

# Povezanost biljega polimorfizma gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 te specifičnih autoantitijela protiv beta stanica Langerhansovih otočića s nastankom dijabetesa melitusa tipa 1 u bolesnika s aut ...

---

Rojnić Putarek, Nataša

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:099745>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-18**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nataša Rojnić Putarek**

**Povezanost biljega polimorfizma gena  
HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 te  
specifičnih autoantitijela protiv beta  
stanica Langerhansovih otočića s  
nastankom dijabetesa melitusa tipa 1 u  
bolesnika s autoimunom bolešću  
štitnjače**

**DISERTACIJA**

**ZAGREB, 2015**

Disertacija je izrađena u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju, Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor: dr.sc. Miroslav Dumić, prof.emeritus

*Zahvaljujem svom mentoru, profesoru emeritusu Miroslavu Dumiću, na bezrezervnoj i neprocjenjivoj pomoći i podršci u izradi ovog rada. Zahvaljujem mu što me uveo u svijet pedijatrijske endokrinologije i dijabetesa, otkrio ljepotu i tajne znanstvenog razmišljanja i bio i ostao moj mentor i profesionalni uzor.*

*Zahvaljujem prof.dr.sc. Zorani Grubić na strpljenju, vremenu, trudu i velikom znanju uloženom da bi ovaj rad bio bolji.*

*Zahvaljujem prof. dr.sc. Danki Grčević, prof.dr.sc. Vesni Kušec, prof.dr.sc. Renati Žunec, dr.sc. Katarini Štingl, dr. Jadranki Knežević-Ćuća na nesebičnoj pomoći oko laboratorijskog dijela istraživanja i vrijednim savjetima tijekom pisanja rada.*

*Zahvaljujem liječnicama Zavoda za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju (mr.sc. Jasenki Ille, dr.sc. Neveni Krnić i Aniti Špehar Uroić, dr.med.) na pomoći i podršci koje su mi pružale u svim fazama izrade rada.*

*Zahvaljujem medicinskim sestrama Biserki Štajnkler, bacc.med.techn., Gordani Čolig, bacc.med.techn. i Jasni Radanović, bacc.med.techn. na savjesnoj i temeljitoj pomoći u organizaciji i izvođenju tehničkih dijelova rada.*

*Zahvaljujem Bruni Jakšić, mag.ing.ele. na sistematičnoj i iscrpnoj statističkoj analizi.*

*Zahvaljujem sponzorima koji su financijskim doprinosom omogućili izradu ovog rada.*

*Na kraju, zahvaljujem svom suprugu, svojoj djeci i cijeloj obitelji na ljubavi, strpljenju i razumijevanju koje mi oduvijek pružaju.*

## KAZALO

POPIS KRATICA .....	2
1. UVOD .....	1
1.1. AITD .....	1
1.1.1. Genetska etiologija AITD .....	4
1.1.1.1. Geni HLA razreda II .....	4
1.1.1.2. Gen CTLA-4 .....	7
1.1.1.3. Gen PTPN22 .....	8
1.2. DMT1 .....	8
1.2.1. Genetska etiologija DMT1 .....	13
1.2.1.1. Geni HLA razreda II .....	14
1.2.1.2. Gen za inzulin .....	16
1.2.1.3. Gen CTLA-4 .....	17
1.2.1.4. Gen PTPN22 .....	18
1.3. Povezanost AITD i DMT1 (APSv3) .....	18
1.3.1. Genetska etiologija APS3v .....	21
1.3.1.1. Gen CTLA-4 .....	21
1.3.1.2. Gen PTPN22 .....	22
1.3.1.3. Geni HLA razreda II .....	22
2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA .....	24
2.1. HIPOTEZA .....	24
2.2. CILJEVI RADA .....	24
2.2.1. OPĆI CILJ .....	24
2.2.2. SPECIFIČNI CILJEVI .....	24
3. ISPITANICI I METODE .....	27
3.1. PLAN ISTRAŽIVANJA .....	27
3.2. ISPITANICI .....	27
3.3. METODE .....	28
3.3.1. Kliničke metode: .....	28

3.3.2.	<i>Analitičke metode</i> .....	30
3.3.2.1.	<i>Testovi određivanja autoantitijela</i> .....	30
3.3.2.2.	<i>Određivanje gena HLA razreda II</i> .....	31
3.3.2.3.	<i>Određivanje polimorfizma gena CTLA-4 i PTPN22</i> .....	33
3.4.	STATISTIČKE METODE .....	37
4.	REZULTATI.....	38
4.1.	Geni HLA razreda II .....	40
4.1.1.	<i>Geni lokusa HLA-DRB1</i> .....	40
4.1.1.1.	<i>Bolesnici s DMT1</i> .....	40
4.1.1.2.	<i>Bolesnici s AITD</i> .....	43
4.1.2.	<i>Geni lokusa HLA-DQB1</i> .....	45
4.1.2.1.	<i>Bolesnici s DMT1</i> .....	45
4.1.2.2.	<i>Bolesnici s AITD</i> .....	47
4.1.3.	<i>Analiza haplotipova HLA-DRB1 - DQB1</i> .....	49
4.1.3.1.	<i>Bolesnici s DMT1</i> .....	50
4.1.3.2.	<i>Bolesnici s AITD</i> .....	61
4.1.4.	<i>Analiza homozigota HLA-DRB1-DQB1</i> .....	67
4.2.	Polimorfizam gena CTLA-4.....	68
4.2.1.	<i>CTLA-4 49AG</i> .....	69
4.2.2.	<i>CTLA-4 CT60</i> .....	75
4.3.	Polimorfizam R620W gena PTPN22 .....	81
4.4.	Povezanost gena HLA razreda II, CTLA-4 (49AG i CT60) i PTPN22 s visinom titra TPO i Tg antitijela u bolesnika s AITD i APS3v .....	86
4.5.	Raspodjela gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 u braće i sestara s DMT1 i AITD .....	87
4.6.	Bolesnici s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na $\beta$ stanice Langerhansovih otočića gušterače .....	90
4.7.	Raspodjela gena HLA-DRB1-DQB1, CTLA-4 i PTPN22 u obitelji bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića .....	100
5.	RASPRAVA.....	103
5.1.	Geni HLA razreda II .....	104
5.1.1.	<i>Geni HLA i DMT1</i> .....	105

5.1.2. Geni HLA i AITD .....	110
5.2. Polimorfizam gena CTLA-4.....	111
5.2.1. Polimorfizam CTLA-4 i DMT1 .....	112
5.2.2. Polimorfizam CTLA-4 i AITD.....	114
5.2.2.1. Polimorfizam gena CTLA-4 49AG.....	114
5.2.2.2. Polimorfizam CTLA-4 CT60 .....	115
5.3. Polimorfizam gena PTPN22.....	118
5.3.1. Polimorfizam PTPN22 i DMT1 .....	118
5.3.2. Polimorfizam PTPN22 i AITD .....	119
5.4. Bolesnici s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na $\beta$ stanice Langerhansovih otočića gušterače .....	121
6. ZAKLJUČCI.....	128
7. SAŽETAK .....	134
8. SUMMARY.....	136
9. LITERATURA .....	138
10. ŽIVOTOPIS .....	160

## POPIS KRATICA

AITD	engl. <i>Autoimmune Thyroid Disease</i>
APS3v	engl. <i>Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant</i>
AT	<i>Autoimuni tiroiditis</i>
CTLA-4	engl. <i>Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4 gene</i>
DMT1	<i>Dijabetes melitus tip 1</i>
GAD	engl. <i>Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody</i>
GB	Gravesova bolešt
HLA	engl. <i>Human Leukocyte Antigen</i>
IA/A	engl. <i>Insulin AutoAntibody</i>
IA-2	engl. <i>Thyrosin Phosphatase Islet Autoantibody</i>
ICA	engl. <i>Islet Cell Cytoplasmic Autoantibody</i>
INS	engl <i>Insulin Gene</i>
MHC	<i>engl. Major Histocompatibility Complex</i>
PTPN22	engl. <i>Protein Thyrosine Phosphatase Non- receptor type 22</i>
Tg At	<i>Antitijela na tireoglobulin</i>
TPO At	<i>Antitijela na tiroidnu peroksidazu</i>
TSHr	<i>Antitijela za receptor za TSH</i>
ZnT8	engl. <i>Zinc transporter Slc30A8</i>

# 1. UVOD

Autoimune endokrinološke bolesti su organ-specifične bolesti u kojima su ciljni organi imunološkog odgovora endokrine žlijezde, a najčešće među njima su dijabetes melitus tip 1 (DMT1) i autoimuna bolest štitnjače (engl. *Autoimmune Thyroid Disease*, AITD). Od svih autoimunih endokrinopatija koje se javljaju zajedno te se dvije bolesti daleko najčešće mogu naći u iste osobe (1,2) te se taj fenotip klasificira kao varijanta autoimunog poliglandularog sindroma tip 3 (engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*, APS3v) (3,4).

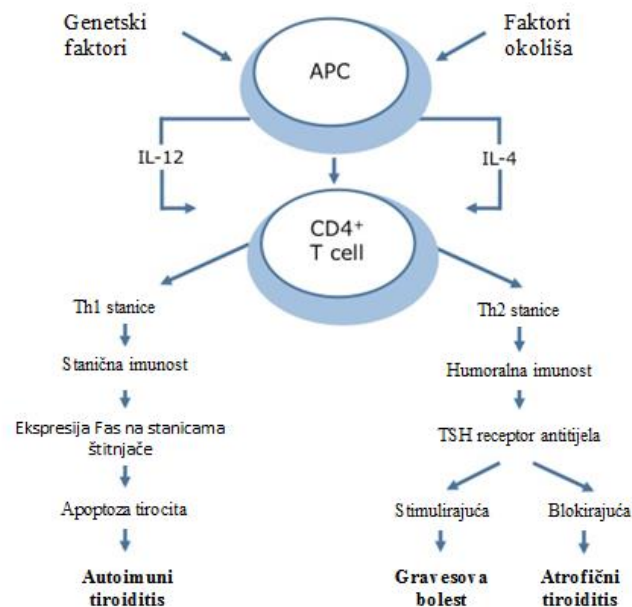
## 1.1. AITD

AITD se javlja u oko 2% ženske i 0,2% muške populacije (5) te uključuje dvije glavne autoimune bolesti štitnjače, autoimuni tiroiditis (AT) i Gravesovu bolest (GB). U AT limfocitna infiltracija štitnjače vodi apoptozi tiroidnih stanica i hipotireozu. U GB limfocitna infiltracija štitnjače dovodi do aktivacije B-stanica koje luče stimulirajuća antitijela za receptor za TSH (TSHr At) koja ga aktiviraju i dovode do hiperplazije folikularnih stanica i hipersekrecije tiroidnih hormona, te uzrokuju hipertireozu. Važnost ravnoteže Th1 stanica koje posreduju u imunološkom odgovoru koji potiče staničnu imunost i Th2 stanica koje posreduju u imunološkom odgovoru koji potiče humoralnu imunost, u regulaciji autoimunosti na tiroidne antigene i fenotipsku ekspresiju autoimune bolesti štitnjače prikazana je na slici 1.1.1.

Iako se AT i GB klinički razlikuju, mnogi etiološki faktori su im zajednički. Obje se bolesti mogu naći u istoj obitelji i u iste osobe (6), a opisani su jednojajčani blizanci od kojih



jedan je imao GB a drugi AT (7). U nekih osoba bolest prelazi iz jednog oblika u drugi s time da GB češće spontano završava hipotireozom uzrokovanom AT (8) dok je nastanak GB iz AT bitno rjeđi (9).



Slika 1.1.1. Važnost ravnoteže Th1/Th2 u regulaciji autoimunosti na tiroidne antigene i fenotipsku ekspresiju autoimune bolesti štitnjače.

Prevlast Th1-posredovanog imunološkog odgovora koji potiče staničnu imunost, može dovesti do proapoptoze tiroidnih stanica. Fas i/ili TRAIL (od engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) ovisni apoptotički putevi aktiviraju se putem tip-1 proinflammatory citokina kao što su TNF-alpha, INF gamma i IL-2 i započinju apoptozu tiroidnih stanica s posljedičnim nastankom AT ili njegovih varijanti. Prevlast Th2–posredovanog imunološkog odgovora koji potiče humoralnu imunost, može dovesti do aktivacije antigen specifičnih B limfocita i produkcije anti-TSHr antitijela. Ako prevladava stimulirajući tip anti TSHr antitijela nastati će hiperplazija tiroidnih stanica s posljedičnom hiperfunkcijom i Gravesovom hipertireozom. S druge strane, ako dominiraju TSHr-blokirajuća antitijela, doći će do atrofije tiroidnih stanica i posljedične hipofunkcije i atrofičnog tiroiditisa. Fenotipska ekspresija tiroidne autoimunosti u smjeru GB ili AT ovisna je o ravnoteži Th1:Th2 imunološkog odgovora kojeg reguliraju antigen prezentirajuće stanice (APC) i tip citokina koji predomina u parenhimu štitnjače. Činjenica da ista osoba može imati AT i GB govori u prilog tome da je Th1: Th2 ravnoteža dinamički proces na koji mogu utjecati vanjski faktori koji djeluju preko

APC-a. (Peuzeto iz: A Tsatsoulis, C Limniati. Stress-Induced Th2 Shift & Thyroid Autoimmunity: Unifying Hypothesis. 2012, <http://brainimmune.com/the-modifying-role-of-stress-induced-th2-shift-in-the-clinical-expression-of-thyroid-autoimmunity-a-brief-overview-and-unifying-hypothesis/>) (10)

AT je najčešći uzrok primarne hipotireoze u djece starije od 6 godina i adolescenata u područjima s dostatnom količinom joda u hrani. Prvi ga je opisao Hashimoto 1912. godine (11). Tiroidna antitijela kao dokaz autoimune bolesti štitnjače nađu se u oko 2% djece školske dobi i u 4-6% adolescenata (9). Učestalost bolesti je u djevojčica oko 2,5-5 puta veća nego u dječaka, a u odrasloj dobi taj je omjer oko 10-15 puta veći (9). U Hrvatskoj je provedeno epidemiološko istraživanje o učestalosti strume i AT u šibenskoj regiji i utvrđena prevalencija AT od 0,35% u djece školske dobi (11 do 18 godina) s omjerom 8:1 u korist djevojčica (12). Familijarno javljanje bolesti je često, bolest se može naći u oko 25% članova uže obitelji (braće, sestara i roditelja) bolesnika s AT. Dva su osnovna oblika AT; klasični, autoimuni tiroiditis sa strumom i atrofični autoimuni tiroiditis (koji je rijedak u djece). Određeni antigeni HLA (HLA-DR5, HLA-DR4) povezani su s AT i strumom, dok se drugi (HLA-DR3) češće javljaju u atrofičnom obliku bolesti (9).

GB je relativno rijetka u djece. Učestalost u djevojčica je 4-5 puta veća (13). Godišnja incidencija je 8 na 1.000.000 djece mlađe od 15 godina i 1 na 1.000.000 djece mlađe od 4 godine. U Hrvatskoj je prema studiji Jakšić i sur. (12) prevalencija GB u šibenskom području iznosila 7.3 na 10.000 djece i adolescenata u dobi od 11 do 18 godina (4/5462 ispitanika; tri djevojčice i jedan dječak).

Prvi korak u patogenezi AT je aktivacija CD4 pozitivnih T limfocita specifičnih za antigene štitnjače. Nakon aktivacije, autoreaktivni CD4 T-limfociti potiču stvaranje citotoksičnih CD8 T-limfocita te autoreaktivnih B-limfocita i autoantitijela u štitnjači. Tiroidna autoantitijela vežu se na tiroidnu peroksidazu (TPOAt), tireoglobulin (TgAt) i receptor za TSH (TSHrAt). TPO antitijela inhibiraju aktivnost enzima TPO *in vitro*, no smatra se da hipotireoza *in vivo* primarno nastaje zbog direktnog citotoksičnog učinka CD8 T-limfocita na stanice štitnjače. Što se tiče blokirajućih TSHr antitijela, ona doprinose nastanku hipotireoze u manjem broja odraslih pacijenata s atrofičnim oblikom AT, no to nije potvrđeno i u djece (10).

### **1.1.1. Genetska etiologija AITD**

Do danas poznati geni koji nose rizik za AITD mogu se podijeliti u dvije velike skupine: 1. geni s imunomodulirajućom ulogom, 2. geni specifični za štitnjaču. U prvu skupinu pripadaju geni HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) razreda II (kromosom 6p21), gen CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T Lymphocyte Associated protein 4 gene*; kromosom 2q33), gen PTPN22 (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase Non- receptor type 22*, kromosom 1p13) i gen za CD40 (kromosom 20q13.12). U skupinu gena specifičnih za štitnjaču pripadaju gen za tireoglobulin (Tg) (7) i gen za TSHr (14) čiji su produkti glavni ciljevi imunološkog odgovora u AITD.

#### **1.1.1.1. Geni HLA razreda II**

Kompleksna regija glavnog sustava histokompatibilnosti (MHC, engl *Major Histocompatibility Complex*) u kojoj se nalaze geni HLA koji kodiraju molekule HLA, glikoproteine, smještena je na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21) (15). Kromosom 6 je multicentrični kromosom koji čini 6% ljudskog genoma (16). Većina onoga što se danas zna o genetičkim varijacijama i organizaciji haplotipova otkriveno je upravo proučavanjem ove regije (17). Geni HLA pokazuju veliku raznolikost i veći dio ih je zadužen za imunološki odgovor te se povezuju s različitim autoimunim bolestima. Molekula HLA, veže peptidni antigen (autoantigen u slučaju autoimunosti) i prezentira ga T-stanicama te kao i T stanice, određuje je li antigen vlastiti (i ne pokreće imunološki odgovor) ili strani kada pokreće imunološki odgovor (18).

Regija HLA organizirana je u 3 glavna područja u kojima su geni grupirani prema sličnosti svoje strukture kao i strukture svojih produkata u razrede I, II i III (19). U području HLA razreda I nalaze se klasični geni HLA-A, -B i -C koji kodiraju molekule HLA-A, -B i -C, a glavna im je karakteristika velika raznovrsnost alela (19). Osim njih u ovom se području nalaze i neklasični geni HLA razreda I (HLA-E, -F, -G) koji imaju manji stupanj raznolikosti te pseudogeni (HLA-H, -J, -K i -L) čiji proteinski produkti nisu poznati (19,20). Regija HLA

razreda III ili centralna regija, smještena je između regije gena HLA razreda I i II, a sadrži gene koji kodiraju komponente komplekta i još neke druge gene kao npr gen za TNF (engl. *Tumor Necrosis Factor*) (21), te ne sadrži niti jedan gen HLA.

Unutar regije HLA razreda II nalazi se 6 podregija, klasične HLA-DP, -DQ –DR i neklasične HLA-DM i DO. Samo se produkti klasičnih gena ispoljavaju na površini stanica (22).

Podpodručje gena HLA-DP sadrži po dva para gena A i B (DPA1-DPB1 i par DPA2 i DPB2 te gen DPB3) od kojih su geni DPA1 i DPB1 funkcionalni dok su ostali geni ovog podpodručja nefunkcionalni (23).

Podpodručje gena HLA-DQ sadrži funkcionalne gene DQA1 i DQB1 i pseudogene DQA2, DQB2 i DQB3. Jedna od glavnih značajki gena HLA-DQ je jaka neravnoteža udruživanja s genima DR, tako da pojedine populacije i rase karakterizira određen broj uobičajenih, tzv klasičnih haplotipova, s uvijek točno određenim kombinacijama gena DR i DQ (24).

Podpodručje gena HLA-DR posebno je složeno zbog velikog broja usko vezanih gena koji čine stabilne haplotipske skupine. Haplotipska skupina sadrži jedan gen HLA-DRA1 i promjenjiv broj aktivnih gena DRB i pseudogena (25). Upravo različiti geni HLA-DRB čine haplotipove DRB. Tako se na kraju bližem centromeri uvijek nalazi gen HLA-DRB1, na kraju bližem telomeri HLA-DRA1 te pseudogen HLA-DRB9, a između se mogu nalaziti i dodatni aktivni geni HLA-DRB i pseudogeni. Gen HLA-DRA1 pokazuje vrlo mali polimorfizam, dok se geni HLA-DRB1 odlikuju velikom raznolikošću, više od 1000 različitih alela (25).

Molekule koje kodiraju geni HLA polimorfni su glikoproteini u kojima proteinski dio tvore dva različita i odvojena polipeptidna lanca (heterodimeri): teški ili  $\alpha$  lanac i laki ili  $\beta$  lanac (26). Ove molekule se ispoljavaju na površini stanica i u stranoj jedinki predstavljaju antigene te su uzrokom stvaranja specifičnih antitijela HLA.

Geni HLA razreda II kodiraju heterodimere čija oba lanca,  $\alpha$  i  $\beta$ , kodiraju geni smješteni u parovima (DRA1 i DRB1, DQA1 i DQB1, DPA1 i DPB1, DMA1 i DMB1). (22). Geni koji kodiraju lanac  $\alpha$  označavaju se slovom „A“, a oni koji kodiraju lanac  $\beta$  slovom „B“ (26).

Za većinu spomenutih gena poznat je velik broj različitih alela. Učestalost alela pojedinih gena HLA u različitim populacijama pokazala su velike razlike tako da se neki aleli HLA mogu smatrati karakterističnim za određenu populaciju ili etničku skupinu dok su u

drugoj prisutni s vrlo malom učestalošću ili se uopće ne javljaju (npr. u bijeloj rasi ne pojavljuje se gen HLA-B\*42 koji je prisutan u pripadnika crne rase, nadalje genl HLA-A\*43 zastupljen je u visokoj učestalosti u južnoafričkoj populaciji Khoisan, dok je drugdje vrlo rijedak ili ga uopće nema (20).

Usprkos velikom broju mogućih kombinacija poznato je da se neki aleli HLA u haplotipu zajedno javljaju češće nego bi se očekivalo iz njihovih pojedinačnih učestalosti. Ta se pojava naziva neravnotežom udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*). Neravnoteža udruživanja rezultat je niske učestalosti rekombinacija između određenih lokusa i koji su smješteni vrlo blizu na kromosomu te vrlo rijetko dolazi do rekombinacija između njih (27). Tako npr. vrlo jaka veza postoji između alela HLA-DRB1 i HLA-DQB1, HLA -DQA1 i HLA-DQB1. Unutar određenih populacija povezanost određenih alela HLA-DRB1, DQA1 i DQB1 može biti gotovo potpuna što znači da gotovo uvijek dolaze zajedno (27). Tako npr. alel HLA- DRB1\*03:01 koji se nalazi i u populacijama bijele rase i Afrikanaca dolazi uglavnom u kombinaciji s alelima HLA- DQA1\*05:01 i DQB1\*02:01, dok se DRB1\*03:02 koji je prisutan samo u populaciji Afrikanaca veže s alelima DQA1\*04:01 i DQB1\*04:02. Općenito, u skladu s različitim učestalošću alela HLA u različitim populacijama, broj haplotipova HLA u određenim populacijama čini samo mali broj mogućih haplotipskih kombinacija, a određene kombinacije tj. haplotipovi HLA mogu biti karakteristične za određene populacije (27).

### **Povezanost gena HLA razreda II s AITD**

Gen koji kodira molekulu HLA-DR3 (HLA-DRB1\*03) prvi je gen za kojeg je utvrđeno da je povezan s GB (14,28) i primarni je gen rizika za GB (29). Učestalost antigena HLA-DR3 u bolesnika s GB je oko 40-50%, dok je u općoj populaciji oko 15-30% (30). S pojavom GB u bijelaca je u manjoj mjeri povezan i alel HLA-DQA1\*05:01 (29,30). Huber i sur (28) sekvencionirali su gen HLA-DRB1 u populaciji bolesnika s GB i u kontrolnoj skupini i identificirali su *Arginin* na poziciji 74. lanca HLA-DRβ1 (DRβ-Arg-74) kao kritičnu aminokiselinu lanca molekule DR, koja nosi rizik za nastanak GB (29). S druge strane, pokazalo se da aminokiselina *Glutamin* na istoj poziciji smanjuje rizik za nastanak GB (29),

što upućuje na važnost poziciji 74 lanca DR $\beta$ 1 u patogenezi GB.

Ranije studije su pokazale povezanost AT i strume s genom koji kodira molekulu HLA-DR5 (29), te atrofičnog AT s genom koji kodira molekulu HLA-DR3 u bijelaca (31), dok su nedavne studije u bijelaca pokazale slabiju povezanost AT s antigenima HLA-DR3 (32,33) i HLA-DR4 (34).

#### **1.1.1.2. Gen CTLA-4**

Od drugih imunomodulirajućih gena koji nose rizik za AITD, geni CTLA-4 i PTPN22 glavni su inhibitori aktivacije T stanica (35).

Gen CTLA-4 kodira citotoksični limfocit-vezani protein 4 (*engl. Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4*). Uloga gena CTLA-4 je supresija imunološkog odgovora. Neaktivirani T-limfociti ne ekspimiraju CTLA-4, dok s aktivacijom T- limfocita dolazi do ekspresije CTLA-4 koji se veže na receptor antigen-prezentirajućih stanica, onemogućuje aktivaciju T stanica i tako prekida daljnji imunološki odgovor. Razumljivo je stoga da mutacije gena za CTLA-4 mogu predisponirati nastanku autoimunosti. (36,37)

Polimorfizam gena CTLA-4 povezan je s nastankom mnogih autoimunih bolesti uključujući astmu (38), Addisonovu bolest (39), mijasteniju gravis (40), Sjögrenov sindrom (41), sistemski lupus eritematosus (42), sistemnu sklerozu (43) i ulcerozni kolitis (44), a do sada je najjača povezanost dokazana s AITD. Svi oblici AITD, uključujući GB, AT kao i prisutnost tiroidnih antitijela bez kliničkih znakova bolesti povezani su s polimorfizmom gena CTLA-4. Prvi su opisali tu povezanost DeGroot i suradnici (45), a od tada su brojne studije potvrdile njegovu važnost u nastanku AITD (45,46). Povezanost polimorfizma gena CTLA-4 i AITD dokazana je u različitim populacijama i etničkim skupinama (45,47). Određene varijante gena CTLA-4 pokazuju povezanost s povišenim titrom tiroidnih antitijela bez prisustva kliničkih znakova bolesti (28) čime je potvrđena njegova uloga kao općeg imunomodulirajućeg gena. Tri varijante gena CTLA-4 pokazuju najjaču povezanost s AITD: (AT) $n$  mikrosatelit unutar regije 3'UTR gena CTLA-4 (45,47), SNP (*engl. Single Nucleotide*

*Polymorphism*) na poziciji 49 vodećeg peptida CTLA-4 (49AG) (35,48) i SNP (CT60) lociran blizu regije 3'UTR gena CTLA-4.

### **1.1.1.3. Gen PTPN22**

Gen za PTPN22 smješten je na 1p13 kromosomu i kodira limfoidnu protein kinazu koja sudjeluje u prevenciji spontane aktivacije T limfocita (36,49). Varijanta PTPN22 R620W prema nekim je istraživanjima u bijelaca povezana s GB (50-52) i AT (53), no povezanost s AT nije potvrđena u svim studijama (48). Za razliku od gena CTLA-4, gen PTPN22 pokazuje značajne etničke razlike obzirom na povezanost s AITD. Tako Ben i sur. (35) nisu našli povezanost ovog gena s GB u japanskoj populaciji, što je potvrđeno i istraživanjima Mori i sur. (54).

## **1.2. DMT1**

DMT1 autoimuna je bolest koja nastaje u genetski podložnih osoba izloženih okolišnim faktorima koji aktiviraju autoimunu destrukciju  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića gušterače autoreaktivnim T limfocitima, što u konačnici rezultira potpunim nedostatkom inzulina. Uslijed oštećenja  $\beta$ -stanica dolazi do otpuštanja antigena koji do tada nisu bili u kontaktu s imunološkim sustavom i stvaranja autoantitijela. To su prvenstveno antitijela na citoplazmu  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (*Islet Cell Cytoplasmic Autoantibody*, ICA), antitijela na dekarboksilazu glutamičke kiseline (engl. *Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody*; GADA), antitijela na protein 2 tirozin fosfataze (engl. *Thyrosin Phosphatase Islet Autoantibody*; IA-2), inzulinska antitijela (engl. *Insulin AutoAntibody*; IA/A) i antitijela

na cink transporter 8 (engl. *Zinc transporter Slc30A8*; ZnT8).

U više od 95% bijelaca s novootkrivenim DMT1, nađe se barem jedno od ovih autoantitijela. ICA su pozitivna u 70-80% djece s novootkrivenim DMT1 (55), nakon 5 godina trajanja dijabetesa nađu se u oko 25% djece, a nakon 10 godina od početka bolesti u oko 5% djece. Viši titar ICA upućuje na povećan rizik za nastanak DMT1 u osoba koje nemaju dijabetes, tako da je učestalost DMT1 je u prvih srodnika bolesnika s DMT1 slična učestalosti pozitivnih ICA (3-5%) u toj rizičnoj grupi. Prisustvo ovih autoantitijela u zdravih srodnika predskazuje mogućnost nastanka DMT1 (56) i obično se mogu naći mjesecima ili godinama prije pojave kliničkih simptoma bolesti (57,58). Nadalje, u novootkrivenih bolesnika s DMT1 koji imaju viši titar ICA endogena sekrecija C-peptida gubi se ranije (59), a slično je dokazano i u bolesnika s višim titrom GADA (60).

Autoantigen GAD opisan je 1990. godine kao imunoprecipitirajući autoantigen Langerhansovih otočića (61). GAD je inhibitorni neurotransmiter odgovoran za sintezu gamaA/Aminomaslačne kiseline iz glutamata u živčanom sustavu. Primarno je izražen u centralnom i perifernom živčanom sustavu ali se nalazi i u testisima, ovarijima, nadbubrežnoj žlijezdi, štitnjači, otočićima pankreasa i bubrezima (62). Dok je uloga GAD u živčanom tkivu dobro poznata, njegova uloga u Langerhansovim otočićima nije još sasvim jasna.

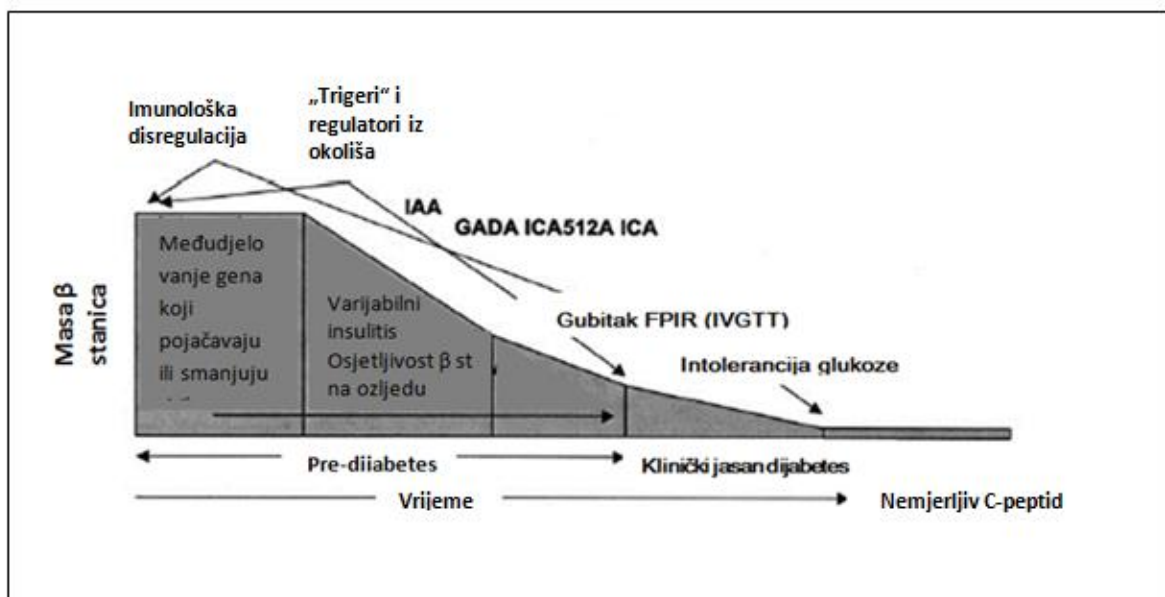
Autoantigen IA-2 je član je porodice tirozin fosfataza plazma-membranskih proteina (36). Osim u Langerhansovim otočićima, IA-2 je nađen i u drugim endokrinim žlijezdama. Kao i za GAD, uloga IA-2 u otočićima nije u potpunosti jasna. U svakom slučaju GAD antitijela prisutna su u 75% (63) a IA-2 antitijela u 50-60% bolesnika s DMT1 u vrijeme postavljanja dijagnoze (64).

Autoantigeni IA/A prisutni su s niskom učestalošću u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 (65,66), a nakon uvođenja inzulinske terapije može ih se zamijeniti za inzulinska antitijela (IA) koja se stvaraju nakon primjene egzogenog inzulina (65,67). S druge strane, različite studije su pokazale da je učestalost pozitivnih IA/A češća i uz više razine titrova u mlađe djece (68) i bolesnika u kojih je nađen antigen HLA-DR4 (69,70,71), te se nalaze gotovo u sve djece s DMT1 u koje je nađen pozitivan titar više autoantitijela (72-74). Prema sadašnjim saznanjima, učestalost pozitivnih IA/A u vrijeme postavljanja dijagnoze značajno varira u različitim studijama ovisno o korištenoj metodi analize, dobi u vrijeme postavljanja



dijagnoze i ispitivanoj populaciji (65).

Autoantigen ZnT8 najkasnije je otkriven. Član je velike porodice proteina koji imaju funkciju prijenosa kationa, od kojih je najmanje 7 prisutno u beta stanicama gušterače (65,75). Autoantitijela na ZnT8 nedavno su otkrivena u bolesnika s novootkrivenim DMT1 (65,76-78). Osim u bolesnika s DMT1, autoantigen ZnT8 može se naći i u bolesnika s drugim autoimunim bolestima, te u bolesnika s DMT1 u kojih nisu nađena druga autoantitijela na beta stanice gušterače (65,76)

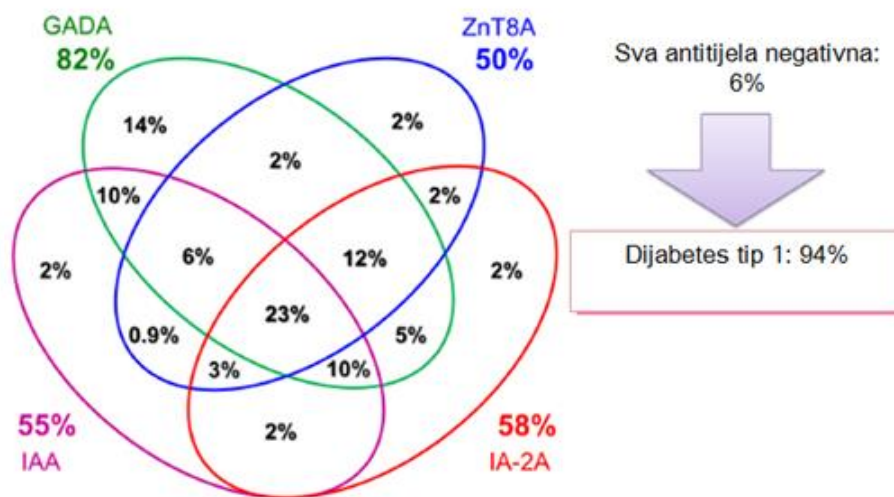


Slika 1.2.1. Tijek bolesti DMT1 (Izvor: *American Diabetes Association, ADA 2005*)

Broj pozitivnih antitijela i njihovi titrovi neovisni su prediktori rizika za DMT1. Petogodišnji rizik za nastanak DMT1 u osoba s pozitivnim ICA s titrom većim od 40 jedinica (Juvenile Diabetes Foundation Units) je oko 60-70% (79). Osim toga, rizik za nastanak DMT1 u djece mlađe od 5 godina s pozitivnim ICA je gotovo 90%, dok je u osobe u dobi od 40 godina taj rizik znatno manji, oko 30%. U Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study petogodišnji rizik za razvoj DMT1 u osoba sa samo jednim pozitivnim autoantitijelom bio je

20%- 25%, u osoba s dva pozitivna autoantitijela 50%-60%, u onih s tri pozitivna autoantitijela 70% i gotovo 80% u onih s četiri (80). Studije rađene među blizancima i u osoba s obiteljskom anamnezom pozitivnom na DMT1 pokazale su da rizik razvoja dijabetesa unutar 5 godina (knjiga – autoimunost pogl 1,) raste od manje od 5% u osoba koje nemaju pozitivne antigene na više od 90% u osoba u kojih su pozitivna antitijela na inzulin, GAD i IA-2 (65,72).

Osim dokaza njihove prisutnosti, u predikciji razvoja DMT1 važna je i visina titra autoantitijela (81). Nadalje, rizik za nastanak DMT1 u osoba s pozitivnim titrom većeg broja autoantitijela značajno je viši uz prisustvo visokorizičnog genotipa, tako da u osoba koje su nosioci HLA DR3/4 antigena iznosi 67% nasuprot 20% u osoba koje su HLA DR3/4 negativne (82).



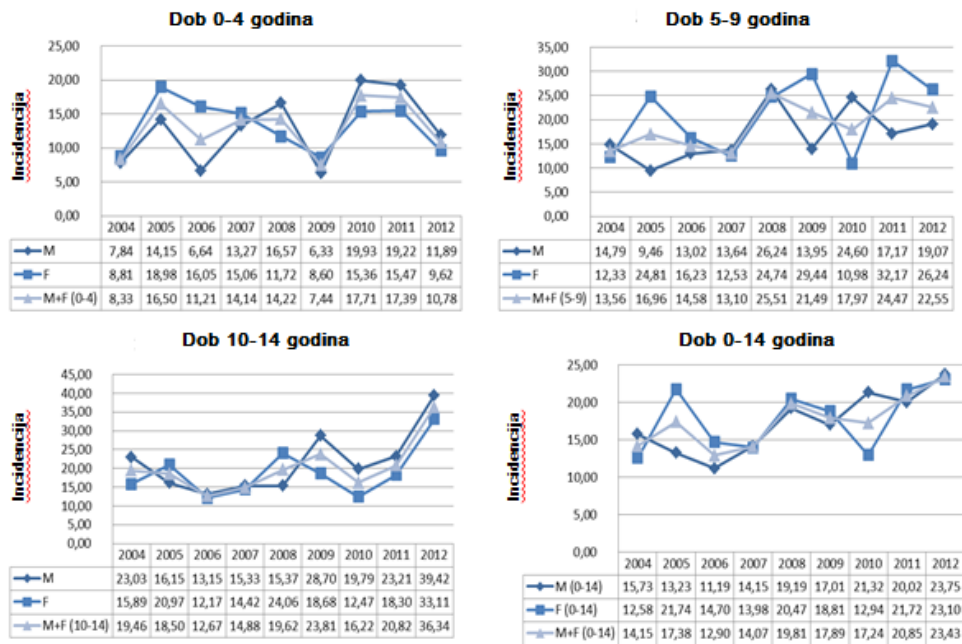
Slika 1.2.2. Analiza zajedničke pojavnosti antitijela protiv elemenata  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića u japanskoj populaciji bolesnika s DMT1 u vrijeme postavljanja dijagnoze bolesti. GADA – GAD antitijela, IA/A – antitijela na inzulin, ZnT8A – antitijela na cink transporter, IA-2 - IA2 antitijela; Type 1 diabetes – DMT1 (izvor: Kawasaki E. Type 1 diabetes and autoimmunity. Clin Pediatr Endocrinol 2014; 23(4), 99–105) (83)

Autoimunu etiologiju DMT1 potvrđuje i povezanost DMT1 s drugim autoimunim

bolestima (posebno AT i atrofičnim gastritisom) i povećanom učestalošću određenih gena lokusa HLA-DR i HLA-DQ (84). No, za razliku od drugih autoimunih bolesti, DMT1 se s jednakom učestalošću javlja u dječaka i djevojčica i češći je u djetinjstvu nego u odrasloj dobi.

Incidencija DMT1 među djecom i adolescentima značajno je porasla tijekom posljednjih 50 godina u cijelom svijetu uz istovremeno smanjenje srednje životne dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze (85-87). Ovaj trend ukazuje na važnu ulogu vanjskih faktora odgovornih za DMT1 obzirom da se samo genetičkim faktorima ne može objasniti tako brzi porast incidencije (88). Epidemiološke studije o incidenciji DMT1 u svijetu pokazale su različitu učestalost DMT1 u različitim zemljama (85,88-90) od 0,1/100 000/ godišnje u Kini i Venezueli (89,90) do 64/100 000/godišnje u Finskoj (91,92) uz srednji godišnji porast incidencije od 5,3% u Sjevernoj Americi, 4,0% u Aziji i 3-4% u Europi, dok se u Centralnoj Americi i zemljama zapadnog dijela Indijskog oceana uočava negativni trend od -3,6% (91,93,94).

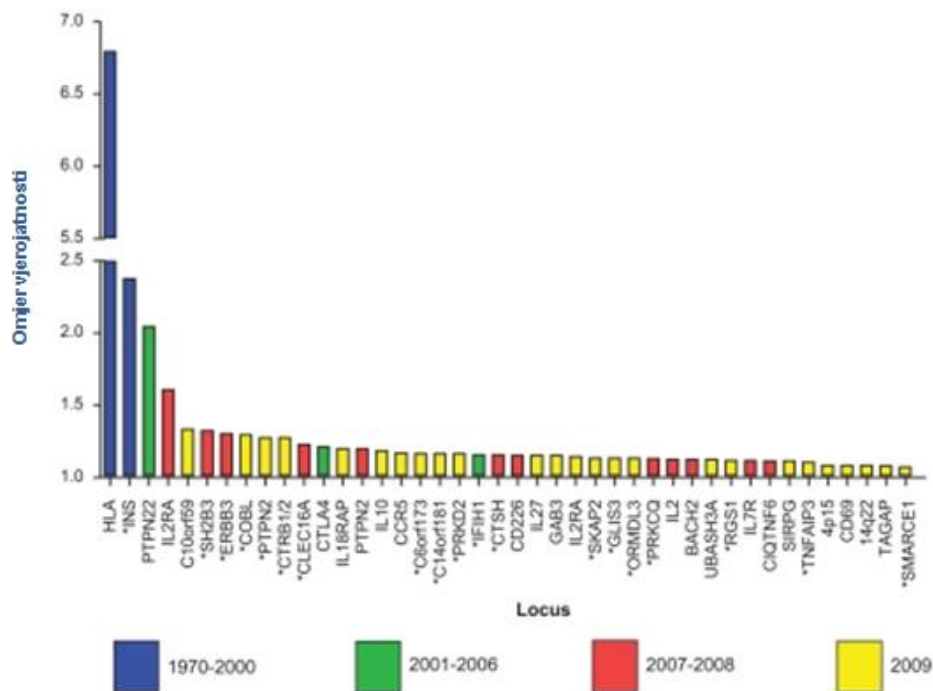
Incidencija DMT1 u djece i adolescenata u Hrvatskoj također je u porastu. U razdoblju od 1995. do 2003. godine iznosila je 8,87 djece i adolescenata mlađih od 15 godina godišnje na 100,000 djece iste dobi (95) s godišnjim porastom incidencije od 9%. U slijedećem je razdoblju od 2004 do 2012 godine iznosila 17,23 djece i adolescenata godišnje na 100,000 djece iste dobi (96) s godišnjim porastom incidencije od 5,87% koji je nešto viši od srednjeg europskog prosjeka (3-4%) (91-94).



Slika 1.2.2. Raspodjela incidencije DMT1 na 100.000 stanovnika godišnje prema dobnim skupinama (Izvor: Rojnic Putarek N i sur. Incidence of type 1 diabetes mellitus in 0 to 14-yr-old children in Croatia – 2004 to 2012 study. *Pediatric Diabetes* 2014) (96)

### 1.2.1. Genetska etiologija DMT1

Do sada je poznato više od 18 genskih lokusa povezanih s nastankom DMT1, no samo su 4 gena/lokusa pokazala funkcionalni učinak koji vodi predispoziciji odnosno prevenciji nastanka bolesti. Najznačajniji među njima nalazi se u regiji HLA. Ostali uključuju druga dva imunoregulacijska gena, *CTLA-4* i *PTPN22* te polimorfizam tkivno specifičnog gena koji ovisi o varijabilnom broju ponavljajućih sekvenci u genu za inzulin (engl. *Variable Number of Tandem Repeats*, *INS-VNTR*) (28).



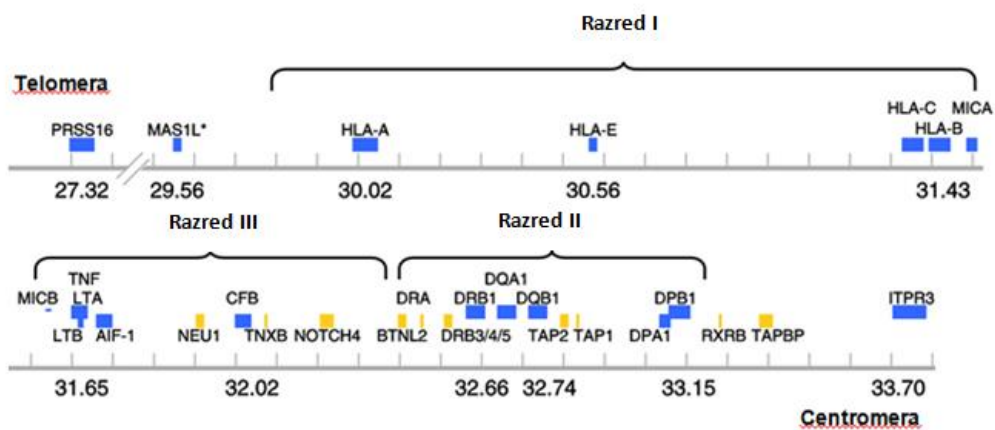
Slika 1.2.1.1. Geni za koje je prema GWA studijama (engl. *Genome-Wide Association studies*) dokazana povezanost s nastankom DMT1. Većina do sada nađenih povezanosti je slaba Bojama su prikazane godine kada je povezanost s određenim genima nađena. (Izvor: Pociot F i sur. *Genetics of Type 1 Diabetes: What's next?* *Diabetes* 2010; 59:1561-71.) (97)

### 1.2.1.1. Geni HLA razreda II

Geni HLA, prvenstveno razreda II, i to oni koji kodiraju molekule HLA-DR i HLA-DQ u ljudi određuju ukupan rizik nastanka DMT1 (nose 40-50% rizika za nastanak DMT1) (90-101), iako se bolest razvije samo u manjeg broja osoba koje nose visoko rizične haplotipove. U bijelaca je DMT1 prvenstveno povezan s antigenom HLA-DQ2 (haplotip DQB1\*02:01-DQA1\*05:01) koji dolazi u kombinaciji s genom DRB1\*03 i antigenom HLA-DQ8 (haplotip DQB1\*03:02-DQA1\*03:01) koji dolazi u kombinaciji s genom DRB1\*04

(102,103). U oko 95% osoba s DMT1 dokazani su antigeni HLA-DR3 ili HLA-DR4. Oko 40% bolesnika su složeni heterozigoti za antigene HLA-DR3/DR4 dok se u općoj populaciji taj haplotip nalazi u oko 3% populacije. Rizik za nastanak bolesti u osoba iz opće populacije s ovim haplotipom je 7%. Visoki rizik za nastanak bolesti imaju i osobe koje su homozigoti za HLA-DR4 (5%), a slijede ga homozigoti HLA-DR3 (2,2%) i složeni heterozigoti za antigen HLA-DR4 i drugi antigen koji ne uključuje HLA-DR3 ili -DR4 (1,7%). I neki drugi geni HLA također su povezani s DMT1, no rizik koji nose manji je nego za gene HLA razreda II.

Osim rizičnih haplotipova identificirani su i protektivni haplotipovi kao što je HLA-DRB1\*15:01- DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 (104,105). Incidencija DMT1 različita je u pojedinim zemljama što je dijelom uzrokovano razlikama u okolišnim faktorima, a dijelom različitom raspodjelom haplotipova DR-DQ u različitim populacijama (104). Tako npr. odsustvo haplotipova koji kodiraju antigen HLA-DR3 u japanskoj populaciji vjerojatno doprinosi sveukupno manjoj učestalosti bolesti iako je u toj etničkoj skupini rizik za nastanak DMT1 vezan uz druge haplotipove HLA-DR4 i HLA-DR9 (106). S druge strane, među bijelcima s DMT1 nije uočena povezanost s haplotipovima HLA-DR9 jer je njihova učestalost u populacijama bijele rase općenito niska (106).



Slika 1.2.1.1.1. Shematski prikaz regije HLA koji prikazuje gene povezane s DMT1. (Izvor: Noble JA<sup>1</sup>, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. Curr Diab Rep. 2011;11:533-42.) (107)

Raspodjela gena HLA razreda II razlikuje se i ovisno o životnoj dobi kada se bolest javlja, i čini se da je utjecaj gena HLA na pojavu DMT1 izraženiji u bolesnika s ranijim nastupom bolesti, te se smatra da okolišni utjecaji imaju veću ulogu u nastanku bolesti u odrasloj dobi (108,109).

U nas su Žunec i sur. ispitivali (110) učestalost gena HLA razreda II (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPB1) među bolesnicima s DMT1, celijakijom i reumatoidnim artritisom u svrhu ispitivanja njihove povezanosti, odnosno uloge u nastanku navedenih bolesti. Podložnost za DMT1 uočena je za genotipove DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 / DRB1\*04:01-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02 (RR=37,08) i DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 / DRB1\*16:01-DQA1\*01:02-DQB1\*05:02 (RR=14,04), kao i heterodimerima DQ( $\alpha$ 1\*Arg52+, $\beta$ 1\*Asp57-) u *cis* položaju (RR=20,4). Genotipovi koji nemaju heterodimer DQ( $\alpha$ 1\*Arg52+, $\beta$ 1\*Asp57-), ili je on u *trans* položaju, imali su zaštitnu ulogu u nastanku DMT1 (RR=0,05) (110).

