RJ (1995) Multiple sclerosis in island populations: prevalence in the Bailiwicks of Guernsey and Jersey. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58: 22–26.
109. Rothwell PM, Charlton D (1998) High incidence and prevalence of multiple sclerosis in south east Scotland: evidence of a genetic predisposition. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64: 730–735.
110. Gray OM, McDonnell GV, Hawkins SA (2008) Factors in the rising prevalence of multiple sclerosis in the north-east of Ireland. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 14: 880–886.
111. Tienari PJ, Sumelahti M-L, Rantamäki T, Wikström J (2004) Multiple sclerosis in western Finland: evidence for a founder effect. *Clin Neurol Neurosurg* 106: 175–179.
112. Binzer M, Forsgren L, Holmgren G, Drugge U, Fredrikson S (1994) Familial clustering of multiple sclerosis in a northern Swedish rural district. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57: 497–499.
113. Bentzen J, Flachs EM, Stenager E, Brønnum-Hansen H, Koch-Henriksen N (2010) Prevalence of multiple sclerosis in Denmark 1950–2005. *Mult Scler* 16: 520–525.
114. Smestad C, Sandvik L, Holmoy T, Harbo HF, Celius EG (2008) Marked differences in prevalence of multiple sclerosis between ethnic groups in Oslo, Norway. *J Neurol* 255: 49–55.
115. Boström I, Callander M, Kurtzke JF, Landtblom A-M (2009) High prevalence of multiple sclerosis in the Swedish county of Värmland. *Mult Scler* 15: 1253–1262.
116. Garcia JR, Rodriguez S, Sosa Henriquez M, Batista E, Corujo E, Font de Mora Turon A, Hernandez Hernandez D, Betancor Leon P (1989) Prevalence of multiple sclerosis in Lanzarote (Canary Islands). *Neurology* 39(2 Pt 1): 265–267.
117. Matias-Guiu J, Bolumar F, Martin R, Insa R, Casquero P, Moltó JM, Calatayud E, Aranaz J (1990) Multiple sclerosis in Spain: an epidemiological study of the Alcoy health region, Valencia. *Acta Neurol Scand* 81: 479–483.
118. Modrego PJ, Pina MA (2003) Trends in prevalence and incidence of multiple sclerosis in Bajo Aragón, Spain. *J Neurol Sci* 216: 89–93.
119. Ares B, Prieto JM, Lema M, Dapena D, Arias M, Noya M (2007) Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler* 13: 262–264.
120. van Ooteghem P, D’Hooghe MB, Vlietinck R, Carton H (1994) Prevalence of multiple sclerosis in Flanders, Belgium. *Neuroepidemiology* 13: 220–225.

121. Beer S, Kesselring J (1994) High prevalence of multiple sclerosis in Switzerland. *Neuroepidemiology* 13: 14–18.
122. Hein T, Hopfenmüller W (2000) [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 71: 288–294.
123. Poser S, Stickel B, Krtisch U, Burckhardt D, Nordman B (1989) Increasing incidence of multiple sclerosis in South Lower Saxony, Germany. *Neuroepidemiology* 8: 207–213.
124. Fasbender P, Kolmel HW (2008) Incidence of multiple sclerosis in the urban area of Erfurt, Thuringia, Germany. *Neuroepidemiology* 30: 147–151.
125. Baumhackl U, Eibl G, Ganzinger U, Hartung HP, Mamoli B, Pfeiffer KP, Fazekas F, Vass K, Austrian MS Study Committee (2002) Prevalence of multiple sclerosis in Austria. Results of a nationwide survey. *Neuroepidemiology* 21: 226–234.
126. Becuş T, Popoviciu L (1994) Epidemiologic survey of multiple sclerosis in Mureş County, Romania. *Romanian J Neurol Psychiatry Rev Roum Neurol Psychiatr* 32: 115–122.
127. Milanov I, Georgiev D, Kmetska K, Jordanova L, Topalov N (1997) Prevalence of multiple sclerosis in Bulgaria. *Neuroepidemiology* 16:304–307.
128. Piperidou HN, Heliopoulos IN, Maltezos ES, Milonas IA (2003) Epidemiological data of multiple sclerosis in the province of Evros, Greece. *Eur Neurol* 49:8–12.
129. Klupka-Sarić I, Galić M (2010) Epidemiology of multiple sclerosis in western Herzegovina and Herzegovina--Neretva Canton, Bosnia and Herzegovina. *Coll Antropol* 34 Suppl 1: 189–193.
130. Klupka-Sarić I, Ristić S, Sepčić J, Kapović M, Peterlin B, Materljan E, Jurisić T, Mamić DM, Burina A, Sulentić V (2007) Epidemiology of multiple sclerosis in western Herzegovina. *Clin Neurol Neurosurg* 109: 779–783.
131. Peterlin B, Ristić S, Sepčić J, Vracko BK, Rako A, Lovrecić L, Brajenović-Milić B, Rudez J, Materljan E, Kapović M (2006) Region with persistent high frequency of multiple sclerosis in Croatia and Slovenia. *J Neurol Sci* 247:169–172.
132. Materljan E, Sepcic J (2002) Epidemiology of multiple sclerosis in Croatia. *Clin Neurol Neurosurg*. 104: 192–198.
133. Glavic N, Pavlovic M, Glavic J, Glavic P (1997) Epidemiologija multiple skleroze u dubrovackoj regiji. *Acta Clin Croat* 36(Suppl): 213
134. Kukić R (2001) Domovinski rat u Hrvatskoj i multipla skleroza: epidemiološka istraživanja u Osječko-baranjskoj županiji (Dizertacija), Rijeka, Sveučilište u Rijeci, 116.