#### **1.2.1.2. Gen za inzulin**

Prvi gen izvan regije HLA za koji je nađena povezanost s DMT1 bio je gen za inzulin (INS) smješten na kromosomu 11p5. Radi se o polimorfnoj regiji koja sadrži VNTR unutar regulacijske regije gena INS smještene u blizini sekvence DNA koja regulira ekspresiju INS. Aleli ovog lokusa mogu se podijeliti u tri razreda: aleli razreda I (duljina oko 570 bp), aleli razreda II (duljina oko 1640 bp) i aleli razreda III (duljina oko 2700 bp). Homozigotnost za alel razreda I doprinosi 2 do 5 puta većem riziku za DMT1, dok su aleli razreda III protektivni (99).

### 1.2.1.3. Gen CTLA-4

Polimorfizmi gena CTLA-4 povezani su s različitim autoimunim bolestima, no studije o povezanosti s DMT1 se razlikuju (46). Neke opisuju povezanost DMT1 s različitim varijantama gena CTLA-4 (38) dok druge ne pokazuju tu povezanost (102). Kao i u drugim autoimunim bolestima i u DMT1 najjaču povezanost su pokazala tri već spomenuta polimorfizma: (AT)<sub>n</sub> mikrosatelit unutar regije 3'UTR gena CTLA-4, CTLA-4 SNP 49AG i CTLA-4 SNP CT60, koja su i najčešće ispitivani. Dvije velike meta-analize studija koje su ispitivale utjecaj polimorfizma gena CTLA-4 za DMT1 pokazale su da je alel G polimorfizma 49AG gena CTLA-4 povezan s nastankom DMT1 (111,112). Kavvoura i sur. (111) proveli su meta-analizu 33 studije koje su ispitivale povezanost DMT1 s polimorfizmima gena CTLA-4. Neke od tih studija analizirale su povezanost DMT1 s jednim polimorfizmom gena CTLA4, dok su druge analizirale povezanost DMT1 s dva ili sva tri najrizičnija polimorfizma gena CTLA-4. Tako je u 29 studija ispitivana povezanost DMT1 s polimorfizmom 49AG, u tri s polimorfizmom CT60 i u šest s polimorfizmom (AT)<sub>n</sub> mikrosatelita i to na ukupno 5.637 bolesnika s DMT1 i 6.759 ispitanika u kontrolnim skupinama. Nađena je statistički značajna povezanost alela G polimorfizma 49AG s nastankom DMT1 ( $p < 0.001$ ; OR je iznosio 1,45; 95% CI 1,28-1,61) te je jača povezanost nađena u bolesnika u kojih je DMT1 dijagnosticiran u mlađoj životnoj dobi (<20 godine života); OR 1,61. Nije nađena značajna povezanost DMT1 s 106 pb (AT)<sub>n</sub> mikrosatelita kao ni s alelom G polimorfizma CT60 (111).

U studiji Huber i sur. povezanost polimorfizma CT60 gena CTLA-4 s nastankom DMT1 nađena samo u onih bolesnika s DMT1 koji su imali i AITD (28), što je potvrđeno i u studiji rađenoj u japanskoj populaciji (113).

Wang i sur. (112) analizirali su 58 studija koje su ispitivale povezanost različitih polimorfizama gena CTLA-4 (49AG i CT60) i rizika za nastanak DMT1 te su ustanovili da postoji značajna povezanost alela G u oba ova polimorfizama s nastankom DMT1.



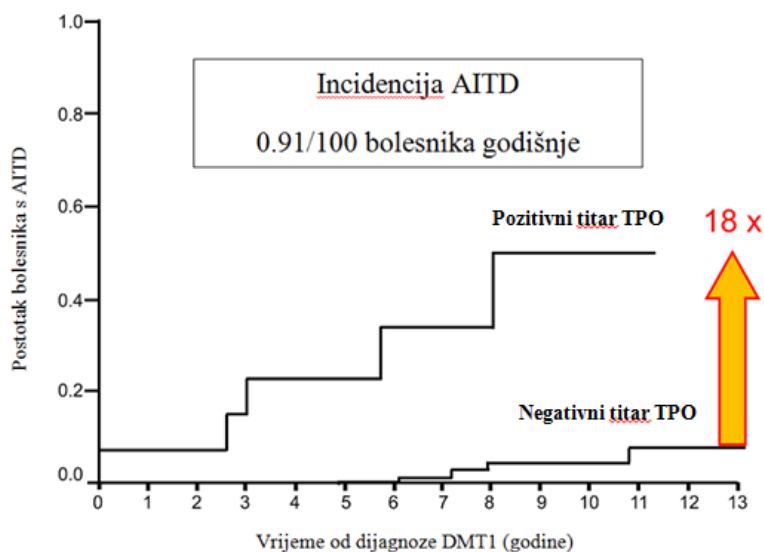
#### **1.2.1.4. Gen PTPN22**

Limfoidna tirozin fosfataza kodirana genom PTPN22 snažan je inhibitor T staničnog signalnog puta (103). Kodirajuća SNP u nukleotidu 1858 PTPN22 gena koja uzrokuje zamjenu arginina za triptofan na poziciji 620 (R620W) pokazala je značajnu povezanost s DMT1, i to je nakon gena HLA i INS najznačajniji gen koji predisponira nastanku DMT1 (114-116). Povezanost polimorfizma R620W gena PTPN22 s razvojem DMT1 dokazali su Bottini i sur. (114) u dvije skupine bolesnika iz Sardinije i SAD-a, a nakon toga Smyth i sur. (50) našli su tu povezanost u 1599 bolesnika s DMT1 iz Velike Britanije te potvrdili u dodatnoj analizi 1388 obitelji čiji su članovi imali DMT1 a koje su porijeklom bile iz Velike Britanije, SAD-a i Rumunjske. U dvije studije nađena je spolna predispozicija za povezanost gena PTPN22 i DMT1, naime pokazalo se da je polimorfizam R620W povezan s DMT1 samo u žena, dok u muškaraca ta povezanost nije dokazana (115,117). Dvije studije rađene u Španjolskoj (116) i Danskoj (118) ukazuju na povezanost varijante R620W gena PTPN22 ne samo s ženskim spolom već i s mlađom dobi pojave DMT1.

Korolija i sur (119) pokazali su značajnu povezanost polimorfizma R620W gena PTPN22 s DMT1 u Hrvatskoj, dok povezanost s polimorfizmom 49AG gena CTLA-4 nije bila statistički značajna.

### **1.3. Povezanost AITD i DMT1 (APSv3)**

Odavno je poznato i u različitim populacijama potvrđeno češće zajedničko pojavljivanje DMT1 i AITD u iste osobe i unutar iste obitelji i ta se povezanost klasificira kao varijanta autoimunog poliglandularnog sindroma tip 3 (engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 Variant*; APS3v). Pokazalo se da su antitiroidna antitijela prisutna u oko 8%-44% bolesnika s DMT1, a 50% tih bolesnika razvije klinički oblik AITD (28,36).



Slika 1.3.1. Rizik za nastanak AITD u djece s DMT1.

TPO – antitijela na tiroidnu peroksidazu. (Izvor: American Diabetes Association from Glastras SJ, *i sur.*: The role of autoimmunity at diagnosis of type 1 diabetes in the development of thyroid and celiac disease and microvascular complications. *Diabetes Care* 2005; 28(9): 2170-2175.) (120)

Zanimljivo je kako je vrlo malo studija u kojima je u bolesnika s AITD ispitivana učestalost autoantitijela protiv stanica Langerhansovih otočića. U studiji Bright *i sur.* (121) od 438 ispitanika (117 u kontrolnoj skupini, 88 bolesnika s AITD, 201 bolesnik s DMT1, 24 bolesnica s Turnerovim sindromom i 8 bolesnika s Addisonovom bolešću), 2,3% bolesnika s AITD imalo je pozitivna ICA antitijela u odnosu na 0% u kontrolnih ispitanika.

U studiji Moriguchi *i sur.* provedenoj u Japanu iz 2010. godine (122), u koju je bilo uključeno 866 bolesnika s AITD (od toga 546 s GB i 320 s AT) i 282 zdravih ispitanika, pozitivna GADA češće su i u višem titru nađena u bolesnika s AITD (5,8%) u odnosu na ispitanike iz kontrolne skupine (2,1%). Međutim, kada je gledano odvojeno onda su pozitivna GADA nađena značajno češće u bolesnika s GB nego u kontrolnih ispitanika (7,1% vs 2,1%) kao što je dokazano u ranijim studijama (123,124), dok su u bolesnika s AT pozitivna GADA nađena češće, no ne značajno u odnosu na kontrolnu skupinu (3,4% vs 2,1%).

S druge strane Kawasaki i sur su (125) našli su veću učestalost pozitivnih GADA u bolesnika s AT nego u bolesnika s GB (7,9% vs 6,1%). Zanimljivo je kako ni jedan od njihovih bolesnika s pozitivnim GADA nije imao pozitivna ICA niti IA-2 antitijela, te su pretpostavili da u bolesnika s AITD autoimuni odgovor na GAD može nastati i neovisno o stvaranju drugih antitijela na beta stanice.

U studiji Yamaguchi i sur. (126) koja je provedena također u japanskoj populaciji nađena je značajno veća učestalost ICA u populaciji bolesnika s AITD (7,6%; 24/316) nego u zdravih kontrola (0,7%; 1/144). Osim toga većina ICA pozitivnih bolesnika s AITD imali su DMT1 (20 od 24 ICA pozitivnih bolesnika, 83%). Također su pokazali da su pozitivna ICA u bolesnika s AITD jednako česta u japanskoj populaciji kao u bijelaca, iako je incidencija DMT1 u toj populaciji samo 1/5 do 1/3 od one u bijelaca.

U studiji Mariguchi i sur. analiza gena HLA u bolesnika s AITD i pozitivnim GADA pokazala je veću učestalost haplotipova za koje je poznato da predisponiraju tipu 1 dijabetesa u Japanaca (DRB1\*04:05-DQB1\*04:01) i nisku učestalost haplotipova za koje je poznato da imaju protektivni učinak na nastanak DMT1 (122). Polimorfizam CTLA-4 gena (rs3087243) u ispitivanoj grupi bolesnika bio je povezan s AITD ali ne i s pozitivnim GADA.

U jednoj od rijetkih studija rađenih u populaciji bijelaca u ranoj fazi GB u Europi klinički manifestan dijabetes je imalo 1,7% bolesnika (123). Pozitivan titar ICA nađen je u 4,9% bolesnika s GB bez znakova dijabetesa što je značajno više nego u općoj populaciji i odgovara prevalenciji ICA u prvih srodnika bolesnika s DMT1 (127). Prevalencija GADA u bolesnika s GB iz ove studije (10,6%) bila je viša nego u kontrolnoj skupini (1,3%) i prvih srodnika bolesnika s DMT1 (4,2%) (123). Povećana učestalost GADA, ali ne i ICA, dokazana je u bolesnika s AITD i u ranijim istraživanjima, no nije nađena povezanost između ta dva markera (125,128). Tako je švedska studija Hallengrena i sur. iz 1996. godine (86) pokazala veću učestalost GADA (11/85 ispitanika, 13%), dok pozitivna ICA nisu bila statistički značajno češća u bolesnika s GB (2/92 ispitanika, 2,2%) nego u zdravoj kontrolnoj skupini (0/37 ispitanika, 0%). Druga švedska studija iz 2002. godine, Lethagena i sur. (129), rađena je sa ciljem ispitivanja jesu li pozitivna GADA povezana sa subkliničkim oštećenjem beta stanica i poremećenom sekrecijom inzulina u bolesnika s AT. Pozitivna GADA nađena su u 3,4% bolesnika. U tih je bolesnika potom mjerena razina inzulina, C peptida te odgovor glukagona na stimulaciju glukozom i argininom. Kako je u bolesnika s pozitivnim GADA

nađena smanjena sposobnost sekrecije inzulina, zaključeno je da bi pozitivna GADA mogla biti marker subkliničkog insulitisa (129) u bolesnika s AT.

### ***1.3.1. Genetska etiologija APS3v***

Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazali su na nedvojbenu važnost genetičkog utjecaja na zajedničko pojavljivanje AITD i DMT1 unutar APS3v i identificirali najmanje 3 gena koji se češće nađu u bolesnika s ovim sindromom. To su geni HLA razreda II, gen CTLA-4 i gen PTPN22. Svi do sada identificirani geni uključujući i ova tri, reguliraju imunološki odgovor, posebno prezentaciju antigena T stanicama.

#### ***1.3.1.1. Gen CTLA-4***

Povezanost polimorfizama gena CTLA-4 s APS3v (28) dokazana je u većini dosadašnjih istraživanja. U studiji Kemp i sur. (130) polimorfizam gena CTLA-4 bio je najjače povezan s podskupinom bolesnika koji su imali vitiligo i AITD ili DMT1. U japanskoj studiji Takara i sur. (131) dokazana je povezanost G alela polimorfizma 49AG gena CTLA-4 s DMT1 u mlađih bolesnika s AITD. Howson i sur. (132) ispitivali su polimorfizam gena CTLA-4 u velikoj skupini od više od 4000 bolesnika s DMT1 koju su podijelili na podskupinu s pozitivnim titrom TPO antitijela (APS3v) i podskupinu s negativnim titrom TPO antitijela. Polimorfizam gena CTLA-4 bio je povezan samo sa podskupinom bolesnika s APS3v. Ikegami i sur (113) našli su povezanost polimorfizma 49AG gena CTLA-4 samo sa skupinom bolesnika s APS3v, a ne i sa skupinom bolesnika s DMT1 bez AITD. Ovi podaci sveukupno upućuju na ulogu gena CTLA-4 u zajedničkoj pojavi DMT1 i AITD ali ne i za izolirani nastanak DMT1.

### **1.3.1.2. Gen PTPN22**

Pokazalo se da u populaciji bijelaca gen PTPN22 igra značajnu ulogu u sklonosti različitim organ specifičnim autoimunim bolestima. Rijetke su studije u kojima je ispitivana uloga gen PTPN2 u bolesnika s DMT1 i AITD. Saccucci i sur (133) u talijanskoj su populaciji bolesnika s DMT1 pokazali povezanost s varijantom R620W gena PTPN22. Osim povezanosti s DMT1 ispitivali su i povezanost R620W varijante PTPN22 gena s drugim autoimunim bolestima te su našli povezanost s AT, ali ne i sa celijakijom (133). Povezanost polimorfizma gena PTPN22 s DMT1 i GB, kao i obiteljske studije koje su ispitivale važnost gena PTPN22 u obiteljima s multiplim autoimunim bolestima (49-53) ukazuju na njegovu važnost u zajedničkoj podložnosti za DMT1 i AITD.

### **1.3.1.3. Geni HLA razreda II**

Većina studija pokazala je jak utjecaj gena HLA razreda II na pojavu APS3v u iste osobe ili unutar obitelji u različitim etničkim grupama uključujući bijelce (134-136), Japanace (137), Koreanace (138) i Kineze (139). Povezanost s genima HLA jača je u bolesnika s obje bolesti, nego u onih s izoliranim AITD (95). Dokazano je da haplotipove HLA-DR3-DQB1\*02:01 i DR4-DQB1\*03:02 češće nasljeđuju potomci koji imaju DMT1 ili DMT1 i AITD, dok potomci koji imaju samo AITD češće nasljeđuju samo haplotip DR3-DQB1\*02:01. To upućuje na povezanost haplotipa HLA-DR3-DQB1\*02:01 s istovremenom pojavom obje bolesti, dok je haplotip HLA-DR4-DQB1\*03:02 specifičan za DMT1 (140). Populacijske studije rađene s istim ciljem također su pokazale da bolesnici koji nose kombinaciju HLA-DR3/DR4 češće imaju pozitivna tiroidna antitijela u odnosu na bolesnike koji su nosili druge antigene HLA-DR (DR3/DR<sub>x</sub>, DR4/DR<sub>X</sub> i DR<sub>X</sub>/DR<sub>X</sub> pri čemu X nije niti antigen HLA-DR3, ni antigen HLA-DR4) što upućuje na povezanost kako HLA-DR3 tako i HLA-DR4 s tiroidnom autoimunošću u bolesnika s DMT1 (140).

U samo tri relativno stare studije u ispitana je učestalost antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih (ICA, IA/A, GAD i IA-2) otočića u bolesnika s AITD u bijelaca (123, 128, 129) no niti jedna od tih studija nije ispitivala povezanost s do sada poznatim rizičnim genima

za nastanak DMT1.

Točan mehanizam povezanosti AITD i DMT1 još nije u potpunosti jasan, no sve je više dokaza da odlučujuću ulogu imaju genetički faktori. Jedna od spoznaja do kojih se došlo istraživanjem genetičkih utjecaja na zajedničko javljanje kompleksnih bolesti ukazuje na važnost analize "slabije" podložnih gena u podskupinama bolesnika (kao što je APS3v). Naime pokazano je da geni koji „slabo“ predisponiraju širem fenotipu (npr AITD ili DMT1) mogu imati značajan učinak u određenim podskupinama (kao što je pokazano na primjeru gena CTLA-4 koji je važan u zajedničkoj pojavi DMT1 i AITD dok mu je doprinos u izoliranom nastanku DMT1 bitno manji) (28). Neki preliminarni rezultati istraživanja ukazuju na to da i unutar podskupina bolesnika s AITD i DMT1 (tj. APSv3) postoji dodatna podskupina (pr. mlađi bolesnici, žene, viši titar antitroidnih antitijela i dr) na koje je genetički utjecaj značajniji (28). Također, s dovršavanjem projekata humane gentike uključujući i projekt HapMap (141), vjerojatno će se identificirati još neki geni i njihovi polimorfizmi koji će pokazati povezanost s nastankom DMT1 i/ili AITD te će biti potrebne dodatne studije da bi se utvrdila njihova eventualna uloga u etiologiji ovih kompleksnih bolesti (28).

## **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

### **2.1. HIPOTEZA**

Bolesnici s AITD koji imaju pozitivna ICA, GAD ili IA-2 antitijela razviti će DMT1. Polimorfizam gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 povezan s nastankom DMT1 češće ćemo naći u bolesnika s AITD mlađe dobi, ženskog spola i s višim titrom antitijela na beta stanice Langerhansovih otočića.

### **2.2. CILJEVI RADA**

#### **2.2.1. OPĆI CILJ**

U populaciji bolesnika s AITD podijeljenih u dvije grupe (bolesnici s AT i bolesnici s GB) ispitati povezanost humoralnih markera autoimunosti na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića pankreasa te polimorfizma gena HLA razreda II (HLA-DRB1 i HLA-DQB1), CTLA-4 i PTPN22 s nastankom DMT1.

#### **2.2.2. SPECIFIČNI CILJEVI**

(1) Ispitati učestalost pozitivnih antitijela protiv beta stanica otočića (ICA, GAD; IA-2) u

bolesnika s AITD te usporediti kliničke i genetske karakteristike podskupine bolesnika s pozitivnim antitijelima na stanice otočica u odnosu na one s negativnim

- (2) Odrediti gene HLA razreda II u sve četiri skupine bolesnika (DMT1, AITD, AITD i pozitivnim antitijelima na stanice otočica, te AITD i DMT1) i u kontrolnoj skupini. Odrediti koji je od gena HLA razreda II (HLA-DRB1 i HLA-DQB1) najjače povezan s pozitivnim antitijelima na stanice otočica u populaciji bolesnika s AITD, odnosno koji su geni HLA rizični, a koji protektivni za nastanak DMT1 u bolesnika s AITD. Bolesnici s AITD biti će podijeljeni u dvije podskupine, bolesnici s AT i bolesnici s GB.
- (3) Ispitati učestalost polimorfizma gena CTLA-4 u sve četiri skupine bolesnika (DMT1, AITD, AITD i pozitivnim antitijelima na stanice otočica, te AITD i DMT1) i u kontrolnoj skupini. Ispitati povezanost polimorfizma gena CTLA-4 s nastankom DMT1 u populaciji bolesnika s AITD koji su podijeljeni u dvije podskupine, bolesnici s AT i bolesnici s GB.
- (4) Ispitati učestalost polimorfizma gena PTPN22 u sve četiri skupine bolesnika (s AITD, AITD i DMT1, DMT1, te s AITD i pozitivnim antitijelima na stanice otočica) i u kontrolnoj skupini. Odrediti povezanost polimorfizma gena PTPN22 s nastankom DMT1 u populaciji bolesnika s AITD koji su podijeljeni u dvije podskupine, bolesnici s AT i bolesnici s GB.
- (5) Procijeniti postoji li povezanost rizičnih gena HLA razreda II i polimorfizma gena CTLA-4 i PTPN22 u sve četiri grupe bolesnika s životnom dobi u vrijeme pojave simptoma bolesti
- (6) Ispitati da li postoji povezanost visine titra TPO i Tg antitijela sa životnom dobi, te koja se od njih ranije javljaju
- (7) Ispitati koja su od antitiroidnih antitijela (TPO ili hTgAt) češće povezana s pojavom autoantitijela na stanice otočica te postoji li povezanost visine titra TPO i Tg antitijela



s pojavom autoimunosti na stanice Langerhanstovih otočića gušterače

- (8) Obzirom na poznatu veću incidenciju AITD u osoba ženskog spola, uz jednaku učestalost DMT1 u dječaka i djevojčica, ispitati razlikuje li se učestalost pozitivnih antitijela na stanice otočića u bolesnika s AITD po spolu (posebno u grupi bolesnika s AT odnosno GB)
- (9) U svih članova uže obitelji bolesnika s AITD (roditelji, braća i sestre) u kojih su dokazana pozitivna antitijela na beta stanice Langerhansovih otočića ispitati učestalost pozitivnih antitijela na beta stanice pankreasa, polimorfizam gena HLA razreda II, te polimorfizam gena CTLA-4 i PTPN22

## **3. ISPITANICI I METODE**

### **3.1. PLAN ISTRAŽIVANJA**

1. faza - sastanak sa svakim ispitanikom:

- Punoljetni ispitanici, odnosno roditelji ili staratelji malodobnih ispitanika upućeni su u pojedinosti istraživanja i potpisali su informirani pristanak.
- Intervju, klinički pregled
- Uzimanje uzoraka krvi (5 ml venske krvi za određivanje autoantitijela, te 5 ml venske krvi u epruvetu s antikoagulansom EDTA za potrebe izolacije DNA i određivanja gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22).

2. faza:

- Provođenje testova za određivanje autoantigena
- Određivanje polimorfizma gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22

3. faza:

- Obrada i statistička analiza rezultata.

### **3.2. ISPITANICI**

U ovu prospektivnu studiju uključeno je 417 ispitanika dobi od 1,1 do 25,8 godina oba spola (158 bolesnika s AITD, 165 bolesnika s DMT1 od kojih 94 bolesnika s DMT1 bez AITD i 71 bolesnika s DMT1 i AITD te 94 zdravi ispitanik odgovarajuće dobi i spola), iz različitih dijelova RH, liječenih u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju

KBC Zagreb u razdoblju od 1. lipnja 2012 godine do 31. lipnja 2014 godine koji su zadovoljili ulazne kriterije i potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju, te 18 članova uže obitelji bolesnika s AITD (roditelji, braća i sestre) s pozitivnim ICA, GADA ili IA-2.

Tablica 3.2.1. Karakteristike ispitanika uključenih u studiju

f	Broj bolesnika (N)	Dob kod dijagnoze – srednja dob (raspon)	Spol	
			M	Ž
DMT1 ukupno	165	8,35 (1,12-19,36)	68	97
DMT1	94	8,76 (1,45-16,72)	48	46
APS3v	71	7,83 (1,12-19,36)	20	51
AITD	158	12,49 (4,17-25,87)	36	122
AT	127	11,75 (4,17-19,04)	29	98
GB	31	15,43 (6,50-25,87)	7	24
Kontrolna skupina	94	11,99 (4,65-21,46)	46	48

M – muškarci; Ž – žene; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis; GB – Gravesova bolest

Kontrolnu skupinu su činili zdravi ispitanici odgovarajuće dobi i spola, iz različitih dijelova RH, primljeni u Kliniku zbog interkurentnog infekta, a u kojih su isključene kronične bolesti i imali su negativne titrove TPO, Tg, ICA, GAD i IA-2 antitijela.

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Kliničke metode:

Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kišpatićeva 12,

Zagreb, u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Određivanje ICA, GAD i IA-2 antitijela provedeno je u Endokrinološkom laboratoriju Kliničke bolnice Merkur

Određivanje gena HLA provedeno je u Zavodu za tipizaciju tkiva, Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Određivanje polimorfizma gena CTLA-4 i PTPN22 provedeno je u Zavodu za fiziologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Dijagnoza GB postavljena je na osnovu kliničke slike, suprimirane koncentracije TSH i povišenih koncentracija T3 i T4, te pozitivnog titra stimulirajućih TSHr antitijela i/ili ultrazvučnog nalaza povećanog protoka u štitnjači.

Dijagnoza AT postavljena je na osnovu povišenog titra antitijela na TPO i Tg, te UZV-a štitnjače.

Dijagnoza DMT1 postavljena je na osnovu kliničkih znakova dijabetesa, hiperglikemije, niske razine C peptide, povišene koncentracije HbA1c i pozitivnih ICA, GAD i/ili IA-2 antitijela (kriteriji *American Diabetes Association*; ADA).

Gornja granica normalne vrijednosti titra GAD antitijela je 10 IU/ml, IA-2 antitijela 15 IU/ml, a ICA antitijela 1 IF. Gornja granica normalnih vrijednosti titra za Tg antitijela je 60.0 IU/ml, za TPO antitijela 20.0 IU/mL i za stimulirajuća TSHr antitijela 9 IU/ml.

U svih je ispitanika izračunata životna dob u vrijeme pojave simptoma bolesti (AITD i DMT1).

Svim ispitanicima uključujući i one iz kontrolne skupine jednokratno su određeni titrovi TPO, Tg, ICA, GAD i IA-2 antitijela, tipizirani su geni HLA-DRB1 i HLA-DQB1 te određene varijante gena CTLA-4 (SNP A/G<sub>49</sub>; SNP CT60; 3'UTR (AT)<sub>n</sub> mikrosatelit) i mutacija R620W u genu PTPN22 (rs2476601)

U bolesnika s AITD i u kojih je nađen povišen titar antitijela na  $\beta$  stanice otočića procijenjen je klinički stadij dijabetesa na osnovu OGTT, HbA1c, koncentracije inzulina i C peptide prema kriterijima ISPAD-a („International Society of Pediatric and Adolescent

Diabetes“, ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014 Compendium) (142).

U članova uže obitelji (roditelji, braća i sestre) bolesnika s AITD i pozitivnim GADA, ICA i/ili IA-2 također su jednokratno određeni titrovi TPO, Tg, ICA, GAD i IA-2 antitijela, tipizirani su geni HLA-DR/-DQ, te određene varijante gena CTLA-4 (SNP A/G<sub>49</sub>; SNP CT60; 3'UTR (AT)<sub>n</sub> mikrosatelit) i mutacija R620W u genu PTPN22 (rs2476601).

Provođenje studije je odobreno od Etičkog povjerenstva KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### ***3.3.2. Analitičke metode***

U biokemijsku epruvetu izvađeno je 5 ml venske krvi za potrebe testova detekcije autoantitijela, te 5 ml venske krvi u epruvetu s antikoagulansom EDTA za potrebe izolacije DNK i određivanja gena HLA razreda II (HLA-DRB1 i HLA-DQB1), CTLA-4 i PTPN22.

#### ***3.3.2.1. Testovi određivanja autoantitijela***

(1) Imunoenzimska metoda – ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) koristi se za određivanje titra GAD i IA-2 antitijela. Test je kvantitativni laboratorijski test za određivanje antitijela u uzorku seruma/EDTA plazme na principu „sendvič“ eseja, primjenom primarnog i sekundarnog antitijela. U jažice mikrotitracijske pločice koje su obložene pročišćenim, biokemijski određenim antigenom, dodaju se uzorci kalibratora, kontrola (pozitivnih i negativnih) i seruma ispitanika. Ako u ispitivanom uzorku postoje antigen-specifična antitijela (primarna) vežu se na istraživani antigen. Vezana antitijela djeluju dvovalentno i stvaraju most između ispitivanog antigena na stjenkama jažica i biotinom-označenog ispitivanog antigena koji se dodaje u drugom koraku testa. Nakon inkubacije, ispiranjem mikrotitracijske pločice, zaustavlja se reakcija kompeticije. Nastali kompleks otkriva se dodavanjem peroksidazom označenog avidina. Dodatkom otopine kromogena / supstrata (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) razvija se boja koja se određuje fotometrijski (količina antitijela proporcionalna je koncentraciji ispitivanih antitijela).

(2) Antitijela ICA ispituju se na kriostatским presjecima humanog pankreasa (dobivenog od kadavera, krvna grupa "0", bez ikakvih autoimunih poremećaja u anamnezi). Tkivo se zamrzava na specifičan način te reže na približno 5 mikrometara u kriostatu. Indirektna imunofluorescencija je serološka metoda kojom se opaža reakcija antigen-antitijelo. Određivanjem ICA antitijela utvrđuje se postoje li u serumu ispitanika auto-antitijela usmjerena protiv različitih proteina  $\beta$ -stanica. Kao sekundarno antitijelo bojanja koristi se konjugat IG/G,A,M antitijela markiranog fluoresceinizotiocijanatom (FITC) čime reakcija postaje vidljiva fluorescentnim mikroskopom. Pretraga se radi na najmanje 2 različita pankreasa (u duplikatu) i čitanje obavljaju najmanje 2 educirana čitača. Rezultati će se izraziti uz pomoć titracije standradom WHO 97/550 i kvalitativno u vidu JDF jedinica.

### **3.3.2.2.    *Određivanje gena HLA razreda II***

Određivanje gena HLA provedeno je uz pomoć komercijalnog seta LIFECODES (Gen-Probe Transplant Diagnostics, Stamford, SAD). Metoda se temelji na hibridizaciji označenog produkta PCR (engl. Polymerase Chain Reaction) s oligoprobama specifičnim za slijed nukleotida. Umnažanje DNA se provodi metodom lančane reakcije polimeraze, pri čemu se koriste početnice specifične za pojedini gen HLA. U reakciji umnažanja koriste se dvije početnice, pri čemu je jedna početnica prisutna u suvišku. Na taj način će u početnim ciklusima reakcije umnažanja nastajati dvolančana DNA kao produkt. Jednom kad se iscrpi količina ograničavajuće početnice, u slijedećim koracima će se uz pomoć preostale početnice, stvarati jednolančana DNA. I dvolančana i jednolančana DNA će, nakon postupka denaturacije, biti korištene u reakciji hibridizacije. Oligoprobe na mikrosferama (kuglicama) koje se koriste u reakciji hibridizacije su homologne sa slijedom nukleotida u umnoženoj DNA koja je jedinstvena ili za alel HLA ili za grupu alela HLA, odnosno gen HLA. One se stoga hibridiziraju s komplementarnom regijom ukoliko je ta regija prisutna u umnoženoj DNA, odnosno ukoliko je osoba kojoj se određuju aleli na pojedinom lokusu HLA nosilac alela HLA s tim specifičnim slijedom nukleotida. U reakciji hibridizacije se također koristi i tzv. "kontrolna", oligoproba koje imaju slijed nukleotida homologan slijedu nukleotida

prisutnom na svim alelima pojedinog lokusa HLA. Na taj način se kontrolira uspjeh samog postupka umnažanja i hibridizacije. Same oligoprobe su vezane za Luminex mikrosfere koje su napravljene za uporabu u Luminex aparatu (Luminex Corp., Austin, SAD). Budući su populacije mikrosfera obilježene s jedinstvenom fluorescentnom bojom, aparat može istovremeno očitati i razlikovati signal sa 100 različitih mikrosfera. To znači da se pojedine oligoprobe mogu razlikovati s obzirom na fluorescentnu boju mikrosfere na koju su vezane. Luminex aparat može odrediti relativnu količinu označenog produkta PCR koji se hibridizirao s oligoprobom na pojedinoj mikrosferi te na taj način, prema jačini dobivenog signala, odrediti da li je za pojedinu probu došlo do hibridizacije (pozitivna reakcija) ili ne (negativna reakcija), što zauzvrat daje informaciju o tome koji je alel na lokusu HLA prisutan u analiziranom uzorku.

Haplotipske veze HLA u skupinama bolesnika i ispitanika kontrolne skupine određeni su na osnovu podataka o neravnoteži udruživanja alela HLA-DRB1, HLA-DQA1 i HLA-DQB1 u hrvatskoj populaciji i u drugim populacijama bijele rase (27,143). Aleli lokusa HLA-DR i lokusa DQ nalaze se u jakoj neravnoteži udruživanja.

Obzirom da se radi o skupini nesrodnih osoba te kombinacije alela nisu uočene praćenjem segregacije pravih haplotipova unutar obitelji već su određene računskim putem, pravilnije je govoriti o haplotipskim vezama, no zbog kratkoće izražavanja u daljnjem tekstu će se koristiti izraz haplotip u istom značenju.

Popis najčešćih klasičnih haplotipova u hrvatskoj populaciji prikazan je tablicom 3.3.2.2.1. (27). Iako ovim istraživanjem nije obuhvaćen lokus DQA1, zbog jake neravnoteže udruživanja, moguće je ovu tablicu koristiti za usporedbu s haplotipovima HLA-DRB1-DQB1 izostavivši lokus HLA-DQA1.

Tablica 3.3.2.2.1. Najčešći haplotipovi HLA-DRB1-DQA1-DQB1 u hrvatskoj populaciji.

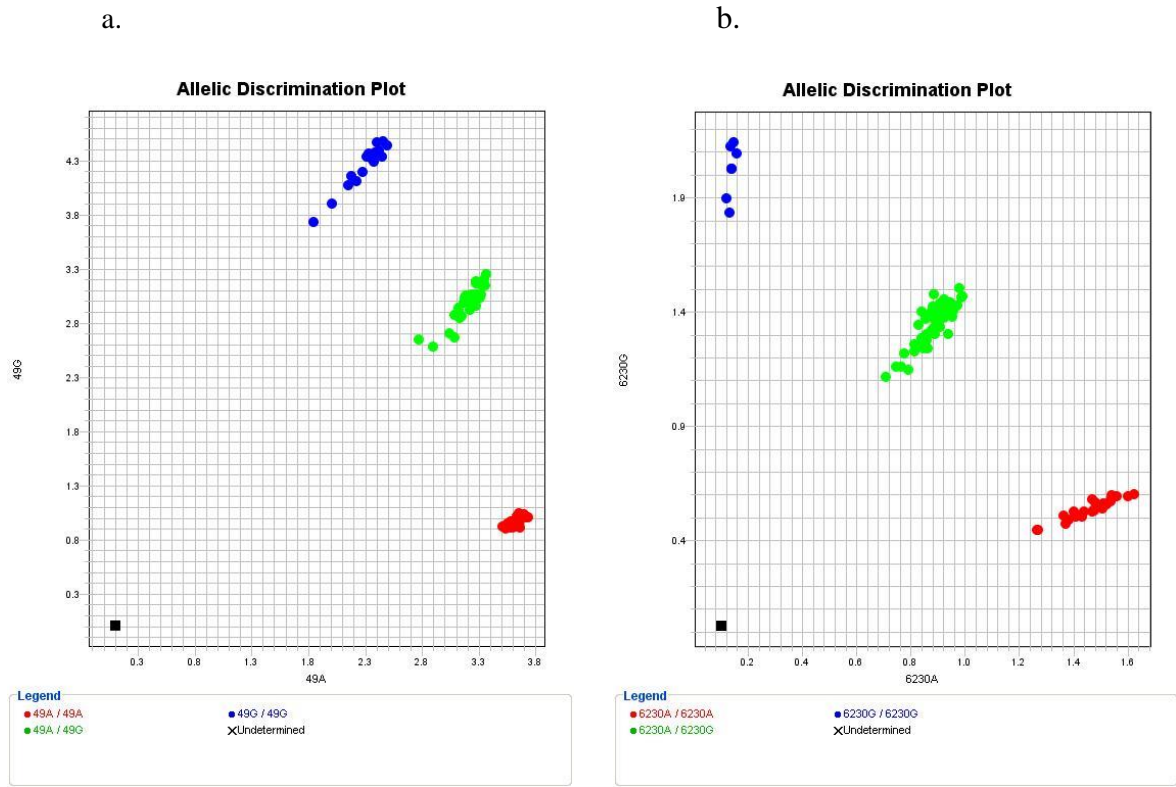
HAPLOTIP HLA-DRB1-DQA1-DQB1	Broj haplotipova	%
01:01 / 01:01 / 05:01	29	9,29
15:01 / 01:02 / 06:02	28	8,97
15:02 / 01:03 / 06:01	4	1,28
16:01 / 01:02 / 05:02	35	11,21
16:02 / 01:02 / 05:01	4	1,28
03:01 / 05:01 / 02:01	27	8,65
04:01 / 03:01 / 03:01	4	1,28
04:01 / 03:01 / 03:02	7	2,24
04:03 / 03:01 / 03:02	6	1,92
11:01 / 05:01 / 03:01	22	7,05
11:04 / 05:01 / 03:01	25	8,01
12:01 / 05:01 / 03:01	6	1,92
13:01 / 01:03 / 06:03	9	2,88
13:02 / 01:02 / 06:04	8	2,56
13:03 / 05:01 / 03:01	6	1,92
14:01 / 01:01 / 05:03	10	3,20
07:01 / 02:02 / 02:01	23	7,37
07:01 / 02:02 / 03:03	7	2,24
08:01 / 04:01 / 04:01	4	1,28
10:01 / 01:01 / 05:01	6	1,92

### 3.3.2.3. *Određivanje polimorfizma gena CTLA-4 i PTPN22*

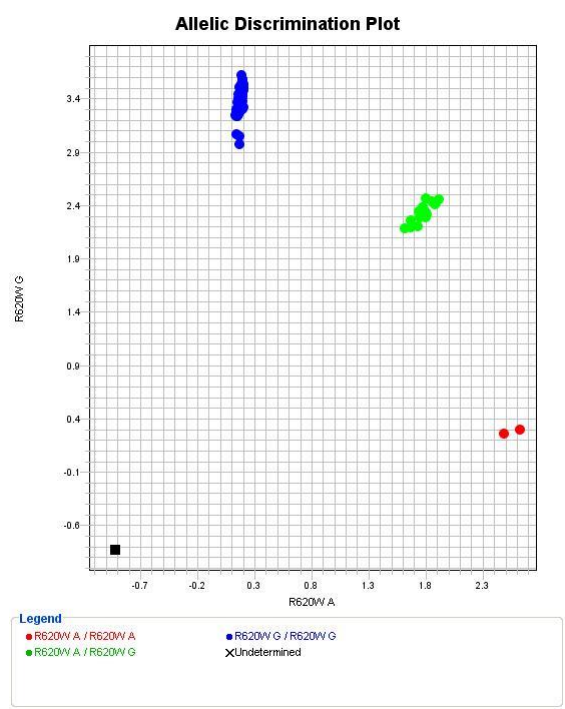
Izolirana genomska DNA analizirana je na uređaju za kvantitativni PCR ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Polimorfizam gena za CTLA-4 i PTPN-22 određen je pomoću komercijalnog kita TaqMan Assay (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih začetnika i probe koja na 5' kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM, a na 3' kraju hvatač fluorescencije (NFQ, prema engl. nonfluorescent quencher). Proba se veže na c DNA između oba začetnika, a produljenjem začetnika, DNA polimeraza cijepa probu i odvaja fluorescentnu boju od NFQ što dovodi do porasta fluorescencije sa svakim ciklusom umnažanja. Za svaki gen korištena su dva seta, s istim začetnicima i po dvije probe (označene različitim fluorescentnim bojama) od kojih je svaka specifična za određenu mutaciju [u genu CTLA-4 mutaciju SNP 49AG (rs231775) i



SNP 6230A > G (CT60, rs3087243), te u genu PTPN22 mutaciju R620W (rs2476601)]. Svaka reakcija odvijala se u duplikatu. Uzorci izolirane genomske DNA (0,5 mL po jažici), set TaqMan Assay (s dvije fluorescentne probe) i set kemikalija za PCR (TagMan Genotyping Master Mix) su prvo inkubirani tijekom 2 minute na 50 °C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza, a potom 10 minuta na +95 °C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza. Potom slijedi 40 ciklusa tijekom kojih će se uzorci inkubirati na: 95 °C 15 s i 60 °C 60s. Očitavanja fluorescencije je prikazano grafički. Na apscisi se nalazi broj ciklusa, a na ordinati intenzitet fluorescencije prikazan logaritamski. Na sredini linearnog dijela krivulje umnožavanja postavljen je arbitrarni prag i prema njemu određen kritični broj ciklusa (Ct) kao onaj ciklus na kojem razina fluorescencije prelazi arbitrarni prag. Na kraju je analizirano postojanje polimorfizma na grafikonu koji prikazuje odnos dvije fluorescencije, tako da fluorescenciju 6-FAM detektiramo u uzorcima koji imaju traženi DNA-slijed CTLA-4 SNP 49AG (rs231775); CTLA-4 SNP 6230A > G (CT60, rs3087243) ili PTPN22 R620W (rs2476601).



c.



Slika 3.3.2.3.1. Grafikon alelne diskriminacija za gen a) CTLA-4 49AG, b) CTLA-4 6230 A/G; c) PTPN22 R620W (vlastiti primjer)

Grafikon prikazuje rezultat analize kvantitativnom reakcijom lančane polimeraze (qPCR, prema engl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*). U reakciji se koriste fluorescentno označene probe (eseji TaqMan), dizajnirane tako da su pojedini *aleli* (prisutnost određenog nukleotida) označeni različitim fluorescentnim bojama (Fam i Vic). U grafikonu koji prikazuje odnos dvije fluorescencije rezultati se prikazuju u obliku „*klastera*“, odnosno podskupine uzoraka koji pokazuju isti fluorescentni biljeg. Detekcija samo jedne fluorescencije znači homozigotni fenotip (crvene točke za nukleotid A (adenozin); plave točke za nukleotid G (gvanozin), dok detekcija obje fluorescencije znači heterozigotni fenotip (zelene točke). Crni kvadrat označava kontrolni uzorak umnožen bez dodavanja DNA (negativna kontrola). Reakcija se odvija u pločici s 96 jažica po standardnom protokolu, gdje uz uzorke DNA nepoznatog genotipa usporedno umnažamo negativnu kontrolu i pozitivne kontrole svih alelnih varijanti na uređaju za qPCR (Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System). Na temelju rezultata detektirane fluorescencije u pojedinom uzorku zaključujemo o genotipu, odnosno alelu.

### 3.4. STATISTIČKE METODE

Za statističku obradu korišten je program SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

U svim obradama podataka korišteni su dvosmjerni (eng. two-tailed) testovi statističke značajnosti, a granična vrijednost statističke značajnosti je 0,05.

Učestalost svakog alela i haplotipa gena HLA-DRB1 i HLA-DQB1, između pojedine skupine bolesnika (DMT1 svi, DMT1 bez AITD, APS3v, AITD, AT i GB) i kontrolne skupine uspoređena je hi-kvadrat testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom. Fisherov egzaktni test koristi se u slučaju kad je u jednoj ili više skupina očekivana vrijednost manja od 5. Ovim testovima se određuje da li postoji statistički značajna razlika u učestalostima genotipova ili alela između oboljelih i kontrole. Dobivene p vrijednosti korigirati će se s brojem otkrivenih polimorfizama na pojedinom lokusu HLA i tako dobiti korigirana p vrijednost ( $p_k$ )

Učestalost svakog od genotipova i alela gena CTLA-4 49AG, CTLA-4 CT60 i PTPN22 R620W, između dječaka i djevojčica pojedine skupine bolesnika (DMT1 svi, DMT1 bez AITD, APS3v, AITD, AT i GB) uspoređena je hi-kvadrat testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom. Ovim testovima se određuje da li postoji statistički značajna razlika u učestalostima genotipova ili alela između oboljelih dječaka i djevojčica.

Da bi utvrdili da li je populacija u Hardy-Weinberg ravnoteži, odnosno da li učestalosti ispitivanih genotipova i alela odstupaju od Hardy-Weinbergove ravnoteže, očekivane frekvencije genotipova uspoređuju se sa stvarnim frekvencijama u konkretnoj populaciji koristeći hi kvadrat test. Odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže kod kontrolne skupine izračunata su koristeći Michael H. Court's (2005–2008) online kalkulator (144).

## 4. REZULTATI

Provedeno je istraživanje povezanosti gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 u skupini od 165 nesrodnih bolesnika s DMT1 (68 dječaka i 97 djevojčica) od kojih je 71 imalo i AITD, te u četvero braće i sestara koji također imaju DMT1. U četvero bolesnika s DMT1 analiza HLA gena nije učinjena iz tehničkih razloga. Genetske analize povezanosti polimorfizma gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 ispitane su u skupinama nesrodnih bolesnika. Braća i sestre s DMT1 (s ili bez AITD) analizirani su i opisani posebno (Tablica 4.5.1.).

Ispitivanje povezanosti polimorfizma gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 te specifičnih autoantitijela protiv beta stanica Langerhansovih otočića s nastankom DMT1 provedeno je u skupini od 158 nesrodnih bolesnika s AITD (36 muških i 122 ženskih), od kojih je 31 bolesnika imalo GB (7 muških i 24 ženskih) i 127 bolesnika AT (29 muških i 98 ženskih). U skupini bolesnika s AT ispitano je i 10 braće i sestara. U četvero bolesnika s AITD (troje bolesnika s AT i jedan s GB) analiza HLA gena nije učinjena iz tehničkih razloga. Genetske analize povezanosti gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 ispitane su u skupinama nesrodnih bolesnika. Braća i sestre s AT analizirani su i opisani posebno (Tablica 4.5.1.).

Kliničke karakteristike bolesnika i ispitanika kontrolne skupine prikazane su u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Kliničke karakteristike nesrodnih bolesnika s DMT1 i AITD i ispitanika kontrolne skupine.

	<b>DMT1</b>	<b>AITD</b>	<b>Kontrolna skupina</b>
<b>N*</b>	165	158	94
<b>Spol (M/Ž)</b>	68/97	36/122	46/48
<b>Srednja dob u vrijeme postavljanja dg</b>			
<b>Srednja dob (95%CI)</b>	8,36 (7,75-8,97)	12,43 (11,81-13,06)	
<b>Srednja dob M/Z (god)</b>	8,10/8,54	12,45/12,43	
<b>Antitijela na beta stanice Langerhansovih otočića (%)</b>	100 (100%)	17 (10,8%)	0(0%)
<b>ICA</b>	91 (54,8%), 4 NR**	8 (5,1%)	0
<b>GAD</b>	142 (84,5%), 6 NR**	10 (6,3%)	0
<b>IA-2</b>	112 (66,7%), 14 NR**	8 (5,1%)	0
<b>Braća i sestre</b>	8	20	8
<b>AITD (ukupno)</b>	71	158	0
<b>GB</b>	3	31	0
<b>AT</b>	68	127	0
<b>Pozitivna Tg i/ili TPO antitijela</b>	71	158	0

\*N – ukupan broj ispitanika, \*\*NR – nije rađeno

Ispitivanje gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 provedeno je i u skupini od 165 nesrodnih bolesnika s DMT1 (68 dječaka i 97 djevojčica) od kojih je 71 imalo i AITD, te u četvero braće i sestara koji također imaju DMT1. U četvero bolesnika s DMT1 tipizacija HLA nije učinjena iz tehničkih razloga. Genetske analize povezanosti gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 ispitane su u skupinama nesrodnih bolesnika. Braća i sestre s DMT1 (s ili bez AITD) analizirani su i opisani posebno (Tablica 4.5.1.).

Svaka skupina i podskupina bolesnika uspoređena je s kontrolnom skupinom od 94 nesrodnih ispitanika (46 dječak i 48 djevojčica) obzirom na učestalost antitijela protiv beta stanica Langerhansovih otočića te polimorfizam gena CTLA-4 i PTPN22. U jednog ispitanika kontrolne skupine tipizacija HLA nije učinjena iz tehničkih razloga.

U 17 bolesnika s AITD nađena su pozitivna antitijela na stanice Langerhansovih otočića. U 15 bolesnika iz te skupine učinjena je dodatna obrada u svrhu procjene kliničkog

stadija dijabetesa (oralni test opterećenja glukozom i/ili razina C-peptid i HbA1c). Dvoje bolesnika se nije odazvalo na dodatno testiranje. U 18 članova uže obitelji tih bolesnika provedeno je ispitivanje polimorfizma gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 te titar antitijela na stanice Langerhansovih otočića.

#### **4.1. Geni HLA razreda II**

U skupini bolesnika s DMT1, ukupno i podjeljeno u podskupine (DMT1 bez AITD i APS3v) te u skupini bolesnika s AITD, ukupno i podjeljeno u podskupine (AT i GB) provedena je analiza učestalosti pojedinih gena HLA-DRB1 i DQB1, te analiza haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u odnosu na učestalost istih alela HLA, odnosno haplotipova HLA u kontrolnoj skupini bolesnika koristeći.

##### **4.1.1. Geni lokusa HLA-DRB1**

###### **4.1.1.1. Bolesnici s DMT1**

U skupini bolesnika s DMT1 uočeno je 13 različitih gena HLA-DRB1 (Tablica 4.1.1.1.).