135. Vukelic K, Vukas D, Sepcic J (2000) Epidemiology of multiple sclerosis on the northern Adriatic islands, Croatia. *Eur J Neurol* 7(Suppl 3): 127.
136. Materljan E, Materljan B, Sepčić J, Rudež J (2000) Multiple Sclerosis in Northeast Istria: An Update. U: Barac B, Huber G, Lechner H, Muačević V (ed.) *Neurologia Croatica* vol.49 40th International Neuropsychiatric Pula Symposium.
137. Benjak T, Štefančić V, Draušnik Ž, Cerovecki I, Roginić D, Habek M, Mihel S, Stevanović R (2018) Prevalence of multiple sclerosis in Croatia: Data from national and non-governmental organization registries. *Croat Med J* 59: 65–70.
138. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung H-P (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3: 291–301.
139. Hussman JP, Beecham AH, Schmidt M, Martin ER, McCauley JL, Vance JM, Haines J L, Pericak-Vance MA (2016) GWAS analysis implicates NF-κB-mediated induction of inflammatory T cells in multiple sclerosis. *Genes Immun* 17: 305–312.
140. Lazibat I (2018) Multiple Sclerosis: New Aspects of Immunopathogenesis. *Acta Clin Croat* 57: 352-361.
141. O’connor KC, Bar-Or A, Hafler DA (2001) The Neuroimmunology of Multiple Sclerosis: Possible Roles of T and B Lymphocytes in Immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 21: 81–92.
142. Prat A, Antel J (2005) Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 18:225–230.
143. Maoz-Segal R, Andrade P (2015) Molecular Mimicry and Autoimmunity. *Infection and Autoimmunity*:27-44.
144. Lünemann JD, Jelčić I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, Münz C (2008) EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-γ and IL-2. *J Exp Med* 205: 1763–1773.
145. Lang HLE, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Fugger LA (2002) functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 3:940–943.
146. Holmøy T, Kvale EØ, Vartdal F (2004) Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirol* 10:278–283.
147. Paroni M, Maltese V, Simone MD, Ranzani V, Larghi P, Fenoglio C, Pietroboni AM, Riz MAD, Crosti MC, Maglie S, Moro M, Caprioli F, Rossi R, Rossetti G, Galimberti D,

- Pagani M, Scarpini E, Abrignani S, Geginat J (2017) Recognition of viral and self-antigens by TH1 and TH1/TH17 central memory cells in patients with multiple sclerosis reveals distinct roles in immune surveillance and relapses. *J Allergy Clin Immunol* 140:797–808.
148. Harkiolaki M, Holmes SL, Svendsen P, Gregersen JW, Jensen LT, McMahon R, Friese MA, Boxel G van, Etzensperger R, Tzartos JS, Kran, K, Sainsbury S, Harlos K, Mellins ED, Palace J, Esiri MM, Merwe PA van der, Jones EY, Fugger L (2009) T Cell-Mediated Autoimmune Disease Due to Low-Affinity Crossreactivity to Common Microbial Peptides. *Immunity* 30: 348–357.
149. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, Nepom GT, Kwok WW, Love JC, Hafler DA (2015) Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 7: 287ra74
150. Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, Krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, Strominger JL, Svejgaard A, Hjorth JP, Holmdahl R, Wucherpfennig KW, Fugger L (1999) A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* 23: 343–347.
151. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS (1999) Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5: 170–175.
152. Voskuhl RR, Martin R, Bergman C, Dalal M, Ruddle NH, McFarland HF (1993) T helper 1 (Th1) functional phenotype of human myelin basic protein-specific T lymphocytes. *Autoimmunity* 15: 137–143.
153. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim HJ, Bar-Or (2007) A Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 178: 6092–6099.
154. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, Calabresi PA, Waubant E, Hauser, SL, Zhang J, Smith CH (2010) Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol*. 67: 452–461.
155. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA (2015) Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 161: 51–58.
156. Brinar V (2001) Autoimmune disorders in Neurology. *Neurol Croat* 50: 139-154.
157. Pearce JMS (2005) Historical descriptions of multiple sclerosis. *Eur Neurol* 54: 49–53.
158. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA (2018) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 378: 169–180.



159. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707–717.
160. Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Brück W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM (2011) Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365: 2188–2197.
161. Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50: 389–400.
162. Gilmore CP, Geurts JGG, Evangelou N, Bot JCJ, van Schijndel RA, Pouwels PJW, Barkhof F, Bö L (2009) Spinal cord grey matter lesions in multiple sclerosis detected by post-mortem high field MR imaging. *Mult Scler* 15: 180–188.
163. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM (2006) The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain J Neurol* 129(Pt 6): 1507–1516.
164. Petzold A, Balcer LJ, Calabresi PA, Costello F, Frohman TC, Frohman EM, Martinez-Lapiscina EH, Green AJ, Kardon R, Outteryck O, Paul F, Schippling S, Vermersch P, Villoslada P, Balk LJ, ERN-EYE IMSVISUAL (2017) Retinal layer segmentation in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 16: 797–812.
165. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46: 907–911.
166. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, ... Polman CH (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 83: 278–286.
167. Poser CM, Brinar VV (2001) Diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 103: 1–11.
168. Brinar V, Petelin Ž (2003) Multipla skleroza - klinička slika, dijagnostika i liječenje. *Medix* 9: 66–70.
169. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte, WW (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13: 227–231.

170. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69: 292–302.
171. Bašić Kes V, Jurašić MJ, Zavoreo I, Lisak M, Soldo Butković S, Titlić M, Matijaca M., Lazibat I, Jančuljak D, Habek M, Bošnjak Pašić M, Zadro I, Škarpa Prpić I, Hustić I, Grbić N, Kobasić I, Mirošević Zubonja T, Marčinko A, Vladić A, ... Demarin V (2018) Osvremenjene smjernice za farmakološko liječenje oboljelih od multiple skleroze Hrvatskog društva za neurovaskularne poremećaje, Hrvatskog liječničkog zbora i Hrvatskog društva za neuroimunologiju i neurogenetiku. *Acta Medica Croat* 72: 431–444.
172. Amiel J (1967) Study of leucocyte phenotypes in Hodgkins' disease. U: Curtoni ES, Mattiuz PL, Tosi MR (ed) *Histocompatibility Testing*. Munksgaard, Copenhagen, 79–81.
173. Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W (1972) Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Invest* 51: 1602–1605.
174. Russell TJ, Schultes LM, Kuban DJ (1972) Histocompatibility (HL-A) antigens associated with psoriasis. *N Engl J Med* 287: 738–740.
175. Svejgaard A (1979) HLA and Autoimmune Diseases. *Allergy* 34: 275–281.
176. Trowsdale J, Knight JC (2013) Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 14 :301–323.
177. Dendrou CA, Petersen J, Rossjohn J, Fugger L (2018) HLA variation and disease. *Nat Rev Immunol* 18: 325–339.
178. Bulek AM, Cole DK, Skowera A, Dolton G, Gras S, Madura F, Fuller A, Miles JJ, Gostick E, Price DA, Drijfhout JW, Knight RR, Huang GC, Lissin N, Molloy PE, Wooldridge L, Jakobsen BK, Rossjohn J, Peakman M, ... Sewell AK (2012) Structural basis for the killing of human beta cells by CD8(+) T cells in type 1 diabetes. *Nat Immunol* 13: 283–289.
179. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel, DD (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR- IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 15: 293–297.
180. Quandt JA, Baig M, Yao K, Kawamura K, Huh J, Ludwin SK, Bian HJ, Bryant M, Quigley L, Nagy ZA, McFarland, HF, Muraro, PA, Martin R, Ito K (2004) Unique clinical and

- pathological features in HLA-DRB1\*0401-restricted MBP 111-129-specific humanized TCR transgenic mice. *J Exp Med* 200: 223–34.
181. Armstrong KM, Piepenbrink KH, Baker BM (2008) Conformational changes and flexibility in T-cell receptor recognition of peptide-MHC complexes. *Biochem J* 415: 183–196.
  182. Yin Y, Li Y, Kerzic MC, Martin R, Mariuzza RA (2011) Structure of a TCR with high affinity for self-antigen reveals basis for escape from negative selection. *EMBO J* 30: 1137–1148.
  183. Gough SCL, Simmonds MJ (2007) The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Curr Genomics* 8: 453–465.
  184. Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80: 695–705.
  185. Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, Wijeyewickrema, LC, Eckle SBG, van Heemst J, Pik RN, McCluskey J, Toes RE, La Gruta NL, Purcell AW, Reid HH, Thomas R, Rossjohn, J (2013) A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 210: 2569–2582.
  186. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger, L, Scott H, Norén O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjöström H, Sollid LM (1998) Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 4: 713–717.
  187. Liepe J, Marino F, Sidney J, Jeko A, Bunting DE, Sette A, Kloetzel, P. M., Stumpf, M. P. H., Heck, A. J. R., & Mishto, M. (2016) A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides. *Science* 354: 354–358.
  188. Delong T, Wiles TA, Baker RL, Bradley B, Barbour G, Reisdorph R, Armstrong M, Powell RL, Reisdorph N, Kumar N, Elso CM, DeNicola M, Bottino R, Powers AC, Harlan DM, Kent SC, Mannering SI, Haskins K (2016) Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science* 351: 711–714.
  189. Jensen PE, Zhou Z (2013) Structural Characteristics of HLA-DQ that May Impact DM Editing and Susceptibility to Type-1 Diabetes. *Front Immunol* 4: 262.
  190. Weinstock C, Matheis N, Barkia S, Haager MC, Janson A, Marković A, Bux J, Kahaly GJ (2011) Autoimmune polyglandular syndrome type 2 shows the same HLA class II pattern as type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 77: 317–324.

191. Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, Okun M, Hohjoh H, Miki T, Hsu S, Leffell M, Grumet F, Fernandez-Vina M, Honda M, Risch N (2001) Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* 68:686–699.
192. Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR (2000) HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatol Oxf Engl* 39: 1060–1066.
193. Grommé M, Neefjes J (2002) Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39:181–202.
194. Agudelo WA, Galindo JF, Ortiz M, Villaveces JL, Daza EE, Patarroyo ME (2009) Variations in the electrostatic landscape of class II human leukocyte antigen molecule induced by modifications in the myelin basic protein peptide: a theoretical approach. *PLoS One* 4: e4164.
195. Bertrams J, Kuwert E, Liedtke U (1972) HL-A antigens and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2:405–408.
196. Winchester R, Ebers G, Fu SM, Espinosa L, Zabriskie J, Kunkel HG (1975) B-cell alloantigen Ag 7a in multiple sclerosis. *Lancet Lond Engl* 2:814.
197. Terasaki PI, Park MS, Opelz G, Ting A (1976) Multiple sclerosis and high incidence of a B lymphocyte antigen. *Science* 193:1245–1247.
198. Oksenberg JR, Barcellos LF, Cree BA, Baranzini SE, Bugawan TL, Khan O, Lincoln RR, Swerdlin A, Mignot E, Lin L, Goodin D, Erlich HA, Schmidt S, Thomson G, Reich DE, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL (2004) Mapping multiple sclerosis susceptibility to the HLA-DR locus in African Americans. *Am J Hum Genet* 74:160–167.
199. Cree BA, Reich DE, Khan O, De Jager PL, Nakashima I, Takahashi T, Bar-Or A, Tong C, Hauser SL, Oksenberg JR (2009) Modification of Multiple Sclerosis Phenotypes by African Ancestry at HLA. *Arch Neurol* 66:226–233.
200. Chao MJ, Barnardo MC, Lui GZ, Lincoln MR, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dyment DA, Sadovnick AD, Ebers GC (2007) Transmission of class I/II multi-locus MHC haplotypes and multiple sclerosis susceptibility: accounting for linkage disequilibrium. *Hum Mol Genet* 16:1951–1958.
201. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, Cree BC, Begovich AB, Villoslada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln RR, DeLoa C, Haines JL, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser SL, Oksenberg JR (2006)

- Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 15: 2813–2824.
202. Wu JS, James I, Wei Qiu, Castley A, Christiansen FT, Carroll WM, Mastaglia FL, Kermode AG (2010) Influence of HLA-DRB1 allele heterogeneity on disease risk and clinical course in a West Australian MS cohort: a high-resolution genotyping study. *Mult Scler J* 16:526–532.
  203. Nakamura Y, Matsushita T, Sato S, Niino M, Fukazawa T, Yoshimura S, Hisahara S, Isobe N, Shimohama S, Watanabe M, Yoshida K, Houzen H, Miyazaki Y, Yamasaki R, Kikuchi S, Kira J (2016) Latitude and HLA-DRB1\*04:05 independently influence disease severity in Japanese multiple sclerosis: a cross-sectional study. *J Neuroinflammation* 13: 239.
  204. Harbo HF, Utsi E, Lorentzen AR, Kampman MT, Celius EG, Myhr KM, Lie BA, Mellgren SI, Thorsby E (2007) Low frequency of the disease-associated DRB1\*15-DQB1\*06 haplotype may contribute to the low prevalence of multiple sclerosis in Sami. *Tissue Antigens* 69: 299–304.
  205. Kwon OJ, Karni A, Israel S, Brautbar C, Amar A, Meiner Z, Abramsky O, Karussis D (1999) HLA class II susceptibility to multiple sclerosis among Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews. *Arch Neurol* 56: 555–560.
  206. Toro J, Cuellar-Giraldo D, Díaz-Cruz C, Burbano LE, Guío CM, Reyes S, Cortes F, Cárdenas-Robledo S, Narváez DM, Cárdenas W, Porras A, Lattig MC, Groot de Restrepo H (2016) HLA-DRB1\*14 is a protective allele for multiple sclerosis in an admixed Colombian population. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 3: e192.
  207. Alves-Leon SV, Papais-Alvarenga R, Magalhães M, Alvarenga M, Thuler LCS, Fernández y Fernandez O (2007) Ethnicity-dependent association of HLA DRB1-DQA1-DQB1 alleles in Brazilian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 115:306–311.
  208. Link J, Kockum I, Lorentzen AR, Lie BA, Celius EG, Westerlind H, Schaffer M, Alfredsson L, Olsson T, Brynedal B, Harbo HF, Hillert J (2012) Importance of Human Leukocyte Antigen (HLA) Class I and II Alleles on the Risk of Multiple Sclerosis. *PLoS One* 7:e36779.
  209. Balnytė R, Rastenytė D, Mickevičienė D, Vaitkus A, Skrodenienė E, Vitkauskienė A (2012) Frequency of HLA-DRB1 gene alleles in patients with multiple sclerosis in a Lithuanian population. *Med Kaunas Lith* 48: 9–14.
  210. Romero-Pinel L, Pujal JM, Martínez-Yélamos S, Gubieras L, Matas E, Bau L, Torrabadella M, Azqueta C, Arbizu T (2011) HLA-DRB1: genetic susceptibility and disability