U bolesnika s DMT1 neovisno o prisustvu AITD među genima koji se mogu povezati s nastankom bolesti najčešće je nađen gen HLA-DRB1\*04 u 32% bolesnika u odnosu na 5,9% ispitanika kontrolne skupine ( $p < 0,001$ , OR 7,48, 95% CI 3,90 – 14,37). Drugi najčešći alel u skupini bolesnika bio je HLA-DRB1\*03, u 22,7% bolesnika u odnosu na 10,8% ispitanika kontrolne skupine ( $p = 0,001$ , OR 2,43, 95% CI 1,43-4,14). Treći po učestalosti je u bolesnika s DMT1 izoliran gen HLA-DRB1\*01 u 12,1% bolesnika što je čak manje no ne i statistički značajno u odnosu na ispitanike kontrolne skupine u kojih je isti alel izoliran u 15,1% bolesnika ( $p = 0,035$ )

S druge strane, geni koji su statistički značajno rjeđe uočeni u bolesnika s DMT1 neovisno o prisustvu AITD u odnosu na ispitanike kontrolne skupine te se mogu povezati s protektivnom ulogom u nastanku DMT1 su HLA-DRB1\*11 (DMT1 neovisno o AITD 5,9%, kontrolna skupina 17,2% ispitanika,  $p < 0.001$ ), a slijede ga HLA-DRB1\*07 (DMT1 neovisno o AITD 5,0%, kontrolna skupina 10,8%,  $p = 0.014$ ), HLA-DRB1\*15 (DMT1 neovisno o AITD 2,2%, kontrolna skupina 8,6%,  $p = 0.001$ ) i HLA-DRB1\*12 (DMT1 neovisno o AITD 0,6%, kontrolna skupina 3,8%,  $p = 0.014$ ).

Tablica 4.1.1.1. Učestalost gena HLA-DRB1 u skupini svih bolesnika s DMT1 (N=322) u odnosu na učestalost istih gena u kontrolnoj skupini ispitanika (N=186).

Gen HLA-DRB1	Kontrolna skupina n (%)	DMT1 svi n (%)	OR (95% CI)	p
01	28 (15,1)	39 (12,1)	0,78 (0,46 – 1,31)	0,345
03	<b>20 (10,8)</b>	<b>73 (22,7)</b>	<b>2,43 (1,43 – 4,14)</b>	<b>0,001</b>
04	<b>11 (5,9)</b>	<b>103 (32,0)</b>	<b>7,48 (3,90 – 14,37)</b>	<b>&lt;0,001</b>
07	<b>20 (10,8)</b>	<b>16 (5,0)</b>	<b>0,43 (0,22 – 0,86)</b>	<b>0,014</b>
08	8 (4,3)	17 (5,3)	1,24 (0,53 – 2,93)	0,623
09	1 (0,5)	2 (0,6)	1,16 (0,10 – 12,84)	1,000
10	0	1 (0,3)		1,000
11	<b>32 (17,2)</b>	<b>19 (5,9)</b>	<b>0,30 (0,17 – 0,55)</b>	<b>&lt;0,001</b>
12	<b>7 (3,8)</b>	<b>2 (0,6)</b>	<b>0,16 (0,03 – 0,78)</b>	<b>0,014</b>
13	15 (8,1)	14 (4,3)	0,52 (0,24 – 1,10)	0,082
14	4 (2,2)	1 (0,3)	0,14 (0,02 – 1,28)	0,063
<b>15</b>	<b>16 (8,6)</b>	<b>7 (2,2)</b>	<b>0,24 (0,09 – 0,56)</b>	<b>0,001</b>
16	24 (12,9)	28 (8,7)	0,64 (0,36 – 1,15)	0,132

n - broj pojedinih gena, OR – omjer vjerojatnosti, DMT1 – dijabetes melitus tip 1

Kada se skupina bolesnika s DMT1 podijeli na podskupine bolesnika s DMT1 bez AITD te s APS3v određeno je 13 gena HLA-DRB1 (Tablica 4.1.1.2.).

U bolesnika s DMT1 bez AITD među alelima koji se mogu povezati s nastankom bolesti najčešće je nađen gen HLA-DRB1\*04 u 31,5% bolesnika u odnosu na 5,9% ispitanika kontrolne skupine ( $p < 0.001$ , OR 7,32, 95% CI 3,70 – 14,51). Drugi najčešći gen u skupini bolesnika bio je HLA-DRB1\*03, u 20,1% bolesnika u odnosu na 10,8% ispitanika kontrolne skupine ( $p = 0.013$ , OR 2,09, 95% CI 1,16-3,76). Treći po učestalosti je u bolesnika s DMT1 izoliran gen HLA-DRB1\*01 u 14,1% bolesnika no bez značajnije razlike u odnosu na



ispitanike kontrolne skupine u kojih je isti gen izoliran u 15,1% bolesnika ( $p=0,801$ )

S druge strane, geni koji su statistički značajno rjeđe uočeni u bolesnika s DMT1 bez AITD u odnosu na kontrolnu skupinu te se mogu povezati s protektivnom ulogom u nastanku DMT1 su gen HLA-DRB1\*11 (DMT1 bez AITD 4,9%, kontrolna skupina 17,2%,  $p<0,001$ ) te gen HLA-DRB1\*15 (DMT1 bez AITD 1,1%, kontrolna skupina 8,6%,  $p=0,001$ ).

U bolesnika s APS3v među genima koji se mogu povezati s nastankom bolesti ponovo je najčešće nađen gen HLA-DRB1\*04 (APS3v 32,6%, kontrolna skupina 5,9%,  $p<0,001$ , OR 7,70, 95% CI 3,80–15,60). Kao i u bolesnika s DMT1 bez AITD i u bolesnika s APS3v drugi najčešći gen HLA bio je HLA-DRB1\*03 (APS3v 26,1%, kontrolna skupina 10,8%,  $p<0,001$ , OR 2,93, 95% CI 1,61-5,34).

Geni HLA-DRB1 koji su statistički značajno manje prisutni u bolesnika s APS3v u odnosu na kontrolnu skupinu te se mogu povezati s protektivnom ulogom u nastanku APS3v su gen HLA-DRB1\*11 (APS3v 7,2%, kontrolna skupina 17,2%,  $p=0,008$ ), a slijede ga gen HLA-DRB1\*07 (APS3v 3,6%, kontrolna skupina 10,8%,  $p=0,017$ ) i gen HLA-DRB1\*12 (APS3v 0%, kontrolna skupina 3,8%,  $p=0,022$ ) i gen HLA-DRB1\*13 (APS3v 2,9%, kontrolna skupina 8,1%,  $p=0,05$ ). U bolesnika s APS3v gen HLA-DRB1\*15 također je nađen rjeđe nego u ispitanika kontrolne skupine (APS3v 3,6%, kontrolna skupina 8,6%), no ta razlika nije statistički značajna ( $p=0,072$ ).

Tablica 4.1.1.2. Učestalost gena HLA-DRB1 u skupini bolesnika s DMT1 bez AITD (N=184) i u skupini bolesnika s APS3v (N=138) u odnosu na učestalost istih alela u kontrolnoj skupini ispitanika (N=186).

Gen HLA-DRB1	Kontrolna skupina n (%)	DMT1bez AITD n (%)	OR (95% CI)	p	APS3v n (%)	OR (95% CI)	p
01	28 (15,1)	26 (14,1)	0,93 (0,52 – 1,65)	0,801	13 (9,4)	0,59 (0,29 – 1,18)	0,132
<b>03</b>	<b>20 (10,8)</b>	<b>37 (20,1)</b>	<b>2,09 (1,16 – 3,76)</b>	<b>0,013</b>	<b>36 (26,1)</b>	<b>2,93 (1,61 – 5,34)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>04</b>	<b>11 (5,9)</b>	<b>58 (31,5)</b>	<b>7,32 (3,70 – 14,51)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>45 (32,6)</b>	<b>7,70 (3,80 – 15,60)</b>	<b>&lt;0,001</b>
07	<b>20 (10,8)</b>	11 (6,0)	0,53 (0,25 – 1,14)	0,097	<b>5 (3,6)</b>	<b>0,49 (0,13 – 1,90)</b>	<b>0,017</b>
08	8 (4,3)	14 (7,6)	1,83 (0,75 – 4,48)	0,179	3 (2,2)	1,83 (0,75 – 4,48)	0,365
09	1 (0,5)	0		1,000	2 (1,4)	2,72 (0,24-30,31)	0,577
10	0	0			1 (0,7)		0,426
<b>11</b>	<b>32 (17,2)</b>	<b>9 (4,9)</b>	<b>0,25 (0,12 – 0,54)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>10 (7,2)</b>	<b>0,38 (0,18 – 0,80)</b>	<b>0,008</b>
12	<b>7 (3,8)</b>	2 (1,1)	0,28 (0,06 – 1,37)	0,174	<b>0</b>		<b>0,022</b>
13	<b>15 (8,1)</b>	10 (5,4)	0,66 (0,29 – 1,50)	0,314	<b>4 (2,9)</b>	<b>0,34 (0,11 – 1,05)</b>	<b>0,050</b>
14	4 (2,2)	0		0,123	1 (0,7)	0,33 (0,04 – 3,01)	0,399
<b>15</b>	<b>16 (8,6)</b>	<b>2 (1,1)</b>	<b>0,12 (0,03 – 0,52)</b>	<b>0,001</b>	5 (3,6)	0,40 (0,14 – 0,12)	0,072
16	24 (12,9)	15 (8,2)	0,60 (0,30 – 1,18)	0,137	13 (9,4)	0,70 (0,34 – 1,43)	0,330

n – broj pojedinih gena; OR – omjer vjerojatnosti; DMT1 bez AITD – dijabetes melitus tip 1 bez autoimne bolesti štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*

#### 4.1.1.2. Bolesnici s AITD

U skupini bolesnika s AITD uočeno je 13 različitih gena HLA-DRB1 (Tablica 4.1.1.3.).

U skupini svih bolesnika s AITD među gnima koji se mogu povezati s nastankom bolesti otkriven je gena HLA-DRB1\*04 (AITD 14,3%, kontrolna skupina 5,9%; p=0,004, OR 2,65, 95% CI 1,33–5,28). Drugi najčešći gen u skupini bolesnika bio je HLA-DRB1\*03 (AITD 14,6%, kontrolna skupina 10,8%), no ta razlika nije statistički značajna (p=0.219).

S druge strane, gen HLA-DRB1\*01 je statistički značajno rjeđe prisutan u bolesnika s AITD u odnosu na ispitanike kontrolne skupine te se može povezati s protektivnom ulogom u

nastanku AITD (AITD 8,8%, kontrolna skupina 15,1%,  $p=0,031$ ). Učestalost drugih gena HLA-DRB1 podjednaka je u bolesnika s AITD i ispitanika kontrolne skupine ( $p>0,05$ )

Tablica 4.1.1.3. Učestalost alela HLA-DRB1 u skupini svih bolesnika s AITD (N=308) u odnosu na učestalost istih alela u kontrolnoj skupini ispitanika (N=186).

Geni HLA-DRB1	Kontrolna skupina n (%)	AITD n (%)	OR (95% CI)	p
<b>01</b>	<b>28 (15,1)</b>	<b>27 (8,8)</b>	<b>0,54 (0,31 – 0,95)</b>	<b>0,031</b>
03	20 (10,8)	45 (14,6)	1,42 (0,81 – 2,49)	0,219
<b>04</b>	<b>11 (5,9)</b>	<b>44 (14,3)</b>	<b>2,65 (1,33 – 5,28)</b>	<b>0,004</b>
07	20 (10,8)	28 (9,1)	0,83 (0,45 – 1,52)	0,546
08	8 (4,3)	9 (2,9)	0,67 (0,25 – 1,77)	0,415
09	1 (0,5)	1 (0,3)	0,60 (0,04 – 9,69)	1,000
10	0	1 (0,3)		1,000
11	32 (17,2)	52 (16,9)	0,98 (0,60 – 1,59)	0,927
12	7 (3,8)	6 (1,9)	0,51 (0,17 – 1,54)	0,253
13	15 (8,1)	34 (11,0)	1,42 (0,75 – 2,67)	0,284
14	4 (2,2)	6 (1,9)	0,90 (0,25 – 3,25)	1,000
15	16 (8,6)	23 (7,5)	0,86 (0,44 – 1,67)	0,650
16	24 (12,9)	32 (10,4)	0,78 (0,45 – 1,38)	0,393

n – broj pojedinih gena; AITD – autoimuna bolest štitnjače; OR – omjer vjerojatnosti

Kada se skupina bolesnika s AITD podijeli na podskupine bolesnika s AT i GB uočeno je 13 različitih gena HLA-DRB1 (Tablica 4.1.1.4.).

U skupini bolesnika s AT među genima koji se mogu povezati s nastankom bolesti nađen je gen HLA-DRB1\*04 (AT 16,9%, kontrolna skupina 5,9%;  $p=0,001$ , OR 3,24, 95% CI 1,62–6,49).

S druge strane, gen HLA-DRB1\*01 je statistički značajno rjeđe nađen u bolesnika s AT u odnosu na kontrolnu skupinu te se može povezati s protektivnom ulogom u nastanku AT (AT 8,1%, kontrolna skupina 15,1%;  $p=0,022$ ). Učestalost drugih gena HLA-DRB1 je podjednaka u bolesnika s AT i ispitanika kontrolne skupine ( $p>0,05$ ).

U bolesnika s GB gen HLA-DRB1\*03 je uočen statistički značajno češće (GB 26,7%, kontrolna skupina 10,8%;  $p=0,002$ , OR 3,02, 95% CI 1,45-6,31).

Gen HLA-DRB1\*07 je statistički značajno rjeđe prisutan u bolesnika s GB u odnosu

na kontrolnu skupinu te se može povezati s protektivnom ulogom u nastanku GB (GB 0%, kontrola 10,8%;  $p=0,005$ ). Učestalost drugih gena HLA-DRB1 je podjednaka u bolesnika s GB i kontrolnih ispitanika ( $p>0,05$ )

Tablica 4.1.1.4. Učestalost gena HLA-DRB1 u skupini bolesnika s AT (N=248) i GB (N=60) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=186).

Geni HLA-DRB1	Kontrolna skupina n (%)	AT n (%)	OR (95% CI)	p	GB n (%)	OR (95% CI)	p
01	28 (15,1)	20 (8,1)	0,50 (0,27–0,91)	0,022	7 (11,7)	0,75 (0,31–1,81)	0,514
03	20 (10,8)	29 (11,7)	1,10 (0,60–2,01)	0,759	16 (26,7)	3,02 (1,45–6,31)	0,002
04	11 (5,9)	42 (16,9)	3,24 (1,62–6,49)	0,001	2 (3,3)	0,55 (0,12–2,55)	0,740
07	20 (10,8)	28 (11,3)	1,06 (0,58–1,94)	0,860	0		0,005
08	8 (4,3)	5 (2,0)	0,46 (0,15–1,42)	0,167	4 (6,7)	1,24 (0,53–2,93)	0,494
09	1 (0,5)	1 (0,4)	0,75 (0,05–12,05)	1,000	0		1,000
10	0	1 (0,3)		1,000	0		0
11	32 (17,2)	39 (15,7)	0,90 (0,54–1,50)	0,680	13 (21,7)	1,33 (0,65–2,74)	0,437
12	7 (3,8)	6 (2,4)	0,63 (0,21–1,92)	0,416	0		0,200
13	15 (8,1)	27 (10,9)	1,39 (0,72–2,70)	0,325	7 (11,7)	1,51 (0,58–3,89)	0,395
14	4 (2,2)	5 (2,0)	0,94 (0,25–3,54)	1,000	1 (1,7)	0,77 (0,09–7,04)	1,000
15	16 (8,6)	17 (6,9)	0,78 (0,38–1,59)	0,497	6 (10,0)	1,18 (0,44–3,17)	0,741
16	24 (12,9)	28 (11,3)	0,86 (0,48–1,54)	0,609	4 (6,7)	0,48 (0,16–1,45)	0,186

n – broj pojedinih gena; AT – autoimuni tiroiditis; GB – Gravesova bolest; OR – omjer vjerojatnosti

#### 4.1.2. Geni lokusa HLA-DQB1

##### 4.1.2.1. Bolesnici s DMT1

U skupini bolesnika s DMT1 neovisno o prisutnosti AITD određeno je 7 gena lokusa HLA-DQB1 (Tablica 4.1.2.1.). U bolesnika s DMT1 neovisno o prisustvu AITD među genima koji se mogu povezati s podložnošću za nastanak bolesti najčešće je nađen gen HLA-DQB1\*03(DQ8) u 29,5% bolesnika što je približno 4 puta više nego u kontroli 5,9%;  $p<0,001$ , OR 6,66, 95% CI 3,46–12,81). Drugi najčešći gen u skupini bolesnika bio je HLA-DQB1\*02 u 27,6% bolesnika u odnosu na 18,8% ispitanika kontrolne skupine ( $p=0,026$ , OR 1,65, 95% CI 1,06–2,56).

Geni HLA-DQB1 koji su statistički značajno manje prisutni među bolesnicima DMT1

te su možda protektivni u nastanku DMT1 su gen HLA-DQB1\*03(DQ7) (DMT1 9,9%, kontrolna skupina 23,7%,  $p < 0,001$ ) te gen HLA-DBQ1\*05 (DMT1 22,0%, kontrolna skupina 31,7%;  $p = 0,021$ ) i gen HLA-DQB1\*06 (DMT1 5,6%, kontrolna skupina 13,4%,  $p = 0,002$ ).

Tablica 4.1.2.1. Učestalost gena HLA-DQB1 u skupini svih bolesnika s DMT1 (N=322) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=186).

Geni HLA-DQB1	Kontrolna skupina n (%)	DMT1 svi n (%)	OR (95% CI)	p
<b>02</b>	<b>35 (18,8)</b>	<b>89 (27,6)</b>	<b>1,65 (1,06–2,56)</b>	<b>0,026</b>
<b>03(DQ7)</b>	<b>44 (23,7)</b>	<b>32 (9,9)</b>	<b>0,36 (0,22–0,57)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>03(DQ8)</b>	<b>11 (5,9)</b>	<b>95 (29,5)</b>	<b>6,66 (3,46–12,81)</b>	<b>&lt;0,001</b>
03(DQ9)	7 (3,8)	4 (1,2)	0,32 (0,09–1,11)	0,108
04	5 (2,7)	13 (4,0)	1,52 (0,53–4,34)	0,428
<b>05</b>	<b>59 (31,7)</b>	<b>71 (22,0)</b>	<b>0,61 (0,41–0,91)</b>	<b>0,021</b>
<b>06</b>	<b>25 (13,4)</b>	<b>18 (5,6)</b>	<b>0,38 (0,20–0,72)</b>	<b>0,002</b>

n – broj pojedinih gena; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, OR – omer vjerojatnosti

U tablici 4.1.2.2. prikazana je raspodjela gena lokusa HLA-DQB1 u bolesnika s DMT1 bez AITD i bolesnika s APS3v.

U bolesnika s DMT1 bez AITD najčešći su opet bili gen HLA-DQB1\*03(DQ8) u 28,3% bolesnika u odnosu na 5,9% ispitanika kontrolne skupine ( $p < 0,001$ , OR 6,27, 95% CI 3,15–12,48) te gen HLA-DQB1\*02 u 25,5% bolesnika u odnosu na 18,8% kontrolnih ispitanika, no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0,119$ ).

Istovremeno, geni koji su rjeđe nađeni u bolesnika s DMT1 bez AITD te se mogu povezati s protektivnom ulogom za nastanak DMT1 su gen HLA-DQB1\*03(DQ7) (DMT1 bez AITD 10,3%, kontrola 23,7%;  $p = 0,001$ ), gen HLA-DBQ1\*05 (DMT1 bez AITD 2,3%, kontrola 31,7%;  $p = 0,041$ ) i gen HLA-DQB1\*06 (DMT1 bez AITD 6,5%, kontrola 13,4%;  $p = 0,027$ ).

U bolesnika s APS3v među genima koji se mogu povezati s podložnošću za bolest najčešće je opet nađen gen HLA-DQB1\*03(DQ8), (31,2% bolesnika; 5,9% kontrola;  $p < 0,001$ , OR 7,20, 95% CI 3,55–14,61) i gen HLA-DQB1\*02 (30,4% bolesnika; 18,8% kontrola), no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0,015$ ).

Geni HLA-DQB1 koji su statistički značajno rijede prisutni u bolesnika s APS3v te se mogu povezati s protektivnom ulogom su gen HLA-DQB1\*03(DQ7) (APS3v 9,4%; kontrola 23,7%; p=0,001), gen HLA-DBQ1\*05 (APS3v 21,7%, kontrola 31,7%; p=0,047) i gen HLA-DQB1\*06 (APS3v 4,3%, kontrola 13,4%, p=0,006).

Tablica 4.1.2.2. Učestalost gena HLA-DQB1 u skupini bolesnika s DMT1 bez AITD (N=184) i u skupini bolesnika s APS3v (N=138) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=186).

Geni HLA-DQB1	Kontrolna skupina n (%)	DMT1 bez AITD n (%)	OR (95% CI)	p	APS3v n (%)	OR (95% CI)	P
<b>02</b>	<b>35 (18,8)</b>	47 (25,5)	1,48 (0,90–2,43)	0,119	<b>42 (30,4)</b>	<b>1,89 (1,13–3,16)</b>	<b>0,015</b>
<b>03(DQ7)</b>	<b>44 (23,7)</b>	<b>19 (10,3)</b>	<b>0,37 (0,21–0,67)</b>	<b>0,001</b>	<b>13 (9,4)</b>	<b>0,34 (0,17–0,65)</b>	<b>0,001</b>
<b>03(DQ8)</b>	<b>11 (5,9)</b>	<b>52 (28,3)</b>	<b>6,27 (3,15–12,48)</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>43 (31,2)</b>	<b>7,20 (3,55–14,61)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>03(DQ9)</b>	<b>7 (3,8)</b>	<b>2 (1,1)</b>	<b>0,28 (0,06–1,37)</b>	<b>0,0174</b>	2 (1,4)	0,38 (0,08–1,84)	0,310
04	5 (2,7)	11 (6,0)	2,30 (0,78–6,76)	0,120	2 (1,4)	0,53 (0,10–2,79)	0,703
<b>05</b>	<b>59 (31,7)</b>	<b>41 (22,3)</b>	<b>0,62 (0,39–0,98)</b>	<b>0,041</b>	<b>30 (21,7)</b>	<b>0,60 (0,36–1,00)</b>	<b>0,047</b>
<b>06</b>	<b>25 (13,4)</b>	<b>12 (6,5)</b>	<b>0,45 (0,22–0,92)</b>	<b>0,027</b>	<b>6 (4,3)</b>	<b>0,29 (0,12–0,74)</b>	<b>0,006</b>

n – broj pojedinih gena; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; OR – omjer vjerojatnosti

#### 4.1.2.2. Bolesnici s AITD

Raspodjela gena HLA-DQB1 prikazana je u tablici 4.1.2.3. U bolesnika s AITD najčešće je nađen gen HLA-DQB1\*03(DQ8) (13,0% bolesnika, 5,9% kontrola; p=0,012, OR 2,27, 95% CI 1,19–4,75).

S druge strane, gen HLA-DBQ1\*05 statistički je značajno manje zastupljen među bolesnicima s AITD (22,7% bolesnika; 31,7% kontrola, p=0,027).

Tablica 4.1.2.3. Učestalost alela HLA-DQB1 u skupini svih bolesnika s AITD (N=308) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=186).

Geni HLA-DQB1	Kontrolna skupina n (%)	AITD n (%)	OR (95% CI)	p
02	35 (18,8)	68 (22,1)	1,22 (0,78–1,93)	0,387
03(DQ7)	44 (23,7)	67 (21,8)	0,90 (0,58–1,38)	0,623
<b>03(DQ8)</b>	<b>11 (5,9)</b>	<b>40 (13,0)</b>	<b>2,27 (1,19–4,75)</b>	<b>0,012</b>
03(DQ9)	7 (3,8)	6 (1,9)	0,51 (0,17–1,54)	0,253
04	5 (2,7)	4 (1,9)	0,72 (0,22–2,39)	0,754
<b>05</b>	<b>59 (31,7)</b>	<b>70 (22,7)</b>	<b>0,63 (0,42–0,95)</b>	<b>0,027</b>
06	25 (13,4)	51 (16,6)	1,28 (0,76–2,14)	0,352

n – broj pojedinih gena; AITD – autoimuna bolest štitnjače; OR – omjer vjerojatnosti

U tablici 4.1.2.4. prikazana je raspodjela gena lokusa HLA-DQB1 u bolesnika s AT i bolesnika s GB.

U bolesnika s AT najčešće je nađen gen HLA-DQB1\*03(DQ8) (14,9% bolesnika; 5,9% kontrola;  $p=0,003$ , OR 2,79, 95% CI 1,38–5,63).

Gen HLA-DBQ1\*05 je pokazao manju učestalost među bolesnicima s AT (23,0%) nego u kontroli (31,7%) što je statistički značajno ( $p=0,041$ ).

U bolesnika s GB nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti gena HLA-DQB1 u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.

Tablica 4.1.2.4. Učestalost alela HLA-DQB1 u skupini bolesnika s AT (N=248) i GB (N=60) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=186).

Geni HLA-DQB1	Kontrolna skupina n (%)	AT n (%)	OR (95% CI)	p	GB n (%)	OR (95% CI)	p
02	35 (18,8)	52 (21,0)	1,15 (0,71–1,85)	0,580	16 (26,7)	1,57 (0,80–3,10)	0,192
03(DQ7)	44 (23,7)	52 (21,0)	0,86 (0,54–1,35)	0,504	15 (25,0)	1,08 (0,55–2,11)	0,832
<b>03(DQ8)</b>	<b>11 (5,9)</b>	<b>37 (14,9)</b>	<b>2,79 (1,38–5,63)</b>	<b>0,003</b>	3 (5,0)	0,84 (0,23–3,11)	1,000
03(DQ9)	7 (3,8)	6 (2,4)	0,63 (0,21–1,92)	0,416	0 (0,0)		0,200
04	5 (2,7)	3 (1,2)	0,44 (0,11–1,88)	0,297	3 (1,2)	1,91 (0,44–8,22)	0,408
<b>05</b>	<b>59 (31,7)</b>	<b>57 (23,0)</b>	<b>0,64 (0,42–0,99)</b>	<b>0,042</b>	13 (21,7)	0,60 (0,30–1,18)	0,137
06	25 (13,4)	14 (16,5)	1,28 (0,75–2,19)	0,375	10 (16,7)	1,29 (0,58–2,86)	0,534

n – broj pojedinih gena, AT – autoimuni tiroiditis; GB – Gravesova bolest; OR – omjer vjerojatnosti

#### 4.1.3. Analiza haplotipova HLA-DRB1 - DQB1

Nakon analize učestalosti gena HLA, analizirali smo i haplotipove HLA-DRB1-DQB1. Usporedba je učinjena s kontrolnom skupinom ispitanika koja je obrađena na isti način.

U našoj kontrolnoj skupini otkrivena je 17 različitih kombinacija alela od kojih je HLA-DRB1\*09-DQB1\*03(DQ9) nađen samo jednom, a 16 ih se pojavljuje dva ili više puta (Tablica 4.1.3.1.).

Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u kontrolnoj skupini ispitanika uspoređena je s učestalošću najčešćih klasičnih haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u hrvatskoj populaciji (122). U obje skupine ispitanika najčešće je nađen haplotip HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) i to u 16,7% ispitanika naše kontrolne skupine i 17,4% ispitanika iz studije Grubić i sur, Na drugom mjestu u kontrolnoj skupini iz ovog rada nalazi se haplotip HLA-DRB1\*01-DQB1\*05 u 15,1% ispitanika koji je u studiji Grubić i sur nađen u 9,29% ispitanika, razlika nije statistički značajna. Haplotip HLA-DRB1\*16-DQB1\*05 koji je bio prisutan u 12,9% kontrolnih ispitanika i po učestalošću bio na trećem mjestu, u radu iz 1995. godine pokazao je



učestalost od 14,4%. Usporedba raspodjele haplotipova između ove dvije skupine zdravih ispitanika nije pokazala statistički značajne razlike (Tablica 4.1.3.1.).

Tablica 4.1.3.1. Učestalost najčešćih haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u hrvatskoj populaciji (122) i u kontrolnoj skupini ispitanika.

<b>HAPLOTIP HLA-DRB1- DQB1</b>	<b>(Grubić i sur, 1995) N=270</b>	<b>%</b>	<b>Kontrolna skupina N=186</b>	<b>%</b>
01 - 05	29	9,3	28	15,1
15 - 05	0	0	2	1,1
15 - 06	32	11,9	14	7,5
16 - 05	39	14,4	24	12,9
03 - 02	27	8,6	20	10,7
04 - 03(DQ7)	4	1,3	2	1,1
04 - 03(DQ8)	13	4,8	9	4,8
11 - 03(DQ7)	47	17,4	32	17,2
12 - 03(DQ7)	6	1,9	7	3,8
13 - 06	17	6,3	11	5,9
13 - 03(DQ7)	6	1,9	4	2,2
14 - 05	10	3,2	4	2,2
07 - 02	23	7,4	14	7,6
07 - 03(DQ9)	7	2,2	6	3,2
08 - 03(DQ8)	0	0	3	1,6
08 - 04	4	1,3	5	2,7
09 - 03(DQ9)	0	0	1	0,5
10 - 05	6	1,9	0	0

#### **4.1.3.1. Bolesnici s DMT1**

U skupini svih bolesnika s DMT1 nađeno je 20 različitih kombinacija gena HLA-DRB1-DQB1. Tri od 17 različitih haplotipa HLA-DRB1-DQB1 uočenih u kontrolnoj skupini pokazala su učestalost od 0,3%, a nisu nađeni u bolesnika s DMT1.

U skupini svih bolesnika s DMT1 među haplotipovima koji se mogu povezati s nastankom bolesti najčešće je nađen haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) u 28,3%

bolesnika u odnosu na 4,8% ispitanika kontrolne skupine ( $p < 0,001$ ). Drugi najčešći haplotip u skupini bolesnika bio je HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 u 22,7% bolesnika u odnosu na 10,7% ispitanika kontrolne skupine ( $p < 0,001$ ).

Haplotipovi HLA-DRB1-DQB1 koji su statistički značajno manje prisutni u bolesnika s DMT1 u odnosu na kontrolnu skupinu te se mogu povezati s protektivnom ulogom u nastanku DMT1 su haplotip HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) (DMT1 5,9%; kontrolna skupina 17,2%;  $p < 0,001$ ) te haplotip HLA-DRB1\*15-DBQ1\*06 (DMT1 1,6%; kontrolna skupina 7,5%;  $p = 0,001$ ), haplotip HLA-DRB1\*12-DQ\*03(DQ7) (DMT1 0,6%; kontrolna skupina 3,8%,  $p = 0,014$ ) te haplotip HLA-DRB1\*07-DQB1\*03(DQ9) (DMT1 0,3%; kontrolna 3,2%;  $p = 0,011$ ) (Slika 4.1.3.1., Tablica 4.1.3.2)

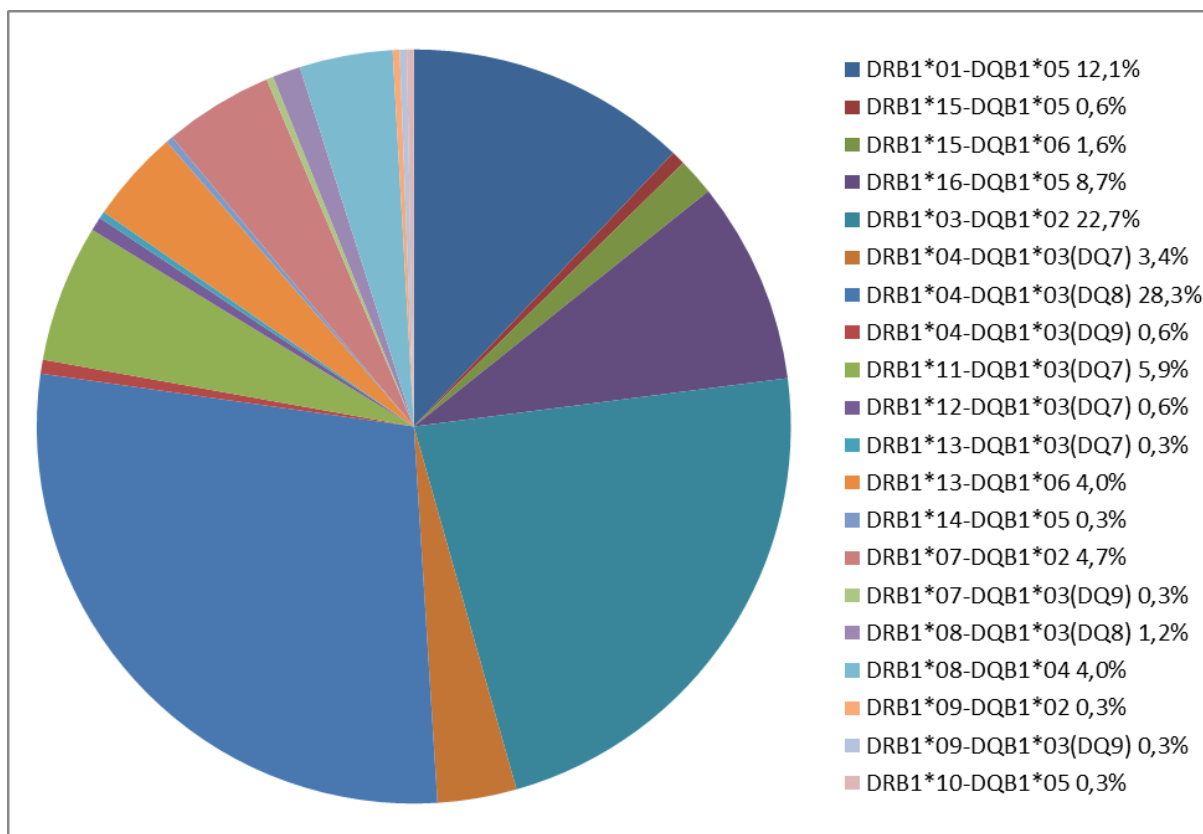
U skupini svih bolesnika s DMT1 nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog haplotipa između dječaka i djevojčica ( $p > 0,05$ ).

Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma gena HLA razreda II na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 nisu pokazale statistički značajnu razliku u dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s DMT1 s/ili bez AITD ovisno o haplotipu HLA-DRB1-DQB1 ( $p > 0,05$ ).

Tablica 4.1.3.2. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u skupini svih bolesnika s DMT1 (N=161) u odnosu na kontrolnu skupinu (N=93).

HAPLOTIP HLA-	DMT1 n (%)	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI)	p*
DRB1*01-DQB1*05	39 (12,1)	28 (15,1)	0,755 (0,446 – 1,277)	0,294
DRB1*15-DQB1*05	2 (0,6)	2 (1,1)	0,575 (0,808 - 4,116)	0,626
<b>DRB1*15-DQB1*06</b>	<b>5 (1,6)</b>	<b>14 (7,5)</b>	<b>0,194 (0,069 – 0,547)</b>	<b>0,001</b>
DRB1*16-DQB1*05	28 (8,7)	24 (12,9)	0,618 (0,345 – 1,106)	0,103
<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	<b>73 (22,7)</b>	<b>20 (10,7)</b>	<b>2,577 (1,499 – 4,429)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DRB1*04-DQB1*03(DQ7)	11 (3,4)	2 (1,1)	6,543 (0,838 -51,093)	0,064
<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	<b>91 (28,3)</b>	<b>9 (4,8)</b>	<b>8,368 (3,954 – 17,706)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DRB1*04-DQB1*03(DQ9)	2 (0,6)	0		0,535
<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	<b>19 (5,9)</b>	<b>32 (17,2)</b>	<b>0,261 (0,139 – 0,493)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>DRB1*12-DQB1*03(DQ7)</b>	<b>2 (0,6)</b>	<b>7 (3,8)</b>	<b>0,160 (0,033 – 0,778)</b>	<b>0,014</b>
DRB1*13-DQB1*03(DQ7)	1 (0,3)	4 (2,2)	0,142 (0,016 – 1,278)	0,063
DRB1*13-DQB1*06	13 (4,0)	11 (5,9)	0,669 (0,294 – 1,526)	0,337
DRB1*14-DQB1*05	1 (0,3)	4 (2,2)	0,142 (0,016 – 1,278)	0,063
DRB1*07-DQB1*02	15 (4,7)	14 (7,5)	0,600 (0,283 – 1,273)	0,179
<b>DRB1*07-DQB1*03(DQ9)</b>	<b>1 (0,3)</b>	<b>6 (3,2)</b>	<b>0,093 (0,011 – 0,782)</b>	<b>0,011</b>
DRB1*08-DQB1*03(DQ8)	4 (1,2)	3 (1,6)	0,767 (0,170 – 3,466)	0,711
DRB1*08-DQB1*04	13 (4,0)	5 (2,7)	1,523 (0,534 – 4,342)	0,428
DRB1*09-DQB1*02	1 (0,3)	0		1,000
DRB1*09-DQB1*03(DQ9)	1 (0,3)	1 (0,5)	0,576 (0,036 – 9,268)	1,000
DRB1*10-DQB1*05	1 (0,3)	0		1,000

\* $\chi$  kvadrat odnosno Fisherov test kod učestalosti <5; n – broj pojedinih haplotipova; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, OR – omjer vjerojatnosti



Slika 4.1.3.1. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u bolesnika s DMT1 (N=161)

Kada se skupina svih bolesnika s DMT1 podijeli na podskupine bolesnika s DMT1 bez AITD te s APS3v, u skupini bolesnika s DMT1 bez AITD otkriveno je 14 različitih haplotipova HLA-DRB1-DQB1, od kojih su 2 nađeni samo jednom a 12 ih se pojavljuje dva ili više puta. Jedan haplotip nađen je samo u skupini bolesnika s DMT1 bez AITD a nije nađen u kontrolnoj skupini, dok od 4 haplotipa HLA-DRB1-DQB1 koji su nađeni u kontrolnoj skupini, a nisu nađeni u bolesnika s DMT1 bez AITD učestalost ne prelazi više od 2,2%.

U bolesnika s DMT1 bez AITD među haplotipovima HLA-DRB1-DQB1 najčešće je nađen haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) u 26,6% bolesnika u odnosu na 4,3% ispitanika kontrolne skupine ( $p < 0,001$ ), Drugi najčešći haplotip u skupini bolesnika bio je HLA-DRB1\*03:DQB1\*02 u 20,1% bolesnika u odnosu na 10,7% ispitanika kontrolne skupine ( $p = 0,008$ ). Treći haplotip, HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7) koji je bio statistički

značajno češći među bolesnicima s DMT1 bez AITD uočen je kod 4,9% bolesnika u odnosu na 1,1% kontrola ( $p=0,01$ ).

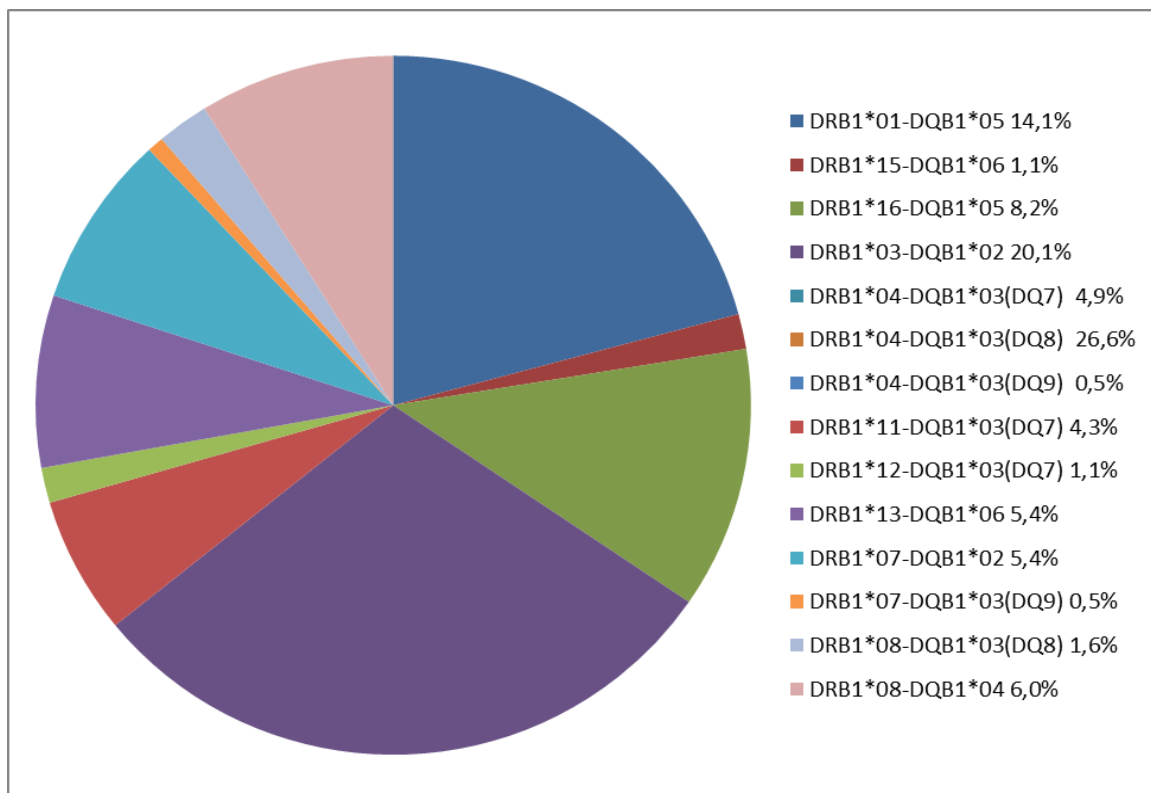
Haplotipovi HLA-DRB1-DQB1 koji su statistički značajno rjeđe prisutni u bolesnika s DMT1 bez AITD u odnosu na kontrolnu skupinu te se mogu povezati s protektivnom ulogom u nastanku DMT1 su haplotip HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) (DMT1 bez AITD 4,3%; kontrola 17,2%;  $p<0,001$ ) te haplotip HLA-DRB1\*15-DBQ1\*06 (DMT1 bez AITD 1,1%; kontrola 7,5%;  $p=0,002$ ) (Slika 4.1.3.2., Tablica 4.1.3.3.)

U skupini bolesnika s DMT1 bez AITD nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog haplotipa između dječaka i djevojčica ( $p>0,05$ ).

Tablica 4.1.3.3. Raspodjela haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u skupini bolesnika s DMT1 bez AITD (N=92) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=93).

HALPOTIP HLA-	DMT1 bez AITD n (%)	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI)	p
DRB1*01-DQB1*05	26 (14,1)	28 (15,1)	0,887(0,496 – 1,589)	0,687
DRB1*15-DQB1*05	0	2 (1,1)		0,499
<b>DRB1*15-DQB1*06</b>	<b>2 (1,1)</b>	<b>14 (7,5)</b>	<b>0,135 (0,030 – 0,603)</b>	<b>0,002</b>
DRB1*16-DQB1*05	15 (8,2)	24 (12,9)	0,556 (0,278 – 1,112)	0,093
<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	<b>37 (20,1)</b>	<b>20 (10,7)</b>	<b>2,212 (1,219 – 4,015)</b>	<b>0,008</b>
<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ7)</b>	<b>9 (4,8)</b>	<b>2 (1,1)</b>	<b>9,514 (1,193 – 75,875)</b>	<b>0,010</b>
<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	<b>49 (26,6)</b>	<b>9 (4,8)</b>	<b>7,417 (3,390 – 16,228)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DRB1*04-DQB1*03(DQ9)	1 (0,5)	0		0,497
<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	<b>8 (4,3)</b>	<b>32 (17,2)</b>	<b>0,169 (0,069 – 0,415)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DRB1*12-DQB1*03(DQ7)	2 (1,1)	7 (3,8)	0,281 (0,058 - 1,371)	0,174
DRB1*13-DQB1*06	10 (5,4)	11 (5,9)	0,914 (0,379 – 2,208)	0,842
DRB1*13-DQB1*03(DQ7)	0	4 (2,2)		0,123
DRB1*14-DQB1*05	0	4 (2,2)		0,123
DRB1*07-DQB1*02	10 (5,4)	14 (7,5)	0,706 (0,305 – 1,633)	0,414
DRB1*07-DQB1*03(DQ9)	1 (0,5)	6 (3,2)	0,164 (0,020 – 1,375)	0,121
DRB1*08-DQB1*03(DQ8)	3 (1,6)	3 (1,6)	1,011 (0,201 – 5,076)	1,000
DRB1*08-DQB1*04	11 (6,0)	5 (2,7)	2,302 (0,784 – 6,761)	0,120
DRB1*09-DQB1*03(DQ9)	0	1 (0,5)		1,000

\* $\chi$  kvadrat odnosno Fisherov test kod učestalosti <5; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; OR – omjer vjerojatnosti; n- broj pojedinih haplotipova



Slika 4.1.3.2. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u bolesnika s DMT1 bez AITD (N=92)

U skupini bolesnika s APS3v otkriveno je 18 različitih kombinacija alela od kojih su 7 nađene samo jednom a 11 ih se pojavljuje dva ili više puta.

U bolesnika s APS3v među haplotipovima koji se mogu povezati s nastankom bolesti najčešće je nađen haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) (30,4% bolesnika s APS3v; 4,8% kontrola;  $p < 0,001$ ) i haplotip HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 (26,1% bolesnika s APS3v; 10,7% kontrola;  $p < 0,001$ ).

Haplotipovi HLA-DRB1-DQB1 koji su statistički značajno manje prisutni u kontrolnoj skupini u odnosu na bolesnike s APS3v te mogu biti protektivni za nastanak DMT1 su haplotip HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) (APS3v 7,2%; kontrola 17,2%;  $p = 0,01$ ) te haplotip HLA-DRB1\*15-DQB1\*06 (APS3v 2,2%; kontrola 7,5%;  $p = 0,03$ ). Haplotipovi HLA-DRB1\*12-DQB1\*03(DQ7) (APS3v 0%, kontrola 3,8%,  $p = 0,022$ ), i haplotip HLA-DRB1\*07-DQB1\*03(DQ9) (APS3v 0%, kontrola 3,2%;  $p = 0,04$ ) nisu prisutni u bolesnika s APS3v, a nađeni su u kontrolnoj skupini s učestalošću većom od 3% razlika je statistički

značajna. (Slika 4.1.3.3., Tablica 4.1.3.4.)

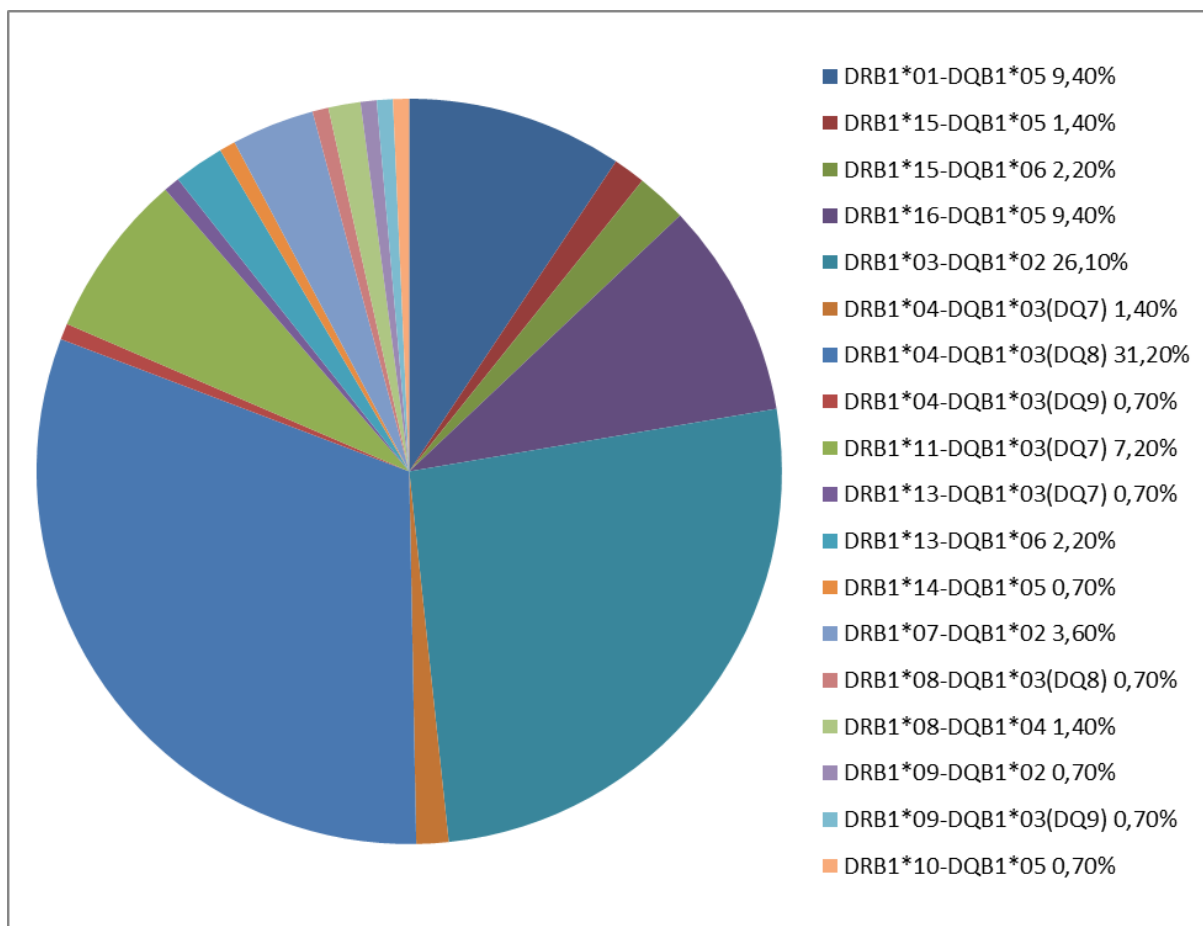
U skupini bolesnika s APS3v nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog haplotipa između dječaka i djevojčica ( $p>0,05$ ).