- progression in a Spanish multiple sclerosis population: HLA-DRB1 and multiple sclerosis in a Spanish cohort. *Eur J Neurol* 18: 337–342.
211. Zivadinov R, Uxa L, Bratina A, Bosco A, Srinivasaraghavan B, Minagar A, Ukmar M, Benedetto Sy, Zorzon M (2007) HLA-DRB1\*1501, -DQB1\*0301, -DQB1\*0302, -DQB1\*0602, and -DQB1\*0603 alleles are associated with more severe disease outcome on MRI in patients with multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79: 521–535.
  212. Schmied MC, Zehetmayer S, Reindl M, Ehling R, Bajer-Kornek B, Leutmezer F, Zebenholzer K, Hotzy C, Lichtner P, Meitinger T, Wichmann HE, Illig T, Gieger C, Huber K, Khalil M, Fuchs S, Schmidt H, Auff E, Kristoferitsch W, Fazekas F, Berger T, Vass K, Zimprich A (2012) Replication study of multiple sclerosis (MS) susceptibility alleles and correlation of DNA-variants with disease features in a cohort of Austrian MS patients. *Neurogenetics* 13: 181–187.
  213. Crnić-Martinović M, Balen S, Katalinić N, Fućak M, Grahovac B, Sepčić J, Kapović M, Ristić S (2010) HLA Class II gene polymorphism in multiple sclerosis patients from Gorski Kotar, Croatia. *Tissue Antigens* 622.
  214. Dean G, Yeo TW, Goris A, Taylor CJ, Goodman RS, Elian M, Galea-Debono A, Aquilina A, Felice A, Vella M, Sawcer S, Compston DA (2008) HLA-DRB1 and multiple sclerosis in Malta. *Neurology* 70:101–105.
  215. Qiu W, James I, Carroll WM, Mastaglia FL, Kermode AG (2011) HLA-DR allele polymorphism and multiple sclerosis in Chinese populations: a meta-analysis. *Mult Scler J* 17: 382–388.
  216. Abolfazli R, Samadzadeh S, Sabokbar T, Siroos B, Armaki SA, Aslanbeiki B, Ghelman M, Taheri T, Shakoori A (2014) Relationship between HLA-DRB1\* 11/15 genotype and susceptibility to multiple sclerosis in Iran. *J Neurol Sci* 345: 92–96.
  217. Kollaee A, Ghaffarpor M, Ghlichnia HA, Ghaffari SH, Zamani M (2012) The influence of the HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allele heterogeneity on disease risk and severity in Iranian patients with multiple sclerosis: HLA-DRB1, DQB1 genes and MS risk and severity in Iranian. *Int J Immunogenet* 39:414–422.
  218. Al Jumah M, Kojan S, Al Shehri AM, Al Balwi M, Al Abdulkarim I, Masuadi EM, Alhaidan Y, Alabdulrahman A, Fakhoury HM, Hajeer AH (2018) HLA class II polymorphism in Saudi patients with multiple sclerosis. *HLA* 91: 17–22.
  219. Bergamaschi L, Leone MA, Fasano ME, Guerini FR, Ferrante D, Bolognesi E, Barizzone N, Corrado L, Naldi P, Agliardi C, Dametto E, Salvetti M, Visconti A, Galimberti D,