Tablica 4.1.3.4. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u skupini bolesnika s APS3v (N=69) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=93).

HALPOTIP HLA-	APS3v n (%)	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI)	p
DRB1*01-DQB1*05	13 (9,4)	28 (15,1)	0,587 (0,292 – 1,180)	0,132
DRB1*15-DQB1*05	2 (1,4)	2 (1,1)	1,353 (0,188 – 9,725)	1,000
<b>DRB1*15-DQB1*06</b>	<b>3 (2,2)</b>	<b>14 (7,5)</b>	<b>0,273 (0,077 – 0,969)</b>	<b>0,033</b>
DRB1*16-DQB1*05	13 (9,4)	24 (12,9)	0,702 (0,344 – 1,434)	0,330
<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	<b>36 (26,1)</b>	<b>20 (10,7)</b>	<b>3,102 (1,689 – 5,697)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DRB1*04-DQB1*03(DQ7)	2 (1,4)	2 (1,1)	2,721 (0,244 -30,310)	0,577
<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	<b>43 (31,2)</b>	<b>8 (4,8)</b>	<b>9,734 (4,392 -21,573)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DRB1*04-DQB1*03(DQ9)	1 (0,7)	0		0,426
<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	<b>10 (7,2)</b>	<b>32 (17,2)</b>	<b>0,391 (0,184 – 0,827)</b>	<b>0,012</b>
<b>DRB1*12-DQB1*03(DQ7)</b>	<b>0</b>	<b>7 (3,8)</b>		<b>0,022</b>
DRB1*13-DQB1*03(DQ7)	1 (0,7)	4 (2,2)	0,332 (0,037 – 3,005)	0,399
DRB1*13-DQB1*06	3 (2,2)	11 (5,9)	0,354 (0,097 – 1,292)	0,102
DRB1*14-DQB1*05	1 (0,7)	4 (2,2)	0,332 (0,037 – 3,005)	0,399
DRB1*07-DQB1*02	5 (3,6)	14 (7,5)	0,462 (0,162 – 1,314)	0,139
<b>DRB1*07-DQB1*03(DQ9)</b>	<b>0</b>	<b>6 (3,2)</b>		<b>0,040</b>
DRB1*08-DQB1*03(DQ8)	1 (0,7)	3 (1,6)	0,445 (0,046 – 4,327)	0,639
DRB1*08-DQB1*04	2 (1,4)	5 (2,7)	0,532 (0,102 – 2,785)	0,703
DRB1*09-DQB1*02	1 (0,7)	0		0,426
DRB1*09-DQB1*03(DQ9)	1 (0,7)	1 (0,5)	1,350 (0,084 – 21,780)	1,000
DRB1*10-DQB1*05	1 (0,7)	0		0,426

\* $\chi$  kvadrat odnosno Fisherov test kod učestalosti  $<5$ ; n – broj pojedinih haplotipova; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; OR – omjer vjerojatnosti





Slika 4.1.3.3. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u bolesnika s APS3v (N=69)

U tablici 4.1.3.5.a. i b. prikazana je raspodjela genotipova HLA prema do sada poznatom riziku za nastanak DMT1 (102,103,145-147) u bolesnika s DMT1 (s i bez AITD) i u kontrolnoj skupini ispitanika, te razlika u učestalost pojedinih genotipova HLA među navedenim skupinama bolesnika.

Visoko rizični genotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8) / HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 nađen je u statistički značajno češće u sve 3 skupine bolesnika nego u kontroli ( $p < 0,001$ ).

U skupini srednje rizičnih genotipova, genotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8) / HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8), nađen je u 5,4-7,2% bolesnika s DMT1 i u 1% kontrolnih ispitanika, ali razlike nisu bila statistički značajne. Genotip HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 / HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 uočen je samo u bolesnika s APS3v (5/69, 7,2%) sa statistički značajano većom učestalosću ( $p = 0,013$ ) nego u kontroli. Zanimljivo je spomenuti

da ovaj genotip nije imao niti jedan bolesnik s DMT1 bez AITD.

Heterozigoti za genotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8) i drugi haplotip koji ne uključuje HLA-DRB1\*04-DQB1\*03 odnosno HLA-DRB1\*03-DQB1\*02, statistički su značajno češći među bolesnicima s DMT1 (DMT1 32,1%, DMT1 bez AITD 33,3%; APS3v 30,4%) u odnosu na 7,5% kontrolnih skupina, što su statistički značajne razlike ( $p < 0,001$ ).

Genotip HLA-DRB1\*03-DQB1\*02/drugi haplotip HLA koji ne uključuje HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8) odnosno HLA-DRB1\*03-DQB1\*02, nađen je s približno jednakim učestalostima u sve 3 analizirane skupine bolesnika kao i u kontroli ( $p > 0,05$ ).

Nisko rizični genotipovi koji ne uključuju haplotipove HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8) odnosno HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 nađeni su s rasapom od 17,4-20,4% bolesnika s DMT1 što je više od 3 puta manje nego u kontrolnoj skupini (70%;  $p < 0,001$ ).

Tablica 4.1.3.5.a. Raspodjela genotipova HLA prema do sada poznatim riziku za nastanak DMT1 u bolesnika s DMT1 (102,103,145-147), ukupno i podjeljenim u podskupine te u kontrolnoj skupini ispitanika. 4.1.3.5.b. Razlika učestalosti pojedinih haplotipova prema skupinama bolesnika s DMT1 u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika

a.

Rizik	Genotip HLA	DMT1 svi (N=161) n (%)	DMT1 bez AITD (N=92) n (%)	APS3v (N=69) n (%)	Kontrolna skupina (N=93) (%)
Visoki rizik	DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)/DRB1*03-DQB1*02	31 (19,1)	17 (18,4)	14 (20,3)	0 (0)
Srednji rizik	DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)//DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)	10 (6,2)	5 (5,4)	5 (7,2%)	1 (1,0)
	DRB1*03-DQB1*02/DRB1*03-DQB1*02	5 (8,1)	0 (0)	5 (7,2)	0 (0)
	DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)/DRB1*X-DQB1*X	52 (32,1)	31 (33,3)	21 (30,4)	7 (7,5)
	DRB1*03-DQB1*02/DRB1*X-DQB1*X	32 (19,7)	20 (21,5)	12 (17,4)	20 (21,5)
Niski rizik	DRB1*X-DQB1*X/DRB1*X-DQB1*X	31 (19,1)	19 (20,4)	12 (17,4)	65 (70,0)

b.

Genotipovi HLA-	DMT1 svi (N=161)		APS3v (N=69)		DMT1 bez AITD (N=92)	
	p	95%CI	p	95%CI	p	95%CI
DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)/DRB1*03-DQB1*02	<0,001		<0,001		<0,001	
DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)/DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)	0,060	6,053 (0,762-48,056)	0,084	7,188 (0,820-62,988)	0,211	5,227 (0,599-45,637)
DRB1*03-DQB1*02/DRB1*03-DQB1*02	0,162		0,013			
DRB1*04-DQB1*03(DQ7iliDQ8)/DRB1*X-DQB1*X	<0,001	5,808 (2,512-13,426)	<0,001	5,375 (2,130-13,561)	<0,001	6,143 (2,541-14,851)
DRB1*03-DQB1*02/DRB1*X-DQB1*X	0,738	0,898 (0,480-1,683)	0,515	0,768 (0,347-1,702)	1,000	1,000 (0,497-2,013)
DRB1*X-DQB1*X/DRB1*X-DQB1*X	<0,001	0,102 (0,056-0,184)	<0,001	0,091 (0,042-0,195)	<0,001	0,111 (0,057-0,216)

N- ukupan broj bolesnika; n – broj pojedinih genotipova; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; OR – omjer vjerojatnosti; X-gen na lokusu HLA-DRB1 koji nije ni DRB1\*04 ni DRB1\*03; X-gen na lokusu HLA-DQB1 koji nije ni DQB1\*03 ni DQB1\*02

#### **4.1.3.2. Bolesnici s AITD**

U bolesnika s AITD dokazano je 19 različitih haplotipova HLA-DRB1-DQB1 od kojih su 2 uočene samo jednom, a 17 ih se pojavljuje dva ili više puta.

U bolesnika s AITD među haplotipovima HLA-DRB1-DQB1 koji se mogu povezati s nastankom bolesti nađen je haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) (12,3% bolesnika, 4,8%), što je statistički značajna razlika ( $p=0,005$ ).

Haplotip HLA-DRB1-DQB1 koji je statistički značajno manje prisutni u bolesnika s AITD u odnosu na kontrolu je haplotip HLA-DRB1\*01-DQB1\*05 (AITD 8,8%; kontrola 15,1%;  $p=0,03$ ) (Slika 4.1.3.4., Tablica 4.1.3.6.)

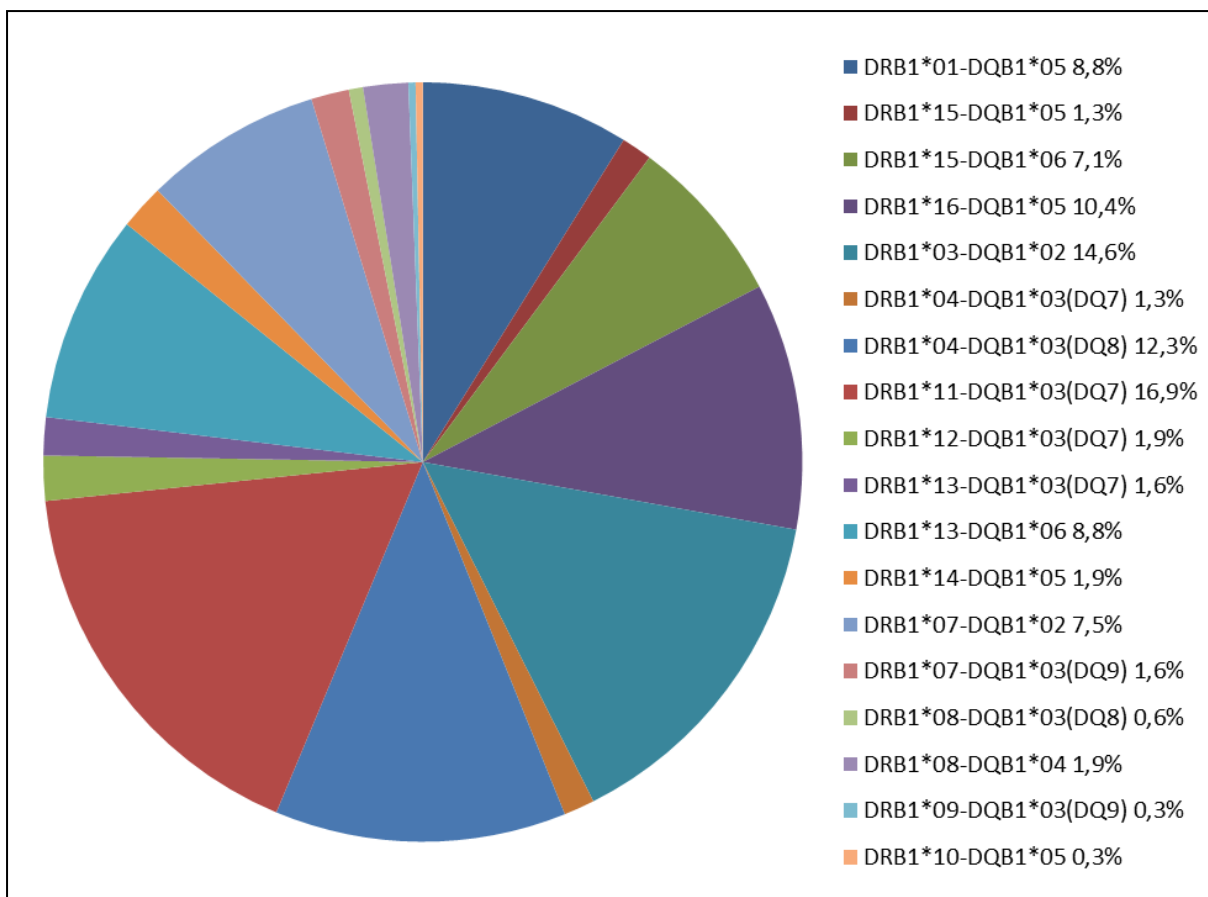
U skupini bolesnika s AITD nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog haplotipa između dječaka i djevojčica ( $p>0,05$ ).

Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma gena HLA razreda II na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 nisu pokazale statistički značajnu razliku u dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s AITD ovisno o haplotipu HLA-DRB1-DQB1 ( $p>0,05$ ).

Tablica 4.1.3.6. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u skupini bolesnika s AITD (N=154) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (N=93).

HALPOTIP HLA-	AITD n (%)	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI)	p
<b>DRB1*01-DQB1*05</b>	<b>27 (8,8)</b>	<b>28 (15,1)</b>	<b>0,542 (0,309 – 0,952)</b>	<b>0,031</b>
DRB1*15-DQB1*05	4 (1,3)	2 (1,1)	1,211 (0,220 – 6,674)	1,000
DRB1*15-DQB1*06	22 (7,1)	14 (7,5)	0,808 (0,395 – 1,652)	0,558
DRB1*16-DQB1*05	32 (10,4)	24 (12,9)	0,755 (0,428 – 1,332)	0,331
DRB1*03-DQB1*02	45 (14,6)	20 (10,7)	1,504 (0,850 – 2,660)	0,159
DRB1*04-DQB1*03(DQ7)	4 (1,3)	2 (1,1)	2,434 (0,270 – 21,945)	0,655
<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	<b>38 (12,3)</b>	<b>9 (4,8)</b>	<b>2,945 (1,338 – 6,482)</b>	<b>0,005</b>
DRB1*11-DQB1*03(DQ7)	52 (16,9)	32 (17,2)	0,992 (0,609 – 1,618)	0,975
DRB1*12-DQB1*03(DQ7)	6 (1,9)	7 (3,8)	0,508 (0,168 – 1,535)	0,253
DRB1*13-DQB1*03(DQ7)	5 (1,6)	4 (2,2)	0,751 (0,199 – 2,832)	0,734
DRB1*13-DQB1*06	27 (8,8)	11 (5,9)	1,529 (0,740 – 3,159)	0,249
DRB1*14-DQB1*05	6 (1,9)	4 (2,2)	0,904 (0,252 – 3,246)	1,000
DRB1*07-DQB1*02	23 (7,5)	14 (7,5)	0,991 (0,497 – 1,978)	0,981
DRB1*07-DQB1*03(DQ9)	5 (1,6)	6 (3,2)	0,495 (0,149 – 1,645)	0,345
DRB1*08-DQB1*03(DQ8)	2 (0,6)	3 (1,6)	0,399 (0,066 – 2,408)	0,370
DRB1*08-DQB1*04	6 (1,9)	5 (2,7)	0,597 (0,171 – 2,092)	0,513
DRB1*09-DQB1*03(DQ9)	1 (0,3)	1 (0,5)	0,603 (0,037 – 9,692)	1,000
DRB1*10-DQB1*05	1 (0,3)	0		1,000

\* $\chi$  kvadrat odnosno Fisherov test kod učestalosti <5, n – broj pojedinih haplotipova, AITD – autoimuna bolest štitnjače; OR – omjer vjerojatnosti



Slika 4.1.3.4. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u bolesnika s AITD (N=154)

Kada se skupina bolesnika s AITD podijeli na podskupine bolesnika s AT i GB , u skupini bolesnika s AT otkriveno je 18 različita haplotipa HLA-DRB1-DQB1 od kojih je 3 nađeno samo jednom, a 15 ih se pojavljuje dva ili više puta.

U bolesnika s AT u odnosu na kontrolnu skupinu, statistički značajano češće je uočen haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) (14,5% bolesnika; 4,8% kontrolnih ispitanika;  $p < 0,001$ ).

S druge strane, učestalost haplotip HLA-DRB1\*01-DQB1\*05 statistički je značajno manja u bolesnika s AITD (8,1%) nego kontrolnih ispitanika (15,1%),  $p = 0,02$ . (Slika 4.1.3.5., Tablica 4.1.3.7.)

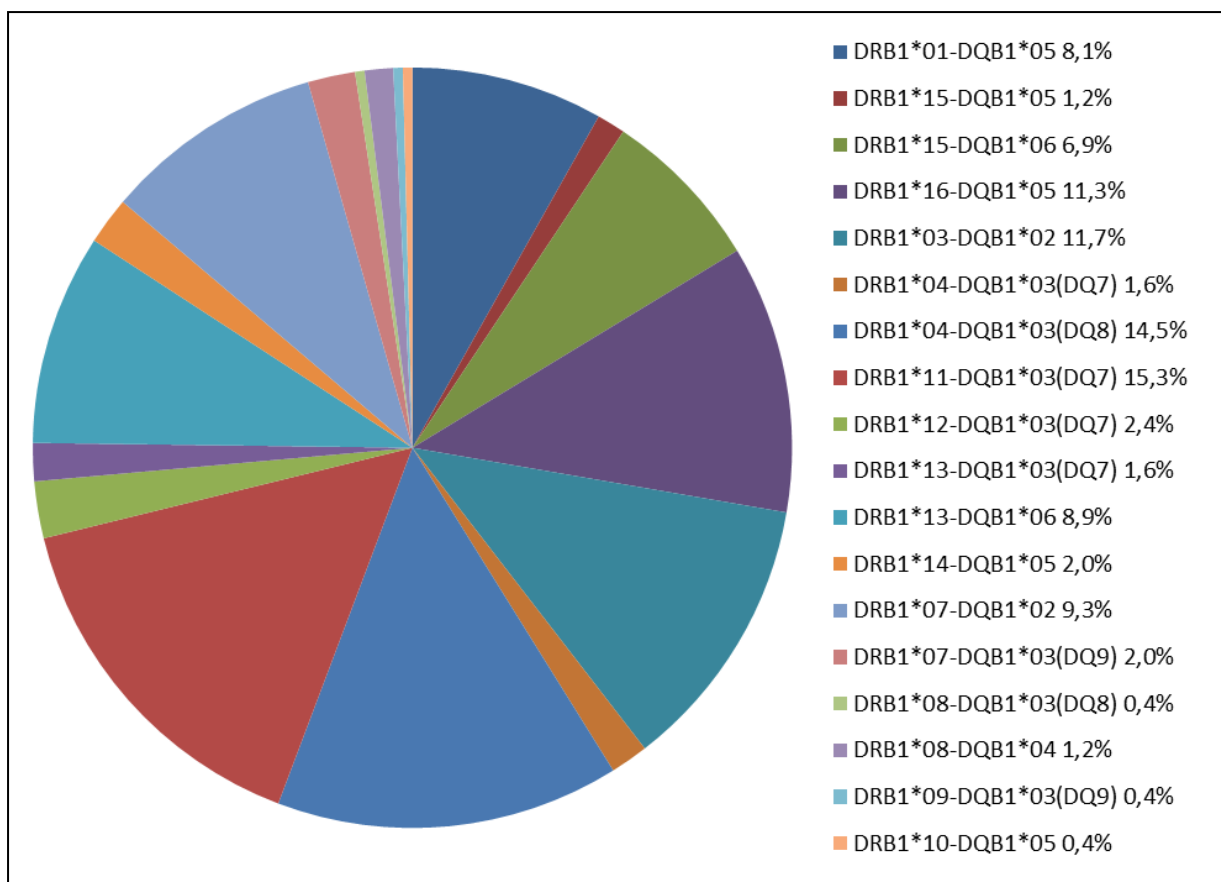
Korištenjem  $\chi$  kvadrat testa ustanovljena je statistički značajna razlika u učestalosti haplotipa HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) između dječaka i djevojčica s AT. Učestalost je statistički značajno veća u dječaka (24,1%) nego u djevojčica (12,6%), ( $p = 0,033$ , OR 2,201;

95% CI 1,502–4,604). Učestalost ostalih haplotipova nije značajnije različita u dječaka i djevojčica s AT.

Tablica 4.1.3.7. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u skupini bolesnika s AT (N=124) u odnosu na učestalost istih haplotipova u kontrolnoj skupini ispitanika (N=93).

HALPOTIP HLA	AT n (%)	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI)	p
<b>DRB1*01-DQB1*05</b>	<b>20 (8,1)</b>	<b>28 (15,1)</b>	<b>0,495 (0,269 – 0,910)</b>	<b>0,022</b>
DRB1*15-DQB1*05	3 (1,2)	2 (1,1)	1,127 (0,186 – 6,811)	1,000
DRB1*15-DQB1*06	17 (6,9)	14 (7,5)	0,735 (0,342 – 1,582)	0,430
DRB1*16-DQB1*05	28 (11,3)	24 (12,9)	0,859 (0,480 – 1,537)	0,609
DRB1*03-DQB1*02	29 (11,7)	20 (10,7)	1,164 (0,631 – 2,148)	0,627
DRB1*04-DQB1*02	0	1 (0,5)		0,429
DRB1*04-DQB1*03(DQ7)	4 (1,6)	1 (0,5)	3,033 (0,336 – 27,361)	0,398
<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	<b>36 (14,5)</b>	<b>8 (4,3)</b>	<b>3,778 (1,712 – 8,338)</b>	<b>&lt;0,001</b>
DRB1*11-DQB1*03(DQ7)	38 (15,3)	32 (17,2)	0,905 (0,539 – 1,518)	0,705
DRB1*12-DQB1*03(DQ7)	6 (2,4)	7 (3,8)	0,634 (0,209 – 1,919)	0,416
DRB1*13-DQB1*03(DQ7)	4 (1,6)	4 (2,2)	0,764 (0,184 – 3,022)	0,729
DRB1*13-DQB1*06	22 (8,9)	11 (5,9)	1,549 (0,731 – 3,279)	0,250
DRB1*14-DQB1*05	5 (2,0)	4 (2,2)	0,936 (0,248 – 3,535)	1,000
DRB1*07-DQB1*02	23 (9,3)	14 (7,5)	1,256 (0,628 – 2,512)	0,519
DRB1*07-DQB1*03(DQ9)	5 (2,0)	6 (3,2)	0,617 (0,185 – 2,054)	0,541
DRB1*08-DQB1*03(DQ8)	1 (0,4)	3 (1,6)	0,247 (0,025 – 2,393)	0,318
DRB1*08-DQB1*04	3 (1,2)	5 (2,7)	0,294 (0,056 – 1,534)	0,144
DRB1*09-DQB1*03(DQ9)	1 (0,4)	1 (0,5)	0,749 (0,047 – 12,053)	1,000
DRB1*10-DQB1*05	1 (0,4)	0		1,000

\* $\chi$  kvadrat odnosno Fisherov test kod učestalosti  $<5$ ; n – broj pojedinih haplotipova, AT – autoimuni tiroiditis; OR – omjer vjerojatnosti



Slika 4.1.3.5. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u bolesnika s AT (N=124)

U skupini bolesnika s GB otkriveno je 12 različitih haplotipova HLA-DRB1-DQB1.

U bolesnika s GB među haplotipovima HLA-DRB1-DQB1 koji se mogu povezati s nastankom bolesti nađen je haplotip HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 (26,7% bolesnika; 10,2% kontrolnih ispitanika), što je statistički značajna razlika ( $p=0,002$ ).

Haplotipa HLA-DRB1\*07-DQB1\*02 nije nađen u bolesnika s GB, te je njegova učestalost u bolesnika s GB statistički značajno manja u odnosu na kontrolne ispitanike (7,6%),  $p=0,03$  (Slika 4.1.3.5., Tablica 4.1.3.8.)

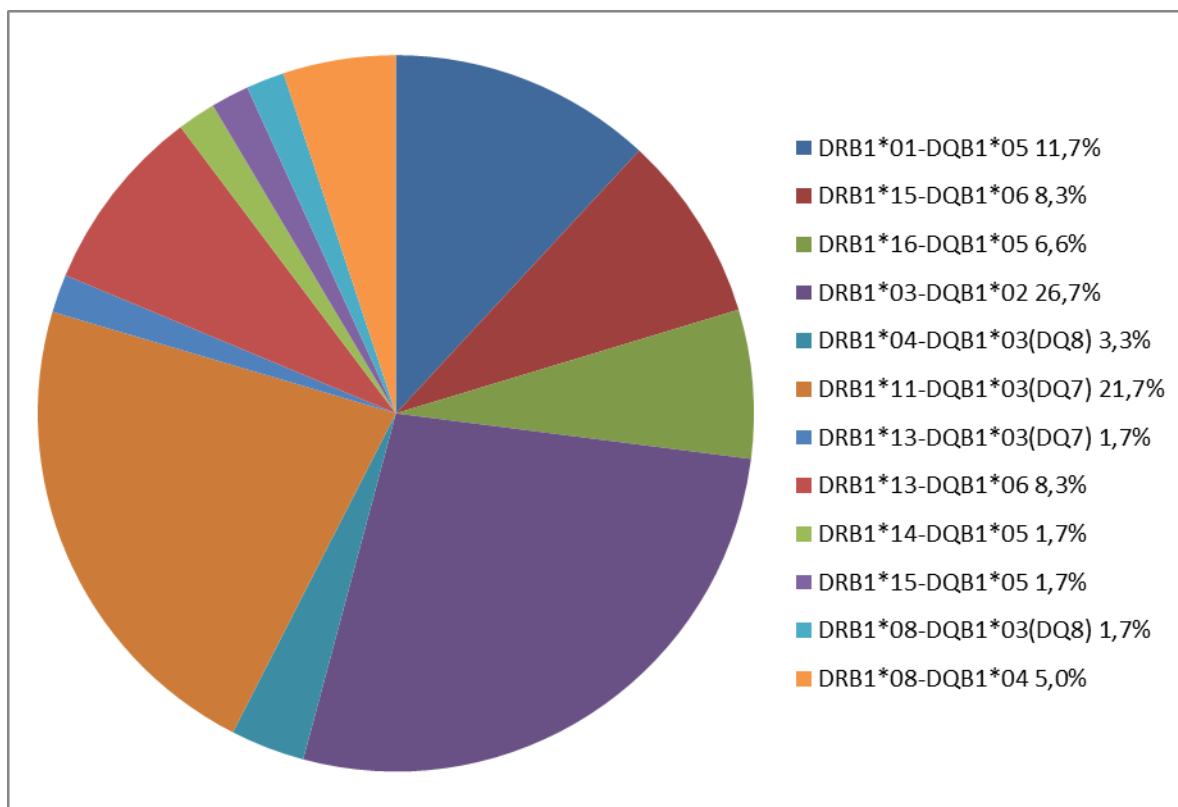
U skupini bolesnika s GB nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog haplotipa HLA između dječaka i djevojčica.



Tablica 4.1.3.8. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u skupini bolesnika s GB (N=30) u odnosu na učestalost istih haplotipova u kontrolnoj skupini ispitanika (N=93).

HALPOTIP HLA	GB n (%)	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI)	p
DRB1*01-DQB1*05	7 (11,7)	28 (15,1)	0,745 (0,308 – 1,805)	0,514
DRB1*15-DQB1*06	5 (8,3)	14 (7,5)	1,117 (0,385 – 3,241)	0,786
DRB1*16-DQB1*05	4 (6,6)	24 (12,9)	0,355 (0,103 – 1,225)	0,089
<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	<b>16 (26,7)</b>	<b>20 (10,7)</b>	<b>3,196 (1,520 – 6,772)</b>	<b>0,002</b>
DRB1*04-DQB1*02	0	1 (0,5)		1,000
DRB1*04-DQB1*03(DQ7)	0	2 (1,1)		1,000
DRB1*04-DQB1*03(DQ8)	2 (3,3)	9 (4,8)	0,767 (0,158 – 3,716)	1,000
DRB1*11-DQB1*03(DQ7)	13 (21,7)	32 (17,2)	1,383 (0,670 – 2,856)	0,380
DRB1*12-DQB1*03(DQ7)	0	7 (3,8)		0,200
DRB1*13-DQB1*03(DQ7)	1 (1,7)	4 (2,2)	0,771 (0,085 – 7,036)	1,000
DRB1*13-DQB1*06	5 (8,3)	11 (5,9)	1,446 (0,482 – 4,344)	0,549
DRB1*14-DQB1*05	1 (1,7)	4 (2,2)	0,771 (0,085 – 7,036)	1,000
DRB1*15-DQB1*05	1 (1,7)	2 (1,1)	1,559 (0,139 -17,506)	0,569
<b>DRB1*07-DQB1*02</b>	<b>0</b>	<b>14 (7,6)</b>		<b>0,025</b>
DRB1*07-DQB1*03(DQ9)	0	6 (3,2)		0,341
DRB1*08-DQB1*03(DQ8)	1 (1,7)	3 (1,6)	1,034 (0,106 – 10,129)	1,000
DRB1*08-DQB1*04	3 (5,0)	5 (2,7)	1,905 (0,442 – 8,220)	0,408
DRB1*9-DQB1*03(DQ9)	0	1 (0,5)		1,000

\* $\chi$  kvadrat odnosno Fisherov test kod učestalosti <5; n – broj pojedinih haplotipova, GB – Gravesova bolest; OR – omjer vjerojatnosti



Slika 4.1.3.6. Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u bolesnika s GB (N=30)

#### ***4.1.4. Analiza homozigota HLA-DRB1-DQB1***

U populaciji bolesnika s DMT1 i AITD nađeno je 15 homozigota HLA-DRB1-DQB1 u bolesnika s DMT1 te 7 u bolesnika s AITD (Tablica 4.1.4.1.).

U skupini bolesnika s DMT1 najčešće nađeni homozigoti bili su HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) u 7 bolesnika (3 bolesnika s DMT1 bez AITD i 4 bolesnika s APS3v) i HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 u 5 bolesnika (svih 5 bolesnika s APS3v) dok je u skupini bolesnika s AITD najčešće bila prisutna kombinacija dva haplotipa HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) u 4 bolesnika (2 bolesnika s AT i 2 bolesnika s GB).

Tablica 4.1.4.1. Učestalost homozigota HLA-DRB1-DQB1 u skupinama bolesnika s DMT1 i AITD

Skupine bolesnika	Homozigoti <i>HLA-DRB1-DQB1</i>	Učestalost (n)
DMT1 svi N=161	<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	5 (3,1)
	<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	7 (4,3)
	<b>DRB1*16-DQB1*05</b>	2 (1,2)
	<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	1 (0,6)
DMT1 bez AITD N=92	<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	3 (3,2)
	<b>DRB1*16-DQB1*05</b>	1 (1,1)
APS3v N=69	<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	5 (7,2)
	<b>DRB1*04-DQB1*03(DQ8)</b>	4 (5,8)
	<b>DRB1*16-DQB1*05</b>	1 (1,4)
	<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	1 (1,4)
AITD N=154	<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	2 (1,3)
	<b>DRB1*14-DQB1*05</b>	1 (0,6)
	<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	4 (2,6)
AT N=124	<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	1 (0,8)
	<b>DRB1*14-DQB1*05</b>	1 (0,8)
	<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	2 (1,6)
GB N=30	<b>DRB1*03-DQB1*02</b>	1 (0,8)
	<b>DRB1*11-DQB1*03(DQ7)</b>	2 (1,6)

n – broj pojedinih homozigota; N – ukupan broj bolesnika; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis, GB – Gravesova bolest

#### 4.2. Polimorfizam gena *CTLA-4*

U kontrolnoj skupini ispitanika za oba polimorfizma zadovoljen je Hardy-Weinbergov ekvilibrij ( $p=0,65$  za *CTLA-4* 49AG;  $p=0,06$  za *CTLA-4* CT60) (Tablica 4.2.1.)

Tablica 4.2.1. Hardy-Weinbergov ekvilibrij (HWE) ispitan je koristeći Michael H. Courtov (2005–2008) *online* kalkulator (144)

HWE		CTLA-4 49AG	CTLA-4 CT60
DMT1 svi	p	0.55	0.95
	$\chi^2$	0.357	0.003
DMT1	p	0.85	0.77
	$\chi^2$	0.036	0.086
APS3v	p	0.57	0.81
	$\chi^2$	0.323	0.060
AITD	p	0.09	0.06
	$\chi^2$	2.808	3.581
AT	p	0.27	<b>0.04</b>
	$\chi^2$	1.218	4.241
GB	p	0.14	0.93
	$\chi^2$	2.126	0.008
Kontrolna skupina	p	0.65	0.06
	$\chi^2$	0.207	3.625

HWE - Hardy-Weinbergov ekvilibrij; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; APS3v - engl.

*Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AITD – autoimuna bolest štitnjače; AT – autoimuni tiroiditis; GB – Gravesova bolest

#### 4.2.1. CTLA-4 49AG

Genotip i učestalost alela G polimorfizma CTLA-4 49AG prikazani su u tablici 4.2.1.1.

U našoj skupini bolesnika nije nađena statistički značajna povezanost polimorfizma gena CTLA-4 49AG s rizikom za nastanak DMT1 (s ili bez AITD) s omjerom vjerojatnosti od 1,64 (95% CI 0,80-3,37). Također, nije nađena statistički značajna povezanost polimorfizma 49AG s rizikom za nastanak AITD, s omjerom vjerojatnosti od 1,67 (95% CI 0,81-3,43). Veća učestalost genotipa G/G nađena je u bolesnika s DMT1 i AITD u odnosu na zdrave ispitanike (bolesnici s DMT1 - 19,4; bolesnici s AITD - 19,6%; kontrolna skupina –

12,8%), no ta razlika nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Najveća tendencija povezanosti nađena je u bolesnika s APS3v (OR 2,15; 95% CI 0,85-4,86) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika iako nije dostigla statističku značajnost ( $p = 0,06$ ).

Učestalost alela G također se ne razlikuje statistički značajno u bolesnika s DMT1 (s ili bez AITD) i bolesnika s AITD od ispitanika kontrolne skupine (42,7% u bolesnika s DMT1; 40,5% u bolesnika s AITD; 37,2% kontrolna skupina,  $p > 0,05$ ) (Tablica 4.2.1.1.)

Tablica 4.2.1.1. Učestalost genotipova i alela G polimorfizma gena CTLA-4 49AG u bolesnika s DMT1 i AITD u odnosu na skupinu zdravih ispitanika.

Genotipovi CTLA-4 49AG	Genotipovi			OR* (95% CI)	p	alel G n (%)	OR* (95% CI)	p
	G/G n (%)	A/G n (%)	A/A n (%)					
<b>DMT1</b>								
Svi; N=165	32 (19,4)	77 (46,7)	56 (33,9)	1,64 (0,80-3,37)	0,17	141 (42,7)	1,26 (0,87-1,82)	0,22
APS3v; N=71	17 (23,9)	33 (46,5)	21 (29,6)	2,15 (0,95-4,86)	0,06	67 (47,2)	1,51 (0,96-2,35)	0,07
DMT1 bez AITD; N=94	15 (16,0)	44 (46,8)	35 (37,2)	1,30 (0,57-2,95)	0,53	74 (39,4)	1,09 (0,72-1,66)	0,67
<b>AITD</b>								
Svi; N=158	31 (19,6)	66 (41,8)	61 (38,6)	1,67 (0,81-3,43)	0,16	128 (40,5)	1,15 (0,79-1,66)	0,47
AT; N=127	26 (20,5)	56 (44,1)	45 (35,4)	1,76 (0,84-3,70)	0,13	108 (42,5)	1,25 (0,85-1,84)	0,26
GB; N=31	5 (16,1)	10 (32,3)	16 (51,6)	1,31 (0,42-4,08)	0,76	20 (32,3)	0,80 (0,44-1,48)	0,48
Kontrolna skupina; N=94	12 (12,8)	46 (48,9)	36 (38,3)			70 (37,2)		

\*za G/G genotip; n – broj pojedinih genotipova/alela; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis, GB – Gravesova bolest; OR – omjer vjerojatnosti

Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma 49AG na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 nisu pokazale statistički značajnu povezanost polimorfizma 49AG gena CTLA-4 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s DMT1 s/ili bez AITD ( $p > 0,05$ ) (Slika 4.2.1.1.. Tablica 4.2.1.2.).

Tablica 4.2.1.2. Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 ovisno o genotipu polimorfizma 49AG gena CTLA-4.

Genotipovi CTLA-4 49AG	Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze					
	DMT1 svi* (N=165)		DMT1 bez AITD** (N=94)		APS3v*** (N=71)	
	Dob	95% CI	Dob	95% CI	Dob	95% CI
A/A	8,03	6,93-9,14	8,34	7,07-9,60	7,55	5,51-9,59
A/G	8,27	7,40-9,14	8,79	7,70-9,89	7,57	6,18-8,97
G/G	9,11	7,45-10,47	9,60	7,60-11,60	8,67	6,78-10,57
<b>Ukupno</b>	8,36	7,75-8,97	8,76	8,00-9,52	7,83	6,84-8,82

\*Log Rank (Mentel-Cox)  $\chi^2$  1.220. p=0.54; \*\* $\chi^2$  1.815. p=0.40; \*\*\* $\chi^2$  0.353. p=0.84; n – broj pojedinih genotipova/alela; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*

U bolesnika s AITD nađena je statistički značajna razlika u srednjoj dobi bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze (p=0,047) tako da je u bolesnika nosioca rizičnog genotipa G/G te u bolesnika nosioca genotipa A/G srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze niža u odnosu na nosioce genotipa A/A (11,82 godina u bolesnika s genotipom G/G; 11,79 godina u bolesnika s genotipom A/G i 13,44 godine u bolesnika s genotipom A/A).

Kada se skupina bolesnika s AITD podijeli na podskupine bolesnika s AT i GB, u bolesnika s AT također je srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze niža u bolesnika koji nose genotip G/G (11,05 godina) i genotip AG (11,32 godina) u odnosu na nosioce genotipa A/A (12,54 godine), no ta razlika nije bila statistički značajna (p=0,13).

S druge strane, dob bolesnika s GB u vrijeme postavljanja dijagnoze u nosioca sva tri genotipa polimorfizma CTLA-4 49AG je podjednaka (za genotip G/G bila je 15,97 godina, genotip A/G 14,44 godine i genotipa A/A 15,81 godina; p=0,87) (Slika 4.2.1.2. Tablica 4.2.1.3.)

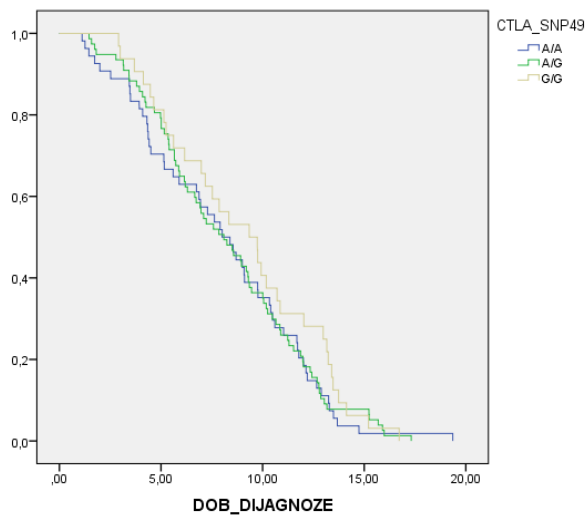
Tablica 4.2.1.3. Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD ovisno o genotipu CTLA-4 49AG.

Genotipovi CTLA-4 49AG	Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze					
	AITD* (N=158)		AT** (N=127)		GB*** (N=31)	
	Dob	95% CI	Dob	95% CI	Dob	95% CI
A/A	13,44	12,50-14,38	12,54	11,61-13,50	15,97	13,92-18,02
A/G	11,79	10,82-12,76	11,32	10,36-12,27	14,44	11,25-17,64
G/G	11,82	10,40-13,24	11,05	9,71-12,39	15,81	11,62-20,00
<b>ukupno</b>	12,43	11,81-13,06	11,70	11,09-12,30	15,45	13,87-17,04

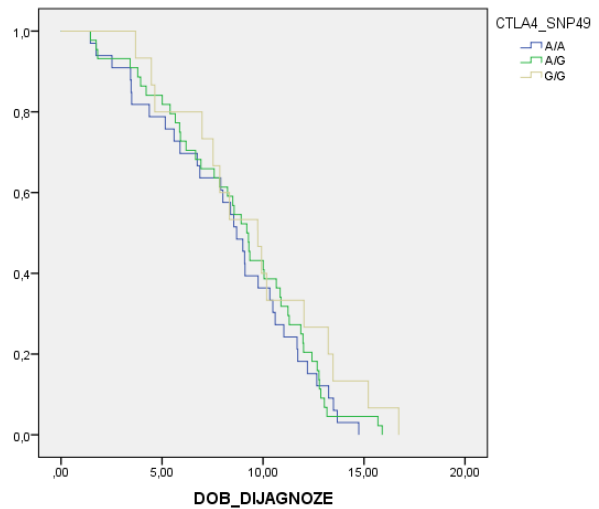
\* Log Rank (Mentel-Cox)  $\chi^2$  6.124. **p=0.047** \*\* $\chi^2$  4.157. p=0.13; \*\*\* $\chi^2$  0.270. p=0.87; AITD

– autoimuna bolest štitnjače; AT – autoimuni tiroiditis, GB – Gravesova bolest

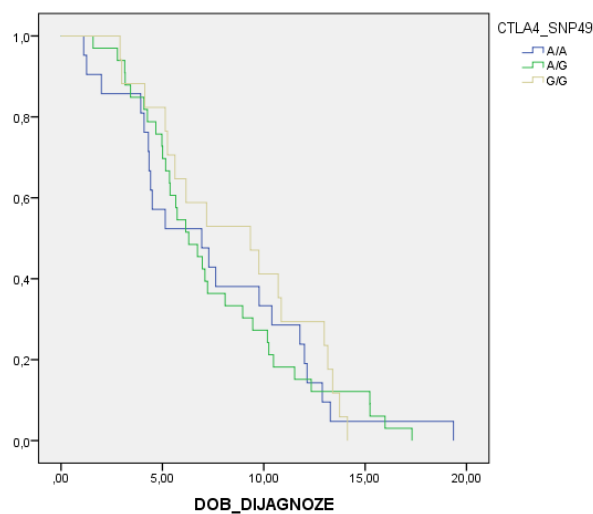
a. svi bolesnici s DMT1



b. bolesnici s DMT1 bez AITD



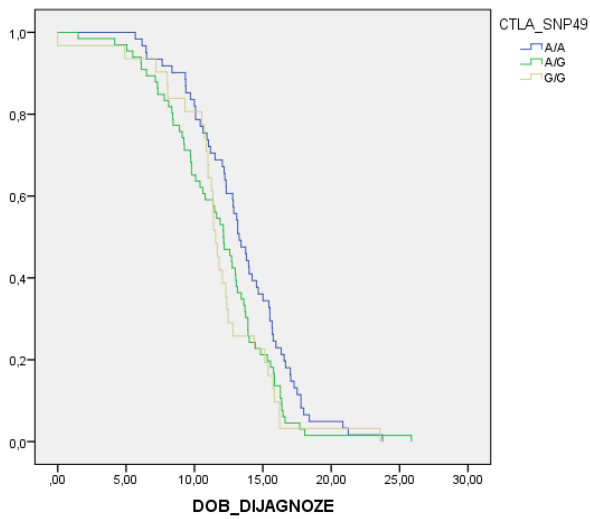
c. bolesnici s APS3v



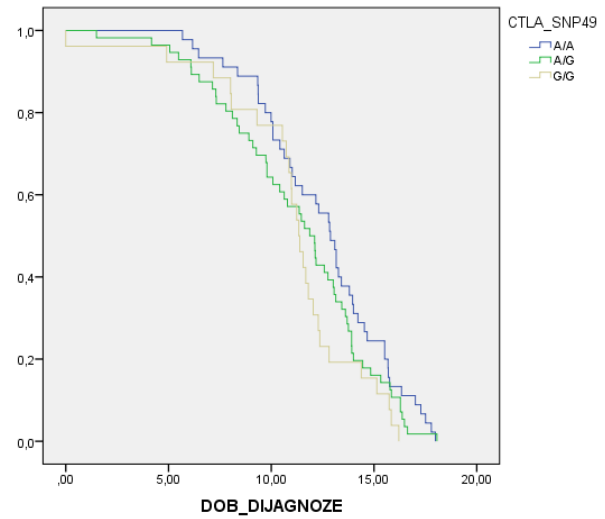
Slika 4.2.1.1. Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma 49AG na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1. Grafovi pokazuju učinak genotipa CTLA-4 49AG na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 (sa ili bez AITD). Vrijeme ispod krivulje ekvivalentno je dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze



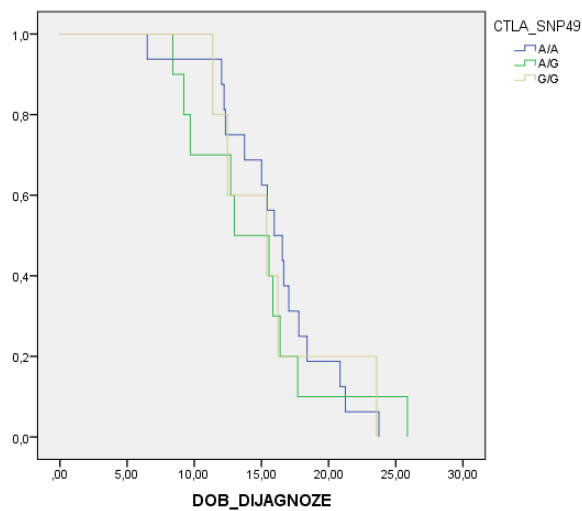
a. svi bolesnici s AITD



b. bolesnici s AT



c. bolesnici s GB



Slika 4.2.1.2. Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma 49AG na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD. Grafovi pokazuju učinak genotipa CTLA-4 49AG na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD (AT i GB). Vrijeme ispod krivulje ekvivalentno je dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze

Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti alela G i raspodjeli genotipa polimorfizma 49AG gena CTLA-4 između dječaka i djevojčica (Tablica 4.2.1.4.)

Tablica 4.2.1.4. Raspodjela genotipova i učestalost alela G polimorfizma 49AG gena CTLA-4 u bolesnika s DMT1 (N=165) i AITD (N=158) ovisno o spolu.

CTLA-4 49AG	DMT1				AITD			
	M (%)	Ž (%)	OR* (95% CI)	p	M (%)	Ž (%)	OR* (95% CI)	p
A/A	23 (33,8)	33 (34,0)	1,14 (0,61-2,11)	0,98	15 (41,7)	46 (37,7)	1,18 (0,55-2,52)	0,67
A/G	33 (48,5)	44 (45,4)	0,92 (0,41-2,08)	0,69	17 (47,2)	49 (40,2)	1,33 (0,63-2,82)	0,45
G/G	12 (17,6)	20 (20,6)	0,83 (0,37-1,83)	0,64	4 (11,1)	27 (22,1)	0,44 (0,14-1,35)	0,14
alel G	57 (41,9)	84 (43,3)	0,95 (0,61-1,47)	0,80	25 (34,7)	103 (42,2)	0,73 (0,41-1,26)	0,26

M – muškarci, Ž – žene; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolesti štitnjače, OR – omjer vjerojatnosti

#### 4.2.2. CTLA-4 CT60

Genotip i učestalost genotipa G/G te alela G polimorfizma CTLA-4 CT60 prikazani su u tablici 4.2.2.1.

Polimorfizam gena CTLA-4 CT60 statistički je značajno češći u svih bolesnika s DMT1 s omjerom vjerojatnosti za genotip G/G od 2,18 (95% CI 1,23-3,86; p=0,007) jednako u bolesnika s DMT1 bez AITD i APS3v (OR 2,12; p=0,02 i OR 2,26; p=0,01, kako slijedi).

Rizični genotip G/G polimorfizma CTLA-4 CT60 također je statistički značajno češći u skupini bolesnika s AITD u odnosu na kontrolnu skupinu (40,5% prema 23,4%. kako slijedi) s omjerom vjerojatnosti od 2,23 (95% CI 1,25-3,95).

Kada se skupina bolesnika s AITD podijeli na podskupine bolesnika s AT i GB, genotip G/G nađen je statistički značajno češće u bolesnika s AT, s omjerom vjerojatnosti za nastanak bolesti od 2,42 (95% CI 1,34-4,38); p=0,003 dok je u bolesnika s GB učestalost genotipa G/G bila veća no ne i statistički značajno različita u odnosu na ispitanike kontrolne skupine (OR 1,56; 95% CI 0,64-3,80; p=0,33). Genotip A/G nađen je statistički značajno manje u bolesnika s AT (38,6%; p=0,002) odnosno AITD (40,5%; p=0,003) u odnosu na kontrolnu skupinu (59,6%).

Učestalost alela G statistički je značajno veća u bolesnika s DMT1 (OR 1,52, 95% CI 1,06 – 2,19,  $p=0,02$ ) i to na račun bolesnika s DMT1 bez AITD (OR 1,52, 95% CI 1,01 – 2,30,  $p=0,047$ ) u odnosu na kontrolu, dok je u bolesnika s APS3v kao i u bolesnika s AITD učestalost alela G veća u odnosu na kontrolnu skupinu, no ta razlika nije statistički značajna (Tablica 4.2.2.1.).

Tablica 4.2.2.1. Genotip i frekvencija alela G polimorfizma gena CTLA-4 CT60 u bolesnika s DMT1 (N=165) i AITD (N=158) u odnosu na skupinu zdravih ispitanika (N=94).