- Scarpini E, Vercellino M, Bergamaschi R, Monaco F, Caputo D, Momigliano-Richiardi P, D'Alfonso S (2010) HLA-class I markers and multiple sclerosis susceptibility in the Italian population. *Genes Immun* 11: 173–180.
220. Nacionalna klasifikacija prostornih jedinica za statistiku (2007) Narodne novine br. 35/07.
221. REPUBLIKA HRVATSKA [Internet]. Hrvatska školska kartografija. Dostupno na: <http://hsk.com.hr/geografske-karte/zidne-karte-2/republika-hrvatska-2/> (pristupljeno 10. 05. 2021.)
222. Državni zavod za statistiku. Stanovništvo prema starosti i spolu po naseljima, popis 2011. Dostupno na <https://www.dzs.hr> (pristupljeno 10. 05. 2021.)
223. Grubić Z, Zunec R, Naipal A, Kastelan A, Giphart MJ (1995) Molecular analysis of HLA class II polymorphism in Croats. *Tissue Antigens* 46:293–298.
224. Stipčević A (1989) *Iliri: povijest, život, kultura*. 2 izd. Zagreb, Školska knjiga.
225. Matijašić R (2009) *Povijest hrvatskih zemalja u antici do cara Dioklecijana*. Leykam International, Zagreb.
226. Šišić F (2004) *Povijest Hrvata: Pregled povijesti hrvatskog naroda 600. -1526. prvi dio*. Marjan tisak, Split.
227. Gračanin H, Pisk S (2015) *Sjeverozapadna Hrvatska u ranome srednjem vijeku*. U: Nikolić Jakus, Z (ur.) *Nova zraka u europskom svjetlu. Hrvatske zemlje u ranome srednjem vijeku (oko 550 - oko 1150)* Zagreb, Matica hrvatska, 345-366.
228. Šišić F (2004) *Povijest Hrvata: Pregled povijesti hrvatskog naroda 1526. - 1918. drugi dio*. Marjan tisak, Split.
229. Goldstein I (2003) *Hrvatska povijest*. Novi liber, Zagreb.
230. Skupina autora (2007) *Povijest Hrvata - Od 1918. do danas - 3. knjiga*. Školska knjiga, Zagreb.
231. Karakaš Obradov M (2016) Migracije stanovništva na hrvatskom području neposredno prije i nakon završetka Drugoga svjetskog rata. *Časopis za suvremenu povijest* 48: 653-672.
232. Ljubić I (2017) *Domovinski rat i prognaničko-izbjegličko pitanje 1991./1992.. (Diplomski rad)*. Filozofski fakultet u Zagrebu, Odsjek za povijest.
233. Dražić V, Grahovac B, Bingulac-Popović J, Babić I, Balija M, Grgičević D (2000) Allele and haplotype frequencies for HLA class I loci in Croatian population. *Vox Sang* 79 (suppl 1): 583.

234. Dražić V, Grahovac B, Bingulac-Popović J, Babić I, Balija M, Grgičević D (2001) Allele and haplotype frequencies for HLA class II loci in Croatia. *Transfus Clin Biol* 8 (suppl 1): 163.
235. <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction> (pristupljeno 10. svibnja 2021.)
236. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2007) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis (2005) *Evol Bioinform Online* 1: 47-50.
237. Gonzalez-Galarza FF, McCabe A, Santos EJMD, Jones J, Takeshita L, Ortega-Rivera ND, Cid-Pavon GMD, Ramsbottom K, Ghattaoraya G, Alfirevic A, Middleton D, Jones AR (2020) Allele frequency net database (AFND) 2020 update: Gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res* 8;48(D1): D783-D788.
238. Grubic Z, Burek Kamenaric M, Mikulic M, Stingl Jankovic K, Maskalan M, Zunec R (2014) HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 allele and haplotype diversity among volunteer bone marrow donors from Croatia. *Int J Immunogenet* 41: 211–221.
239. Smigoc Schweiger D, Mendez A, Kunilo Jamnik S, Bratanic N, Bratina N, Battelino T, Breclj J, Vidan-Jeras B (2014) Genetic risk for co-occurrence of type 1 diabetes and celiac disease is modified by HLA-C and killer immunoglobulin-like receptors. *Tissue Antigens* 84: 471–478.
240. Andric Z, Popadic D, Jovanovic B, Jaglicic I, Bojic S, Simonovic R (2014) HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 allele and haplotype frequencies in the Serbian population. *Hum Immunol*. 75:218–226.
241. Inotai D, Szilvasi A, Benko S, Boros-Major A, Illes Z, Bors A, Kiss KP, Rajczy K, Gelle-Hossó A, Buhler S, Nunes JM, Sanchez-Mazas A, Tordai A (2015) HLA genetic diversity in Hungarians and Hungarian Gypsies: complementary differentiation patterns and demographic signals revealed by HLA-A, -B and -DRB1 in Central Europe. *Tissue Antigens* 86:115–121.
242. Rendine S, Ferrero NM, Sacchi N, Costa C, Pollichieni S, Amoroso A (2012) Estimation of human leukocyte antigen class I and class II high-resolution allele and haplotype frequencies in the Italian population and comparison with other European populations. *Hum Immunol* 73: 399-404



243. Kirijas M, Genadieva Stavrik S, Senev A, Efinska Mladenovska O, Petlichkovski A (2018) HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele and haplotype frequencies in the Macedonian population based on a family study. *Hum Immunol* 79: 145–153.
244. Nerstheimer S, Tauscher P, Petek E, Schappacher-Tilp G (2015) HLA-frequencies of Austrian umbilical cord blood samples. *Hum Immunol* 76: 863–867.
245. Grubic Z, Zunec R, Cecuk-Jelicic E, Kerhin-Brkljacic V, Kastelan A (2000) Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet* 27: 47–51.
246. Pingel J, Solloch UV, Hofmann JA, Lange V, Ehninger G, Schmidt AH (2013) High-resolution HLA haplotype frequencies of stem cell donors in Germany with foreign parentage: How can they be used to improve unrelated donor searches? *Hum Immunol* 74:330–340.
247. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, Dykeman J, Wolfson C, Koch MW, Marrie RA (2013) Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 13:128.
248. Wade BJ (2014) Spatial Analysis of Global Prevalence of Multiple Sclerosis Suggests Need for an Updated Prevalence Scale. *Mult Scler Int* 2014:1–7.
249. Pavličević D (2007) *Povijest Hrvatske*. 4. izd. Naknada Pavličić, Zagreb.
250. Buhler S, Mendez A, Montanic S, Dolsak V, Jamnik SK, Ambroz N, Sanchez-Mazas, A, Nunes, J, Vidan-Jeras B (2013) The HLA genetic relationship between a well-defined Slovenian population sample and the national haematopoietic stem cell donor registry. *Tissue Antigens* 81: 364-365.
251. Pera C, Delfino L, Longo A, Pistillo MP, Ferrara GB (2000) Novel associations among HLA-DQA1 and -DQB1 alleles, revealed by high-resolution sequence-based typing (SBT). *Tissue Antigens* 55: 275-9.
252. Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, Fernandez-Viña M (2003) New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens* 62: 296–307.
253. Horton R, Gibson R, Coggill P, Miretti M, Allcock RJ, Almeida J, Forbes S, Gilbert JG, Halls K, Harrow JL, Hart E, Howe K, Jackson DK, Palmer S, Roberts AN, Sims S, Stewart CA, Traherne JA, Trevanion S, Wilming L, Rogers J, de Jong PJ, Elliott JF, Sawcer S,

- Todd JA, Trowsdale J, Beck S (2008). Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project. *Immunogenetics*; 60: 1–18.
254. Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Akesson E, Palmgren J, Hillert J (2007) HLA-A Confers an HLA-DRB1 Independent Influence on the Risk of Multiple Sclerosis *PLoS One* 2: e664.
255. Bergamaschi L, Leone MA, Fasano ME, Guerini FR, Ferrante D, Bolognesi E, Barizzone N, Corrado L, Naldi P, Agliardi C, Dametto E, Salvetti M, Visconti A, Galimberti D, Scarpini E, Vercellino M, Bergamaschi R, Monaco F, Caputo D, Momigliano-Richiardi P, D'Alfonso S (2010) HLA-class I markers and multiple sclerosis susceptibility in the Italian population. *Genes Immun* 11: 173–180.
256. Burfoot RK, Jensen CJ, Field J, Stankovich J, Varney MD, Johnson LJ, Butzkueven H, Booth D, Bahlo M, Tait BD, Taylor BV, Speed TP, Heard R, Stewart GJ, Foote SJ, Kilpatrick TJ, Rubio JP (2007) SNP mapping and candidate gene sequencing in the class I region of the HLA complex: searching for multiple sclerosis susceptibility genes in Tasmanians. *Tissue Antigens* 71: 42-50.
257. Fogdell-Hahn A, Ligers A, Grønning M, Hillert J, Olerup O (2000) Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* 55:140–148.
258. Harbo HF, Lie BA, Sawcer S, Celius EG, Dai KZ, Oturai A, Hillert J, Lorentzen AR, Laaksonen M, Myhr KM, Ryder LP, Fredrikson S, Nyland H, Sørensen PS, Sandberg-Wollheim M, Andersen O, Svejgaard A, Edland A, Mellgren SI, Compston A, Vartdal F, Spurkland A (2004) Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 63: 237–247.
259. Chao MJ, Barnardo MC, Lui GZ, Lincoln MR, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dymont DA, Sadovnick AD, Ebers GC (2007) Transmission of class I/II multi-locus MHC haplotypes and multiple sclerosis susceptibility: accounting for linkage disequilibrium. *Hum Mol Genet* 16: 1951–1958.
260. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymont DA, Tiislar M, Ferretti V, Tienari PJ, Sadovnick AD, Peltonen L, Ebers GC, Hudson TJ (2005) A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 37: 1108–1112.
261. Healy BC, Liguori M, Tran D, Chitnis T, Glanz B, Wolfish C, Gauthier S, Buckle G, Houtchens M, Stazzone L, Khoury S, Hartzmann R, Fernandez-Vina M, Hafler DA,

- Weiner HL, Guttman CR, De Jager PL (2010) HLA B\*44: protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *Neurology* 75: 634–640.
262. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, Fenoglio C, Ban M, Taylor CJ, Goodman RS, Walsh E, Wolfish CS, Horton R, Traherne J, Beck S, Trowsdale J, Caillier SJ, Ivinson AJ, Green T, Pobywajlo S, Lander ES, Pericak-Vance MA, Haines JL, Daly MJ, Oksenberg JR, Hauser SL, Compston A, Hafler DA, Rioux JD, Sawcer S (2007) A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61: 228–236.
263. Werneck LC, Lorenzoni PJ, Arndt RC, Kay CSK, Scola RH (2016) The immunogenetics of multiple sclerosis. The frequency of HLA-alleles class 1 and 2 is lower in Southern Brazil than in the European population. *Arq Neuropsiquiatr* 74: 607–616.
264. Ballerini C (2004) HLA–multiple sclerosis association in Continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe. *J Neuroimmunol* 150: 178–185.
265. Saruhan-Direskeneli G, Esin S, Baykan-Kurt B, Örnek İ, Vaughan R, Eraksoy M (1997) HLA-DR and -DQ Associations with Multiple Sclerosis in Turkey. *Hum Immunol* 55: 59–65.
266. Didonna A, Oksenberg JR (2015) Genetic determinants of risk and progression in multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 449: 16–22.
267. Mohajer B, Abbasi N, Pishgar F, Abdolalizadeh A, Ebrahimi H, Razaviyoun T, Mohebbi F, Eskandarieh S, Sahraian MA (2018) HLA-DRB1 polymorphism and susceptibility to multiple sclerosis in the Middle East North Africa region: A systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol* 321: 117–124.
268. Pandit L, Malli C, Singhal B, Wason J, Malik O, Sawcer S, Ban M, D’Cunha A, Mustafa S (2016) HLA associations in South Asian multiple sclerosis. *Mult Scler* 22: 19–24.
269. Ramagopalan SV, Morris AP, Dymant DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, Orton SM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC (2007) The Inheritance of Resistance Alleles in Multiple Sclerosis. Abecasis G, editor. *PLoS Genet* 3: 1607-1613.
270. Lincoln MR, Ramagopalan SV, Chao MJ, Herrera BM, Deluca GC, Orton SM, Dymant DA, Sadovnick AD, Ebers GC (2009) Epistasis among HLA-DRB1, HLA-DQA1, and HLA-DQB1 loci determines multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7542-7547.