CTLA-4 CT60	Genotipovi			OR* (95% CI)	p	alel G n (%)	OR* (95% CI)	p
	G/G n (%)	A/G n (%)	A/A n (%)					
<b>DMT1</b>								
Svi (N=165)	66 (40,0)	77 (46,7)	22 (13,3)	<b>2,18 (1,23-3,86)</b>	<b>&lt;0,01</b>	209 (63,3)	<b>1,52 (1,06-2,19)</b>	<b>0,02</b>
APS3v (N=71)	29 (40,8)	32 (45,1)	10 (14,1)	<b>2,26 (1,15-4,43)</b>	<b>0,02</b>	90 (63,4)	1,52 (0,98-2,38)	0,06
DMT1 bez AITD (N=94)	37 (39,4)	45 (47,9)	12 (12,8)	<b>2,12 (1,13-3,99)</b>	<b>0,02</b>	119 (63,3)	<b>1,52 (1,01-2,30)</b>	<b>0,04</b>
<b>AITD</b>								
Svi (N=158)	64 (40,5)	64 (40,5)	30 (19,0)	<b>2,23 (1,26-3,95)</b>	<b>&lt;0,01</b>	192 (60,8)	1,36 (0,95-1,96)	0,10
AT (N=127)	54 (42,5)	49 (38,6)	24 (18,9)	<b>2,42 (1,34-4,38)</b>	<b>0,003</b>	157 (61,8)	1,42 (0,97-2,09)	0,07
GB (N=31)	10 (32,3)	15 (48,4)	6 (19,4)	1,56 (0,64-3,80)	0,33	35 (56,5)	1,14 (0,64-2,03)	0,65
Kontrolna skupina (N=94)	22 (23,4)	56 (59,6)	16 (17,0)			100 (53,2)		

\*za G/G genotip; n – broj pojedinih genotipova/alela; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis, GB – Gravesova bolest; OR – omjer vjerojatnosti

Kaplan Mayerove krivulje nisu pokazale statistički značajnu povezanost polimorfizma CT60 gena CTLA-4 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s DMT1 s/ili bez AITD ( $p>0,05$ ) iako je srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u bolesnika s APS3v nosioca genotipa G/G i AG niža (8,24 godine i 6,71 godina) nego u bolesnika nosioca A/A genotipa (10,22 godina), no ta razlika nije statistički značajna (Slika 4.2.2.1., Tablica 4.2.2.2.).

Tablica 4.2.2.2. Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 ovisno o genotipu CTLA-4 CT60.

Genotipovi CTLA-4 CT60	Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1					
	DMT1 svi* (N=165)		DMT1 bez AITD** (N=94)		APS3v*** (N=71)	
	Dob	95% CI	Dob	95% CI	Dob	95% CI
A/A	8,79	6,81-10,77	7,48	5,00-9,96	10,22	7,21-13,24
A/G	7,93	7,02-8,83	8,81	7,75-9,89	6,71	5,24-8,19
G/G	8,72	7,82-9,62	9,09	7,89-10,29	8,24	6,89-9,59
<b>ukupno</b>	8,36	7,75-8,97	8,76	8,00-9,53	7,83	6,84-8,82

\*Log Rank (Mentel-Cox)  $\chi^2$  1,235, p=0,54; \*\* $\chi^2$  0,70, p=0,70; \*\*\* $\chi^2$  3,087, p=0,21; n – broj pojedinij genotipova/alela; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*

U bolesnika s AITD nađena je statistički značajna razlika u dobi bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze (p=0,03) tako da su bolesnici nosioci rizičnog genotipa G/G najmlađi (11,48 godina), slijede nosioci genotipa A/G (12,92 godine), dok su nosioci genotipa A/A u vrijeme postavljanja dijagnoze bili najstariji (13,44 godina) (Slika 4.2.2.2.. tablica 4.2.2.3).

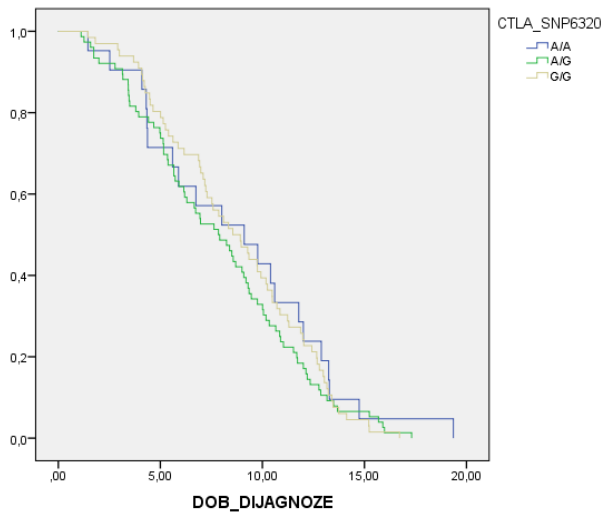
S druge strane kada se skupina bolesnika s AITD podijeli na podskupine bolesnika s AT ili GB nije nađena statistički značajna razlika između dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze i genotipa CTLA-4 CT60 (p>0,05) iako su bolesnici s AT, nosioci genotipa G/G također bili mlađi u vrijeme postavljanja dijagnoze (10,94 godina) u odnosu na nosioce genotipa A/G (12,3 godine) i nosioce genotipa A/A (12,16 godina), ali ta razlika nije statistički značajna (Slika 4.2.2.2.. Tablica 4.2.2.3)

Tablica 4.2.2.3. Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD ovisno o genotipu CTLA-4 CT60.

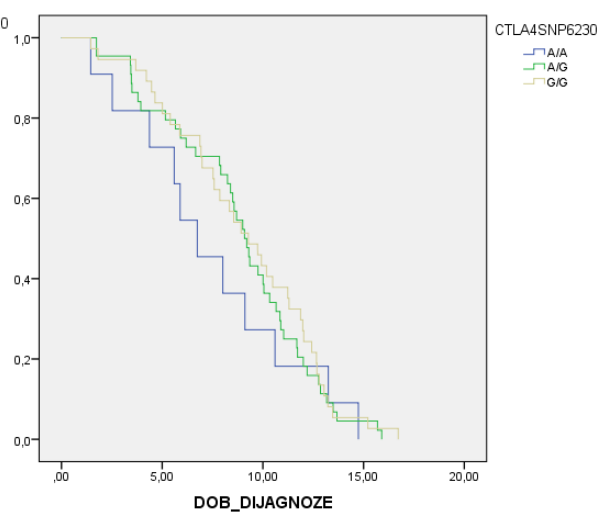
Genotipovi CTLA-4 CT60	Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD					
	AITD* (N=158)		AT** (N=127)		GB*** (N=31)	
	Dob	95% CI	Dob	95% CI	Dob	95% CI
A/A	13,44	11,92-14,95	12,16	11,80-13,55	15,97	13,92-18,02
A/G	12,92	12,01-13,83	12,30	11,41-13,19	14,44	11,25-17,64
G/G	11,48	10,50-12,46	10,94	9,95-11,93	15,81	11,62-20,00
<b>Ukupno</b>	<b>12,43</b>	<b>11,81-13,06</b>	11,70	11,09-12,30	15,45	13,87-17,04

\* Log Rank (Mentel-Cox)  $\chi^2$  6,800, p=0,03, \*\* $\chi^2$  3,043, p=0,22; \*\*\* $\chi^2$  0,270, p=0,87; AITD – autoimuna bolest štitnjače; AT – autoimuni tiroiditis; GB – Gravesova bolesti

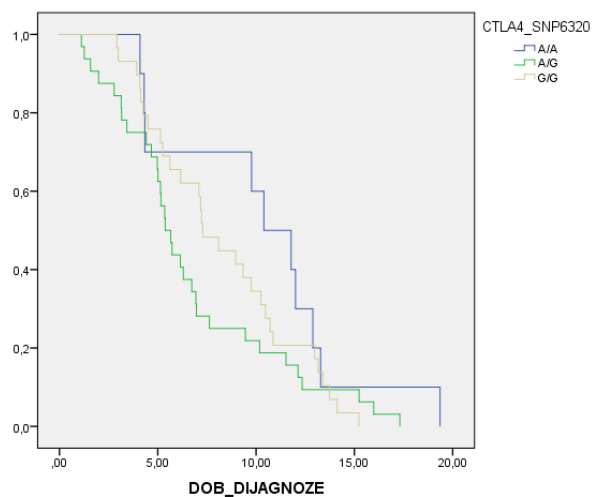
a. svi bolesnici s DMT1



b. bolesnici s DMT1 bez AITD

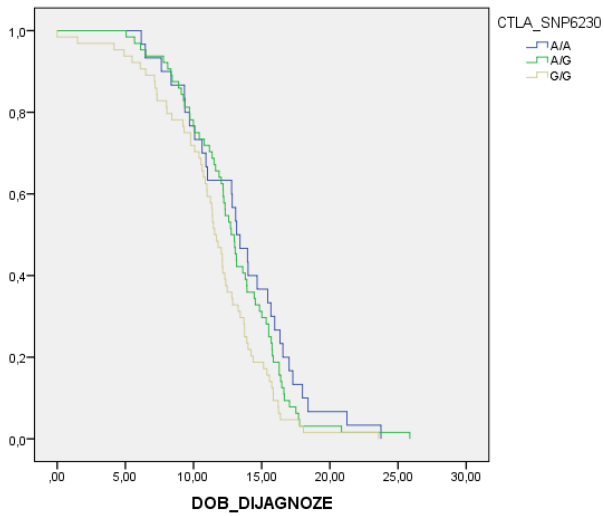


c. bolesnici s APS3v

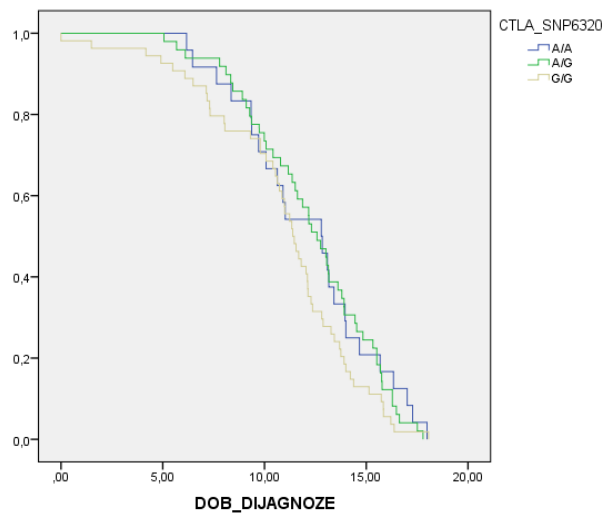


Slika 4.2.2.1. Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma CT60 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1. Grafovi pokazuju učinak genotipa CTLA-4 CT60 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 (s ili bez AITD). Vrijeme ispod krivulje ekvivalentno je dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze.

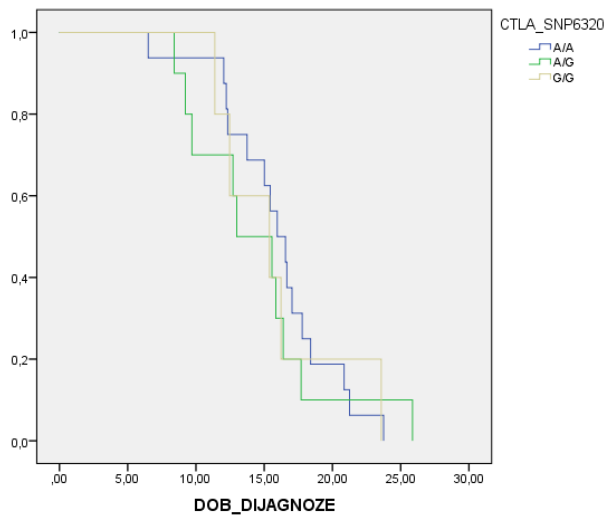
a. svi bolesnici s AITD



b. bolesnici s AT



c. bolesnici s GB



Slika 4.2.2.2. Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma CT60 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD. Grafovi pokazuju učinak genotipa CTLA-4 CT60 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD (AT i GB). Vrijeme ispod krivulje ekvivalentno je dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze

Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti alela G i raspodjeli genotipa polimorfizma CT60 gena CTLA-4 između dječaka i djevojčica (Tablica 4.2.2.4.)

Tablica 4.2.2.4. Raspodjela genotipova i učestalost alela G polimorfizma 49AG gena CTLA-4 u bolesnika s DMT1 (N=165) i AITD (N=158) ovisno o spolu.

CTLA-4 CT60	DMT1				AITD			
	M (%)	Ž (%)	OR* (95% CI)	p	M (%)	Ž (%)	OR* (95% CI)	p
A/A	11 (16,2)	11 (11,3)	1,51 (0,61-3,71)	0,37	6 (16,7)	24 (19,7)	0,82 (0,31-2,19)	0,69
A/G	30 (44,1)	47 (48,5)	0,84 (0,45-1,57)	0,58	17 (47,2)	47 (38,5)	1,43 (0,68-3,02)	0,35
G/G	27 (39,7)	39 (40,2)	0,98 (0,52-1,84)	0,95	13 (36,1)	51 (41,8)	0,79 (0,37-1,70)	0,54
alel G	84 (61,8)	125 (64,4)	0,89 (0,57-1,40)	0,62	43 (59,7)	149 (61,1)	0,95 (0,55-1,62)	0,84

M – muškarci, Ž – žene; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolesti štitnjače, OR – omjer vjerojatnosti

### 4.3. Polimorfizam R620W gena PTPN22

Učestalosti genotipova C/C, C/T i T/T te alela T polimorfizma R620W gena PTPN22 prikazani su u Tablici 4.3.1.

Učestalost alela T gena PTPN22 R20W statistički je značajno češća u svih bolesnika s DMT1 s omjerom vjerojatnosti od 2,62 (95% CI 1,36-5,06; p=0,003) i to prvenstveno u bolesnika s APS3v (OR 3,93, 95% CI 1,93-7,99; p<0,001) dok je u bolesnika s DMT1 bez AITD učestalost T alela također češća ali ta razlika u odnosu na zdrave ispitanike nije statistički značajna (OR 1,75; p=0,14). Individualnom analizom također je nađena statistički značajno veća učestalost osoba s genotipom T/T u svih bolesnika s DMT1 (p=0,01) i to prvenstveno u bolesnika s APS3v (p<0,01) dok u bolesnika samo s DMT1 ta razlika nije bila statistički značajna (p=0,12).

U bolesnika s AITD, alel T je također statistički značajno češći u cijeloj skupini bolesnika u odnosu na ispitanike kontrolne skupine s omjerom vjerojatnosti od 2,13 (95% CI



1,09-4,16,  $p=0,02$ ) i to prvenstveno u bolesnika s GB (OR 3,16; 95% CI 1,32-7,59,  $p<0,01$ ) dok je u bolesnika s AT, alel T također bio češći nego u kontrolnoj skupini bolesnika no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,07$ ). S druge strane, analizom genotipova nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika s AITD i ispitanika kontrolne skupine u raspodjeli genotipova T/T, C/T i C/C.

Tablica 4.3.1. Genotip i frekvencija alela T polimorfizma R620W gena PTPN22 u bolesnika s DMT1 i AITD u odnosu na skupinu zdravih ispitanika.

PTPN22 R620W	Genotipovi			OR* (95% CI)	p	alel T	OR* (95% CI)	p
	T/T n (%)	T/C n (%)	C/C n (%)					
<b>DMT1</b>								
Svi (N=165)	10 (5,9)	32 (18,9)	127 (86,1)	/	0,01	52 (15,4)	2,62 (1,36-5,06)	0,003
APS3v (N=71)	6 (8,5)	18 (25,4)	47 (66,2)	/	<0,01	30 (21,1)	3,93 (1,93-7,99)	<0,001
DMT1 bez AITD (N=94)	4 (4,3)	12 (12,8)	78 (83,0)	/	0,12	20 (10,6)	1,75 (0,83-3,68)	0,14
<b>AITD</b>								
Svi (N=158)	2 (1,3)	36 (22,8)	120 (75,9)	/	0,53	40 (12,7)	2,13 (1,09-4,16)	0,02
AT (N=127)	1 (0,8)	27 (21,3)	99 (78,0)	/	1	29 (11,4)	1,89 (0,94-3,81)	0,07
GB (N=31)	1 (3,2)	9 (29,0)	21(67,7)	/	0,24	11 (17,1)	3,16 (1,32-7,59)	<0,01
Kontrolna skupina (N=94)	0 (0)	12 (12,8)	82 (87,2)			12 (6,4)		

\*za genotip T/T; n – broj pojedinih genotipova/alela; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis, GB – Gravesova bolest; OR – omjer vjerojatnosti

Kaplan Mayerovovim krivuljama utjecaja polimorfizma PTPN22 R620W na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 nađena je statistički značajna razlika u srednjoj dobi bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze ( $p=0,037$ ), tako da je srednja dob u bolesnika nosioca genotipa C/C (11,48 godina) viša u odnosu na nosioce genotipa s rizičnim alelom T (u nosioca genotipa T/T 7,56 godina, a u nosioca genotipa C/T 6,95 godina) (Slika 4.3.1., Tablica 4.3.2.).

Tablica 4.3.2. Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 ovisno o genotipu PTPN22 R620W.

Genotipovi PTPN22 R620W	Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1					
	DMT1 svi* (N=165)		DMT1 bez AITD** (N=94)		APS3v*** (N=71)	
	Dob	95% CI	Dob	95% CI	Dob	95% CI
C/C	<b>8,77</b>	<b>8,06-9,48</b>	7,48	5,00-9,96	8,37	7,12-9,59
C/T	<b>6,95</b>	<b>5,55-8,3</b>	8,81	7,74-9,88	6,42	4,47-8,38
T/T	<b>7,56</b>	<b>5,78-9,33</b>	9,09	7,89-10,30	7,86	5,93-9,78
<b>ukupno</b>	<b>8,36</b>	<b>7,75-8,97</b>	8,76	8,00-9,53	7,83	6,84-8,82

\*Log Rank (Mentel-Cox)  $\chi^2$  6.574. **p=0.037**; \*\* $\chi^2$  0.704. p=0.70; \*\*\* $\chi^2$  2.726. p=0.26; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolest štitnjače; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*

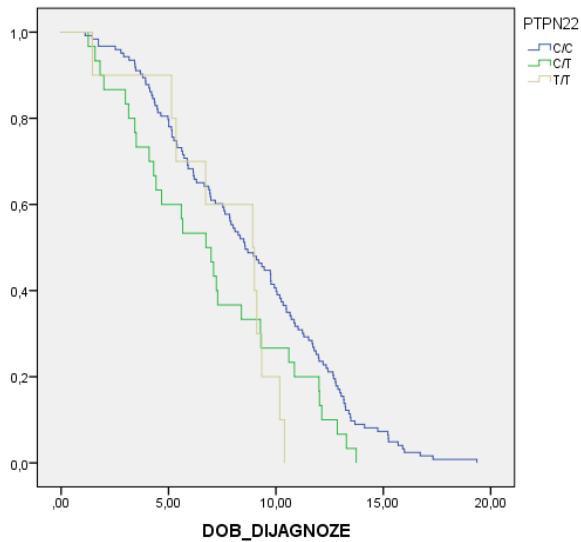
U bolesnika s AITD nije nađena statistički značajna razlika u srednjoj dobi bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze, osim u bolesnika s AT u kojih je srednja dob u nosioca rizičnog TT genotipa bila statistički značajno niža od nosioca druga dva genotipa (p=0,001) (Slika 4.3.2. Tablica 4.3.3.)

Tablica 4.3.3. Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD ovisno o genotipu PTPN22 R620W.

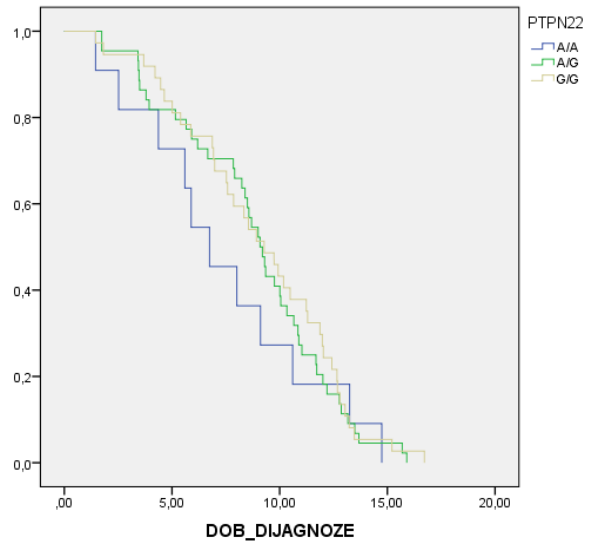
Genotipovi PTPN22 R620W	Srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD					
	AITD* (N=158)		AT** (N=127)		GB*** (N=31)	
	Dob	95% CI	Dob	95% CI	Dob	95% CI
C/C	12,40	11,68-13,12	11,75	11,07-12,42	15,88	14,09-17,68
C/T	12,45	11,17-13,74	11,77	10,40-13,14	14,12	10,64-17,60
T/T	14,09	5,66-22,53	5,06	5,06-5,06	18,40	18,40-18,40
<b>ukupno</b>	12,43	11,81-13,06	11,70	11,09-12,30	15,45	13,87-17,04

\* Log Rank (Mentel-Cox)  $\chi^2$  0.777. p=0.68 \*\* $\chi^2$  23.223. **p=0.001**; \*\*\* $\chi^2$  0.696. p=0.71; AITD – autoimuna bolest štitnjače, AT – autoimuni tiroiditis, GB – Gravesova bolest

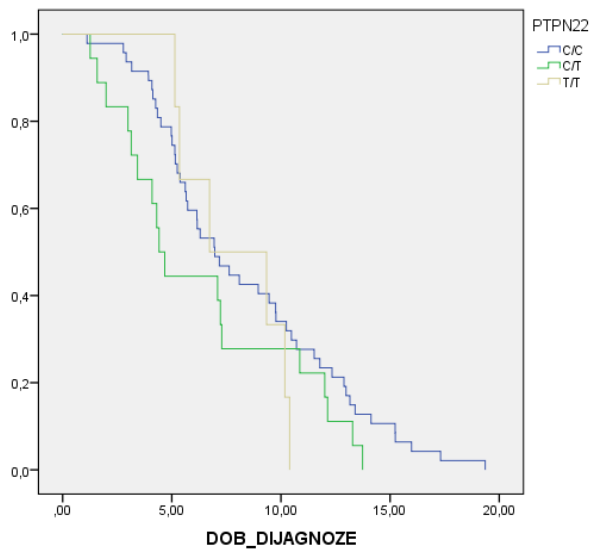
a. svi bolesnici s DMT1



b. bolesnici s DMT1 bez AITD

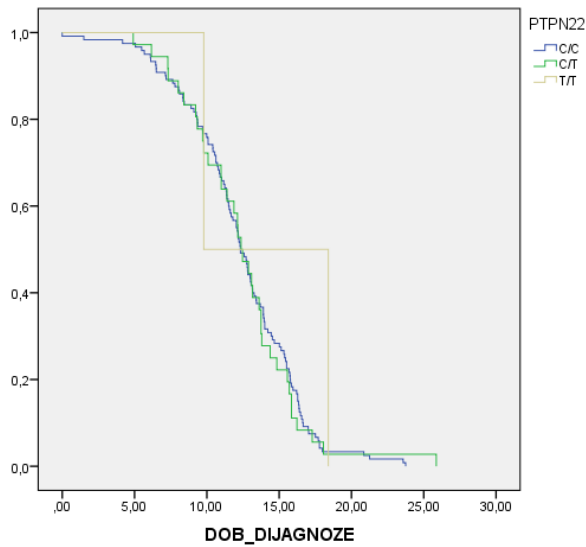


c. bolesnici s APS3v

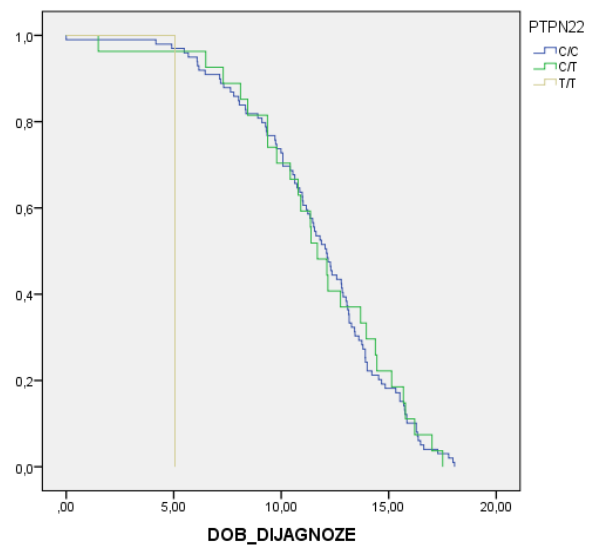


Slika 4.3.1. Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma R620W gena PTPN22 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1. Grafovi pokazuju učinak genotipa PTPN22 R620W na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 (s ili bez AITD). Vrijeme ispod krivulje ekvivalentno je dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze.

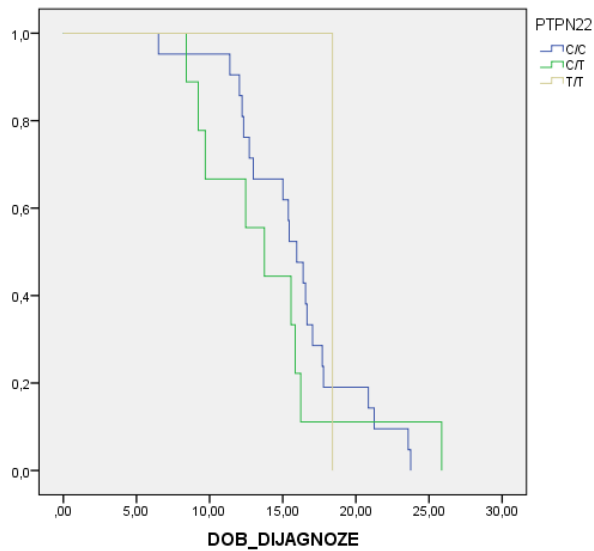
a. svi bolesnici s AITD



b. bolesnici s AT



c. bolesnici s GB



Slika 4.3.2. Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma R620W gena PTPN22 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD. Grafovi pokazuju učinak genotipa PTPN22 R620W na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD (AT i GB). Vrijeme ispod krivulje ekvivalentno je dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze

Tablica 4.3.4. Raspodjela genotipova i alela G polimorfizma R620W gena PTPN22u bolesnika s DMT1 (N=165) i AITD (N=158) ovisno o spolu.

PTPN22 R620W	DMT1		OR* (95% CI)	P	AITD		OR* (95% CI)	p
	M (%)	Ž (%)			M (%)	Ž (%)		
C/C	55 (80,9)	70 (72,2)	1,14 (0,61-2,11)	0,98	28 (75,8)	92 (75,4)	1,41 (0,47-2,77)	0,77
C/T	9 (13,2)	21 (21,6)	0,92 (0,41-2,08)	0,69	7 (19,4)	29 (23,8)	0,77 (0,31-1,95)	0,58
T/T	4 (5,9)	6 (6,2)	0,83 (0,37-1,83)	0,64	1 (2,8)	1 (0,8)	3,45 (0,21-56,69)	0,41
alel T	17 (12,5)	33 (17,0)	0,69 (0,37-1,31)	0,26	9 (12,5)	31 (12,7)	0,98 (0,44-2,17)	0,96

M – muškarci, Ž – žene; DMT1 – dijabetes melitus tip 1, AITD – autoimuna bolesti štitnjače, OR – omjer vjerojatnosti

#### 4.4. Povezanost gena HLA razreda II, CTLA-4 (49AG i CT60) i PTPN22 s visinom titra TPO i Tg antitijela u bolesnika s AITD i APS3v

U analizi statističke značajnosti razlike u visini titra Tg i TPO antitijela ovisno o genotipu gena CTLA-4 (49AG i CT60) i PTPN22 u bolesnika s AITD i APS3v korišten je Kruskal-Wallisov test.

Tablica 4.4.1. Povezanost polimorfizma gena CTLA-4 (49AG i CT60) i PTPN22 u bolesnika s APS3v i AITD (AT i GB).

	APS3v (N=71)		AT (N=127)		GB (N=31)	
	Tg At $\chi^2$ (p)	TPO At $\chi^2$ (p)	Tg At $\chi^2$ (p)	TPO At $\chi^2$ (p)	Tg At $\chi^2$ (p)	TPO At $\chi^2$ (p)
<b>CTLA-4 49AG</b>	5,79 (0,06)	4,95 (0,08)	0,91 (0,63)	0,74 (0,69)	0,17 (0,92)	0,43 (0,81)
<b>CTLA-4 CT60</b>	0,43 (0,81)	1,25 (0,54)	<b>6,82 (0,03)</b>	2,02 (0,36)	1,34 (0,51)	1,81 (0,41)
<b>PTPN22 R620W</b>	2,99 (0,22)	5,29 (0,07)	1,05 (0,59)	3,24 (0,20)	1,38 (0,50)	1,09 (0,58)

APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis, GB – Gravesova bolest; TPO At – antitijela na tiroidnu peroksidazu, Tg At – antitijela protiv tiroglobulina; OR – omjer vjerojatnosti

Koristeći Mann-Whitney-ev test u bolesnika s AT nađena je statistički značajna razlika u razini Tg antitijela između genotipa A/G i G/G gena CTLA4 CT60 ( $z = -2.569$ ;  $p = 0.01$ ), tako da je titar Tg antitijela bio značajno viši u bolesnika s AT i rizičnim genotipom G/G. Uključen je Bonferonijev efekt.

#### ***4.5. Raspodjela gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 u braće i sestara s DMT1 i AITD***

Analiza polimorfizama gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 provedena je u četvero braće i sestara bolesnika s DMT1 (troje s DMT1 bez AITD i jednog s APS3v) te u desetero braće i sestara bolesnika s AT koji imaju istu bolest.

Od troje parova braće i sestara s DMT1, jedan je par sestara identičan HLA, jedan par braće je haploidentičan dok je treći par braće različit za gene DRB1 i DQB1. S druge strane, svo troje parova braće i sestara identično je za polimorfizme gena CTLA 4 i PTPN22.

Dvije sestre, dvojajčane blizanke, koje obje boluju od APS3v, identične su za gene HLA razreda II te za polimorfizme CTLA-4 gena, dok je rizični genotip T/T gena PTPN22 nađen u sestri koja ima viši titar antitiroidnih antitijela i antitijela na beta stanice otočića pankreasa i u kojoj je ranije dijagnosticiran AITD dok se klinička slika DMT1 razvila godinu dana kasnije nego u sestri u kojoj je nađen genotip C/T gena PTPN22.

Od desetero parova braće i sestara s AT, tri para je identično za gene HLA razreda II, a sedam parova haploidentično. U ovoj skupini bolesnika nisu nađeni parovi braće i sestara s istom bolešću i različitim haplotipovima za gene HLA-DRB1 i DQB1. S druge strane, podudarnost u polimorfizmu CTLA-4 49AG nađena je u sedam parova braća i sestara, u polimorfizmu CTLA-4 CT60 gena u pet parova, dok je podudarnost u polimorfizmu gena PTPN22 nađena u devet parova braće i sestara s AT.

Tablica 4.5.1. Kliničke i demografske karakteristike te raspodjela genotipova gena HLA-DRB1 i DQB1, polimorfizama 49AG i CT60 gena CTLA-4 i polimorfizama R620W gena PTPN22 u braće i sestara s DMT1, APS3v i AITD.

Broj	inicijali	spol	dg	dob	ICA	GAD	IA-2	TgAt	TPOAt	Genotip HLA	Genotip		
										DRB1-DQB1/ DRB1-DQB1	CTLA-4 49AG	CTLA-4 CT60	PTPN22 R620W
1	BL	m	DMT1	13,82	0,5	11,7	0	0	11	03-02/04-03(DQ8)	A/G	G/G	C/T
2	BL	m	DMT1	9,28	0	0	244,8	0	0	01-05/04-03(DQ8)	A/G	G/G	C/T
3	PA	ž	DMT1	11,03	2	651,7	0	0	0	03-02/04-03(DQ8)	A/A	A/G	C/C
4	PI	ž	DMT1	5,11	2	0	21,6	31	0	03-02/04-03(DQ8)	A/A	A/G	C/C
5	VD	m	DMT1	13,47	1,5	0	0	0	0	04-03(DQ8)/11-03(DQ7)	G/G	G/G	C/C
6	VM	m	DMT1	4,37	2	0	0	0	14	01-05/03-02	G/G	G/G	C/C
7	MA	ž	APS3v	5,31	3	43,4	0	62	608	03-02/04-03(DQ8)	A/G	A/G	C/T
8	MM	ž	APS3v	6,73	0,5	693	30,8	269,7	>2000	03-02/04-03(DQ8)	A/G	A/G	T/T
9	BL	ž	AT	13,54				755	269	11-03(DQ7)/14-05	A/A	A/G	C/T
10	BM	ž	AT	12,14				722,5	1099	11-03(DQ7)/04-03(DQ8)	A/G	G/G	C/T
11	BK	ž	AT	15,47	0,5	0	0,0	32,1	25	07-02/16-05	A/G	A/G	C/T
12	BM	ž	AT	10,99	0,5	0	0,0	28	51	07-02/03-02	G/G	G/G	C/T
13	JF	m	AT	16,16	0	0	0,0	43	201	03-02/04-03(DQ8)	A/A	A/A	C/C
14	JM	ž	AT	14,67	0,5	0	0,0	83	1712	03-02/04-03(DQ8)	A/A	A/A	C/C
15	KI	m	AT	15,85	0	0	0,0	421	>2000	01-05/03-02	A/G	G/G	C/T
16	KL	m	AT	11,08	0,5	0	0,0	56	585	01-05/07-02	A/G	A/G	C/C
17	KG	ž	AT	17,79	0	0	0,0	68	>2000	07-02/13-06	A/A	A/G	C/C
18	KM	ž	AT	15,44	0	0	0,0	27	157	07-02/13-06	A/A	A/A	C/C
19	PK	ž	AT	10,63	0,5	0	0,0	385,5	479,3	04-03(DQ7)/09-03(DQ9)	A/G	G/G	C/C
20	PM	ž	AT	7,14	0	0	0,0	438,5	>2000	04-03(DQ7)/09-03(DQ9)	A/G	G/G	C/C
21	PM	ž	AT	11,07	0	0	0,0	24	27	15-06/16-05	A/A	A/A	C/C
22	PN	ž	AT	7,64	0	0	0,0	119,5	21	13-06/16-05	A/A	A/A	C/C
23	RB	ž	AT	13,16	1,5	0	0,0	177,2	>2000	03-02/13-06	A/A	A/G	C/C
24	RP	ž	AT	8,93	0	0	0,0	21	>2000	01-05/13-06	A/G	A/G	C/C
25	RA	ž	AT	15,39	0	0	0,0	266,3	122	03-02/13-06	A/A	A/A	C/T
26	RK	ž	AT	17,28	1	1193	0,0	642,6	1112	03-02/16-05	A/A	A/A	C/T
27	ŠA	m	AT	9,74	0,5	0	0,0	99,5	>2000	11-03(DQ7)/16-05	A/G	A/G	C/C
28	ŠJ	m	AT	13,43	0	0	0,0	440	>2000	11-03(DQ7)/11-03(DQ7)	A/G	G/G	C/C



DMT1 – dijabetes melitus tip 1, APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; AT – autoimuni tiroiditis, TPO At – antitijela na tiroidnu peroksidazu, Tg At – antitijela protiv tiroglobulina; ICA - engl. *Islet Cell Cytoplasmic Autoantibody*; GAD - engl. *Glutamic Acid Decarboxylase Autoantibody*, IA-2 - engl. *Thyrosin Phosphatase Islet Autoantibod*; m – muškarci; ž – žene;

#### **4.6. Bolesnici s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na $\beta$ stanice Langerhansovih otočića gušterače**

U tablici 4.6.1 prikazane su demografske i kliničke karakteristike te raspodjela genotipova HLA-DRB1 i DQB1, polimorfizama 49AG i CT60 gena CTLA-4 i polimorfizma R620W gena PTPN22 u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače.

Povišeni titar antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače nađeni su u 17 od 158 bolesnika s AITD (10,76%), statistički značajno više nego u kontrolnoj skupini u kojoj povišen titar antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića nije nađen u niti jednog ispitanika ( $p=0,001$ ), od toga u 15 od 127 bolesnika s AT (11,81%), također statistički značajno više nego u kontrolnoj skupini ispitanika ( $p=0,001$ ) i u 2 od 31 bolesnika s GB (6,45%) što nije dostiglo statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0,06$ ).

U skupini bolesnika s AT povišeni titar antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače nađena su u 2 od 29 dječaka (6,90%) što nije statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu (0/46 dječaka,  $p=0,16$ ). Trinaest od 98 djevojčica (13,26%) također je imalo povišen titar antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića, što je statistički značajno više nego u kontrolnoj skupini (0/48,  $p=0,005$ ). U skupini bolesnika s GB povišeni titrovi antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače nađena u dvije od 24 djevojčice (8,33%), i u ni jednog od 7 dječaka.

Povišen titar ICA antitijela uočen je u 8 bolesnika (5,1% svih bolesnika s AITD, u odnosu na 0/94 kontrolnih ispitanika,  $p=0,027$ ), od toga samostalno u 3 bolesnika. Jedan je

bolesnik imao povišen titar ICA antitijela u kombinaciji s povišenim titrom GAD antitijela, jedan je bolesnik imao povišene titrove ICA i IA-2 antitijela, dok su preostala tri bolesnika imala povišene titrove sve tri vrste antitijela.

Povišen titar GAD antitijela nađen je u 10 bolesnika (6,3% svih bolesnika s AITD, što je statistički značajno više u odnosu na 0/94 kontrolnih ispitanika,  $p=0,015$ ). Pet bolesnika je imalo povišena samo GAD antitijela, jedan bolesnik je imao u kombinaciji s povišenim titrom ICA antitijela, kao i jedan bolesnik u kombinaciji s povišenim titrom IA-2 antitijela, dok su tri bolesnika imala u kombinaciji s povišenim titrovima ICA i IA-2 antitijela.

Povišen titar IA-2 antitijela nađen je u 8 bolesnika (5,1% svih bolesnika s AITD, u odnosu na 0/94 kontrolnih ispitanika,  $p=0,027$ ) i to samostalno u 3 bolesnika, u kombinaciji s povišenim titrom ICA antitijela u jednog bolesnika, u kombinaciji s povišenim titrom GAD antitijela u jednog bolesnika te u kombinaciji s povišenim titrovima ICA i GAD antitijela u tri bolesnika.

Povišeni titrovi sva tri antitijela nađeni su u 3 od 158 bolesnika (1,9% od ukupnog broja bolesnika s AITD), a povišeni titrovi dva antitijela nađeni su također u 3 od 158 bolesnika (1,9% od ukupnog broja bolesnika s AITD).

Svih 6 bolesnika (troje bolesnika s AITD u kojih je nađen povišen titar sva tri antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače te tri bolesnika u kojih je nađen povišen titar dva antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače), razvilo je kliničku sliku i laboratorijske znakove DMT1 (Tablica 4.6.2.)

Tablica 4.6.1. Kliničke, demografske karakteristike te raspodjela genotipova HLA-DRB1 i DQB1, polimorfizama 49AG i CT60 gena CTLA-4 i polimorfizma PTPN22 R620W u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače.

	Inicijali	dg	spol	dob kod dg (godine)	ICA	GAD	IA-2	TgAt	TPOAt	Genotip HLA	Genotip CTLA4 49AG	Genotip CTLA4 CT60	Genotip PTPN22 R620W
										DRB1-DQB1/DRB1-DQB1			
1	BL	AT	ž	13,54	1,0	0	<b>16,7</b>	755	269	11-03(DQ7)/14-05	A/A	A/G	C/T
2	BT	AT	ž	11,34	0,5	<b>22,7</b>	0,0	147	>2000	04-03(DQ8)/11-03(DQ7)	G/G	G/G	C/C
3	GA	AT	ž	11,80	<b>3</b>	<b>676</b>	<b>258,6</b>	44,2	>2000	04-03(DQ8)/07-02	G/G	G/G	C/C
4	GK	AT	ž	19,04	0	<b>17,7</b>	0,0	0	159	NT	NT	NT	NT
5	HP	AT	ž	11,55	1	<b>23,7</b>	0,0	2000	93,3	04-06/13-06	G/G	G/G	C/C
6	JI	AT	m	13,75	1	0	<b>21,0</b>	0	46	04-03(DQ8)/11-03(DQ7)	A/G	G/G	C/T
7	KV	AT	ž	12,31	0,5	0	<b>22,3</b>	28,2	1191	04-03(DQ8)/15-06	A/A	A/G	C/C
8	KK	AT	ž	8,02	<b>3</b>	0	<b>1245,0</b>	140	40	03-02/13-06	G/G	G/G	C/T
9	KM	AT	ž	7,79	2	0	0,0	0	15	11-03(DQ7)/13-06	A/G	A/G	C/C
10	KI	AT	ž	11,39	1	<b>68,6</b>	<b>226,0</b>	25	>2000	04-03(DQ8)/11-03(DQ7)	G/G	G/G	C/T
11	RB	AT	ž	13,16	<b>1,5</b>	0	0,0	177,2	>2000	03-02/13-06	A/A	A/G	C/C
12	RM	AT	ž	10,08	<b>3</b>	<b>859</b>	<b>136,1</b>	0	>2000	01-05/07-02	A/A	A/A	C/C
13	RT	AT	ž	12,18	0	<b>27,4</b>	0,0	155	96	03-02/14-05	A/G	A/G	C/C
14	RK	AT	ž	17,28	1	<b>1193</b>	0,0	642,6	1112	03-02/16-05	A/A	A/A	C/T
15	VD	AT	m	8,11	<b>1,5</b>	<b>149</b>	0,0	584	>2000	03-02/04-03(DQ8)	A/G	A/G	C/C
16	DT	GB	ž	15,38	<b>1,5</b>	0	0	27	279	01-05/08-04	G/G	G/G	C/C
17	JB	GB	ž	6,50	<b>3,5</b>	<b>2509</b>	<b>1882</b>	71,1	>2000	03-02/03-02	A/A	A/G	C/C

m – muškarci; ž – žene; ICA – antitijela na citoplazmu  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića; GAD – antitijela na glutamičku dekarboksilazu; IA-2 – antitijela na tirozin fosfatazu, NT – nije testiran

Tablica 4.6.2. Procjena kliničkog stadija DMT1 u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače.

	Inicijali	dg	spol	dob kod dg AITD (godine)	OGTT		Inzulin (mIJ/l)*	C peptid (nmol/l)**	HbA1c (%)***	dob kod dg DMT1 (god)
					GUK 0' (mmol/l)	GUK 120' (mmol/l)				
1	BL	AT	ž	13,54	4,5	6,7	9,8	0,43	5,5	
2	BT	AT	ž	11,34	5,2	5,9	6,8	0,49	5,20	
3	<b>GA</b>	<b>AT</b>	<b>ž</b>	<b>11,80</b>	/	/	/	<b>0,08</b>	<b>14,00</b>	<b>12,49</b>
4	GK	AT	ž	19,04	4,7	2	8,2	0,51	5,00	
5	HP	AT	ž	11,55	5,2	6,5	14,8	0,82	5,20	
6	JI	AT	m	13,75	/	/	/	/	/	
7	KV	AT	ž	12,31	4,8	6	8,1	0,69	5,30	
8	<b>KK</b>	<b>AT</b>	<b>ž</b>	<b>8,02</b>	/	/	/	/	<b>11,5</b>	<b>10,61</b>
9	KM	AT	ž	7,79	5,2	5,5	9,1	0,41	4,70	
10	<b>KI</b>	<b>AT</b>	<b>ž</b>	<b>11,39</b>	/	/	<b>3,7</b>	<b>0,25</b>	<b>13,40</b>	<b>11,41</b>
11	RB	AT	ž	13,16	3,8	5,1	/	0,65	5,10	
12	<b>RM</b>	<b>AT</b>	<b>ž</b>	<b>10,08</b>	4,8	11,8	8,1	0,39,,0,06	5,40,, <b>10,3</b>	<b>10,56</b>
13	RT	AT	ž	12,18	4,7	5,0	6,5	0,59	5,2	
14	RK	AT	ž	17,28	/	/	/	/	/	
15	<b>VD</b>	<b>AT</b>	<b>m</b>	<b>8,11</b>	/	/	/	<b>0,11</b>	<b>13,50</b>	<b>13,24</b>
16	DT	GB	ž	15,38	5,0	3,1	6,2	0,68	5,4	
17	JB	GB	ž	6,50	5,1	<b>8,1</b>	/	0,53	5,8,, <b>6,8</b>	<b>10,28</b>

\*Inzulin: referentni raspon 2.6-24.9 mIJ/l; \*\*C-peptid: referentni raspon 0.37-1.47 nmol/l;

HbA1c: referentni raspon 4.6-6.6% (DCA2000); OGTT – oralni test opterećenja glukozom

Analizom gena HLA-DRB1 i DQB1 samo u jednog od 16 (6,3%) bolesnika s AITD (kod jednog bolesnika nisu određeni geni HLA) u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nađen je visoko rizični genotip:

HLA-DRB1\*04-DQB1\*03/DRB1\*03-DQB1\*02. Dječak je imao povišene titrove dva antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (ICA i GADA) te je razvio DMT1.

Učestalost genotipa HLA visokog rizika nije se značajnije razlikovala između bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (1/16, 6,3%) u odnosu na bolesnike s APS3v (14/69, 20,3%; p=0,283) i kontrolnu skupinu ispitanika (0/94, 0%; p=0,147)

Genotipovi HLA srednjeg rizika nađeni su u 10 od 16 djevojčica (62,5%), dok u

preostalih 5 od 16 (31,2%) djevojčica nisu nađeni rizični genotipovi (Tablica 4.6.3.).

Učestalost genotipova HLA srednjeg rizika za nastanak DMT1 nije se značajnije razlikovala između bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (10/16, 62,5%) u odnosu na bolesnike s APS3v (43/69, 62,3%;  $p=0,578$ ).

U skupini genotipova HLA srednjeg rizika za nastanak DMT1, učestalost genotipa HLA-DRB1\*04-DQB1\*03/DRB1\*X-DQB1\*X bila je značajno viša u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (5/16, 31,3%) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (7/94, 7,5%;  $p=0,015$ ). Učestalost drugih genotipova srednjeg rizika za nastanak DMT1 nije se značajnije razlikovala između ove dvije skupine ispitanika (Tablica 4.6.3.)

Učestalost genotipova HLA-DRB1-DQB1 koji nose niski rizik za nastanak DMT1 bila je značajno manja u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (5/16, 31,3%) nego u kontrolnoj skupini (65/94, 69,9%;  $p=0,003$ ). Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipova niska rizika za nastanak DMT1 između bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (5/16, 31,3%) u odnosu na bolesnike s APS3v (12/69, 17,4%;  $p=0,296$ ).

Tablica 4.6.3. Raspodjela genotipova HLA prema do sada poznatim riziku za nastanak DMT1 (102,103,145-147) u bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (N=17) u odnosu na bolesnike s APS3v (N=71) i kontrolnu skupinu ispitanika (N=94).

a.

Rizik	Genotip HLA	AITD (+ ICA/GAD/IA-2) n (%)	Kontrolna skupina n (%)	p1	APS3v n (%)	p2
Visoki rizik	DRB1*04-DQB1*03(DQ7,DQ8)/ DRB1*03-DQB1*02	32 (19,8)	0 (0)	0,147	14 (20,3)	0,283
Srednji rizik	DRB1*04-DQB1*03(DQ7,DQ8)/ DRB1*04-DQB1*03(DQ7,DQ8)	10 (6,2)	1 (1,0)	1,000	5 (7,2%)	0,578
	DRB1*03-DQB1*02/DRB1*03-DQB1*02	5 (8,1)	0 (0)	0,147	5 (7,2)	1,000
	DRB1*04-DQB1*03(DQ7,DQ8)/DRB1*X-DQB1*X	52 (32,1)	7 (7,5)	0,015	21 (30,4)	1,000
	DRB1*03-DQB1*02/DRB1*X-DQB1*X	32 (19,7)	20 (21,5)	0,749	12 (17,4)	0,489
Niski rizik	DRB1*X-DQB1*X/DRB1*X-DQB1*X	31 (19,1)	65 (70,0)	0,003	12 (17,4)	0,296

n – broj pojedinih genotipova; AITD (+ ICA/GAD/IA-2) – bolesnici s AITD i povišenim

titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića; APS3v - engl. *Autoimmune*

*Polyglandular Syndrome type 3 variant*; X-gen na lokusu HLA-DRB1 koji nije ni DRB1\*04

ni DRB1\*03; X-gen na lokusu HLA-DQB1 koji nije ni DQB1\*03 ni DQB1\*02; p1 –

usporedba bolesnika s AITD (+ ICA/GAD/IA-2) u odnosu na kontrolnu skupinu, p2 –

usporedba bolesnika s AITD (+ ICA/GAD/IA-2) u odnosu na bolesnike s APS3v

U tablicama 4.6.3., 4.6.4., 4.6.5. prikazane su raspodjele polimorfizama 49AG i CT60 gena CTLA-4 te PTPN22 u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na skupine bolesnika s DMT1, APS3v i AITD kod kojih nisu nađeni povišeni titrovi antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića. Nisu nađene statistički značajne razlike između ovih skupina bolesnika osim za učestalost genotipa G/G polimorfizma 49AG gena CTLA-4 u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića koja je povećana u odnosu kontrolnu skupinu.

Tablica 4.6.3. Raspodjela genotipova polimorfizma 49AG gena CTLA-4 u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na skupine bolesnika s DMT1 (N=165), APS3v (N=71), AITD (N=158) i zdravih ispitanika (N=94).

CTLA-4 49AG	AITD + at na $\beta$ stan (%)	DMT1 n (%)	OR (95% CI), p	APS3v n (%)	OR (95% CI), p	AITD n (%)	OR (95% CI), p	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI), p
A/A	6 (37,5)	35 (37,2)	1,01 (0,34-3,02), p=0,98	21 (29,6)	1,43 (0,46- 4,44), p=0,56	45 (35,4)	1,09 (0,37-3,21), p=0,87	36 (38,3)	0,97 (0,32- 2,89), p=0,95
A/G	4 (25,0)	44 (46,8)	0,38 (0,11-1,26), p=0,10	33 (46,5)	0,38 (0,11-1,31), p=0,11	56 (44,1)	0,42 (0,13-1,38), p=0,15	46 (48,9)	0,35 (0,11-1,16), p=0,08
G/G	6 (37,5)	15 (16,0)	3,16 (1,00-10,0), p=0,08	17 (23,9)	1,91 (0,60-6,02), p=0,34	26 (20,5)	2,33 (0,78-7,00), p=0,20	12 (12,8)	4,1 (1,26-13,34), p=0,024

n – broj pojedinih genotipova; AITD +at na  $\beta$  st - bolesnici s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; OR – omjer vjerojatnosti

Tablica 4.6.4. Raspodjela genotipova polimorfizma CT60 gena CTLA-4 u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na skupine bolesnika s DMT1 (N=165), APS3v (N=71), AITD (N=158) i zdravih ispitanika (N=94).

CTLA-4 CT60	AITD + at na $\beta$ stan (%)	DMT1 n (%)	OR (95% CI), p	APS3v n (%)	OR (95% CI), p	AITD n (%)	OR (95% CI), p	Kontrolna skupina n (%)	OR (95% CI), p
A/A	2 (12,5)	12 (12,8)	0,98 (0,20-4,84), p=1,00	10 (14,1)	0,87 (0,17-4,43), p=1,00	24 (18,9)	0,61 (0,13-2,88), p=0,74	16 (17,0)	0,70 (0,14-3,37), p=1,00
A/G	7 (43,8)	45 (47,9)	0,85 (0,29-2,46), p=0,76	32 (45,1)	0,95 (0,32-2,83), p=0,92	49 (38,6)	1,24 (0,43-3,54), p=0,69	56 (59,6)	0,53 (0,18-1,54), p=0,24
G/G	7 (43,8)	37 (39,4)	1,20 (0,41-3,50), p=0,74	29 (40,8)	1,13 (0,38-3,37), p=0,83	54 (42,5)	1,05 (0,37-3,00), p=0,93	22 (23,4)	2,54 (0,85-7,63), p=0,12

n – broj pojedinih genotipova; AITD +at na  $\beta$  st - bolesnici s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; OR – omjer vjerojatnosti

Tablica 4.6.5. Raspodjela genotipa polimorfizma R620W gena PTPN22 u bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na skupine bolesnika s DMT1 (N=165), APS3v (N=71), AITD (N=158) i zdravih ispitanika (N=94).

<b>PTPN22 R620W</b>	<b>AITD + At na <math>\beta</math> st n (%)</b>	<b>DMT1 n (%)</b>	<b>OR (95% CI), p</b>	<b>APS3v n (%)</b>	<b>OR (95% CI), p</b>	<b>APS3v n (%)</b>	<b>OR (95% CI), p</b>	<b>Kontrolna skupina n (%)</b>	<b>OR (95% CI), p</b>
<b>C/C</b>	11 (68,8)	78 (83,0)	0,45 (0,14-1,48), p=0,18	47 (66,2)	1,12 (0,35-3,61), p=0,85	99 (78,0)	0,62 (0,20-1,94), p=0,53	82 (87,2)	0,32 (0,09-1,10), p=0,07
<b>C/T</b>	5 (31,3)	12 (12,8)	3,11 (0,92- 10,50), p=0,07	18 (25,4)	1,34 (0,41-4,38), p=0,75	27 (21,3)	1,68 (0,54-5,26), p=0,35	12 (12,8)	3,11 (0,92-10,5), p=0,07
<b>T/T</b>	0 (0)	4 (4,3)	p=1,00	6 (8,5)	p=0,59	1 (0,8)	p=1,00	0 (0)	

n – broj pojedinih genotipova; AITD +at na  $\beta$  st - bolesnici s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića; APS3v - engl. *Autoimmune Polyglandular Syndrome type 3 variant*; DMT1 – dijabetes melitus tip 1; OR – omjer vjerojatnosti



Korištenjem Mann-Whitney testa ustanovljeno je da bolesnici s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića imaju viši titar TPO antitijela i Tg antitijela u odnosu na bolesnike s AITD i s nemjerljivim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića, no da ta razlika nije statistički značajna (Tg At - U=965, z --1,363, p=0,173; TPO At - U=931, z -1,553; p=0,120).

Tablica 4.6.5.a i b. Usporedba visine titra antitiroidnih antitijela (Tg At i TPO At) u bolesnika s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na bolesnika s AITD s nemjerljivim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića

<b>a.</b>	<b>Skupine bolesnika</b>	<b>Broj bolesnika</b>	<b>Zajednički rang</b>	<b>Suma rangova</b>
TgAt	AITD (- ICA/GAD/IA-2)	142	78,30	11118,00
	AITD (+ ICA/GAD/IA-2)	17	94,24	1602,00
	Ukupno	159		
TPOAt	AITD (- ICA/GAD/IA-2)	142	78,06	11084,50
	AITD (+ ICA/GAD/IA-2)	17	96,21	1635,50
	Ukupno	159		

<b>b.</b>	<b>TgAt</b>	<b>TPOAt</b>
Mann-Whitney U	965,000	931,500
Wilcoxon W	11118,000	11084,500
Z	-1,363	-1,553
Asimptotska značajnost (dvostrani test)	p=0,173	p=0,120

AITD (+ ICA/GAD/IA-2) – bolesnici s autoimunom bolešću štitnjače i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića; AITD (- ICA/GAD/IA-2) - bolesnici s autoimunom bolešću štitnjače i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića; Tg At – antitijela na tiroglobulin, TPO At – antitijela na tiroidnu peroksidazu

Korištenjem Mann-Whitney testa ustanovljeno je da su bolesnici s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića mlađi u odnosu na one s nemjerljivim

titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića no da ta razlika nije statistički značajna ( $U=1076$ ,  $z = -0,730$ ,  $p=0,465$ ).

Tablica 4.6.6.a i b. Usporedba dobi kod postavljanja dijagnoze AITD u bolesnika s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića [AITD (+ ICA/GAD/IA-2)] u odnosu na bolesnika s AITD s nemjerljivim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića [AITD (- ICA/GAD/IA-2)].

**a.**

	Skupine bolesnika	Broj bolesnika	Zajednički rang	Suma rangova
dob	AITD (- ICA/GAD/IA-2)	142	80,92	11491,00
	AITD (+ ICA/GAD/IA-2)	17	72,29	1229,00
	Ukupno	159		

**b.**

	dob
Mann-Whitney U	1076,000
Wilcoxon W	1229,000
Z	-0,730
Asimptotska značajnost (dvostrani test)	p=0,465

AITD (+ ICA/GAD/IA-2) – bolesnici s autoimunom bolešću štitnjače i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića; AITD (- ICA/GAD/IA-2) - bolesnici s autoimunom bolešću štitnjače i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića; Tg At – antitijela na tiroglobulin, TPO At – antitijela na tiroidnu peroksidazu

Korištenjem Fisher's Exact testa ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti povišenih titrova antitijela  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića između dječaka i djevojčica s AITD ( $p=0,364$ ; OR 2,361, 95% CI 0,514 – 10,849).

Tablica 4.6.7. Učestalost povišenih titrova antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u bolesnika s AITD ovisno o spolu.

		spol		ukupno
		dječaci	djevojčice	
AITD (- ICA/GAD/IA-2)	Broj bolesnika	34	108	142
	% unutar spola	94,4%	87,8%	89,3%*
AITD (+ ICA/GAD/IA-2)	Broj bolesnika	2	15	17
	% unutar spola	5,6%	12,2%	10,7%*
ukupno	Broj bolesnika	36	123	159
	% unutar spola	100,0%	100,0%	100,0%

\*% bolesnika u odnosu na ukupan broj bolesnika; AITD (+ ICA/GAD/IA-2) – bolesnici s autoimunom bolešću štitnjače i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića; AITD (- ICA/GAD/IA-2) - bolesnici s autoimunom bolešću štitnjače i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića; Tg At – antitijela na tiroglobulin, TPO At – antitijela na tiroidnu peroksidazu

#### ***4.7. Raspodjela gena HLA-DRB1-DQB1, CTLA-4 i PTPN22 u obitelji bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića***

Od 17 bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića, članovi obitelji 10 bolesnika s AITD odazvali su se na tipizaciju gena HLA-DRB1 i DQB1, CTLA-4 i PTPN22 te im je izmjerena visina titra antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića. Ukupno je ispitano 20 članova uže obitelji, 18 roditelja i 2 sestre ovih 10 bolesnika.

Antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nađena su u 5 (25%) članova obitelji bolesnika (3/8 čeva i 2/10 majki).

Jednoj majci dokazana su pozitivna sva tri antitijela i ona boluje od DMT1. Roditelji djevojčice (KV) u koje je nađen blaže povišen titar IA-2 antitijela imali su: majka također blaže povišen titar IA-2 antitijela, a otac povišeni titrovi ICA i GAD antitijela. Od preostala dva roditelja, oba su očevi djevojčica u kojih su nađeni povišeni titrovi dva odnosno sva tri

antitijela na  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića te koje su nekoliko mjeseci nakon postavljanja dijagnoze AT razvile DMT1. U očeva obje djevojčice nađeni su povišeni titrovi ICA i GADA antitijela.

Analizom gena HLA-DRB1 i DQB1 u troje od pet roditelja (dva oca i jedna majka) u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića, nisu nađeni rizični haplotipovi, dok je u dvoje roditelja (jedan otac i jedna majka) otkriven genotip HLA-DRB1\*03-DQB1\*02/DRB1\*X-DQB1\*X.

U 15 članova obitelji u kojih nisu nađeni povišeni titrovi na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića visoko rizični genotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8)/DRB1\*03-DQB1\*02 nađen je u jednog ispitanika (6,7%) i to u oca djevojčice u koje je nekoliko mjeseci nakon postavljanja dijagnoze AT dijagnosticiran DMT1 te čija majka također boluje od DMT1 i u koje je nađen genotip srednjeg rizika (HLA-DRB1\*03-DQB1\*02/DRB1\*X-DQB1\*X).

Rizične kombinacije HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ili DQ8)/DRB1\*X-DQB1\*X te DRB1\*03-DQB1\*02/DRB1\*X-DQB1\*X nađeni su u 3 (20%) od 15 članova obitelji. Nisko rizične kombinacije haplotipova HLA-DRB1-DQB1 nađene su u 9 od 15 članova obitelji s niskim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića.

Tablica 4.7.1. Visina titra antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića i raspodjela genotipova HLA-DRB1-DQB1, CTLA4 i PTPN22 u članova obitelji bolesnika s AITD i povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića.

br	bolesnici s AITD +At na $\beta$ st	spol	majka	otac	sestra	ICA	ICA (JDF-U)	GAD	IA-2	Genotip HLA	Genotip CTLA-4 49AG	Genotip CTLA-4 CT60	Genotip PTPN22- R620W
										DRB1-DQB1/DRB1-DQB1			
1	RM	ž	RV			0,5	<5	0	0	07-02/11-03(DQ7)	A/A	A/A	C/C
				RM		2	180	546	0	01-05/15-06	A/G	A/G	C/C
					RG	0	<5	9	0	01-05/11-03(DQ7)	A/G	A/G	C/C
2	KV	ž	KLJ			0,5	15	0	24,5	11-03(DQ7)/15-06	A/A	A/A	C/C
				KM		0,5	10	1871	0	04-06/13-06	A/A	G/G	C/T
3	AL	ž	AM			0,5	<5	0	0	07-03(DQ9)/11-03(DQ7)	A/A	G/G	C/C
				AD		0	<0,5	0	0	03-02/07-02	A/G	A/G	C/C
4	RB	ž	RI			0	<5	0	0	13-06/14-05	A/A	A/G	C/C
					RP	0	<5	0	0	01-05/13-06	A/G	A/G	C/C
5	GA	ž	GLJ			3	350	2890	1061	03-02/07-02	G/G	G/G	C/C
				GA		0,5	10	0	0	03-02/04-03(DQ8)	G/G	G/G	C/C
6	VD	m	VLJ			0	<5	0	0	03-02/11-03(DQ7)	G/G	G/G	C/T
				VV		0	<5	0	0	04-03(DQ8)/11-03(DQ7)	A/A	A/A	C/C
7	BT	ž	BM			0	<5	0	0	08-04/11-03(DQ7)	G/G	G/G	C/T
				BF		0,5	10	0	0	04-03(DQ8)/15-06	G/G	G/G	C/C
8	KI	ž	KA			0	<5	0	0	04-03(DQ8)/08-04	A/G	G/G	C/T
				KD		0	<5	0	0	01-05/11-03(DQ7)	A/G	A/G	C/C
9	KK	ž	KK			0,5	7	0	0	13-06/13-06	G/G	G/G	C/T
				KK		1,5	105	2109	0	03-02/07-02	A/G	A/G	C/C
10	KM	ž	KI			0	<5	0	0	11-03(DQ7)/15-06	A/G	G/G	C/C

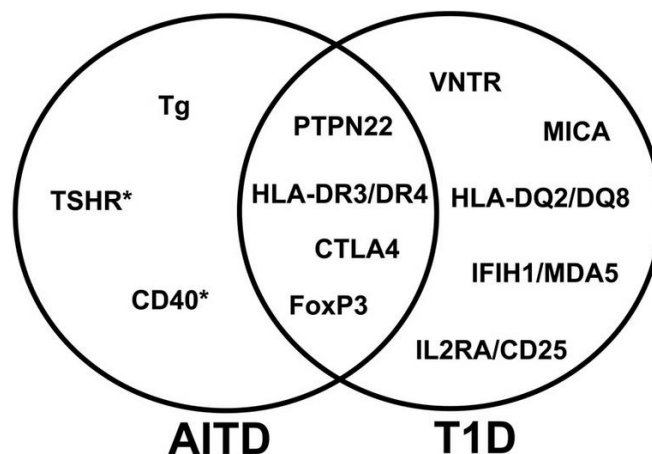
m – muškarci; ž – žene; ICA – antitijela na citoplazmu  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića; GAD – antitijela na glutamičku dekarboksilazu; IA-2 – antitijela na tirozin fosfatazu

## 5. RASPRAVA

Istraživanja genetske podloge autoimunih bolesti promijenila su naše razumijevanje. Otkrivanjem novih gena, identificirani su i novi mehanizmi koji su podloga autoimunosti. Tako je s otkrićem gena HLA-DR (148,149) i još 5 gena koji ne priradaju sustavu HLA (150) kao glavnih gena nosioca rizika za nastanak AITD, istaknuta važnost imunoloških sinapsi (tj. sučelja između antigen prezentirajućih stanica i T imfocita u postupku prezentacije antigena (151,152) u etiologiji tiroidne autoimunosti.

Zadnjih je godina postalo jasno da se genetski rizik dijeli među različitim autoimunim bolestima (153,154). Naime, klinički različite autoimune bolesti grupiraju se unutar obitelji (155,156) sugerirajući postojanje gena koji nose zajednički rizik za nastanak tih bolesti. Od svih autoimunih bolesti, familijarno grupiranje najizraženije je za DMT1 i AITD (14,157,158), i u tom slučaju govorimo o fenotipu APS3v. Učestalost tiroidne autoimunosti u srodnika bolesnika s DMT1 je i do 48%, dok se u općoj populaciji nađe u oko 3-10% osoba (157, 159-161). Nadalje, DMT1 i AITD se često nalaze i u iste osobe, i prema nekim istraživanjima i do 50% bolesnika s DMT1 ima pozitivna tiroidna autoantitijela (14). S druge strane, samo je u rijetkim studijama ispitivana učestalost antitijela na beta stanice Langerhansovih otočića gušterače u bolesnika s AITD i pokazalo se da su prisutna u 2,3%-7,6% bolesnika s AITD u odnosu na 0-0,7% kontrolnih ispitanika (121-126).

Usprkos dobro poznatoj genetskoj povezanosti DMT1 i AITD (APS3v), tek unatrag nekoliko godina istražuju se geni koji mogu nositi zajednički rizik za nastanak obje bolesti (148), pa se pokazalo da su neki od njih zajednički za obje bolesti dok su drugi specifični za svaki pojedini oblik bolesti (Slika 5.1.)



Slika 5.1. Zajednička genetska povezanost DMT1 i AITD (Izvor: Tomer i sur. Type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: the genetic connection. *Thyroid* 2009; 19:99-102) (147)

Zanimljivo je, da produkti sva četiri gena koja nose rizik za APS3v (14) sudjeluju u funkcioniranju imunološke sinapse i aktivaciji T limfocita. Prvenstveno se radi o molekulama HLA-DR koje prezentiraju peptide T stanicama; molekuli CTLA-4, koja ima važnu kostimulatornu funkciju, genu PTPN22 koji je značajan u regulaciji signalnih puteva i genu FOXP3 za kojeg se smatra da je glavni regulator razvoja i funkcije T stanica (12). Identifikacija gena koji predisponiraju nastanku APS3v omogućava bolje razumijevanje molekularnih mehanizama koji uzrokuju povezanost DMT1 i AITD.

### 5.1. Geni HLA razreda II

Regija HLA visoko je polimorfna, uključuje više gena odgovornih za imunološki odgovor i smatra se da je povezana s nastankom različitih autoimunih bolesti (15). U različitim populacijama nađene su velike razlike u učestalosti alela pojedinih gena HLA tako da se neki aleli mogu smatrati karakterističnim za određenu populaciju ili više populacija dok su u drugim populacijama prisutni s vrlo malom učestalošću ili ih uopće nema (31). Unatoč velikom broju alela HLA i teorijskoj mogućnosti velikog broja različitih haplotipova HLA, uočeni broj haplotipova u određenoj populaciji, odnosno populacijama čini samo mali broj mogućih haplotipskih kombinacija. Također i određene kombinacije alela HLA na jednom

kromosomu 6 tj. haplotovi HLA mogu biti prisutni samo u određenim populacijama ili rasprostranjeni širom svijeta (27).

U hrvatskoj populaciji učestalost različitih alela HLA, kao i haplotipskih veza, odnosno haplotipova HLA, istraživana je u nekoliko istraživanja (27,143,163-165). Napravili smo usporedbu naše kontrolne skupine s podacima iz literature za našu populaciju, kako za gene HLA-DRB1 i -DQB1, tako i za haplotipove HLA-DRB1-DQB1. Usporedba kontrolne skupine korištene u ovoj studiji s podacima za hrvatsku populaciju za učestalosti gena lokusa HLA-DRB1 i -DQB1 nije pokazala nikakve statistički značajne razlike (164). Učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u našoj kontrolnoj skupini bila je slična s učestalošću najčešćih klasičnih haplotipova HLA-DRB1-DQB1 nađenih u studiji Grubić i sur. (164). U obje skupine ispitanika najčešći haplotip bio je: HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) i to u 16,7% ispitanika naše kontrolne skupine i 17,4% ispitanika iz studije Grubić i sur. Na drugom mjestu u kontrolnoj skupini u ovom radu nalazi se haplotip: HLA-DRB1\*01-DQB1\*05 (15,1%) koji je u studiji Grubić i sur. bio na 4. mjestu po zastupljenosti (uočen kod 9,3% ispitanika). Ovakva raspodjela haplotipova HLA-DRB1-DQB1 u našoj kontrolnoj skupini ne odstupa od raspodjele tih haplotipova ni u drugim europskim populacijama (143). Haplotip HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 (s učestalošću od 10,2% u naših kontrolnih ispitanika) je haplotip koji je prisutan u brojnim populacijama u svijetu i pokazao je sličnu učestalost i u drugim populacijama u Europi (npr. Francuska - 8,5%; Italija 9,3%; Austrija - 10,5%; Njemačka - 11,6%) (143).

### ***5.1.1. Geni HLA i DMT1***

Uloga gena HLA u nastanku DMT1 uočena je još 70-tih godina prošlog stoljeća (166-168). Iako se danas zna da su i mnogi drugi geni povezani s nastankom DMT1, geni HLA i dalje nose najveći rizik za nastanak DMT1 (169-171). Smatra se da 40-60% nasljednog rizika za nastanak DMT1 nosi upravo geni HLA razreda II, prvenstveno lokusi koji kodiraju molekule HLA-DR i -DQ (104,172).

Također je poznatno da učestalost određenih alela i haplotipova HLA značajno varira među različitim etničkim grupama (173-175) kao i rizik za DMT1 (176). Tako je u populacijama azijskog porijekla učestalost visokorizičnih haplotipova HLA-DR-DQ značajno



niža, dok je relativno visoka među populacijama europskog porijekla što rezultira i u razlikama u incidencijama DMT1 u te dvije populacije (167).

U našoj studiji u bolesnika s DMT1, neovisno o prisustvu AITD, dokazana je snažna povezanost s genom HLA-DRB1\*04 ( $p < 0,001$ ;  $p_k < 0,001$ ). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s podacima iz rada Žunec (110) u kojem autorica također iznosi podatke o povećanoj učestalosti ova dva gena među bolesnicima s DMT1. Isto tako snažna povezanost dokazana je za gen HLA-DQB1\*03(DQ8) ( $p < 0,001$ ;  $p_k < 0,001$ ), dok je utvrđena slaba povezanost s genom HLA-DQB1\*02 ( $p = 0,026$ ;  $p_k > 0,05$ ) bila statistički značajna samo prije korekcije vrijednosti  $p$ . Dobiveni rezultat je u skladu s prethodno navedenim radom u kojem je također uočena statistički značajno povišena učestalost gena DQB1\*03(DQ8) (110). Razlika u vrijednosti  $p$  između dva rada za gen DQB1\*02 vjerojatno leži u činjenici da je prethodnom istraživanju analizirana raspodjela alela DQB1, a ne gena. Naime, dva najčešća alela gena DQB1\*02 (DQB1\*02:01 i DQB1\*02:02) dolaze u kombinacijama, odnosno haplotipovima s različitim genima na lokusu DRB1. Alel DQB1\*02:01 s genom DRB1\*03, a alel DQB1\*02:02 s genom DRB1\*07 koji je među bolesnicima s DMT1 pokazao nisku zastupljenost.

Kada smo skupinu bolesnika s DMT1 podijelili na podskupine bolesnika s DMT1 bez AITD i one s APS3v dobili smo slične rezultate. Analizom gena HLA-DRB1, ponovo je u obje skupine bolesnika najjača povezanost dokazana s genom HLA-DRB1\*04, među bolesnicima s DMT1 bez AITD statistička značajnost iznosila je  $p < 0,001$ , odnosno  $p_k < 0,001$ ) kao i među bolesnicima s APS3v. Dokazana je i povezanost s genom HLA-DRB1\*03 koji je u bolesnika s DMT1 bez AITD bio statistički značajno više prisutan ( $p = 0,013$ ;  $p_k > 0,05$ ) ali samo prije korekcije vrijednosti  $p$ , dok je povezanost u bolesnika s APS3v zadržana i nakon korekcije vrijednosti  $p$  ( $p < 0,001$ ;  $p_k < 0,001$ ). Među genima HLA-DQB1 snažnu povezanost s obje skupine bolesnika pokazao je gen HLA-DQB1\*03(DQ8) sa statistički značajnom vrijednosti  $p$  i nakon korekcije s brojem testiranih gena ( $p < 0,001$ ;  $p_k < 0,001$ ). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima drugih istraživanja (28). U istraživanju Hall i suradnika (28) koji su ispitivali korelaciju alela HLA-DRB1 i učestalost tiroidne autoimunosti u populaciji 495 djece i adolescenata s dijabetesom u Njemačkoj, u bolesnika s genotipom antigena HLA-DR3/DR4 nađena je veća učestalost tiroidne autoimunosti u odnosu na bolesnike koji su imali druge genotipove HLA-DRB1. Golden i sur (140) su također pokazali da haplotipovi HLA-DR3-DQB1\*02:01 i HLA-DR4-DQB1\*03:02 predisponiraju nastanku APS3v u iste osobe.

Nadalje, Huang i suradnici (28) ispitivali su gene HLA u bolesnika s APS2 (autoimuni adrenalitis i još jedna autoimuna bolest) koje su podijelili u skupine na one koji imaju povišene titrove ICA i/ili GAD antitijela i one u kojih su ta antitijela negativna. U skupini bolesnika s povišenim titrovima antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nađena je veća učestalost haplotipova HLA-DR3-DQB1\*02:01 i HLA-DR4-DQB1\*03:02 u odnosu na kontrolu. S druge strane, u bolesnika s APS2 u kojih autoimunost na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nije nađena samo je haplotip HLA-DR3-DQB1\*02:01 bio češći što je dodatna potvrda da je haplotip HLA-DR3-DQB1\*02:01 povezan s autoimunošću koja zahvaća više endokrinoloških organa.

Analizom haplotipova u svih bolesnika s DMT1 te nakon podjele u podskupine bolesnika s DMT1 bez AITD i APS3v, najsnažnija povezanost nađena je s haplotipom HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) ( $p < 0,001$ ;  $p_k < 0,001$ ). Nadalje, snažna povezanost uočena je između DMT1, neovisno o prisutnosti AITD, kao i nakon podjele u dva oblika bolesti s haplotipom HLA-DRB1\*03-DQB1\*02. Jedina razlika uočena je u vrijednosti  $p$ , DMT1 i APS3v -  $p < 0,001$ ;  $p_k < 0,001$ , dok je vrijednost  $p$  za DMT1 bez AITD bila statistički značajna samo prije korekcije ( $p = 0,008$ , odnosno  $p_k > 0,05$ ). S druge strane, samo u bolesnika s DMT1 bez AITD nađena je slaba povezanost s haplotipom HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7) za koju je vrijednost  $p$  iznosila ( $p = 0,01$ ;  $p_k > 0,05$ ). Ovaj haplotip HLA nije statistički značajno povezan s APS3v ( $p > 0,05$ ), kao ni s DMT1 ( $p > 0,05$ ), ali ni sa samim AITD ( $p > 0,05$ ). Brojne su studije analizirale povezanost gena HLA razreda II i DMT1 te je nedvojbeno potvrđena snažna povezanost s haplotipom HLA-DRB1\*03-DQB1\*02:01-DQA1\*05:01 i haplotipom HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:02-DQA1\*03:01 u bijelaca (97, 104, 140, 177-179) što se podudara s podacima dobivenim u ovoj disertaciji. Thomson i suradnici (165) su u meta-analizi 38 studija analizirali povezanost haplotipova i genotipova HLA-DR-DQ i pokazali istu relativnu predispoziciju u različitim etničkim skupinama i populacijama, pri čemu su identificirali kategorije visoko predisponirajućih i predisponirajućih haplotipova [HLA-DRB1\*04:05, 04:01 i 04:02 s HLA-DQB1\*03:02, zatim HLA-DR3 (DRB1\*03:01-DQB1\*02:01) i HLA-DRB1\*04:04-DQB1\*03:02], neutralnih haplotipova [HLA-DRB1\*08:00-DQB1\*04:02, HLA-DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 (DR9) i HLA-DRB1\*01:00-DQB1\*05:01 (DR1)] i protektivnih i vrlo protektivnih haplotipova kao što su HLA-DRB1\*14:00-DQB1\*05:03 i HLA-DRB1\*15:00-DQB1\*06:02.

Međutim, ono što treba svakako istaknuti je da je donošenje zaključaka o povezanosti gena HLA s pojedinim bolestima vrlo složeno i to ne samo zbog izuzetno velikog broja do sada otkrivenih alela određenog gena HLA, učestalosti tih alela HLA, kao i haplotipskih kombinacija, već i zbog neavnoteže uduživanja među genima HLA. Iz tog razloga je vrlo teško reći koja je povezanost primarna, a koja sekundarna odnosno posljedica neravnoteže uduživanja. Važno je u svemu ovome spomenuti i nepotpunu penetraciju rizičnih gena HLA te interakciju gena HLA s drugim faktorima rizika za razvoj bolesti.

Osim rizičnih haplotipova postoje i zaštitni (protektivni) haplotipovi HLA-DRB1-DQB1 za nastanak bolesti. U našoj smo studiji zabilježili statistički značajno manju učestalost haplotipa HLA-DRB1\*15-DBQ1\*06 u oboljelih s DMT1 u odnosu na ( $p=0,001$ ;  $p_k=0,021$ ). Drugi haplotip HLA-DRB1-DQB1 značajno rijede zastupljeni među našim bolesnicima s DMT1 bio je haplotip: HLA-DRB1\*11-DQB1\*03(DQ7) ( $p<0,001$ ;  $p_k<0,001$ ). Za haplotip, kao zaštitni haplotip za razvoj DMT1, HLA-DRB1\*12-DQ\*03(DQ7) vrijednost  $p$  bila je statistički značajna samo prije korekcije ( $p=0,014$ ;  $p_k>0,05$ ). Dobiveni rezultati djelomično se podudaraju s prethodnim nalazima za hrvatsku populaciju, gdje se govori o neutralnoj ulozi alela DRB1\*15:01, odnosno tog haplotipa, dok u prethodnom istraživanju nije uočena smanjena zastupljenost haplotipa DRB1\*12-DQB1\*03 (110). Dobiveni rezultati u skladu su s do sada u više studija potvrđenim rezultatima u kojima su identificirani protektivni haplotipovi kao što je npr. haplotip: HLA-DRB1\*15:01-DQB1\*06:02 odnosno HLA-DR2-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 (97,104,179-181). Haplotip HLA-DR2 (HLA-DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02) smatra se dominantno protektivnim, s tim da se alel DQB1\*06:02 nalazi u oko 20% populacije, ali samo u 1% bolesnika s DMT1 (97). Nije za sada razjašnjeno zašto jedan mali udio osoba koje nose HLA-DQB1\*06:02 ipak dobije DMT1 (97, 107).

Na povezanost DMT1 s haplotipovima HLA-DR-DQ ukazuje mnogobrojne studije (28,110,140,165,177-179). Dokazano je da kombinacija dva rizična haplotipa tj. genotip: DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01/DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02 nosi veći rizik za nastanak DMT1 od homozigotnosti za bilo koji od ta dva haplotipa HLA-DRB1-DQB1 (107). U studiji Spoletini i suradnika (145) analiziran je trend učestalosti rizičnih genotipova u talijanskoj populaciji obzirom na gotovo dvostruki porast incidencije DMT1 u kontinentalnoj Italiji u razdoblju od 2004.-2009. godine u odnosu na razdoblje 1989.-1993. Genotip HLA klasificiran je u tri rizične kategorije na osnovu apsolutnog rizika (AR)

prethodno određenog u kontinentalnoj Italiji i to na: genotip visokog rizika (AR 1:23) za HLA-DRB\*03-DQB1\*02:01/DRB1\*04-DQB1\*03:02; genotipovi srednjeg rizika (AR 1:150) u koje spadaju homozigoti za haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:02 ili homozigoti za haplotip HLA- DRB1\*03-DQB1\*02:01 kao i genotipovi HLA-DRB1\*04-DQB1\*03:02/X odnosno HLA-DRB1\*03-DQB1\*02:01/X. U kategoriju genotipova niskog rizika (AR 1:1100) spadaju svi ostali genotipovi (182). U navedenoj studiji učestalost visoko rizičnog genotipa nije se bitno razlikovala u odnosu na prethodna razdoblja (23,4% u razdoblju od 1980.-1989. godine, 21,2% u razdoblju od 1990.-1999. godine, 26,6% u razdoblju iza 2000. godine). Slični rezultati zabilježeni su u studiji provedenoj u njemačkoj i austrijskoj populaciji gdje je učestalost visoko rizičnog genotipa HLA nađena u 24,8% od 1445 ispitanika s DMT1 mlađih od 20 godina (183). S druge strane rezultati studija provedenih u sjevernoj Europi ukazuju na smanjenje učestalosti visoko rizičnog genotipa HLA u bolesnika s DMT1 tijekom razdoblja praćenja od prije 1979. godine do razdoblja nakon 2000. godine s 25,3% na 18,2% u Finskoj (184), odnosno s 35.6% na 19.1% u Švedskoj usprkos povećanju incidencije DMT1 (185). Slično se događa i u Velikoj Britaniji gdje je učestalost visoko rizičnog genotipa HLA u razdoblju prije 1979. godine bila 47% dok je u razdoblju od 1990.-1999. ta učestalost iznosila 35% (186). U Australiji gdje je pad učestalosti visoko rizičnog genotipa bio najizraženiji (sa 79% u razdoblju od 1950.-1969. godine na 28% poslije 2000. godine (187), te u SAD-u gdje je učestalost visoko rizičnog genotipa HLA ranijih godina bila 39-48% u odnosu na 28-35% u nedavnim istraživanjima (188,189). Nije jasno zašto se najrizičniji genotip HLA u pojedinim populacijama javlja sa stalnom učestalošću dok u drugima s godinama pokazuje tendenciju smanjenja učestalosti iako je u svim navedenim populacijama uočen porast učestalosti DMT1 (srednji porast incidencije DMT1 u Europi iznosi oko 3,9% godišnje, u Sjevernoj Americi 5,3% godišnje, a u Aziji 4,0% godišnje) (94,96).

U našoj populaciji do sada nije rađena analiza učestalosti rizičnih genotipova u bolesnika s DMT1. Prema rezultatima ove studije najrizičniji genotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03/DRB1\*03-DQB1\*02 nađen je u 19,8% bolesnika s DMT1 (Tablica 4.1.3.5.), što je u skladu s učestalostima ovog genotipa HLA u bolesnika s DMT1 u populacijama europskog porijekla koje su istraživane u razdoblju nakon 2000. godine (Švedska 19,1%, Finska 18.2%) te nešto niža nego u Njemačkoj (24,8%), Italiji (26,6%), Velikoj Britaniji (35%), Australiji (28%) i SAD-u (28%) (102).

Učestalost genotipova HLA srednjeg rizika u našem je istraživanju otkriven u 61,1% bolesnika (99 od 162), a učestalost genotipova niskog rizika u 19,1% (31 od 162) bolesnika s DMT1 neovisno o AITD. Ovi su rezultati u skladu s podacima prikazanim za talijansku i njemačku populaciju (102,140). U Italiji učestalost genotipova HLA srednjeg rizika u djece mlađe od 15 godina iznosila je 61,6-62,8% ovisno o razdoblju praćenja, dok je učestalost genotipova HLA koji nose niski rizik za nastanak DMT1 15-16% ovisno o razdoblju praćenja (102). U njemačkoj studiji Awa i suradnika, koji su analizirali skupinu od 1455 bolesnika, genotipovi HLA srednjeg rizika nađeni su u 64% bolesnika, visoko rizični u 24,8% bolesnika dok je učestalost genotipova HLA niskog rizika iznosila 11,1% (183).

### ***5.1.2. Geni HLA i AITD***

U bijelaca prvi lokus HLA za koje je dokazana povezanost s nastankom AITD bio je HLA-DRB1 (14,15). Povezanost gena DRB1\*03 s GB dokazana je u više studija s omjerom vjerojatnosti od 2,0–3,0 (190-192). Rezultati studija koje su ispitivale povezanost gena HLA s AT manje su dosljedni iako je većina pokazala povezanost s antigenima HLA-DR3 i -DR4 u bijelaca kao i negativnu povezanost odnosno protektivnu ulogu antigena HLA-DR1 i -DR8 (15,193) Zeitlin i sur. (194) u Velikoj Britaniji ispitivali su učestalost haplotipova HLA-DRB1-DQB1-DQA1 u velikoj skupini od 640 bolesnika s AT i 621 ispitanika iz kontrolne skupine. U navedenom radu otkrivena je snažna povezanost haplotipa HLA-DRB1\*04-DQB1\*03-DQA1\*03 s nastankom AT, a protektivan učinak je nađen za gen koji kodira molekulu HLA-DR13, odnosno produženi haplotip HLA (DRB1\*13-DQB1\*06-DQA1\*01) kao i za gen koji kodira molekulu HLA-DR7 (194). U populaciji Japana povezanost s nastankom AITD uočena je za polimorfizme na drugim lokusima HLA i to razreda I, tako autori izvještavaju o povezanosti antigena HLA-B35 s nastankom GB, dok je među lokusima HLA razreda II uočena povezanost antigena HLA-DRw53 s AT (15,195). Ovaj rezultat treba objasniti činjenicom da je antigen HLA-DRw53 produkt gena HLA-DRB4 koji je prisutan u haplotipu osoba koje na lokusu HLA-DRB1 imaju DRB1\*04 ili DRB1\*07 ili DRB1\*09. U populaciji Kine otkrivena je povezanost antigena HLA-Bw46 s nastankom GB, dok je antigen HLA-DR9 bio povezan s nastankom AT (195). Haplotip HLA-B\*08-DRB1\*03-DQA1\*05-DQB1\*02 koji se u studijama rađenim u europskim populacijama povezuje s

nastankom GB, izrazito je nisko zastupljen u populacijama Azije (143,196).

Rezultati našeg istraživanja podudaraju se s rezultatima studija provedenim u populacijama europskog porijekla (15). Povezanost nastanka AITD nađena je za gen HLA-DRB1\*04 ( $p=0,004$ ;  $p_k=0,052$ ) ali samo prije korekcije vrijednosti  $p$ . Kada je ova skupina bolesnika podijeljena na bolesnike s AT i one s GB otkrivena je statistički vrlo značajna povezanost s genom HLA-DRB1\*04 ( $p=0,001$ ;  $p_k=0,013$ ), dok je u bolesnika s GB povezanost nađena s genom HLA-DRB1\*03 ( $p=0,002$ ,  $p_k=0,026$ ).

Analizom haplotipova HLA-DRB1-DQB1 koji se mogu povezati s nastankom AITD dokazana je veća učestalost haplotipa HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) ( $p=0,005$ ;  $p_k>0,05$ ) i to na račun bolesnika s AT gdje je povezanost haplotipa HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) s nastankom bolesti snažna, s omjerom vjerojatnosti od 3,778 (1,712–8,338;  $p<0,001$ ;  $p_k<0,001$ ). U bolesnika s GB nađena je veća učestalost haplotipa HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 s omjerom vjerojatnosti od 3,196 (1,520–6,772);  $p=0,002$ ;  $p_k=0,044$ ).

Protektivnu ulogu za nastanak AITD u našem radu našli smo za haplotip HLA-DRB1\*01-DQB1\*05 ( $p=0,03$   $p_k>0,05$ ), ali samo prije korekcije vrijednosti  $p$  (Slika 4.1.3.4., Tablica 4.1.3.6.) i to prvenstveno među bolesnicima s AT. U bolesnika s GB zaštitnu ulogu u nastanku bolesti pokazao je haplotip HLA-DRB1\*07-DQB1\*02 koji uopće nije nađen među bolesnicima s GB ( $p=0,002$ ;  $p_k=0,044$ ). Protektivna uloga ovog haplotipa HLA u nastanku GB uočena je i u drugim istraživanjima (14,33,193).

## ***5.2. Polimorfizam gena CTLA-4***

Osim gena HLA razreda II, drugi gen za kojeg se pokazalo da utječe na zajedničku predispoziciju nastanku DMT1 i AITD je gen CTLA-4 (21,105). Do sada je proveden velik broj studija kako bi se istražila moguća povezanost polimorfizma gena CTLA-4 i DMT1 odnosno AITD (111,112,197), no rezultati nisu uvijek bili jednoznačni.

### 5.2.1. Polimorfizam CTLA-4 i DMT1

Rezultati ove disertacije ne ukazuju na povezanost polimorfizma CTLA-4 49AG u patogenezi DMT1 u naših bolesnika. Genotip G/G koji se povezuje s nastankom bolesti nađen je s većom učestalošću u bolesnika s DMT1, s omjerom vjerojatnosti od 1,64 ali bez statističke značajnosti ( $p=0,17$ ), isto je nađeno i za učestalost alela G ( $p=0,22$ )

S druge strane, u istraživanju provedenom među odraslim bolesnicima s DMT1 u Hrvatskoj opisana je pozitivna povezanost za polimorfizam 49AG (119) s omjerom vjerojatnosti od 2,7 ( $p=0,012$ ) dok je učestalost alela G u populaciji bolesnika s DMT1 (35,3%) bila viša nego u kontrolnoj skupini (28,5%), ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost ( $p=0,089$ ) kao ni razlika među našim bolesnicima i kontrolom. Korolija i sur. analizirali su i učinak rizičnog genotipa na dob pojave DMT1 i našli su da bolesnici koji nose rizični alel G bolest nastupi ranije u odnosu na bolesnike koji ne nose rizični genotip (srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u bolesnika nosioca rizičnog alela G bila je 21,4 godine u odnosu na 24,8 godine u bolesnika koji nisu nosioci rizičnog alela G,  $p=0,046$ ) (119). U našoj studiji nisu nađene razlike u srednjoj dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 neovisno o tome je li uz DMT1 bio prisutan i AITD obzirom da je srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u bolesnika s DMT1 nosioca rizičnog genotipa G/G bila je 9,1 godina, genotipa A/G 8,3 godina dok je srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 u nosioca genotipa A/A bila 8,0 godina ( $p=0,54$ ). Jedno od objašnjenja za navedene razlike moglo bi biti u već je ranije postavljenoj sumnji kako polimorfizam CTLA-4 49AG možda i nije pravi rizični faktor za razvoj bolesti već samo marker neravnoteže udruživanja („linkage disequilibrium“) te da bi do sada opisane razlike mogle biti samo posljedica različitosti neravnoteže udruživanja u različitim populacijama (112,198,199).

Pozitivna povezanost polimorfizma CTLA-4 49AG s DMT1 opisana je i u drugim studijama uključujući brojne evropske populacije kao što su: španjolska, francuska, talijanska, zatim belgijska, estonska (200-202). O pozitivnoj povezanosti polimorfizma CTLA-4 49AG s DMT1 izvjestili su i autori iz drugih dijelova svijeta (Koreja, Iran, Egipat, Japan) u svpojim radovima (203-205). No istovremeno, brojna druga istraživanja nisu našla povezanost polimorfizma CTLA-4 49AG s nastankom DMT1 kako u Europi (Velika Britanija, Portugal,

Turska) (198,199), tako ni u svijetu (Kina, Čile, Japan, Brazil, Azerbejđan) (200,206-209).

S druge strane, rezultati ove studije ukazuju na povezanost polimorfizma gena CTLA-4 CT60 s nastankom DMT1, s omjerom vjerojatnosti za rizični genotip G/G od 2,18 ( $p=0,007$ ) kako u bolesnika s DMT1 bez AITD (OR 2,12;  $p=0,02$ ) tako i APS3v (OR 2,26;  $p=0,01$ ). Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima ranijih istraživanja u kojima je rizični genotip G/G također statistički značajno češće povezan s nastankom DMT1 (112) iako je u nekim od tih studija statistička značajna povezanost nađena samo u skupini bolesnika s APS3v (OR 1,54;  $p=0,027$ ) (plos one) i u onih koji imaju samo AITD (OR 1,31;  $p=0,045$ ) (112) dok nije nađena u bolesnika koji su imali DMT1 bez AITD (14,113). Isti autori nisu našli povezanost s polimorfizmom gena CTLA4 49AG i nastanka DMT1 (OR 1,08 (0,87-1,33), neovisno o prisustvu AITD (113) što također odgovara rezultatima dobivenim u ovoj dizertaciji (Tablica 4.2.1.1.).

U dvije velika istraživanja koja su koristila meta-analize i u kojim se ispitivao utjecaj polimorfizma CTLA-4 gena na DMT1 nađena je statistički značajna povezanost oba polimorfizma gena CTLA-4 (49AG i CT60) s nastankom DMT1 (111,112).

Kavvoura i sur. proveli su meta-analizu koja je obuhvatila 33 studije od kojih je u nekima ispitivana povezanost DMT1 s više od jednog SNP-a gena CTLA-4. Tako je u 29 studija ispitivana povezanost DMT1 s polimorfizmom CTLA-4 49AG, u šest s polimorfizmom (AT)<sub>n</sub> mokrosatelita, a u tri s polimorfizmom CT60 na ukupno 5.637 bolesnika s DMT1, dok je kontrola obuhvaćala 6.759 ispitanika. Nađena je statistički značajna povezanost alela G polimorfizma CTLA-4 49AG s nastankom DMT1 ( $p<0,001$ ; OR 1,45) te je jača povezanost (OR 1,61) nađena u bolesnika u kojih je DMT1 dijagnosticiran u mlađoj životnoj dobi (<20 godine života).

U drugoj meta-analizi (112) autori su analizirali 58 studija od kojih je 51 ispitivalo povezanost polimorfizma CTLA-4 49AG, a 15 je analiziralo povezanost polimorfizma CTLA-4 CT60 s nastankom DMT1 (30723 bolesnika s DMT1 i 45254 kontrolnih ispitanika). Ustanovili su da postoji značajna povezanost alela G u oba polimorfizama s nastankom DMT1. Ukupni omjer vjerojatnosti za nastanak DMT1 u osoba koje nose alel G na CTLA-4 49AG bio je 1,42 (95% CI 1,31-1,53;  $p<10^{-5}$ ), a za alel G CTLA-4 CT60 1,23 (95% CI 1,18-1,29;  $p<10^{-5}$ ), uz razlike koje su ovisne o etničkoj pripadnosti. Statistički značajna povezanost nađena je u populacijama bijele rase i populacijama Srednjeg istoka za oba polimorfizma,



dok je u Istočnoj Aziji značajna povezanost nađena samo s polimorfizmom CTLA-4 49GA, a ne i s polimorfizmom CTLA-4 CT60. U indijskoj populaciji nađena je granična povezanost s polimorfizmom CTLA-4 CT60, a među pripadnicima populacija iz Afrike povezanost nije potvrđena. Obrazloženje zašto isti polimorfizam igra različitu ulogu u pojedinim populacijama ili različitim studijama tumači se kompleksnošću bolesti i genetskom heterogenosti DMT1 ali i razlikama u genetskoj strukturi pojedinih populacija (112).

Rezultati naše studije ukazuju da bi polimorfizam gena CTLA-4 49AG mogao igrati tek manju ulogu u citotoksičnom upalnom odgovoru i riziku za nastanak DMT1 neovisno o prisustvu AITD. S druge strane, naši rezultati mogu poduprijeti ulogu polimorfizma CTLA-4 CT60 gena u riziku za nastanak DMT1 u nosioca genotipa G/G, kako u bolesnika s APS3v tako i u bolesnika s DMT1 bez AITD. Nadalje, zanimljivo je da je u ukupnoj populaciji bolesnika s DMT1 u odnosu na ispitanike kontrolne skupine genotip A/G nađen statistički značajno rjeđe ( $p=0,047$ ) što govori u prilog recesivnoj ulozi polimorfizma CTLA-4 CT60 u riziku za nastanak DMT1.

### ***5.2.2. Polimorfizam CTLA-4 i AITD***

Jedna od najčešćih organ-specifičnih bolesti, AITD, uzrokovana je imunološkim odgovorom na vlastite tiroidne antigene i zahvaća oko 5% opće populacije (210,211). Iako etiološki mehanizmi AITD nisu u potpunosti jasni, dosadašnja saznanja ukazuju na ulogu nekoliko različitih genetskih faktora uključenih u patogenezu ove bolesti koja je karakterizirana obiteljskom agregacijom (210,212). Među do sada istraživanim genima povezanim s nastankom AITD, dokazana je uloga gena CTLA-4 u sklonosti razvoju različitih oblika AITD (214). I kod AITD-a analizirana su već prije spomenuta dva polimorfizma u genu CTLA-4 (49AG i CT60) u različitim etničkim skupinama i populacijama (214,215).

#### ***5.2.2.1. Polimorfizam gena CTLA-4 49AG***

U našem istraživanju u bolesnika s AITD nije nađena povezanost polimorfizma 49AG

s nastankom bolesti. Genotip G/G koji se povezuje s nastankom AITD nađen je s većom učestalošću u naših bolesnika s omjerom vjerojatnosti od 1,67 ( $p=0,16$ ), no ta povezanost nije statistički značajna, kao ni učestalost alela G koji je u bolesnika s AITD nađen gotovo u jednakoj učestalosti kao i u ispitanika kontrolne skupine ( $p>0,05$ ). Jednako tako, genotip G/G nađen je s većom učestalošću u bolesnika s AT (20,5%) i bolesnika s GB (16,1%) u odnosu na kontrolu (12,8%) ali ta razlika nije statistički značajna ( $p>0,05$ ). I u brojnim drugim radovima, rađenim u različitim populacijama, ali uglavnom u odraslih bolesnika, također nije nađena povezanost polimorfizma gena CTLA-4 49AG s AITD (112), s izuzetkom istraživanja u populaciji Turske u kojoj su autori ukazali na povezanost ali samo s nastankom GB (211). Nadalje, u jednoj od rjeđih studija u kojoj je analizirana povezanost gena CTLA-4 s GB kod djece, a koja je provedena u Japanu, također nije nađena razlika u učestalosti alela G između bolesnika i ispitanika kontrolne skupine, iako je učestalost genotipa A/A bila značajno manja u bolesnika s GB u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika (216).

Kavvoura je 2005. godine objavio rezultate kolaborativnog internacionalnog istraživanja, koje je uključivalo meta-analizu, s ciljem utvrđivanja utjecaja polimorfizma gena CTLA-4 na povećanje učestalosti AITD (AT i/ili GB) (153). Bile su uključene 32 studije s 11019 ispitanika i kojih je ispitivana poveznost polimorfizma CTLA-4 49 AG s GB, te 12 studija s ukupno 4479 ispitanika u kojih je ispitivana povezanost istog polimorfizma s nastankom AT. Nađena je statistički značajna povezanost rizičnog alela G s GB s omjerom vjerojatnosti od 1,49 ( $p<0,001$ ) i AT (OR 1,29;  $p<0,001$ ). Rezultati su bili konzistentni u svim populacijama bez obzira na porijeklo (197) iako uz velike razlike među studijama.

#### **5.2.2.2. Polimorfizam CTLA-4 CT60**

Analiza utjecaja polimorfizma gena CTLA-4 CT60 na nastanak AITD u ovom istraživanju, ukazuje na statistički značajnu povezanost za rizični genotip G/G (OR 2,23;  $p=0,006$ ). Unutar skupine bolesnika s AITD statistički značajna povezanost je nađena samo za grupu bolesnika s AT (OR 2,42;  $p=0,003$ ), dok za grupu bolesnika s GB ta povezanost nije bila statistički značajna (OR 1,56;  $p>0,05$ ). Učestalost alela G u bolesnika s AITD je veća

nego u ispitanika kontrolne skupine, no ta razlika nije statistički značajna.

U meta-analizi koju je 2007. godine objavio Kavvoura sa suradnicima (197) bilo je uključeno 15 istraživanja s ukupno 7246 bolesnika koje su ispitivale utjecaj polimorfizma gena CTLA-4 CT60 na nastanak GB i šest studija s preko 3000 bolesnika (N=3086) koje su ispitivale povezanost istog polimorfizma s AT. Nađena je statistički značajna povezanost rizičnog alela G s GB (OR 1,45;  $p < 0,001$ ) i AT (OR 1,64;  $p < 0,003$ ). U kontrolnoj skupini ispitanika učestalost alela G bila je 64,3% što se podudara s učestalošću nađenom u našoj populaciji (53,2%; Tablica 4.2.2.1.). Genotip G/G uočen je u istraživanju Kavvoura i sur. kod 44%, što je više nego u naših kontrolnih ispitanika (23,4%).

U bolesnika s AT, meta-analizom navedenih studija, nađena je statistički značajno veća učestalost alela G (OR 1,64;  $p = 0,003$ ), ali s velikom varijabilnošću među pojedinim studijama. Nadalje, genotip G/G u bolesnika s AT nađen je 2,83 puta češće nego genotip A/A, odnosno s 1,87 puta većom vjerojatnošću od genotipa A/A i genotipa AG zajedno, što upućuje na statistički značajnu povezanost genotipa G/G s nastankom AT u svim populacijama. U našoj studiji učestalost alela G među bolesnicima s AT veća je nego u kontrolni ali bez statističke značajnosti (OR 1,42;  $p = 0,07$ ). S druge strane učestalost genotipa G/G je statistički značajno veća u bolesnika s AT nego u kontrolnoj skupini ispitanika (OR 2,42;  $p = 0,003$ ) što odgovara grupnim rezultatima dobivenim meta-analizom navedenih istraživanja (197).

Među bolesnicima s GB učestalost alela G bila je statistički značajno veća s omjernom vjerojatnosti od 1,45 ( $p < 0,01$ ) i među bolesnicima iz Azije i među bolesnicima europskog porijekla. Genotip G/G u bolesnika s GB nađen 2,24 puta češće nego genotip A/A, odnosno s 1,62 puta većom vjerojatnošću od genotipa A/A i genotipa AG zajedno, što upućuje na statistički značajnu povezanost genotipa G/G s nastankom GB bez obzira o kojoj skupini populacija je riječ. Učestalost alela G i genotipa G/G u bolesnika s GB je također uočena i u ovoj studiji i to s omjerom vjerojatnosti od 1,56 za genotip G/G, odnosno 1,14 za alel G no ta povezanost nije bila statistički značajna.

U istraživanju autora iz Slovenije (215), koje je obuhvatilo slovensku populaciju (123 bolesnika s GB, 53 bolesnika s AT i postpartalnim tiroiditisom te 117 kontrolnih ispitanika), također su istraživani polimorfizmi gena CTLA-4 (49AG i 60CT). U toj studiji samo je u

bolesnika s GB nađena statistički značajno veća učestalost genotipa G/G u odnosu na kontrolne ispitanike za oba polimorfizma ( $p=0,04$  za polimorfizam CTLA-4 49AG i  $p=0,02$  za polimorfizam CTLA-4 60CT). Učestalost genotipa G/G polimorfizma gena CTLA-4 49AG u skupini bolesnika s GB bila je 13,8% u odnosu na kontrolu skupinu gdje je ta učestalost bila značajno manja, odnosno 5,1%. No treba istaknuti da u kontrolnoj skupini ispitanika, uključenoj u to istraživanje, nije bio zadovoljen WHE. Među našim bolesnicima s GB učestalost genotipa G/G polimorfizam CTLA-4 49AG bila je viša (16,1%), nego u bolesnika iz Slovenije, ali kako je bila viša i u kontrolnoj skupini (12,8%) razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,65$ ). U slovenskoj studiji učestalost genotipa G/G za polimorfizam CTLA-4 60CT u bolesnika s GB bila je 40,7%, statistički značajno viša nego u ispitanika kontrolne skupine (25,6%) uz zadovoljen WHE (215). U ovoj studiji učestalost genotipa G/G polimorfizma CTLA-4 CT60 među bolesnicima iznosila je 32,3% što je malo niže nego među bolesnicima iz Slovenije, dok je učestalost tog genotipa u našoj kontrolnoj skupini ispitanika (23,4%) bila skoro ista kao u kontroli u slovenskoj populaciji. Naše istraživane skupine zadovoljavale su WHE.

U bolesnika s AT i postpartalnim tiroiditisom u istoj studiji iz Slovenije (215) nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti genotipa G/G ili alela G u odnosu na kontrolu. Učestalost genotipa G/G među bolesnicima s AT iznosila je 13,4%, a među zdravim kontrolnim ispitanicima 5,1%, no ta razlika nije statistički značajna ( $p=0,054$ ). Rezultati naše studije ukazuju na višu učestalost genotipa G/G među našim bolesnicima s AT (20,5%), nego u slovenskoj populaciji, ali je također bila viša i u kontrolnoj skupini (12,8%), razlika nije bila statistički značajna ( $p>0,05$ ). S druge strane u našoj je studiji nađena statistički značajna povezanost genotipa G/G polimorfizma CTLA-4 CT60 s AT (OR 2,42;  $p=0,003$ ), dok u slovenskoj populaciji ta povezanost nije utvrđena ( $p=0,28$ ). Zanimljivo je da je genotip A/G nađen statistički značajno manje u bolesnika s AT (38,6%;  $p=0,002$ ), odnosno AITD (40,5%;  $p=0,003$ ) nego u kontrolnoj skupini (59,6%) što uz već ranije uočen obrazac i u bolesnika s APS3v, može govoriti u prilog protektivnoj ulozi polimorfizma gena CTLA-4 CT60 i to prvenstveno u riziku za razvoj AITD. Nadalje, povezanost polimorfizma CTLA-4 CT60 s nastankom AITD, kako GB tako i AT, potvrđena je i u nedavno objavljenoj meta-analizi koja je obuhvatila rezultate 20 studija od kojih je njih 18 ispitalo povezanost s GB, a njih 7 povezanost s AT (211). Treba istaknuti da su navedenim istraživanjem bile obuhvaćene populacije različitih rasa. Rezultati ovog radu su podudarni za bolesnike s AT, dok smo u

skupini bolesnika s GB također našli veću učestalost rizičnog genotipa G/G no ta razlika nije dostigla statističku značajnost. Povezanost polimorfizma gena CTLA-4 s AITD nije konzistentno potvrđena. Na osnovu rezultata naše studije, genetski rizik polimorfizma gena CTLA-4 49AG igra tek manju ulogu i u humoralnom i citotoksičnom upalnom odgovoru. S druge strane, naši rezultati mogu poduprijeti ulogu polimorfizma gena CTLA-4 CT60 prvenstveno u citotoksičnom upalnom odgovoru i riziku za nastanak AT u nosioca genotipa G/G, dok je uloga u humoralnoj imunosti upitna.

### ***5.3. Polimorfizam gena PTPN22***

#### ***5.3.1. Polimorfizam PTPN22 i DMT1***

Dosadašnje studije pokazale su povezanost polimorfizma PTPN22 R620W s DMT1 u etnički različitim populacijama (48,50,53,116,118,119,217-234) iako rezultati nisu uvijek bili jednoznačni. S ciljem analize rezultata istraživanja povezanosti polimorfizma gena PTPN22 R620W i DMT1, Peng i suradnici proveli su meta-analizu koja je uključila 26 istraživanja s ukupno 16240 bolesnika s DMT1 i 17997 kontrolnih ispitanika. Ispitali su učestalost alela T u odnosu na alela C te genotip T/T i T/C u odnosu na genotip C/C (236). Utvrdili su povezanost polimorfizma gena PTPN22 R620W i DMT1 s omjerom vjerojatnosti za alel T u odnosu na alel C od 1,948 ( $p < 0,001$ ). Nakon podjele po etničkim skupinama najjaču povezanost su našli u populacijama europskog (OR 1,95;  $p < 0,001$ ) i američkog (OR 1,95,  $p < 0,001$ ) porijekla. Meta-analiza genotipa TT i T/C u odnosu na genotip C/C također je pokazala povezanost polimorfizma gena PTPN22 R620W s DMT1 u prethodno navedenim populacijama (235), dok za populacije azijskog porijekla analiza nije provedena zbog malog broja studija.

Rezultati ove dizertacije također govore u prilog povezanost alela T gena PTPN22 R20W i DMT1 neovisno o prisutnosti AITD (OR 2,62;  $p = 0,003$ ) i to prvenstveno u bolesnika s APS3v (OR 3,93;  $p < 0,001$ ) dok je u bolesnika s DMT1 bez AITD učestalost alela T također veća ali ta razlika u odnosu na zdrave ispitanike nije bila statistički značajna (OR 1,75;  $p < 0,05$ ). Individualnom analizom također je nađena statistički značajno veća učestalost

genotipa T/T među bolesnicima s DMT1 ( $p=0,01$ ) i to na račun bolesnika s APS3v ( $p<0,01$ ) dok u bolesnika samo s DMT1 bez AITD ta razlika nije bila statistički značajna ( $p>0,05$ ). Do sličnih su rezultata došao je i Dultz sa suradnicima u radu u kojem su ispitivali povezanost polimorfizma gena PTPN22 R620W među bolesnicima s APS3v u odnosu na bolesnike s DMT1 bez AITD i bolesnike koji su imali samo AITD (223). Nađena je povezanost alela T s nastankom bolesti u sve tri grupe bolesnika, no najizraženija je, kao i u našem istraživanju u bolesnika s APS3v, s 4 puta većom učestalošću nego u kontroli (OR 4,35;  $p<0,001$ ), zatim u bolesnika s AITD (OR 3,42;  $p=0,006$ ) te u bolesnika s DMT1 bez AITD (OR 2,59;  $p=0,028$ ). Stoga se nameće pretpostavka da gen PTPN22 prvenstveno igra ulogu u ukupnom riziku za nastanak obje bolesti, a tek u manjoj mjeri za svaku bolest posebno (223).

Do sličnih su zaključaka došli i Saccucci i sur. (133) u radu u kojem je ispitivana povezanosti polimorfizma gena PTPN22 u bolesnika s DMT1, ali i unutar male skupine bolesnika s APS3v. Među bolesnicima s DMT1 koji su nosioci alela T autori su uočili veću učestalost AITD. Ovi su rezultati u skladu s našim, no cilj njihovog istraživanja bio je prvenstveno istražiti povezanost alela T s DMT1 i nisu uspoređeni bolesnici koji imaju samo AITD kao su studiji Dultz i sur., te našoj studiji (133).

U Hrvatskoj je do sada ispitivana povezanost polimorfizma gena PTPN22 kod 102 odrasla bolesnika s DMT1 i 193 kontrolna ispitanika, nađena je statistički značajno veća učestalost rizičnog alela T u skupini bolesnika s DMT1 (OR 3,06;  $p<0,0001$ ). U tom radu također nije provedna analiza podskupine bolesnika s APS3v (119). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da polimorfizam gena PTPN22 R620W može doprinijeti nastanku DMT1 u našoj populaciji i to posebno u skupini bolesnika s APS3v.

### **5.3.2. Polimorfizam PTPN22 i AITD**

Posljednjih godina, polimorfizam gena PTPN22 R620W intenzivno je istraživan s ciljem ispitivanja povezanosti s nastankom AITD u različitim etničkim skupinama no rezultati nisu uvijek bili jednoznačni (15,48,236,237). Luo i sur. proveli su meta-analizu 11 različitih studija koje su ispitivale povezanost polimorfizma PTPN22 R620W s nastankom AITD, a

uključivale su 3764 bolesnika i 3328 zdravih ispitanika (236). Četiri istraživanja provedena su među bolesnicima azijskog porijekla (Kina, Japan), a sedam među bolesnicima europskog porijekla (Poljska, Velika Britanija, Njemačka, Rusija) i populaciji iz Tunisa. U sedam istraživanja uključenih u tu studiju ispitivana je povezanost s GB, u dvije studije povezanost s GB i AT zajedno, u jednoj povezanost s GB i AT odvojeno, a u jednoj samo s AT. Nađena je povezanost polimorfizma C/T s rizikom za nastanak AITD (T/T vs. C/C - OR 2,18; T/C vs. C/C - OR 1,50). Nadalje, podjelom u podskupine veći rizik za nastanak bolesti nađen je u bolesnika s GB (T/T vs. C/C - OR 2,18; T/C vs. C/C - OR 1,47) dok među bolesnicima s AT taj rizik nije potvrđen. U analizi prema etničkim grupama, povezanost je nađena s bolesnicima s AITD evropskog porijekla (T/T vs. C/C - OR 2,18; T/C vs. C/C - OR 1,47). U ranije provedenoj meta-analizi Lee i suradnika analizirana je povezanost polimorfizma PTPN22 R620W s nastankom različitih autoimunih bolesti (238). Uključeno je bilo 29 istraživanja s tim da je u nekima od njih ispitivana povezanost s više autoimunih bolesti, analizirane su sveukupno 43 moguće povezanosti i to u 13 istraživanja povezanosti polimorfizma R620W gena PTPN22 s reumatoidnim artritismom (RA), u 6 s sistemskim lupusom eritematosusom (SLE), u 6 s DMT1, u 4 s upalnom bolesti crijeva, u 3 s GB, u 3 s juvenilnim idiopatskim artritismom, u 2 s psorijazom, u 2 s multiplom sklerozom, u 2 s Addisonovom bolešću te u 2 s celijakijom. Veći rizik za nastanak bolesti (povećan omjer vjerojatnosti za alel T, te genotip T/C i genotip T/T) otkriven je kod bolesnika s RA, SLE, GB i DMT1 no ne i u bolesnika s upalnom bolesti crijeva, psorijazom, multiplom sklerozom, Addisonovom bolešću i celijakijom (238). Ovi se podaci podudaraju s rezultatima našeg istraživanja. Naime, među našim bolesnicima s AITD alel T također je statistički značajno češći u cijeloj skupini bolesnika u odnosu na kontrolu (OR 2,13;  $p=0,02$ ) i to prvenstveno u bolesnika s GB (OR 3,16;  $p<0,01$ ). U bolesnika s AT, alel T je također bio češći nego u kontrolnoj skupini no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,07$ ). S druge strane, analizom genotipova nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika s AITD i kontrolnih ispitanika. Zanimljivo je spomenuti da među ispitanicima kontrolne skupine uključenim u ovaj rad nije nađen genotip T/T, dok je alel T nađen s učestalošću od samo 6,4% u odnosu na 93,4% učestalosti alela C. U drugim studijama je također uočena velika raznolikost u zastupljenosti ovih alela. Tako je alel T vrlo rijedak među amerikancima afričkog porijekla i gotovo odsutan u većini populacija azijskog porijekla (52,240). Tako je na primjer u Kini (52), Japanu ili Koreji (238), do sada uočen samo alel C.

Rezultati našeg rada govore u prilog povezanosti polimorfizam gena PTPN22 R620W s nastankom AITD, što je jače izraženo u bolesnika s GB nego u bolesnika s AT. Genetski faktori u svakom slučaju igraju važnu ulogu u nastanku AITD i procjenjuje da nose rizik od oko 80% (236), dok preostalih 20% utjecaja imaju okolišni faktori. Prema našem saznanju i pregledanoj literaturi ovo je jedina studija u kojoj je ispitivana povezanost polimorfizma gena PTPN2 s AITD u populaciji Hrvatske.

#### **5.4. Bolesnici s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na $\beta$ stanice Langerhansovih otočića gušterače**

Učestalost tiroidne autoimunosti u bolesnika s DMT1 ispitivana je u brojnim radovima (240-243), dok je rijetko ispitivana učestalost antitijela na beta stanice Langerhansovih otočića gušterače (ICA, GADA i IA-2) u bolesnika s AITD (121-126). U ovom istraživanju u skupini bolesnika s AITD, njih 10,8% imalo je povišene titrove antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (ICA i/ili GAD i/ili IA-2) od toga 2 od 31 bolesnika s GB (6,45%) i 15 od 127 bolesnika s AT (11,81%). Tijekom istraživanja, u razdoblju od 2,5 godine, njih 3,8% (6/158) razvili su DMT1. Na žalost, od malobrojnih studija koje su ispitivale učestalost povišenih titova antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića među bolesnicima s AITD samo tri uključivale djecu i adolescente (121,244,245).

U studiji Bright i suradnika iz 1982. (121), 2,3% bolesnika s AITD imalo je povišen titar ICA antitijela u odnosu na 0% u kontrolnih ispitanika. Obzirom da je cilj ispitivanja bio isključivo analiza različitih autoantitijela (TPO At, Tg At, ICA, antitijela na parijetalne stanice i stanice adrenalnog korteksa) u različitim skupinama bolesnika (ukupno 438 bolesnika; 88 bolesnika s AITD; 201 bolesnik s DMT1; 24 bolesnice s Turnerovim sindromom; 8 bolesnika s Addisonovom bolešću). Bolesnici s AITD u kojih je nađen povišen titar ICA nisu dalje praćeni obzirom na mogućnost pojave laboratorijskih i kliničkih znakova DMT1, a nije niti ispitivana učestalost drugih autoantitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića niti je provedena analiza rizičnih gena (121). U ovoj dizertaciji povišen titar antitijela ICA nađen je kod 5,1% bolesnika i to samostalno kod tri bolesnika u kojih su laboratorijski



pokazatelji mogućeg razvoja DMT1 (C-peptid, HbA1c, OGTT) bili uredni. U dvoje bolesnika povišen titar ICA nađen je u kombinaciji s povišenim titrom još jednog antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (GAD antitijela u jednog bolesnika te IA-2 antitijela u drugog bolesnika). Povišeni titrovi sva tri antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače nađeni su kod tri bolesnika s AITD. Svi bolesnici u kojih su nađeni pozitivni titrovi dva ili tri antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića razvili su tijekom praćenja DMT1.

U drugoj studiji koja je uključivala dječju populaciju Pilia i sur. ispitivali su učestalost GAD i IA-2 antitijela u skupini od 236 djece i adolescenata samo s AT sa Sardinije, otoka s posebno visokom učestalošću DMT1 (96,244), i to u vrijeme postavljanja dijagnoze AT i ponovo nakon godinu dana. Titrovi oba antitijela (GAD i/ili IA-2) bili su povišeni u 8% u bolesnika s AT u odnosu na 4,1% u kontrolnoj skupini ispitanika ( $p=0,017$ ). Kada su zasebno analizirali učestalost ova dva antitijela, statistički značajna razlika nađena je samo u učestalosti IA-2 antitijela (3,39% u bolesnika s AT u usporedbi s 1,16% u kontrolnih ispitanika;  $p=0,012$ ), dok za GADA nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti između ove dvije skupine ( $p=0,37$ ). Deset od 17 bolesnika s AT i povišenim titrovima autoantitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića reevaluirano je nakon godinu dana i u 7 od njih je perzistirala beta stanična autoimunost, dok je u razdoblju od dvije godine praćenja, dvoje od te djece razvilo DMT1 (244).

Treća studija Marwaha i sur. (245) provedena je kao dio probira u okviru sistematskih pregleda djece i odraslih u Indiji 2013. godine, uključivala je osobe ( $N=577$ ) u kojih su otkrivena antitiroidna antitijela i istog tolikog broja ispitanika kontrolne skupine. Skupine su naknadno podijeljene u dvije podskupine, djeca i adolescenti ( $<18$  g) u kojoj je povišen titar TPO antitijela imalo 236 ispitanika, te podskupina odraslih ( $>18$  g) u kojoj je povišen titar TPO antitijela imalo 342 ispitanika te im je dodatno analizirana tiroidna funkcija i određeni titrovi GAD. Hipotireoza je nađena kod 40,2% ispitanika s povišenim titrom TPO antitijela te u 4,7% onih s negativnim TPOAt ( $p<0,001$ ). Povišen titar GADA nađen je u 12,5% ispitanika s povišenim titrom TPOAt u odnosu na 4,3% kontrolnih ispitanika ( $p=0,001$ ) i ta je razlika bila statistički značajna neovisno o dobi (u 10,6% djece i adolescenata,  $p=0,004$ ; u 13,8% odraslih  $p=0,001$ ). Povišen titar GADA bio je statistički značajno češći s porastom visine titra TPOAt ( $p<0,001$ ).

U ovom radu povišen titar GAD antitijela nađen kod 7,1% bolesnika s AT ,

samostalno u 3,9% (5/127) bolesnika, a u 1,6% bolesnika (2/127) povišen titar GADA nađen je u kombinaciji s povišenim titrom još jednog antitijela i to u kombinaciji s ICA kod jednog te IA-2 kod drugog bolesnika. Povišen titar IA-2 antitijela nađen je u 5,5% bolesnika s AT, od toga samostalno u 2,4% a u kombinaciji s povišenim titrom još jednog antitijela u 1,6% u kombinaciji s ICA ili u kombinaciji s GADA. Povišeni titrovi sva tri antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače nađeni su samo kod dva bolesnika s AT (1,6%). Razlika između učestalosti povišenih titrova antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića između bolesnika s AITD i kontrolne skupine ispitanika bila je statistički značajna ( $p=0,001$ ). Svi bolesnici u kojih su nađeni povišeni titrovi dva ili tri antitijela razvili su DMT1 u razdoblju od 0,3 do 5,4 godine od postavljanja dijagnoze AT.

Još su dvije studije, provedene među odraslim ispitanicima u Švedskoj i Turskoj, ispitivale učestalost povišenih antitijela na stanice otočića gušterače u bolesnika s AT (129, 246). U radu Lethagen i sur. (129) provedenim 2002. godine u Švedskoj, ispitivana je moguću povezanost GADA sa subkliničkim oštećenjem beta stanica i poremećenom sekrecijom inzulina u skupini od 441 bolesnika s AT. Povišen titar GADA nađen je kod 3,4 % bolesnika, a povišen titar IA-2 u 2 od 15 GADA pozitivnih bolesnika i u jednog u kojeg je titar GAD antitijela bio nemjerljiv. Izmjerene su im razine inzulina i C peptida te odgovor glukagona na stimulaciju glukozom i argininom i kako je u bolesnika s povišenim titrom GADA nađena smanjena sposobnost sekrecije inzulina, zaključeno je da bi GADA mogla biti marker subkliničkog insulitisa u bolesnika s AT (129). U istraživanju provedenim od strane grupe autora iz Turske, povišen titar GADA nađen je u 5,1% bolesnika s AT (246). U 9 bolesnika s povišenim titrom GADA, kao i u 8 bolesnika s AITD i negativnim GADA dodatno je učinjena intravenski test opterećenja glukozom s čestim uzorkovanjem (FSIGTT, engl. frequently sampled intravenous glucose tolerance test) te na osnovu izmjerenih razina glukoze i inzulina iz testa izračunati su HOMA IR, HOMA-beta stanična funkcija, prva faza inzulinskog odgovora na glukozu, indeks osjetljivosti na inzulin i indeks osjetljivosti na glukozu. Nije nađena statistički značajna razlika u inzulinskoj osjetljivosti i lučenju između bolesnika s povišenim titrom GAD u odnosu na one s negativnim.

Nekoliko istraživanja analiziralo je bolesnike s GB i učestalost autoimunosti na stanice otočića gušterače i nastanak DMT1 (123, 128), odnosno uspoređivali su učestalost beta stanične autoimunosti u bolesnika s AT u odnosu na GB (247). Tako je u radu Maugendre i

suradnika, koje je uključilo odrasle ispitanike europskog porijekla, u ranoj fazi GB klinički manifestan dijabetes imalo njih 1,7% (29/590 bolesnika) (123). Pozitivan titar ICA nađen je u 4,9% bolesnika s GB bez znakova dijabetesa što je značajno više nego u općoj populaciji i odgovara prevalenciji ICA u prvih srodnika bolesnika s DMT1 (80,84). Prevalencija GADA u bolesnika s GB iz ove studije (10,6%) bila je značajno viša nego u kontrolnoj skupini (1,3%) i prvih srodnika bolesnika s DMT1 (4,2%) (123).

Povećana učestalost GADA, ali ne i ICA, dokazana je u odraslih bolesnika s AITD i u ranijim istraživanjima (125,128). Tako je švedska studija Hallengrena i sur. iz 1996. godine (128) provedena u skupini bolesnika s GB, pokazala statistički značajno veću učestalost GADA (11/85 ispitanika, 13%), dok povišen titar ICA nije bio statistički značajno češći (2/92 ispitanika, 2,2%) nego u zdravoj kontrolnoj skupini (0/37, 0%) (128).

Wiebolt i suradnici (248), ispitivali su učestalost adrenalne, beta-stanične (GADA), gatrične autoimunosti i celijakije u skupini odraslih bolesnika s GB (N=523) i skupini bolesnika s AT (N=359). Povišen titar GADA nađen je u 6,6% bolesnika s AT koji nisu imali DMT1 u odnosu na 4,6% bolesnika s GB koji nisu imali DMT1, razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,29$ ). Istovremeno je statistički značajno ( $p=0,03$ ) više bolesnika s AT (15,9%) nego GB (9,2%) imalo DMT1. Istraživanje provedeno u Brazilu 2008. godine u kojem je ispitivana beta stanična autoimunost (GADA, IA-2, antitijela na inzulin, IA/A, i proinzulin PA/A) u bolesnika s AITD izvjestilo je da je 6,0% bolesnika s AITD (bez DMT1) imalo povišene titrove antitijela na beta stanice Langerhansovih otočića (248).

U ovom radu 6,45% bolesnika s GB (oba bolesnika bila su ženskog spola) imalo je povišen titar antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića. Obje djevojčice imale su povišen titar ICA antitijela, dok je jedna imala i povišene titrove sva tri antitijela te je razvila DMT1, 3,5 godine nakon postavljanja dijagnoze GB. Povećana učestalost autoimunosti na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u zadnjim istraživanjima (244,245) kao i u naših bolesnika s AITD u odnosu na slična ranije provedena istraživanja u europskim zemljama, može se objasniti stalnim povećanjem incidencije DMT1 u cijelom svijetu, posebno u populacijama evropskog porijekla, uključujući i našu populaciju. Prema istraživanjima provedenim u populaciji djece i adolescenata u Hrvatskoj porast godišnje incidencije DMT1 u našoj populaciji je čak i nešto veći nego europski prosjek (5,9% vs. 3,9%) (96).

Nedavno je provedeno nekoliko istraživanja učestalosti autorimunosti na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u bolesnika s AITD u populaciji Japana koja su ukazala na povećanu učestalost povišenog titra antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u bolesnika s AITD u odnosu na kontrolu. Tako su Kawasaki i sur. (125) u studiji objavljenoj 1995. godine otkrili značajno veću učestalost pozitivnih GADA u odraslih bolesnika s AT (7,9%) i GB (6,1%) u odnosu na zdrave ispitanike (0,08%;  $p < 0,005$ ) Zanimljivo je kako ni jedan od njihovih bolesnika s pozitivnim GADA nije imao pozitivna ICA niti IA-2 antitijela, te su pretpostavili da u bolesnika s AITD autoimuni odgovor na GAD može nastati i neovisno o stvaranju drugih antitijela na beta stanice. Autori nisu ispitivali poveznost s do sada poznatim rizičnim genima za nastanak DMT1.

S druge strane, u radu Moriguchi i suradnika provedenoj u Japanu 2010. godine (122), u koju je bilo uključeno 866 odraslih bolesnika s AITD (546 s GB i 320 s AT) i 282 zdravih ispitanika, povišen titar GADA dokazan je češće i u višem titru u bolesnika s AITD (5,8%) u odnosu na zdrave ispitanike (2,1%). Gledano odvojeno povišen titar GADA nađen je značajno češće u bolesnika s GB nego u kontrolnih ispitanika (7,1% vs. 2,1%) kao što je dokazano u ranijim studijama (123,124), dok je u bolesnika s AT povišen titar GADA nađen češće nego kod kontrolnih ispitanika, ali bez statističke značajnosti (3,4% vs. 2,1%). Titar IA-2 antitijela ispitivali su samo u skupini bolesnika s povišenim titrom GADA te su u toj skupini našli 12 od 44 bolesnika s povišen titar i IA-2 antitijela. Analiza gena HLA razreda II u skupini bolesnika s AITD i povišenim titrom GADA pokazala je veću učestalost haplotipa za koje je poznato da je povezan s DMT1 u Japanu (HLA-DRB1\*04:05-DQB1\*04:01) te nisku učestalost haplotipova za koje je poznato da imaju protektivni učinak na nastanak DMT1 (122). Polimorfizam gena CTLA-4 u ispitivanoj grupi bolesnika bio je povezan s AITD ali ne i s pozitivnim GADA. Dokazan povišen titar GADA u bolesnika s AITD u oba istraživanja podudara se s našim rezultatima gdje smo našli 6,3% takvih bolesnika, s tim da je učestalost veća u bolesnika s AT (9/127; 7,1%) u odnosu na bolesnike s GB (1/31; 3,2%) kao i u istraživanju Kawasaki i suradnika (125).

Slično kao i u studiji Moriguchi i sur. učestalost rizičnog genotipa G/G polimorfizma CTLA-4 49AG bila je statistički značajno veća u naših bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na one s niskim titrom antitijela ( $p=0,024$ ). Nismo uočili povezanost s učestalošću polimorfizma gena PTPN22 i CTLA-4

CT60 s nastankom DMT1 u bolesnika s AITD. Bolesnici s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u našoj studiji imali su viši titar antitiroidnih antitijela u odnosu na bolesnike s AITD i niskim titrom autoantitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića iako ta razlika nije bila statistički značajna. Također smo uočili i mlađu dob u skupini bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na one s niskim dok nismo našli razlike u učestalosti autoantitijela među spolovima.

U bolesnika s AITD u kojih je nađen povišen titar jedan ili više antitijela (ICA, GADA, Ia-2) na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače (17/158; 10,76%), od toga kod 5,56% dječaka i 12,30 djevojčica napravljena je analiza genotipa HLA razreda II te polimorfizma gena CTLA-4 i PTPN22. U jednog dječaka analiza gena HLA nije učinjena iz tehničkih razloga tako da je u analizu gena HLA sustava II uključeno 16 bolesnika (1 dječak i 15 djevojčica) s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića gušterače. Visoko rizični genotip HLA za nastanak DMT1, genotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8)/DRB1\*03-DQB1\*02 nađen je samo u jednog od 16 (6,3%) bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića. Riječ je bila o dječaku kojem su dokazani povišeni titrovi dva antitijela i koji je razvio DMT1. Takav genotip HLA imalo 19,8% bolesnika s DMT1 uključenih u našu studiju i niti jedan ispitanika iz kontrolne skupine.

Haplotipovi srednjeg rizika nađeni su u 62,5% djevojčica, slično kao i u bolesnika s DMT1 neovisno o AITD (61,1%), što je znatno više nego u ispitanika kontrolne skupine (30,0%).

Zastupljenost bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića koji nose haplotipove HLA niskog rizika za nastanak DMT1 je 31,2% (5/16 djevojčica) i viša je nego u bolesnika s DMT1 (19,1%) (Tablica 4.6.2.), no niža nego u ispitanika kontrolne skupine (70%). Moguće objašnjenje leži u činjenici što jedan dio djece s AITD u kojih je nađen blago povišen titar samo jednog antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića najvjerojatnije neće razviti DMT1.

U našem istraživanju analizirali smo učestalost povišenih titrova antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića te polimorfizam gena HLA-DRB1-DQB1, CTLA-4 i PTPN22 i u 20 članova obitelji 10 od 17 bolesnika s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi tih antitijela.

Zanimljivo je da je u 25,0% članova obitelji (5/20) nađeni povišeni titrovi antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića i to češće u očeva (3/8 očeva) nego majki (2/10 majki). Jedna majka ima od ranije dijagnosticiran DMT1 i povišene titrove sva tri antitijela (ICA, GADA i IA-2). Drugo dvoje članova obitelji su roditelji djevojčica s AITD i pozitivnim titrom IA-2 antitijela. U majke djevojčice nađen je također blaže povišen titar IA-2 antitijela, dok su u oca nađeni povišeni titrovi ICA i GAD antitijela. Od preostala dva roditelja, oba su očevi djevojčica u kojih su nađeni povišeni titrovi dva odnosno sva tri antitijela na  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočića te koje su nekoliko mjeseci nakon postavljanja dijagnoze AT razvile DMT1. U očeva obje djevojčice nađeni su povišeni titrovi ICA i GADA antitijela. U roditelja djece u kojih su nađeni povišeni titrovi ICA, GAD i/ili IA-2 antitijela u planu je napraviti dodatne laboratorijske pretrage koje bi mogle ukazivati na moguć razvoj DMT1 te će se odrediti titar antitiroidnih antitijela što nije bilo obuhvaćeno ovim ispitivanjem.

U članova obitelji bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića, genotip visokog rizika nije nađen. U dvoje roditelja nađen je genotip srednjeg rizika HLA-DRB1\*03-DQB1\*02/DRB1\*X-DQB1\*X koji u našoj studiji nije češći u bolesnika s DMT1 u odnosu na kontrolnu kupinu ispitanika, a u 3 roditelja nađeni su genotipovi HLA-DRB1-DQB1 niskog rizika.

Učestalost autoantitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u bolesnika s AITD u našem istraživanju iznosi 10,76%, niža je u bolesnika s GB (6,45%), nego s AT (11,81%) te je veća u bolesnika s AT, višim titrom antitiroidnih antitijela i mlađe životne dobi iako ta povezanost nije statistički značajna.

Učestalost autoantitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u bolesnika s AITD nađena u ovom istraživanju viša je nego u ranijim studijama provedenim u populacijama europskog porijekla te odgovara onoj nađenoj u prvih srodnika bolesnika s DMT1 (36,241,242) što govori u prilog povećanom riziku za nastanak DMT1 u ovoj skupini bolesnika.

Ovo istraživanje je jedino do danas, provedeno za neku europsku populaciju, a koje je među djecom i adolescentima s AITD istraživalo visinu titra više antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (GAD, ICA i IA-2) te je analiziralo povezanosti s polimorfizmima do sada poznatih rizičnih gena za nastanak DMT1 (geni HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22).

## 6. ZAKLJUČCI

(1) Učestalost autoantitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u bolesnika s AITD u ovoj studiji iznosi 10.76% (17/158 bolesnika), statistički značajno više nego u kontrolnoj skupini u kojoj povišen titar antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića nije nađen u niti jednog ispitanika ( $p=0.001$ ). Kada podijelimo u poskupine, autoantitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nađena su u bolesnika s AT u 15 od 127 bolesnika, (11.81%), također statistički značajno više nego u kontrolnoj skupini ispitanika ( $p=0.001$ ), i u 2 od 31 bolesnika s GB (6.45%) što nije dostiglo statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p=0.06$ ).

Svih 6 bolesnika s AITD u kojih su nađeni povišeni titrovi dva ili tri antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića (ICA, GADA ili IA-2 antitijela) razvili su tijekom razdoblja praćenja DMT1.

Učestalost povišenih titrova antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića veća je u bolesnika s AITD u kojih je nađen povišen titar antitiroidnih antitijela bili su mlađe životne dobi iako ta povezanost nije statistički značajna.

(2) Visoko rizični haplotip za nastanak DMT1, HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8)/DRB1\*03-DQB1\*02, je u bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nađen s manjom učestalošću (6.3%) nego u bolesnika s APS3v (20.3%) no ta razlika nije statistički značajna ( $p=0.28$ ).

Haplotipovi srednjeg rizika za nastanak DMT1 nađeni su s istom učestalošću u bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića (62.5%) kao i bolesnika s APS3v (62.3%) ali češće nego u ispitanika kontrolne skupine (30%) iako je statistički značajna razlika nađena samo haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03/ HLA-

DRB1\*XX-DQB1\*XX ( $p=0.015$ ) dok razlika u učestalosti drugih haplotipova srednjeg rizika nije bila statistički značajna.

Haplotipovi niska rizika za nastanak DMT1 nađeni su u 31.2% bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića i 17.4% bolesnika s APS3v ( $p=0.296$ ), statistički značajno rjeđe nego u ispitanika kontrolne skupine (69.9%,  $p=0.003$ ).

Rizični G/G genotip polimorfizma CTLA-4 49AG statistički je značajno češći u bolesnika s AITD i povišenim titrom antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića u odnosu na one s niskim titrom antitijela ( $p=0.024$ ).

Nismo uočili povezanost s učestalošću polimorfizma gena PTPN22 i CT60 CTLA-4 s nastankom DMT1 u bolesnika s AITD u ovisnosti o titru antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića.

- (3) Analizom haplotipova gena HLA u svih bolesnika s DMT1 te nakon podjele u podskupine bolesnika s DMT1 bez AITD i APS3v, u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika najznačajnija povezanost nađena je s haplotipovima HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) ( $p<0.001$ ) i HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 ( $p<0.001$  u svih bolesnika s DMT1 te u bolesnika s APS3v,  $p=0.008$  u bolesnika s DMT1 bez AITD). Samo u bolesnika s DMT1 bez AITD nađena je povezanost s haplotipom HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ7 ( $p=0.01$ )). Isti haplotip nije nađen statistički značajno češće u bolesnika s APS3v ( $p=0.577$ ) ni u ukupnoj skupini bolesnika s DMT1 ( $p=0.064$ ) kao ni u bolesnika koji imaju samo AITD ( $p=0.665$ ).

Učestalost pojedinih haplotipova u bolesnika s DMT1 u našoj studiji nije se značajnije razlikovala među dječacima i djevojčicama.

Prema rezultatima ove studije najrizičniji genotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03/DRB1\*03-DQB1\*02 nađen je u 19.8% (32 od 162) bolesnika s DMT1 (Tablica 4.1.3.5.). Učestalost genotipova srednjeg rizika u našoj je studiji nađena u 61.1% bolesnika (99 od 162), a učestalost genotipova niskog rizika u 19.1% (31 od 162) bolesnika s DMT1 neovisno o AITD što je u skladu su s raspodjelom učestalosti ovih genotipa u bolesnika s DMT1 u bijelaca nađenom u studijama rađenim u razdoblju nakon 2000 godine u Europi (145,183).



- (4) Analizom haplotipova gena HLA koji se mogu povezati s nastankom AITD dokazana je veća učestalost haplotipa HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) ( $p=0.005$ ) i to na račun bolesnika s AT gdje je povezanost haplotipa HLA-DRB1\*04-DQB1\*03(DQ8) s nastankom bolesti snažna, s omjerom vjerojatnosti od 3.778 (1.712 – 8.338,  $p<0.001$ ). U bolesnika s GB nađena je veća učestalost haplotipa HLA-DRB1\*03-DQB1\*02 s omjerom vjerojatnosti od 3.196 (1.520 – 6.772),  $p=0.002$ . Protektivnu ulogu za nastanak AITD u našoj studiji našli smo za haplotip HLA-DRB1\*01-DQB1\*05 ( $p=0.03$ ) (Slika 4.1.3.4., Tablica 4.1.3.6.) i to prvenstveno u bolesnika s AT u kojih je isti haplotip značajno češće nađen u ispitanika kontrolne skupine nego u skupini bolesnika s AT ( $p=0.02$ ) (Slika 4.1.3.5., Tablica 4.1.3.7.) U bolesnika s GB protektivna uloga je nađena za haplotip HLA-DRB1\*07-DQB1\*02 koji je nađen u 7.6% ispitanika kontrolne skupine a nije nađen u bolesnika s GB,  $p=0.002$  (Slika 4.1.3.5., Tablica 4.1.3.8.)
- (5) Na osnovu rezultata naše studije, genetski rizik 49AG polimorfizma CTLA-4 gena igra tek manju ulogu u citotoksičnom upalnom odgovoru i riziku za nastanak DMT1 neovisno o prisustvu AITD. S druge strane, naši rezultati mogu poduprijeti ulogu CT60 polimorfizma CTLA-4 gena riziku za nastanak DMT1 u nosioca G/G genotipa, kako u bolesnika s APS3v tako i u bolesnika s DMT1 bez AITD.
- (6) Na osnovu rezultata naše studije, genetski rizik 49AG polimorfizma CTLA-4 gena igra tek manju ulogu i u humoralnom i citotoksičnom upalnom odgovoru. S druge strane, naši rezultati mogu poduprijeti ulogu CT60 polimorfizma gena CTLA-4 prvenstveno u citotoksičnom upalnom odgovoru i riziku za nastanak AT u nosioca G/G genotipa, dok je uloga u humoralnoj imunosti upitna.
- (7) Rezultati našeg istraživanja ukazuju da polimorfizam gena PTPN22 R620W može doprinijeti nastanku DMT1 u našoj populaciji i to posebno u skupini bolesnika s APS3v. Povezanost T alela gena PTPN22 R20W i DMT1 neovisno o prisutnosti AITD nađena je s omjerom vjerojatnosti od 2.62 (95% CI 1.36-5.06;  $p=0.003$ ) i to prvenstveno u bolesnika

s APS3v (OR 3.93. 95% CI 1.93-7.99;  $p < 0.001$ ) dok je u bolesnika s DMT1 bez AITD učestalost T alela također češća ali ta razlika u odnosu na zdrave ispitanike nije bila statistički značajna (OR 1.75;  $p = 0.14$ ).

Individualnom analizom također je nađena statistički značajno veća učestalost osoba s TT genotipom u svih bolesnika s DMT1 ( $p = 0.01$ ), također na račun bolesnika s APS3v ( $p < 0.01$ ) dok u bolesnika samo s DMT1 bez AITD ta razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0.12$ ).

(8) Rezultati naše studije govore u prilog povezanosti polimorfizma gena PTPN22 R620W s nastankom AITD, što je jače izraženo u bolesnika s GB nego u bolesnika s AT. U cijeloj skupini naših bolesnika s AITD, T alel je statistički značajno češći u odnosu na ispitanike kontrolne skupine s omjerom vjerojatnosti od 2.13 (95% CI 1.09-4.16.  $p = 0.02$ ) i to prvenstveno u bolesnika s GB (OR 3.16; 95% CI 1.32-7.59.  $p < 0.01$ ). U bolesnika s AT, T alel također bio češći nego u kontrolnoj skupini bolesnika no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0.07$ ). S druge strane, nije nađena statistički značajna razlika između bolesnika s AITD i ispitanika kontrolne skupine u raspodjeli T/T, C/T i C/C genotipova u odnosu na ispitanike kontrolne skupine.

(9) U skupini svih bolesnika s DMT1 nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog haplotipa između dječaka i djevojčica ( $\chi$  kvadrat, odnosno Fisherov test,  $p > 0.05$ ). Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma gena HLA razreda II na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 nisu pokazale statistički značajnu razliku u dobi u vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s DMT1 s/ili bez AITD ovisno o haplotipu HLA-DRB1\*-DQB1\* ( $p > 0.05$ ).

(10) U skupini bolesnika s AITD nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinog haplotipa između dječaka i djevojčica ( $\chi$  kvadrat, odnosno Fisherov test,  $p > 0.05$ ). Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma gena HLA razreda II na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 nisu pokazale statistički značajnu razliku u dobi u

vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s AITD ovisno o haplotipu HLA-DRB1\*-DQB1\* ( $p>0.05$ ).

- (11) Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma 49AG i CT60 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze DMT1 nisu pokazale statistički značajnu povezanost na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s DMT1 s/ili bez AITD ( $p>0.05$ )
- (12) Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma 49AG na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u bolesnika s AITD pokazale su statistički značajnu razliku u srednjoj dobi bolesnika u vrijeme postavljanja dijagnoze ( $p=0.047$ ) tako da je u bolesnika nosioca rizičnog G/G genotipa te u bolesnika nosioca AG genotipa srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze niža u odnosu na nosioce genotipa A/A (11.82 godina u bolesnika s G/G genotipom, 11.79 godina u bolesnika s AG genotipom i 13.44 godine u bolesnika s A/A genotipom). Kada se skupina bolesnika s AITD podijeli na podskupine bolesnika s AT i GB, u bolesnika s AT također je srednja dob u vrijeme postavljanja dijagnoze niža u bolesnika koji nose G/G genotip (11.05 godina) i AG genotipa (11.32 godina) u odnosu na nosioce A/A genotipa (12.54 godine), no ta razlika nije bila statistički značajna ( $p=0.13$ ). S druge strane, dob bolesnika s GB u vrijeme postavljanja dijagnoze u nosioca sva tri genotipa 49AG polimorfizma je podjednaka (za G/G genotip bila je 15.97 godina, AG genotipa 14.44 godine i A/A genotipa 15.81 godina;  $p=0.87$ ) (Slika 4.2.1.2. Tablica 4.2.1.3.)
- (13) Kaplan Mayerove krivulje utjecaja polimorfizma CT60 na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze AITD nisu pokazale statistički značajnu povezanost na dob u vrijeme postavljanja dijagnoze u svim skupinama bolesnika s AITD ( $p>0.05$ )
- (14) U analizi statističke značajnosti razlike u visini titra Tg i TPO antitijela ovisno o genotipu gena CTLA-4 (SNP 49AG i SNP CT60) i PTPN22 u bolesnika s AITD i APS3v

korišten je Kruskal-Wallisov test. Statistički značajna razlika nađena je samo u bolesnika s AT u razini Tg antitijela između genotipa A/G i G/G gena CTLA4 SNP CT60 ( $z = -2.569$ ,  $p=0.01$ ), tako da je titar Tg antitijela bio značajno viši u bolesnika s AT i rizičnim G/G genotipom.

(15) U našem istraživanju nismo našli statistički značajnu razliku u učestalosti povišenih titrova antitijela na  $\beta$  stanice Langerhansovih otočića između dječaka i djevojčica s AITD ( $p=0,364$ ; OR 2,361, 95% CI 0,514 – 10,849).

(16) Antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nađena su u 25% (5/20 članova obitelji bolesnika, i to u 3 od 8 očeva, 2 od 10 majki).

Analizom gena HLA-DRB1 i HLA-DQB1 u troje od 5 roditelja (dva oca i jedna majka) u kojih su nađeni povišeni titrovi antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića, nisu nađeni rizični haplotipovi, dok je u dvoje roditelja (jedan otac i jedna majka) nađen haplotip HLA-DRB1\*03-DQB1\*02/DRB1\*XX-DQB1\*XX koji nosi srednji rizik za nastanak DMT1, a u našoj studiji je nađen s jednakom učestalošću u oboljelih s DMT1 neovisno o AITD kao i u kontrolnoj skupini ispitanika (Tablica 4.1.3.4.).

U 15 članova obitelji u kojih nisu nađeni povišeni titrovi na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića visoko rizični haplotip HLA-DRB1\*04-DQB1\*03/DRB1\*03-DQB1\*02 nađen je u jednog ispitanika (6.7%) i to u oca djevojčice koja je nekoliko mjeseci nakon postavljanja dijagnoze AT razvila DMT1 te čija majka također boluje od DMT1 i u koje je nađen haplotip srednjeg rizika za nastanak DMT1 (HLA-DRB1\*03-DQB1\*02/DRB1\*XX-DQB1\*XX).

Rizični haplotipovi HLA-DRB1\*04-DQB1\*03/DRB1\*XX-DQB1\*XX te HLA-DRB1\*03-DQB1\*02/DRB1\*XX-DQB1\*XX nađeni su u 3 (dva oca i jedna majka) i 2 (jedan otac i jedna majka) od 15 članova obitelji. Nisko rizični haplotipovi nađeni su u 9 od 15 članova obitelji (jednog oca, 6 majki i dvije sestre) s niskim titrom antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića.

## 7. SAŽETAK

**UVOD:** Zajedničko pojavljivanje dijabetesa melitusa tip 1 (DMT1) i autoimune bolesti štitnjače (AITD) u iste osobe klasificira se kao varijanta autoimunog poliglandularnog sindroma tip 3 (APS3v). Do sada su poznata najmanje 3 podložna gena za nastanak APS3v i to geni HLA razreda II, gen CTLA-4 i gen PTPN22, a svi su uključeni u prezentaciju antigena T stanicama.

**ISPITANICI I METODE:** U studiju je uključeno 323 nesrodnih bolesnika, 165 s DMT1 (94 s DMT1 bez AITD, 71 s APS3v), u dobi od 1.5-16.7 godina, i 158 s AITD (127 s autoimunim tiroiditisom, AT i 31 s Gravesovom bolešću, GB) u dobi od 4.3-25.9 godina. Kontrolna skupina čini 94 zdravih, nesrodnih ispitanika u dobi od 4.7-21.5 godina. Titrovi antitijela na citoplazmu  $\beta$ -stanice (ICA), glutamičku kiselu fosfatazu (GAD) i tirozin fosfatazu (IA-2), genotip HLA-DRB1, DQB1, polimorfizmi A49G i C60T gena CTLA4 te mutacija R620W gena PTPN22 ispitani su u svim skupinama ispitanika.

**RESULTATI:** Učestalost autoimunosti na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića u bolesnika s AITD bila je 10.76% (17/158), statistički značajno viša nego u kontrolnoj skupini ispitanika (0%, 0/94;  $p=0.001$ ). Viša je učestalost nađena u bolesnika s AT (11.81%, 15/127) nego s GB (6.45%, 2/31). Povišeni titrovi sva tri antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića nađeni su u 3 bolesnika s AITD, a troje je imalo pozitivna dva od ta tri antitijela. Svih šestoro bolesnika razvilo je DMT1 tijekom razdoblja istraživanja od 2 i pol godine. Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti haplotipa HLA visokog i srednjeg rizika za razvoj DMT1 u bolesnika s AITD i pozitivnom  $\beta$ -staničnom autoimunosti u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Haplotipovi HLA niskog rizika za razvoj DMT1 statistički su značajno rjeđe prisutni u bolesnika s AITD (31,3%) u odnosu na kontrolne ispitanike (69,9%;  $p=0,003$ ). Rizični G/G genotip polimorfizma A49G gena CTLA4 statistički je značajno češći u bolesnika s AITD i  $\beta$ -staničnom autoimunosti u odnosu na one bez ( $p=0.024$ ).

**ZAKLJUČAK:** Rezultati ove studije upućuju da su bolesnici s AITD, posebno s AT skloni

razvoju  $\beta$ -stanične autoimunosti i DMT1, osobito oni u kojih su nađeni povišeni titrovi više antitijela na  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića.

**KLJUČNE RIJEČI:** dijabetes melitus tip 1, autoimuni tiroiditis, Gravesova bolest, ICA, GAD, IA-2, geni HLA razreda II, gen CTLA-4, gen PTPN 22

## 8. SUMMARY

**BACKGROUND:** Co-occurrence of type 1 diabetes (T1D) and autoimmune thyroid diseases (AITD) in the same patient is classified as variant of autoimmune polyglandular syndrome type 3 (APS3v). At least three susceptibility genes for this syndrome have been identified, HLA class II, CTLA-4 and PTPN22 gene, all involved in T-cells antigen presentation.

**SUBJECTS AND METHODS:** The study comprised of 323 unrelated patients, 165 with T1D (94 with T1D alone, 71 with APS3v), aged 1.5-16.7 years, and 158 with AITD (127 with autoimmune thyroiditis, AT and 31 with Graves disease, GD), aged 4.3-25.9 years. The control group consisted of 94 unrelated healthy subjects, aged 4.7-21.5 years. Islet cell cytoplasmic (ICA), glutamic acid decarboxylase (GADA) and thyrosin phosphatase islet (IA-2) autoantibodies as well as HLA-DRB1, DQB1 genotypes, A49G and C60T polymorphisms of CTLA4 gene and R620W mutation of PTPN22 gene were analysed in all groups.

**RESULTS:** The prevalence of  $\beta$ -cell autoimmunity in patients with AITD was 10.76% (17/158), significantly higher than in control subjects (0%, 0/94;  $p=0.001$ ). Higher prevalence was found in patients with AT (11.81%, 15/127) than GD (6.45%, 2/31). All three  $\beta$ -cell autoantibodies were found in 3 patients, and three patients were positive to two autoantibodies. All six of them developed T1D during the investigation period of 2.5 years. No difference in frequency of high or moderate risk HLA haplotypes for development of T1D in patients with AITD and  $\beta$ -cell autoimmunity and control subjects was found. Low risk HLA haplotypes for development of T1D were found more frequently in control subjects than in patients with AITD and islet autoimmunity (69.9% vs 31.3%,  $p=0.003$ ). Disease associated G/G genotype of CTLA4 gene A49G polymorphism was significantly more common in AITD patient with islet autoimmunity than in ones without ( $p=0.024$ ).

**CONCLUSION:** Our results indicate that patients with AITD, and in particular AT, are prone to develop  $\beta$ -cell autoimmunity and T1D, especially those with positive multiple islet cell autoantibodies.

**The association of HLA class II, CTLA-4 and PTPN22 genetic polymorphisms and autoantibodies to beta Langerhans islet cells in development of type I diabetes in patients with autoimmune thyroid disease**

Nataša Rojnić Putarek

Godina obrane disertacije: 2015.



## 9. LITERATURA

1. Eisenbarth GS, Gottlieb PA. Autoimmune polyendocrine syndromes. *N Engl J Med* 2004;350:2068–79.
2. Weetman AP, Jenkins RC. Disease associations with autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2002;12:977–88.
3. Menconi F, Osman R, Monti MC, i sur. Shared molecular amino acid signature in the HLA-DR peptide binding pocket predisposes to both autoimmune diabetes and thyroiditis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:899-903.
4. Betterle C, Zancheta R. Update on autoimmune polyendocrine syndromes (APS). *Acta Biomed* 2003;74:9-33.
5. Saravanan P, Dayan CM. Thyroid autoantibodies. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:315–37.
6. Doniach D. Humoral and genetic aspects of thyroid autoimmunity. *Clin Endocrinol Metab* 1975;4:267–85.
7. Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, i sur. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1511–2.
8. Wood LC, Ingbar SH. Hypothyroidism as a late sequela in patient with Graves' disease treated with antithyroid agents. *J Clin Invest* 1979;64:1429–36.
9. Cappa M, Bizzarri C, Crea F. Autoimmune Thyroid Diseases in Children. *J Thyroid Res* 2010;14:2011:675703
10. Tsatsoulis A, Limniati C. Stress-Induced Th2 Shift & Thyroid Autoimmunity: Unifying Hypothesis. 2012. <http://brainimmune.com/the-modifying-role-of-stress-induced-th2-shift-in-the-clinical-expression-of-thyroid-autoimmunity-a-brief-overview-and-unifying-hypothesis/>

11. Hashimoto H. Zur Kenntniss der Lymphomatosen Veronderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa) Arch Klin Chir 1912;97:219-48.
12. Jaksić J, Dumić M, Filipović B, i sur. Thyroid diseases in a school population with thyromegaly. Arch Dis Child 1994;70:103-6.
13. Zimmerman D, Lteif AN. Thyrotoxicosis in children. Endocrinol Metab Clin North Am 1998;27:109–26.
14. Tomer Y, Davies TF. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. Endocr Rev 2003;24:694–717.
15. Ban Y. Genetic factors of autoimmune thyroid disease in Japanese. Autoimmune Dis 2012;doi: 10.1155/2012/236981
16. Mungalli AJ, Palmer SA, Sims SK, i sur. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. Nature 2003;425:805-11.
17. Cepelini R. Histocompatibility Testing. U: Curtoni ES, Mattiuz PI, Tosi RM, ur. Hystocompatibility Testing. Copenhagen: MunksgA/Ard; 1967, str. 149-84.
18. Gebe JA, Swanson E, Kwok WW. HLA class II peptide-binding and autoimmunity. Tissue Antigens 2002;59:78-87.
19. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/HLA/stats.html> 2010/03/10
20. Frigoul A, Lefranc MP. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. Recent Res Devel Human Genet 2005;3:95-145.
21. Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alfa gene polymorphism: Clinical and biological implications. Microsc Res Tech 2000;50:216-28.
22. Alfonso C, Karlsson L. Nonclassical MHC class II molecules. Annu Rev Immunol 2000;18:139-42.
23. Cano O, Fernandez-Vina M. Two sequence dimorphisms of DPB1 define the immunodominant serologic epitopes of HLA-DP. Hum Immunol 2009;70:836-43.
24. Kwok WW, Thurtle P, Nepom CT. A genetically controlled pairing anomaly between HLA-DQ alpha and HLA-DQ beta chains. J Immunol 1998;143:3598-3601
25. Anderson G, Larhammar D, Widmark E, Servenius B, Peterson PA, Rask L. Class II genes of the human major histocompatibility complex. Organization and evolutionary relationship of the DR beta genes. J Biol Chem 1987;262:8748-58.
26. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. The major histocompatibility complex. U: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS, ur. Cellular and molecular immunology. Philadelphia:

- W.B. Saunders Company; 1994, str. 97-113.
27. Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić, i sur. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and DQB1 hypotypec in a Croatian population. *Eur j Immunogenet* 2000;27:47-51.
  28. Huber A, Menconi F, Corathers S, i sur. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev* 2008;29:697-725.
  29. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, i sur. Arginine at position 74 of the HLA-DRB1 chain is associated with Graves' disease. *Genes Immun* 2004;5:203–8.
  30. Darendeliler FF, Kadioglu A, Bas F, i sur. Thyroid ultrasound in IDDM. *J Pediatr Endocrinol* 1994;7:33–7.
  31. Moens H, Farid NR, Sampson L, i sur. Hashimoto's thyroiditis is associated with HLA-DRw3. *N Engl J Med* 1978;299:133–4.
  32. Tandon N, Zhang L, Weetman AP. HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991;34:383–6.
  33. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, i sur. The influence of human leucocyte antigen (HLA) genes on autoimmune thyroid disease (AITD): results of studies in HLA-DR3 positive AITD families. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;57:81–8.
  34. Petrone A, Giorgi G, Mesturino CA, i sur. Association of DRB1\*04-DQB1\*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. *Thyroid* 2001;11:171–5.
  35. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, i sur. The codon 620 single nucleotide polymorphism of the protein tyrosine phosphatase-22 gene does not contribute to autoimmune thyroid disease susceptibility in the Japanese. *Thyroid* 2005;15:1115–8.
  36. Lifshitz F, ur. *Endocrinology. Volume 1. Obesity, Diabetes Mellitus, Insulin Resistance, and Hypoglycemia. Section II. Diabetes. Diabetes Autoimmunity.* New York: Informa Healthcare USA; 2007, str. 83-101.
  37. Ueda H, Howson JM, Esposito L, i sur. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506–11.
  38. Donner H, Braun J, Seidl C, i sur. Codon 17 polymorphism of the cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene in Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4130–2.

39. Huang D, Liu L, Noren K, i sur. Genetic association of CtlA-4 to myasthenia gravis with thymoma. *J Neuroimmunol* 1998;88:192–8.
40. Downie-Doyle S, Bayat N, Rischmueller M, i sur. Influence of CTLA4 haplotypes on susceptibility and some extraglandular manifestations in primary Sjogren’s syndrome. *Arthritis Rheum* 2006;54:2434–40.
41. Lee YH, Harley JB, Nath SK. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet* 2005;116:361–7.
42. Almasi S, Erfani N, Mojtahedi Z, i sur. Association of CTLA-4 gene promoter polymorphisms with systemic sclerosis in Iranian population. *Genes Immun* 2006;7:401–6.
43. Jiang Y, Xia B, Jiang L, i sur. Association of CTLA-4 gene microsatellite polymorphism with ulcerative colitis in Chinese patients. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:369–73.
44. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves’ disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:551–4.
45. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, i sur. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 1996;5:1075–80.
46. Ban Y, Davies TF, Greenberg DA, i sur. Analysis of the CTLA-4, CD28 and inducible co-stimulator (ICOS) genes in autoimmune thyroid disease. *Genes Immun* 2003;4:586– 93.
47. Heward JM, Allahabadia A, Armitage M, i sur. The development of Graves’ disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2398–401.
48. Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, i sur. Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto’s thyroiditis or Addison’s disease in the German population. *Eur J Endocrinol* 2005;153:895–9.
49. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, i sur. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves’ disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5862–5.
50. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, i sur. Replication of an association between the

- lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004;53:3020–3.
51. Skorka A, Bednarczuk T, Bar-Andziak E, i sur. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dosedependent correlation with age of onset. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:679–82.
  52. ZhengW, She JX. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and Type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54:906–8.
  53. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, i sur. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet* 2005;76:561–71.
  54. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, i sur. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 2005;50:264–6.
  55. Neufeld M, Maclaren NK, Riley WJ, i sur. Islet cell and other organ-specific antibodies in U.S. Caucasians and Blacks with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1980;29:589–92.
  56. Winter WE. The use of islet autoantibody markers in the prediction of autoimmune Type 1 diabetes. *Clin Immunol Newslett* 1999;19:25–39.
  57. Riley WJ, Maclaren NK, Krischer J, i sur. A prospective study of the development of diabetes in relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1990;323:1167–72.
  58. Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, i sur. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with Type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:103–8.
  59. Decochez K, Keymeulen B, Somers G, i sur. Use of an islet cell antibody assay to identify Type 1 diabetic patients with rapid decrease in C-peptide levels after clinical onset. Belgian Diabetes Registry. *Diabetes Care* 2000;23:1072–8.
  60. Torn C, Landin-Olsson M, Lernmark A, i sur. Prognostic factors for the course of B cell function in autoimmune diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4619–23.
  61. Taylor SI, Arioglu E. Genetically defined forms of diabetes in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4390–6.

62. Vives-Pi M, Somoza N, Vargas F, i sur. Expression of glutamic acid decarboxylase (GAD) in the alpha, beta and delta cells of normal and diabetic pancreas: implications for the pathogenesis of type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 1993;92:391–6.
63. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with Type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 1999;48:460–8.
64. Cilio CM, Bosco A, Moretti C, i sur. Congenital autoimmune diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000;342:1529–31.
65. Aribi M. Autoimmunity and Immunotherapy of Type 1 Diabetes. U: Wagner D, ur. *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*. 2011, <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-pathogenesis-genetics-and-immunotherapy>
66. Breidert M, Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Leonhardt W, Schmoeckel A, Seissler J. Prevalence of diabetes-specific autoantibodies in patients at risk for adult onset diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998;106:113-6.
67. Gilliam LK, Palmer JP, Lernmark Å. Autoantibodies and the disease process of type 1 diabetes mellitus. U: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM, ur. *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text*. Philadelphia: Lippincott; 2004, str. 499-518.
68. Landin-Olsson M, Palmer JP, Lernmark A, Blom L, Sundkvist G, Nyström L, Dahlquist G. Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newlydiagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia* 1992;35:1068-73.
69. Achenbach P, Koczwara K, Knopff A, i sur. Mature high-affinity immune responses to (pro)insulin anticipate the autoimmune cascade that leads to type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2004;114:589-97.
70. Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, i sur. IA-2 antibodies--a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia* 1998;41:424-9.
71. Ziegler AG, Standl E, Albert E, Mehnert H. HLA-associated insulin autoantibody formation in newly diagnosed type I diabetic patients. *Diabetes* 1991;40:1146-9.
72. Bingley PJ, Williams AJ, Gale EA. Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. Implications for future intervention trials. *Diabetes Care*

1999;22:1796-1801.

73. Thivolet C, Nicolino M, Monbeig S, i sur. Combination of autoantibody markers and risk for development of type 1 diabetes: results from a large french cohort of family members. *Diabetes Metab* 2002;28:279-85.
74. Winnock F, Christie MR, Batstra MR, i sur. Autoantibodies to a 38-kDa glycosylated islet cell membrane-associated antigen in (pre)type 1 diabetes: association with IA-2 and islet cell autoantibodies. *Diabetes Care* 2001;7:1181-6.
75. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M. Identification and cloning of a beta-cell specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 2004;53:2330-7.
76. Wenzlau JM, Moua O, Sarkar SA, i sur. SIC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann NY Acad Sciences* 2008;1150:256-9.
77. Yang L, Luo S, Huang G, i sur. The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese. *Diabetes/Metab Res Rev* 2010;26:579-84.
78. Dang M, Rockell J, Wagner R, i sur. Human Type 1 Diabetes Is Associated with T Cell Autoimmunity to Zinc Transporter 8. *J Immunol* 2011;186:6056-63. doi: 10.4049/jimmunol.1003815
79. Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, i sur. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 1993;341:1243-4.
80. Almawi WY, Tamim H, Azar ST. Clinical review 103: T helper Type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type I (insulin-dependent) diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1497-1502.
81. Barker JM, Barriga KJ, Yu L, i sur. Diabetes Autoimmunity Study in the Young. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3896-902.
82. Yamamoto AM, Deschamps I, Garchon HJ, i sur. Young age and HLA markers enhance the risk of progression to type 1 diabetes in antibody-positive siblings of diabetic children. *J Autoimmun* 1998;11:643-50.

83. Kawasaki E. Type 1 diabetes and autoimmunity. *Clin Pediatr Endocrinol* 2014;23:99–105.
84. Nepom GT, Kwok WW. Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* 1998;47:1177–84.
85. EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* 2000;355:873–6.
86. Onkamo P, VA/Ana Nem S, Karnoven M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type I diabetes – the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 1999;42:1395–403.
87. Green A, Patterson CC, EURODIAB TIGER study group. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia* 2001;44:209.
88. Newhook L, Curtis J, Hagerty D, i sur. High incidence of childhood type 1 diabetes in the Avalon Peninsula, Newfoundland, Canada. *Diabetes Care* 2004;27:885–8.
89. WHO - Multinational Project for Childhood Diabetes. WHO DIAMOND Project Group. *Diabetes Care* 1990;13:1062–8.
90. Karnoven M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, Laporte R, Tuomilehto J, for the Diabetes Mondiale (DIAMOND) Project Group. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care* 2000;23:1516–26.
91. The DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabet Med* 2006;23:857–66.
92. Harjutsalo V, Sund R, Knip M, Groop PH. Incidence of type 1 diabetes in Finland. *JAMA* 2013;310:427-8.
93. Patterson CC, Gyürüs E, Rosenbauer J, i sur. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia* 2012;55:2142-7.
94. Patterson CC, Dahlquist G/G, Gyürüs E, Green A, Soltész; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 2009;373:2027-33.
95. Stipancic G, La Grasta Sabolic L, Malenica M, i sur. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes in Croatia from 1995 to 2003. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;80:122-7.



96. Rojnic Putarek N, Ille J, Spehar Uroic A, i sur. Incidence of type 1 diabetes mellitus in 0 to 14-yr-old children in Croatia – 2004 to 2012 study. *Pediatric Diabetes* 2014, doi: 10.1111/peidi.12197
97. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, i sur. Genetics o Type 1 Diabetes: What's next? *Diabetes* 2010;59:1561-71.
98. Onengut-Gumuscu S, Concannon P. The genetics of type 1 diabetes: lessons learned and future challenges. *J Autoimmun* 2005;25:34–9.
99. Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004;33:1–16.
100. Kanatsuna N, Papadopoulos GK, Moustakas AK, Lenmark Å. Etiopathogenesis of Insulin Autoimmunity *Anat Res Int* 2012: 45754
101. Rich SS, Concannon P, Erlich H, i sur. The Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Ann NY Acad Sci* 2006;1079:1–8.
102. Cinek O, Drevinek P, Sumnik Z, i sur. The CTLA4 \_49 A/G dimorphism is not associated with type 1 diabetes in Czech children. *Eur J Immunogenet* 2002;29:219–22.
103. Cloutier JF, Veillette A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med* 1999;189:111–21.
104. Tomer Y, Greenberg DA, Davies TF. The genetic susceptibility to type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease: from epidemiological observations to gene mapping. U: Volpe R (ur) *Contemporary Endocrinology: Autoimmune Endocrinopathies*. Totowa, NJ: Humana Press; 1999, str. 57–90.
105. Gorodezky C, Alaez C, Murguia A, i sur. HLA and autoimmune diseases: type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmun Rev* 2006;5:187–94.
106. Ikegami H, Kawabata Y, Noso S, i sur. Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:S116–S121.
107. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2011;11:533-42.
108. Caillat-Zucman S, Garchon HJ, Timsit J, i sur. Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;90:2242–50.
109. Bjornvold M, Undlien DE, Joner G, i sur. Joint effects of HLA, INS, PTPN22 and CTLA4 genes on the risk of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2008;51:589–96

110. Žunec R. Doktorska disertacija. Molekularna osnovica povezanosti gena HLA razreda II i autoagresivnih bolesti u čovjeka. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilište u Zagrebu, 1998.
111. Kavvoura FK, Ioannidis JPA. CTLA-4 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol* 2005;162:3-16.
112. Wang J, Liu L, Ma J, i sur. Common Variants on Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms Contributes to Type 1 Diabetes Susceptibility: Evidence Based on 58 Studies. *Plos One* 2014;9:e85982
113. Ikegami H, Awata T, Kawasaki E, i sur. The association of CTLA4 polymorphism with type 1 diabetes is concentrated in patients complicated with autoimmune thyroid disease: a multicenter collaborative study in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1087–92.
114. Bottini N, Vang T, Cucca F, i sur. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol* 2006;18:207–13.
115. Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, i sur. Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. *Eur J Endocrinol* 2005;153:895–9.
116. Santiago JL, Martinez A, de la Calle H, i sur. Susceptibility to type 1 diabetes conferred by the PTPN22 C1858T polymorphism in the Spanish population. *BMC Med Genet* 2007;8:54.
117. Fedetz M, Matesanz F, Caro-Maldonado A, i sur. The 1858T PTPN22 gene variant contributes to a genetic risk of type 1 diabetes in a Ukrainian population. *Tissue Antigens* 2006;67:430–3.
118. Nielsen C, Hansen D, Husby S, i sur. Sex-specific association of the human PTPN22 1858T-allele with type 1 diabetes. *Int J Immunogenet* 2007;34:469–73.
119. Korolija M, Renar IP, Hadzija M, i sur. Association of PTPN22 C1858T and CTLA-4 A49G polymorphisms with Type 1 Diabetes in Croatians. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;86:54-7.
120. American Diabetes Association from Glastras SJ, i sur. The role of autoimmunity at diagnosis of type 1 diabetes in the development of thyroid and celiac disease and microvascular complications. *Diabetes Care* 2005;28:2170-5.

121. Bright GM, Blizzard RM, Kaiser DL, i sur. Organspecific autoantibodies in children with common endocrine diseases. *J Pediatr* 1982;100:8–14.
122. Moriguchi M, Noso S, Kawabata Y, i sur. Clinical and genetic characteristics of patients with autoimmune thyroid disease with anti-islet autoimmunity. *Metabolism* 2011;60:761-6.
123. Maugendre D, Verite F, Guilhem I, Genetet B, Allannic H, Delamaire M. Anti-pancreatic autoimmunity and Graves' disease: study of a cohort of 600 Caucasian patients. *Eur J Endocrinol* 1997;137:503-10.
124. Hiromatsu Y, Mukai T, Kaku H, i sur. IL18 gene polymorphism confers susceptibility to the development of anti-GAD65 antibody in Graves' disease. *Diabetic Med* 2005;23:211-5.
125. Kawasaki E, Abiru N, Yano M, i sur. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with autoimmune thyroid disease: relation to competitive insulin autoantibodies. *J Autoimmun* 1995;8:633-43.
126. Yamaguchi Y, Chikuba N, Ueda Y, i sur. Islet cell antibodies in patients with autoimmune thyroid disease. *Diabetes* 1991;40:319-22.
127. Chaillous L, Delamaire M, Elmansour A, i sur. Combined analysis of islet cell antibodies which crossreact with mouse pancreas, antibodies to the 64 000 islet protein, and antibodies to glutamate decarboxylase, in subjects at risk for IDDM. *Diabetologia* 1994;37:491–9.
128. Hallengren B, Falorni A, Landin-Olsson M, i sur. Islet cell and glutamic acid decarboxylase antibodies in hyperthyroid patients: at diagnosis and following treatment. *J Intern Med* 1996;239:63–8.
129. Lethagen AL, Ericsson UB, Hallengren B, i sur. Glutamic acid decarboxylase antibody positivity is associated with an impaired insulin response to glucose and arginine in nondiabetic patients with autoimmune thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1177-83.
130. Kemp EH, Ajjan RA, Waterman EA, i sur. Analysis of a microsatellite polymorphism of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene in patients with vitiligo. *Br J Dermatol* 1999;140:73–8.
131. Takara M, Komiya I, Kinjo Y, i sur. Association of CTLA-4 gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and

- autoimmune thyroid disease. *Diabetes Care* 2000;23:975–978
132. Howson JM, Dunger DB, Nutland S, *i sur.* A type 1 diabetes subgroup with a female bias is characterised by failure in tolerance to thyroid peroxidase at an early age and a strong association with the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene. *Diabetologia* 2007;50:741–6.
133. Saccucci P, Del Duca E, Rapini N, *i sur.* Association between PTPN22 C1858T and type 1 diabetes: a replication in continental Italy. *Tissue Antigens* 2008;71:234–7.
134. Holl RW, Bohm B, Loos U, *i sur.* Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Effect of age, gender and HLA type. *Horm Res* 1999;52:113–8.
135. Wallaschofski H, Meyer A, Tuschy U, *i sur.* HLADQA1\* 0301-associated susceptibility for autoimmune polyglandular syndrome type II and III. *Horm Metab Res* 2003;35:120–4.
136. Levin L, Ban Y, Concepcion E, *i sur.* Analysis of HLA genes in families with autoimmune diabetes and thyroiditis. *Hum Immunol* 2004;65:640–7.
137. Hashimoto K, Maruyama H, Nishiyama M, *i sur.* Susceptibility alleles and haplotypes of human leukocyte antigen DRB1, DQA1, and DQB1 in autoimmune polyglandular syndrome type III in Japanese population. *Horm Res* 2005;64:253–60.
138. Kim EY, Shin CH, Yang SW. Polymorphisms of HLA class II predispose children and adolescents with type 1 diabetes mellitus to autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 2003;36:177–81.
139. Chuang LM, Wu HP, Chang CC, Tsai WY, *i sur.* HLA DRB1/DQA1/DQB1 haplotype determines thyroid autoimmunity in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;45:631–6.
140. Golden B, Levin L, Ban Y, *i sur.* Genetic analysis of families with autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common and unique genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4904–11.
141. Tsui C, Coleman LE, Griffith JL, *i sur.* Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that map to gaps in the human SNP map. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:4910-6.
142. Couper JJ, Haller MJ, Ziegler A-G, Knip M, Ludvigsson J, Craig ME. Phases of type 1 diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes* 2014;15(Suppl. 20): 18–25.
143. Gonzales-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a

database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011;39:913–9.

143. Court MH, Michael H (2012) Court's (2005–2008) online calculator. Tuft University Web site.

144. Spoletini M, Zampetti S, Campagna G, et al. Temporal trends of HLA, CTLA-4 and PTPN22 Genotype Frequencies among Type 1 Diabetes in Continental Italy. *Plos One* 2013;8:e61331

145. Zemunik T, Boraska V. Genetics of Type 1 Diabetes. U: Wagner D, ur. Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy. 2011, <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes-pathogenesis-genetics-and-immunotherapy>

146. Mehers KL, Gillespie KM. The genetic basis for type 1 diabetes. *Brit Med Bulletin*, 2008;115:129-9.

147. Tomer Y, Huber A The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J Autoimmun* 2009;32:231–9.

148. Weetman, AP. Chronic autoimmune thyroiditis. U: Braverman LE, Utiger RD (ur). Werner and Ingbar's The thyroid. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000, str. 721-32.

149. Stagnaro-Green A. Clinical review 152: Postpartum thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4042–7.

150. Roti E, Uberti E. Post-partum thyroiditis--a clinical update. *Eur J Endocrinol* 2002;146:275–9.

151. Muller AF, Drexhage HA, Berghout A. Postpartum thyroiditis and autoimmune thyroiditis in women of childbearing age: recent insights and consequences for antenatal and postnatal care. *Endocr Rev* 2001;22:605–30.

152. Dittmar M, Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes: immunogenetics and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2983–92.

153. Jacobson EM, Tomer Y. The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: Back to the future. *J Autoimmun* 2007;28:85–98.

154. Jacobson EM, Huber A, Tomer Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: From epidemiology to etiology. *J Autoimmun* 2008;30:58–62.

155. Ott J. Analysis of human genetic linkage. Third ed.. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1999.
156. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet* 1995;11:241–7.
157. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955;19:251–3.
158. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 2002;298:2345–9.
159. Altshuler D, Brooks LD, Chakravarti A, Collins FS, Daly MJ, Donnelly P. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005;437:1299–320.
160. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461–3.
161. Donner H, Rau H, Walfish PG, et al. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:143–6.
162. Kaštelan A, Kerhin-Brkljačić V, Hors J, et al. The distribution of HLA antigens and genes in Yugoslavian population. *Tissue Antigen* 1974;4:69-75.
163. Grubić Z, Žunec R, Naipal A, et al. Molecular analysis of HLA class II polymorphism in Croatianc. *Tissue Antigens* 1995;46:293-8.
164. Grubić Z, Žunec R, Kaštelan A. Striking diversity of D15 haplotypes in Croatians. *Tissue Antigens* 1997;49:180-2.
165. Thomson G, Valdes AM, Noble JA, et al. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens* 2007;70:110–27.
166. Thomson G. Strategies involved in mapping diabetes genes: an overview. *Diabetes Rev* 1997;5:106–15.
167. Thomson G. An overview of the genetic analysis of complex diseases, with reference to type 1 diabetes. U: Dunger D, Bain S, ur. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (Eastbourne, UK: Baillie´re Tindall) 2001;15:265–77.
168. Cucca F, Todd JA. HLA susceptibility to type I diabetes: methods and mechanisms. In: Browning MJ, McMichael AJ, ur. *HLA/MHC: Genes, Molecules and Function*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers; 1996, str. 383–406.

169. She JX. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 1996;17:323–9.
170. Qiu YH, Deng FY, Li MJ, i sur. Identification of novel risk genes associated with type 1 diabetes mellitus using a genomewide gene-based association analysis. *J Diabetes Invest* 2014;5:649–56.
171. Onengut-Gumuscu S, Concannon P. The genetics of type 1 diabetes: lessons learned and future challenges. *J Autoimmun* 2005; 25Suppl:34–9.
172. Meyer D, Single R, Mack SJ, Erlich HA, Thomson G. Signatures of demographic history and natural selection in the human MHC loci. *Genetics* 2006;173:2121–42.
173. Meyer D, Single R, Mack S, i sur. Single locus polymorphism of classical HLA genes. U: Hansen JA, ur. *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol. 1. Seattle: IHWG Press, 2007, str. 653–704.*
174. Single R, Meyer D, Mack S, i sur. Haplotype frequencies and linkage disequilibrium. U: Hansen JA, ur. *Immunobiology of the Human MHC: Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol. 1. Seattle: IHWG Press; 2007, str. 705–46.*
175. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project group. *Diabetologia* 1993;36:883–92.
176. Cucca F, Dudbridge F, Loddo M, i sur. The HLA-DPB1-associated component of the IDDM1 and its relationship to the major loci HLA-DQB1, -DQA1, and -DRB1. *Diabetes* 2001;50:1200–5.
- 177 Steenkiste A, Valdes AM, Feolo M, i sur. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on the HLA component of type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2007;69:214–25.
178. Gorodezky C, Alaez C, Murguía A, i sur. HLA and autoimmune diseases: type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmun Rev* 2006;5:187–94.
179. Mehra NK, Kumar N, Kaur G, Kanga U, Tandon N. Biomarkers of susceptibility to type 1 diabetes with special reference to the Indian population. *Indian J Med Res* 2007;125:321–44.

180. Ikegami H, Eisenbarth GS, Hattori M. Major histocompatibility complex-linked diabetogenic gene of the nonobese diabetic mouse. Analysis of genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1990;85:18-24.
181. Buzzeti R, Galgani A, Petrone A, i sur. Genetic prediction of Type 1 diabetes in a population with low frequency of HLA risk genotypes and low incidence of the disease (the DIABFIN study). *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:137-43.
182. Awa WI, Boehm BO, Kapellan T, i sur. HLA-DR genotypes influence age at disease onset in children and juveniles with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2010;163:97-104.
183. Hermann R, Knip M, Veijola R, Simell O, Laine AP, i sur. Temporal changes in the frequencies of HLA genotypes in patients with Type 1 diabetes– indication of an increased environmental pressure? *Diabetologia* 2003;46:420–5.
184. Resic-Lindehammer S, Larsson K, Ortqvist E, i sur. Temporal trends of HLA genotype frequencies of type 1 diabetes patients in Sweden from 1986 to 2005 suG/Gest altered risk. *Acta Diabetol* 2008;45:231–5.
185. Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, i sur. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of highrisk HLA haplotypes. *Lancet* 2004;364:1699–700.
186. Furlanos S, Varney MD, Tait BD, i sur. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care* 2008;31:1546–9.
187. Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, i sur. Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2008;31:1392–6.
188. Steck AK, Armstrong TK, Babu SR, Eisenbarth GS. Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Stepwise or linear decrease in penetrance of type 1 diabetes with lower-risk HLA genotypes over the past 40 years. *Diabetes* 2011;60:1045–9.
189. Stenszky V, Kozma L, Balazs C, i sur. The genetics of Graves' disease. HLA and disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:735-40.
190. Manglabruks A, Cox N, DeGroot LJ. Genetic factors in autoimmune thyroid disease analyzed by restriction fragment length polymorphisms of candidate genes. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:236–44.



191. Heward JM, Allahabadia A, Daykin J, i sur. Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and familybased study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3394–7.
192. Menconi F, Monti MC, Greenberg DA i sur. Molecular amino acid signatures in the MHC class II peptide-binding pocket predispose to autoimmune thyroiditis in humans and in mice. *Proc Nat Acad Sciences U S A* 2008;105:14034–9.
193. Zeitlin AA, Heward JM, Newby PR, i sur. Analysis of HLA class II genes in Hashimoto's thyroiditis reveals differences compared to Graves' disease. *Genes Immun* 2008;9:358–63.
194. Jacobson EM, Huber A, Tomer Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology. *J Autoimmun* 2008;30:58–62.
195. Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M. Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* 2000;56:522–9.
196. Kavvoura FK, Akamizu T, awata T, i sur. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3162-70.
197. Çelmeli F, Türkkahraman D, Özel D, i sur. CTLA-4 (+49A/G) polymorphism and type-1 diabetes in Turkish children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5:40-3.
198. Lemos MC, Coutinho E, Gomes L, i sur. M. The CTLA4 +49 A/G polymorphism is not associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Int J Immunogenet* 2009;36:193-5.
199. Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, i sur. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997;6:1275-82.
200. Van der Auwera BJ, Vandewalle CL, Schuit FC, i sur. CTLA-4 gene polymorphism confers susceptibility to insulindependent diabetes mellitus (IDDM) independently from age and from other genetic or immune disease markers. The Belgian Diabetes Registry. *Clin Exp Immunol* 1997;110:98-103.
201. Haller K, Kisand K, Pisarev H, Salur L, Laisk T, Nemvalts V, Uibo R. Insulin gene VNTR, CTLA-4 +49A/G and HLA-DQB1 alleles distinguish latent autoimmune diabetes

- in adults from type 1 diabetes and from type 2 diabetes group. *Tissue Antigens* 2007;69:121-7.
202. Mojtahedi Z, Omrani GR, Doroudchi M, Ghaderi A. CTLA- 4 +49 A/G polymorphism is associated with predisposition to type 1 diabetes in Iranians. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 68:111-6.
203. MosA/Ad YM, Elsharkawy A/A, El-Deek BS. Association of CTLA-4 (+49A/G) gene polymorphism with type 1 diabetes mellitus in Egyptian children. *Immunol Invest* 2012;41:28- 37.
204. Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Kobayashi M, Fukushima T, Takahashi R, Kuwahara H, Kita A, Oshima K, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2004;22:73-8.
205. Angel B, Balic I, Santos JL, Codner E, Carrasco E, PérezBravo F. Associations of the CTLA-4 polymorphisms with type 1 diabetes in a Chilean population: case-parent design. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;85:34-6.
206. Awata T, Kurihara S, Iitaka M, i sur. Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. *Diabetes* 1998;47:128-9.
207. Hauache OM, Reis AF, Oliveira CS, Vieira JG, Sjöroos M, Ilonen J. Estimation of diabetes risk in Brazilian population by typing for polymorphisms in HLA-DR-DQ, INS and CTLA- 4 genes. *Dis Markers* 2005;21:139-45.
208. Ahmedov G, Ahmedova L, Sedlakova P, Cinek O. Genetic association of type 1 diabetes in an Azerbaijanian population: the HLA-DQ, -DRB1\*04, the insulin gene, and CTLA4. *Pediatr Diabetes* 2006;7:88-93.
209. Ni J, Qiu LJ, Zhang M, i sur. CTLA-4 CT60 (rs3087243) polymorphism and autoimmune thyroid diseases susceptibility: a comprehensive meta-analysis. *Endocr Res* 2014;39:180-8.
210. Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997;26:189–218.
211. Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, i sur. Evidence for a major role of heredity in Grave's disease: a population-bases study of two Danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol*

Metab 2001;86:930–4.

212. Vaidya B, Taylor P, Pearce S. The genetics of autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5385–97.

213. Si X, Zhang X, Tang W, i sur. Association between the CTLA-4 +49A/G polymorphism and Graves' disease: a meta-analysis. *Exp Ther Med* 2012;4:538–44.

214. Bicek A, Zaletel K, Gabersek S, i sur. 49A/G and CT60 polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 gene associated with autoimmune thyroid disease 2009;70:820-4.

215. Iwama S, Ikezaki A, Kikuoka N, i sur. Association of HLA-DR, -DQ genotype and CTLA-4 gene polymorphism with Graves' disease in Japanese children. *Horm Res.* 2005;63:55-60.

216. Baniyadi, V., Das, S.N. No evidence for association of PTPN22 R620W functional variant C1858T with type 1 diabetes in Asian Indians. *J Cell Mol Med* 2008;12:1061–2.

217. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, i sur. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36:337–8.

218. Chagastelles PC, Romitti M, Trein MR, Bandinelli E, Tschiedel B, Nardi NB. Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. *Tissue Antigens* 2010;76:144–8.

219. Chelala C, Duchatelet S, Joffret ML, i sur. PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. *Diabetes* 2007;56:522–6.

220. Cinek O, Hradsky O, Ahmedov G, i sur. No independent role of the -1123 G > C and p 2740 A > G variants in the association of PTPN22 with type 1 diabetes and juvenile idiopathic arthritis in two Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;76:297–303.

221. Douroudis K, Prans E, Haller K, i sur. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 gene variants at position 1858 are associated with type 1 and type 2 diabetes in Estonian population. *Tissue Antigens* 2008;72:425–30.

222. Dultz G, Matheis N, Dittmar M, Röhrig B, Bender K, Kahaly GJ. The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. *Thyroid* 2009;19:143–8.

223. Fedetz M, Matesanz F, Caro-Maldonado A, Smirnov II., Chvorostinka VN, Moiseenko TA, Alcina A. The 1858T PTPN22 gene variant contributes to a genetic risk

- of type 1 diabetes in a Ukrainian population. *Tissue Antigens* 2006;67:430–3.
224. Fichna M, Zurawek M, Januskiewicz-Lewandowska D, Fichna P, Nowak J. PTPN22, PDCD1 and CYP27B1 polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Polish patients. *Int J Immunogenet* 2010;37:367–72.
225. Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A, Martín J. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun* 2005;6:628–31.
226. Hermann R, Lipponen K, Kiviniemi M, i sur. Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes. *Diabetologia* 2006;49:1198–208.
227. Kordonouri O, Hartmann R, Badenhop K, Kahles H, Ilonen J. PTPN22 1858T allele is associated with younger age at onset of type 1 diabetes and is not related to subsequent thyroid autoimmunity. *Hum Immunol* 2010;71:731–2.
228. Petrone A, Suraci C, Capizzi M, i sur. The protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) is associated with high GAD antibody titer in latent autoimmune diabetes in adults: Non Insulin Requiring Autoimmune Diabetes (NIRAD) Study 3. *Diabetes Care* 2008;31:534–8.
229. Smyth DJ, Cooper JD, Howson JM, i sur. PTPN22 Trp 620 explains the association of chromosome 1p13 with type 1 diabetes and shows a statistical interaction with HLA class II genotypes. *Diabetes* 2008;57:1730–7.
230. Steck AK, Liu SY, McFann K, i sur. Association of the PTPN22/LYP gene with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2006;7:274–8.
231. Stene LC, Rønningen KS, Bjørnvold M, Undlien DE, Joner G. An inverse association between history of childhood eczema and subsequent risk of type 1 diabetes that is not likely to be explained by HLA-DQ, PTPN22, or CTLA4 polymorphisms. *Pediatr Diabetes* 2010;11:386–93.
232. Zhebrun D, Kudryashova Y, Babenko A, i sur. Association of PTPN22 1858T/T genotype with type 1 diabetes, Graves' disease but not with rheumatoid arthritis in Russian population. *Aging (Albany, NY)* 2011;3:368–73.
234. Zhernakova A, Eerligh P, Wijmenga C, Barrera P, Roep BO, Koeleman BP. Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. *Genes Immun* 2005;6:459–61.

235. Peng H, Zhou M, Xu WD, i sur. Association of PTPN22 C1858T polymorphism and type 1 diabetes: a meta-analysis. *Immunol Invest* 2012;41:484-96.
236. Luo L, Cai B, Liu F, i sur. Association of Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor 22 (PTPN22) C1858T gene polymorphism with susceptibility to autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocr J* 2012;59:439-45.
237. Heward JM, Brand OJ, Barrett JC, Carr-Smith JD, Franklyn JA, Gough SC Association of PTPN22 haplotypes with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:685-90.
238. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song G/G, Nath SK, Harley JB. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune disease – a meta-analysis. *Rheumatology* 2007;46:49-56.
239. Kawasaki E, Awata T, Ikegami H, i sur. Systematic search for single nucleotide polymorphisms in a lymphoid tyrosine phosphatase gene (PTPN22): association between a promoter polymorphism and type 1 diabetes in Asian populations. *Am J Med Genet A* 2006;140:586–93.
240. McCanlies E, O'Leary LA, Foley TP, i sur. Hashimoto's thyroiditis and insulin-dependent diabetes mellitus: differences among individuals with and without abnormal thyroid function. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1548–51.
241. Burek CL, Rose NR, Guire KE, Hoffman WH. Thyroid autoantibodies in black and in white children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and their first degree relatives. *Autoimmunity* 1990;7:157–67.
242. Jaeger C, Hatziagelaki E, Petzoldt R, Bretzel RG. Comparative analysis of organ-specific autoantibodies and celiac disease--associated antibodies in type 1 diabetic patients, their first-degree relatives, and healthy control subjects. *Diabetes Care* 2001;24:27–32.
243. Sougioultzoglou F, Falorni A, Kassi G, Brozzetti A, Karamitsos D, Koliakos G/G. Coincidence of high antiislet and antithyroid autoantibody titles in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2005;113:85–9.
244. Pilia S, Casini MR, Cambuli VM, i sur. Prevalence of Type 1 diabetes autoantibodies (GAD and IA2) in Sardinian children and adolescents with autoimmune thyroiditis. *Diabet Med* 2011;28:896-9.
245. Marwaha RK, Greg MK, Tandon T, i sur. Glutamic acid decarboxylase (anti-GAD) & tissue transglutaminase (anti-TTG) antibodies in patients with thyroid autoimmunity.

Indian J Med Res 2013;137:82–6.

246. Aksoy DY, Yürekli BP, Yildiz BO, Gedik O. Prevalence of glutamic acid decarboxylase antibody positivity and its association with insulin secretion and sensitivity in autoimmune thyroid disease: A pilot study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2006;114:412-6.

247. Wiebolt J, Achterbergh R, den Boer A, i sur. Clustering of additional autoimmunity behaves differently in Hashimoto's patients compared with Graves' patients. *Eur J Endocrinol* 2011;164:789-94.

248. Primo ME, Niepomniszcze H, Poskus E, i sur. Frequency of pancreatic beta-cell autoimmunity markers in patients with autoimmune thyroid disease. *Medicina (B Aires)* 2008;68:37-42.

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** NATAŠA ROJNIĆ PUTAREK

**Datum rođenja:** 24. veljače 1971. g u Puli

**Naziv ustanove:** Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Klinika za pedijatriju, KBC Zagreb

### OBRAZOVANJE

**2012.** godine - *Prijava teme doktorske dizertacije:* Povezanost markera autoimunosti na stanice Langerhansovih otočića i polimorfizma gena HLA razreda II, CTLA-4 i PTPN22 s nastankom dijabetes melitusa tip 1 u bolesnika s autoimunom bolešću štitnjače. Mentor.

Prof.dr.sc. Miroslav Dumić

**2010. – 2011.** godine – *Znanstveni poslijediplomski doktorski studij* – Biomedicina i zdravstvo, Medicinski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**2003. – 2004.** godine – *Stručni poslijediplomski studij*- Klinička pedijatrija

**1996. – 1998.** godine – *Poslijediplomski studij:* Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biomedicina. 4.7.2002. obranila Magistarsu tezu

**1989. – 1995.** godine – *Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

### RADNO ISKUSTVO

**Od 2011.** godine – *V.d. voditelja Zavoda* za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju KBC Zagreb

**Od 2010.** godine - *Pedijatar endokrinolog i dijabetolog* u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju KBC Zagreb

**2008. - 2010.** godine - *Uža specijalizacija* iz Pedijatrijske endokrinologije, dijabetologije i bolesti metabolizma (Ispit 16.12.2010. g)

**Od 2008.** godine - *Asistent* na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

**Od 2006.** godine - *Pedijatar* u Zavodu za endokrinologiju i dijabetes Klinike za pedijatriju KBC Zagreb

**2002. – 2006.** godine - *Specijalizacija iz pedijatrije, Klinika za pedijatriju KBC Zagreb* (Specijalistički ispit 12.4.2006. g)

**2001. – 2002.** godine - *Znanstveni novak* Medicinski fakultet Zagreb, Katedra za pedijatriju

**1999. – 2001.** godine - *Suradnik u kliničkim istraživanjima, Medicinski poslovi, Pliva d.d.*

**1996. – 1998.** godine - *Liječnik pripravnik* (DZ Medveščak; Državni ispit 30.4.1998. god)

#### UŽE PODRUČJE ZNANSTVENOG I STRUČNOG RADA

- Endokrinologija, dijabetes, genetika

#### PROJEKTI

**Od 2014.** godine - Voditelj Europskog Referentnog Centra za dječji i adolescentni dijabetes u okviru projekta SWEET pod pokroviteljstvom ISPAD-a (International Society for Pediatric and Adolescent Diabetology)

**Od 2013.** godine - Voditelj projekta „Multidisciplinarni pristup liječenju djece i adolescenata“ financiranog od Gradskog ureda za zdravstvo

**Od 2007.** godine - Suradnik u znanstveno Znanstvenoistraživački projekt: «*Nasljedne endokrine bolesti*». Glavni istraživač: Prof. Dr. Sci. Miroslav Dumić; br. 108063

**2001. – 2006.** godine - Suradnik u znanstveno-istraživački projektima: *Imunogenetika srčanih i neuromišićnih bolesti u djece, Etiopatogeneza srčanih bolesti u dječ i Fetalna kardiološka služba u zaštiti perinatalnog mortaliteta i morbiditeta..* I Glavni istraživač: Prof. Dr. Sci. Ivan Malčić

#### NAGRADE

**2004.** godine - Nagrada Hrvatkog pedijatrijskog društva “Radovan Marković”

**1993.** godine - Nagrada Rektora Sveučilišta u Zagreb



## NASTAVNA DJELATNOST

**Od 2008.** godine - *Asistent* u kumulativnom radnom odnosu u Katedri za pedijatriju radnim mjestom u Klinici za pedijatriju KBC

**Od 2008.** godine - Predavač u nizu poslijediplomskih studija na Medicinskom fakultetu u Zagrebu (Klinička pedijatrija, Endokrinologija, Dijabetologija)

**2004. – 2006.** godine - Sudjeluje u provođenju nastave kolegija “Pedijatrijska kardiologija” u sklopu znanstvenog postdiplomskog studija Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Od 2001.** godine, od izbora za znanstvenog novaka, sudjeluje u provođenju dodiplomske nastave iz Pedijatrije, Hitnih stanja u pedijatriji, Kliničkog prosuđivanja, Temelja liječničkog umijeća te studija na engleskom jeziku

## RECENZENTSKI RAD I ČLANSTVA U KOMISIJAMA

Recenzirala nekoliko članaka za domaće i inozemne časopise iz područja endokrinologije

## ORGANIZACIJE TEČAJEVA I SIMPOZIJA

**Od 2013.** godine - *Suvoditelj* tečaja trajnog usavršavanja “Šećerna bolest u djece – odabrana poglavlja iz pedijatrijske endokrinologije” edukacija timova.

## POPIS RADOVA OBJAVLJENIH U POSLJEDNJIH PET GODINA

1. Incidence of type 1 diabetes mellitus in 0 to 14-yr-old children in Croatia – 2004 to 2012 study. Rojnic Putarek N, Ille J, Spehar Uroic A, Skrabic V, Stipancic G, Krnic N, Radica A, Marjanac I, Severinski S, Svirig A, Bogdanic A, Dumic M. *Pediatric Diabetes* 2014 Jul 31. doi: 10.1111/pedi.12197. [Epub ahead of print]
2. Primary hypothyroidism and nipple hypoplasia in a girl with Wolcott-Rallison syndrome. Spehar Uroić A, Mulliqi Kotori V, Rojnić Putarek N, Kušec V, Dumić M. *Eur J Pediatr*. 2013
3. Dumić M, Barišić N, Rojnić Putarek N, Kušec V, Stanimirović A, Koehler K, Huebner A. (2011) Two siblings with triple A syndrome and novel mutation presenting as hereditary

polyneuropathy. Eur J Pediatr. 170(3):393-6.

4. Ille J, Rojnić Putarek N, Radica A, Hattersley A, Ellard S, Dumić M. (2010) Low doses of sulphonyluria as a successful replacement for insulin therapy in a patient with neonatal diabetes due to a mutation of KCNJ11 gene encoding Kir6.2]. Lijec Vjesn; 132(3-4):90-3.
5. Dumić M, Rojnić Putarek N, Skrablin-Kucić S, Matić T, Ille J, Radica A. (2009) *Marden-Walkerov sindrom –prikaz bolesnice*. Lijec Vjesn. 131(7-8):203-6.
6. Krnić N, Dumić K, Radoš M, Rojnić Putarek N, Stanimirović A. (2009) *Dvostruka hipofiza*. Liječnički vjesnik; 131:105-180.
7. Dumić M, Janjanin N, Markov-Glavas D, Prgomet D, Rojnić Putarek N. (2007) *Sialolithiasis with concurrent sialadenitis in an 18-year-old boy with triple A syndrome*. J Otolaryngol. 36(6):E98-9.