271. Kaushansky N, Ben-Nun A (2014) DQB1\*06:02-Associated Pathogenic Anti-Myelin Autoimmunity in Multiple Sclerosis-Like Disease: Potential Function of DQB1\*06:02 as a Disease-Predisposing Allele. *Front Oncol* 4: 280.
272. Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Cucca F, Sotgiu S, Rosati G, Muntoni F (1997) Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles. *Am J Hum Genet* 61: 454–457.
273. Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, Roxburgh R, Corradu F, Smith S, Compston DA (2002) HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 72: 184–187.
274. Irizar H, Muñoz-Culla M, Zuriarrain O, Goyenechea E, Castillo-Triviño T, Prada A, Saenz-Cuesta M, De Juan D, Lopez de Munain A, Olascoaga J, Otaegui D (2012) HLA-DRB1\*15:01 and multiple sclerosis: a female association? *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 18:569–577.
275. Celius EG, Harbo HF, Egeland T, Vartdal F, Vandvik B, Spurkiand A (2000) Sex and age at diagnosis are correlated with the HLA-DR2, DQ6 haplotype in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 178: 132–135.
276. Masterman T, Ligiers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J (2000) HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 48: 211–219.

## 6. ŽIVOTOPIS

Sandra Jagnjić je rođena 18. 02. 1980. u Sinju. Osnovnu školu je pohađala u Obrovcu Sinjskom, a Franjevačku klasičnu gimnaziju u Sinju. Godine 2006. je diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2006. do 2007. godine je odradila pripravnički staž u KBC Zagreb.

Od siječnja do travnja 2007. god. radila je u Domu zdravlja Bjelovarsko-bilogorske županije- Ispostava Garešnica, nakon čega se zapošljava u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM). 2010. god. završava specijalizaciju iz transfuzijske medicine i počinje raditi u Odjelu za imunohematologiju HZTM-a. 2011. postaje voditelj Odsjeka za kliničku transfuziju i telemedicine u sklopu Odjela za eritrocitnu dijagnostiku, a u lipnju 2021. voditelj Odjela za krvlju prenosive bolesti.

Od 2015. do 2017. radi kao vanjski suradnik u nastavi na Zdravstvenom učilištu u Zagrebu.

Član je radne skupine za izradu Kliničkih smjernica Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu. Sudjeluje na brojnim domaćim i međunarodnim stručnim skupovima, kongresima, radionicama i tečajevima. Autor i koautor je više od 30 kongresnih priopćenja te koautor dva znanstvena rada u časopisima indeksiranim u CC i SCI:

- Safic Stanic H, Dogic V, Herceg I, **Jagnjic S**, Bingulac-Popovic J, Babic I, Corusic A, Jukic I (2021) D variants in the population of D-negative blood donors in the north-eastern region of Croatia. *Transfus Med* 31: 43-47.

- Kruhonja Galic Z, **Jagnjic S**, Bingulac-Popovic J, Planinc Peraica A, Hecimovic A, Strauss Patko M, Jukic I (2020) Warm red blood cell autoantibodies and clinical diagnoses in patients with or without autoimmune hemolysis. *Transfus Clin Biol* 27: 25-29.

Prvi je autor rada povezanog s temom doktorskog rada koji je prihvaćen za objavu 2020. god. u časopisu indeksiranom u SCI:

Jagnjić S, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Vladić A, Štingl Janković K, Kruhonja Galić Z, Hećimović A, Jukić I (2021) HLA II alleles and susceptibility to multiple sclerosis in Croatia. *Acta Clin Croat*.

Članica je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora te Hrvatskog društva za transfuzijsku medicinu.

Doktorski studij na Biološkom odjelu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, upisuje u akademskoj godini 2012/13. Vijeće biološkog odsjeka PMF-a odobrilo joj je temu 09. rujna 2015., a Senat Sveučilišta u Zagrebu 08. prosinca 2015. donio odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti.