

# Imunopatološke i imunogenetičke značajke bolesnika s pemphigus vulgaris u Hrvatskoj

---

Lakoš Jukić, Ines

Doctoral thesis / Disertacija

2020

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:105:838681>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-23**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ines Lakoš Jukić**

**Imunopatološke i imunogenetičke  
značajke bolesnika s pemphigus  
vulgaris u Hrvatskoj**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2020.**

Rad je izrađen u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Branka Marinović

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli pri izradi ovoga rada:

Posebnu zahvalnost izražavam mojoj mentorici, prof. dr. sc. Branki Marinović, bez čijeg poticanja, pomoći i stručnih savjeta ne bih uspjela završiti ovaj rad.

Najljepše se zahvaljujem prim. dr. Vesni Đogić, voditeljici Odsjeka za DNA tipizaciju Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na izvrsnoj suradnji u laboratorijskom dijelu rada.

Veliko hvala prof. dr. sc. Davoru Plavecu na statističkoj analizi rezultata i razumijevanju i strpljenju za sva moja pitanja.

Hvala i cijelom timu Kabineta za kliničku imunologiju, imunofluorescentnu i serološku dijagnostiku bolesti kože, a posebno laboratorijskoj tehničarki Martini Jurin.

Konačno velika hvala samo zato što ih imam uz sebe, Tomislavu, Jani, Šimunu i Mati. Hvala što se imali razumijevanja i strpljenja u trenucima kada mi je to bilo najpotrebnije.

Posvećujem ovaj rad mojim roditeljima i roditeljima moga supruga, a posebno mom svekru, koji me prvi i uputio u svijet dermatovenerologije.

# SADRŽAJ

POPIS KRATICA

POPIS SLIKA

POPIS TABLICA

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	PEMPHIGUS VULGARIS .....	1
1.1.1	<i>Epidemiologija</i> .....	1
1.1.2	<i>Etiopatogeneza</i> .....	2
1.1.3	<i>Klinička slika</i> .....	4
1.1.4	<i>Dijagnostika</i> .....	5
1.1.5	<i>Liječenje</i> .....	6
1.2	HLA SUSTAV.....	7
1.2.1	<i>Povezanost razreda II HLA sustava s PV</i> .....	8
<b>2</b>	<b>HIPOTEZA</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>ISPITANICI I METODE</b> .....	<b>12</b>
4.1	ISPITANICI.....	12
4.2	METODE .....	13
4.2.1	<i>Histološka analiza</i> .....	13
4.2.2	<i>Direktna imunofluorescencija</i> .....	13
4.2.3	<i>Indirektna imunofluorescencija</i> .....	13
4.2.4	<i>ELISA test za utvrđivanje protutijela usmjerenih prema Dsg1 i Dsg3</i> .....	14
4.2.5	<i>HLA tipizacija</i> .....	14
4.2.6	<i>Statistička analiza</i> .....	18
<b>5</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>20</b>
5.1	<i>OPIS UZORKA</i> .....	20
5.2	<i>UČESTALOST ALELA HLA SUSTAVA, RAZREDA II</i> .....	21
5.3	<i>UČESTALOST HLA-DRB1*-DQB1-DQA1 HAPLOTIPOVA</i> .....	26
5.4	<i>KONCENTRACIJE PROTUTIJELA USMJERENIH PREMA DEZMOGLEINIMA 1 I 3 U PRISUTNOSTI ODREĐENIH ALELA HLA SUSTAVA, RAZREDA II</i> .....	28
5.5	<i>OSJETLJIVOST METODE INDIREKTNE IMUNOFLUORESCENCIJE (IIF)</i> .....	30
5.6	<i>PRIKAZ UTVRĐENIH PROTUTIJELA USMJERENIH PREMA DEZMOGLEINU 1 I DEZMOGLEINU 3 METODOM ELISA</i> .....	31
<b>6</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>39</b>
<b>8</b>	<b>KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU</b> .....	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>KRATKI SADRŽAJ NA ENGLLESKOM JEZIKU</b> .....	<b>43</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>44</b>
<b>11</b>	<b>BIOGRAFIJA</b> .....	<b>54</b>

**INFORMIRANI PRISTANAK ZA HLA TIPIZACIJU**

## POPIS KRATICA

ABSIS	engl. <i>autoimmune bullous skin disorder intensity score</i> = skala za procjenu težine autoimune bulozne bolesti
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i> = analiza varijance
C	engl. <i>complement</i> = komplement
C3	komponenta 3 komplementa
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> = stanični diferencijacijski antigeni
CI	engl. <i>confidence interval</i> = interval pouzdanosti
Dsg1	dezmoglein 1
Dsg3	dezmoglein 3
Dsc	dezmokolin
DIF	direktna imunofluorescencija
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> = deoksiribonukleinska kiselina
EC	ekstracelularna domena
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> = enzim-vezani imunosorbentni test
HLA	engl. <i>human leukocyte antigen</i> = humani leukocitni antigen
HSV	herpes simplex virus
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
IIF	indirektna imunofluorescencija
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> = glavni kompleks gena tkivne podudarnosti
OD	engl. <i>odds ratio</i> = omjer šansi
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> = lančana reakcija polimerazom
PCR-SSP	engl. <i>polymerase chain reaction-sequence specific primer</i> = lančana reakcija polimerazom sa specifičnim začetnikom za sekvencu
PV	pemphigus vulgaris
TT	tjelesna težina

## POPIS SLIKA

<b>Slika 1.</b>	Klinička slika u bolesnika s PV.....	21
<b>Slika 2.</b>	Osjetljivost metode indirektno imunofluorescencije (IIF) u ispitanika (N=30).....	30
<b>Slika 3.</b>	Rezultati nalaza ELISA testa u ispitanika (N=30).....	31

## POPIS TABLICA

### **Tablica 1.**

Dobna i spolna raspodjela bolesnika s PV i kontrolne skupine.....20

### **Tablica 2.**

Učestalost HLA alela HLA-DRB1\* u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni CI te sirove i korigirane P-vrijednosti.....22

### **Tablica 3.**

Učestalost HLA alela HLA-DQB1\* u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni CI te sirove i korigirane P-vrijednosti.....24

### **Tablica 4.**

Učestalost HLA alela HLA-DQA1\* u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni CI te sirove i korigirane P-vrijednosti.....25

### **Tablica 5.**

Učestalost HLA-DRB1\*-DQB1\*-DQA1\* haplotipova u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni CI te sirove i korigirane P-vrijednosti.....26

### **Tablica 6.**

Prikaz koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo alela HLA-DRB1\*04:02.....28

### **Tablica 7.**

Prikaz koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo alela HLA-DQB1\*05:03.....29

**Tablica 8.** Prikaz koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo alela DRB1\*04:02 ili DQB1\*05:03.....29

## 1.1 Pemphigus vulgaris

Pemphigus (grč. *pemphix* – mjehur) je skupni naziv za rijetku skupinu organ-specifičnih, autoimunih bolesti karakteriziranih nastankom mjehura na koži i sluznicama. Pemphigus vulgaris (PV) je najčešći klinički oblik iz ove skupine; 70% bolesnika s pemfigusom ima PV (1).

### 1.1.1 Epidemiologija

PV je rijetka bolest s incidencijom manjom od 0,76 slučajeva na 1000000 stanovnika u Finskoj, 1,55 - 1,7/1000000 u Francuskoj, 3 /1000000 u Italiji, do 16,1 novootkrivenih bolesnika na 1000000 stanovnika u Izraelu (2-4). Bolest je češća u određenim etničkim skupinama, osobito u Aškenazi Židova te u stanovnika mediteranskog područja. U Izraelu je bolest 3,6 puta češća u Židova nego u osoba arapskog podrijetla te je 4 do 10 puta češća u Židova u odnosu na osobe bijele puti u drugim populacijama s incidencijom od 15 do 30 novih slučajeva na milijun stanovnika (5-7). U epidemiološkoj studiji provedenoj u Sjevernoj Americi utvrđena je incidencija od 32/1000000 godišnje u stanovnika židovskog podrijetla u odnosu na 4,2 slučaja na milijun stanovnika u drugim etničkim skupinama (8). U studiji provedenoj u Njemačkoj utvrđena je veća incidencija PV u stanovnika turskog i talijanskog podrijetla u odnosu na domicilno stanovništvo (9). Uočena je i geografska različitost incidencije u Europi; manja incidencija bolesti utvrđena je u sjevernim područjima, a veća u južnim. Ovakva distribucija može biti rezultat čimbenika okoliša ali i specifične genetske podloge (10). Incidencija u Republici Hrvatskoj je, prema retrospektivnoj studiji, procijenjena na 3,7 novo otkrivenih bolesnika na 1000000 stanovnika (11).

Bolest se pojavljuje podjednako u muškaraca i žena, obično između 4. i 6. desetljeća, iako se može pojaviti u svakoj životnoj dobi (12).



### 1.1.2 Etiopatogeneza

Etiopatogeneza PV je složena i nije još u potpunosti poznata, ali se smatra da bolest nastaje zbog složene interakcije genetskih i vanjskih faktora. S obzirom na različitost u incidenciji bolesti u različitim etničkim populacijama, postavlja se pitanje utjecaja genetskih čimbenika na pojavu bolesti. Iako su opisani rijetki slučajevi obiteljske pojavnosti PV, u prilog bitne uloge genetskog čimbenika u nastanku PV govore zapažanja o značajno većoj prevalenciji drugih autoimunih bolesti kod članova obitelji s PV u odnosu na članove obitelji zdravih ispitanika (13-18). U istraživanju Firooza i sur. utvrđeno je da članovi obitelji bolesnika s PV imaju tri puta veću sklonost nastanku neke druge autoimune bolesti u odnosu na članove obitelji zdravih ispitanika (18). U tom smislu govori se o autoimunoj diatezi, koja je vjerojatno povezana s određenim antigenima glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*). Opisana je i pojava drugih autoimunih bolesti u bolesnika s PV, kao što su miastenia gravis, Sjögren-ov sindrom, reumatoidni artritis, perniciozna anemija i autoimuni tireoiditis (16,17). U nekoliko istraživanja utvrđeno je i prisustvo protutijela usmjerenih prema dezmogleinima (Dsg) u asimptomatskih, zdravih članova obitelji bolesnika s PV (19-21).

Iako je akantoliza, histološki pojam koji označava gubitak veza između stanica epidermisa, prvi put opisana još 1881. godine, tek je 1953. god. Lever razlučio bulozni pemfigoid od pemfigusa (22). Beutner i Jordan su 1964. godine metodom indirektno imunofluorescencije dokazali cirkulirajuća protutijela usmjerena protiv površinskih antigena keratinocita (23). Ovo istraživanje dovelo je do velike prekretnice u smislu shvaćanja PV kao autoimune bolesti. U prilog tome govori i pojava neonatalnog pemfigusa u novorođenčadi majki koje boluju od PV, a koji nastaje zbog transplacentarnog prijelaza protutijela. Amagai i sur. su 1991. godine identificirali novi 130 kDa protein, kao ciljni antigen prema kojemu su usmjerena protutijela iz seruma oboljelih od PV, a koji pokazuje veliki stupanj homolognosti s dezmogleinom 1, prethodno otkrivenim 160 kDa proteinom iz obitelji kadherina. Ovaj novi protein nazvan je dezmoglein 3 (24).

Dezmogleini pripadaju obitelji kadherina, o kalciju ovisnih adhezijskih molekula koje čine desmosome. Dezmosomi (poznati i kao *macula adherens*) su složene ovalne tvorbe smještene nasuprot jednakoj tvorbi na površini susjedne stanice u epitelnom tkivu. Funkcija dezmosoma je osiguravanje vrlo čvrste povezanosti između susjednih stanica. Postoje 4 izoforme dezmogleina: Dsg1, Dsg2, Dsg3 i Dsg4. U mnogoslojnom pločastom epitelu nalaze se dezmogleini 1 i 3. Dezmoglein 2 je prisutan u jednoslojnom epitelu te u miokardu, dok se dezmoglein 4 nalazi u dlačnom folikulu (25,26). Uloga Dsg4 u etiopatogenezi lezija u vlasištu kod PV nije još razjašnjena (26). Postoji razlika u ekspresiji dezmogelina 1 i 3 između kože i sluznica, odnosno između mnogoslojnog pločastog oroženog i mnogoslojnog pločastog neoroženog epitela. U koži se Dsg1 nalazi u svim slojevima epidermisa, ali više u površinskim slojevima dok je ekspresija Dsg 3 prisutna samo u suprabazalnom sloju stanica. U epitelu sluznica (usna šupljina, jednjak, rodnica) prisutna je ekspresija Dsg1 i Dsg 3 u svim slojevima, ali uz puno jaču izražajnost Dsg 3. Ova spoznaja dovela je do razvoja tzv. "kompenzacijske teorije" (27). Ako serum bolesnika sadrži protutijela usmjerena samo protiv Dsg1, tada Dsg3 "kompenzira" funkciju Dsg1 u nižim slojevima epidermisa te posljedično dolazi do pojave mjehura u višim slojevima epidermisa budući isti ne izražavaju Dsg3. Iako se ova anti-Dsg1 protutijela vežu i na epitel sluznica, tamo ne dolazi do akantolize budući je Dsg3 prisutan u svim slojevima epitela. Protutijela usmjerena prema Dsg3 dovode do pojave mjehura samo na sluznicama, budući Dsg1 uspijeva kompenzirati nedostatak Dsg3 u koži. U većini slučajeva serum bolesnika s PV sadrži protutijela usmjerena i prema Dsg1 i prema Dsg3 te se shodno ovoj teoriji, mjehuri nalaze i na koži i na sluznicama.

Uz dezmogleine, u građi dezmosoma sudjeluju i dezmozolini (Dsc); grupa transmembranskih glikoproteina koji postoje u 3 izoforme – Dsc1, Dsc2 i Dsc3. U studiji Mindorfa i sur. utvrđeno je da 5% bolesnika s PV ima IgG i IgA protutijela usmjerena i prema dezmozolinima (28).

Protutijela usmjerena prema dezmogleinima pripadaju IgG klasi, subklasi IgG4. Ova protutijela vežu se na NH<sub>2</sub> terminalni dio EC1 subdomene Dsg1 i Dsg3. Kao posljedica ovog vezanja dolazi do deplecije dezmogleina iz stanične membrane te akantolize. Akantoliza nastaje kao rezultat neadekvatne interakcije

između dezmogleina susjednih stanica i zbog aktivacije signalnog puta, primarno p38MAPK, koji dovodi do endocitoze dezmogleina (12,29).

Novija istraživanja upućuju i na važnost drugih, ne-dezmogleinskih protutijela u etopatogenezi PV. U serumu bolesnika s PV dokazano je i prisustvo protutijela usmjerenih prema acetilkolinским receptorima, mitohondrijskim proteinima, dezmokolinima, pemfaksinu, tiroidnoj peroksidazi i kolagenu XVII (30). Uloga ovih protutijela nije još razjašnjena; neka od njih mogla bi djelovati sinergistički s antidezmogleinskim protutijelima, dok su neka rezultat fenomena “širenja epitopa”, nastalog zbog gubitka tolerancije uslijed progresije same bolesti. Prethodno opisana “kompenzacijska teorija” ne može objasniti nesukladnost između utvrđenih protutijela i kliničke slike te se predlaže “superkompenzacijska hipoteza” – vezanje više specifičnih protutijela, ne samo onih usmjerenih prema dezmogleinima, nego i onih prema brojnim antigenima izraženim na keratinocitima, što dovodi do alteracije signalnih puteva i posljedične akantolize ako zbroj svih učinaka nadvlada mogućnost adhezije stanica (30).

### 1.1.3 Klinička slika

Bolest u više od 60% bolesnika počinje pojavom vezikula i bula na sluznicama, najčešće na sluznici usne šupljine. S obzirom na činjenicu da pokrov vezikula i bula čini samo dio epidermisa, isti brzo pucaju te nastaju erozije koje su bolne. Najčešće su zahvaćene bukalna sluznica, tvdo nepce, gingiva i usnice. Lezije na gingivi manifestiraju se kao deskvamativni gingivitis. Erozije na sluznicama mogu biti jedina manifestacija bolesti. Osim sluznice usne šupljine, promjenama mogu biti zahvaćene i sluznica gornjeg probavnog trakta (jednjak), sluznica respiratornog sustava (nos, grkljan, ždrijelo), spojnica oka te sluznica genitalnog sustava (penis, vagina). U većini slučajeva, obično nakon 3 do 5 mjeseci, dolazi i do pojave promjena na koži. Na koži je bolest obilježena pojavom fragilnih, mlohavih mjehura čijim pucanjem zaostaju erozije. Opisane lezije obično nastaju na klinički nepromijenjenoj koži. Znakovi Nikolskog tipa I (trljanjem nepromijenjene kože u blizini erozije izaziva se odljuštenje epidermisa) i II (pritiskom na središte mjehura dolazi do njegovog rubnog širenja) pozitivni su i imaju dijagnostičko značenje. Mjehuri mogu nastati na koži cijelog tijela iako su

predilekcijska mjesta trup, prepone, vlasište i lice; dlanovi i tabani obično su pošteđeni. Ubrzo dolazi do pojave erozija prekrivenih krustama, koje ne pokazuju tendenciju cijeljenja. Promjenama može biti zahvaćena velika površina kože uz subjektivnu bolnost i pečenje te adinamiju. Najčešća komplikacija je bakterijska superinfekcija uz mogućnost razvoja septičnog šoka. Ako se ne započne liječenje, može doći do po život opasnih infekcija i metaboličkih poremećaja (1,12,31,32).

Diferencijalno-dijagnostički potrebno je isključiti druge bolesti iz skupine pemfigusa i bolesti iz skupine subepidermalnih buloznih dermatozata kao i bulozne oblike medikamentoznih egzantema i eksudativnog multiformnog eritema. Kod lezija prisutnih samo na sluznici usne šupljine, diferencijalno-dijagnostički u obzir dolazi erozivni oblik lichen ruber planus-a, aftozni stomatitis, gingivostomatitis uzrokovan herpes simplex virusom (HSV), pemfigoid sluznica (MMP; engl. *mucous membrane pemphigoid*) i Stevens-Johnson-ov sindrom.

#### 1.1.4 Dijagnostika

Postavljanje dijagnoze PV temelji se na anamnezi, kliničkoj slici i laboratorijskoj obradi koja uključuje patohistološku analizu, direktnu imunofluorescenciju (DIF), indirektnu imunofluorescenciju (IIF) i enzim-vezani imunosorbentni test (ELISA - engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kojim se utvrđuje prisustvo protutijela usmjerenih prema Dsg1 i Dsg3 u serumu bolesnika.

Za histološku analizu potrebno je probatornom ekscizijom odstraniti u cijelosti manji svježi mjehur ili rub većeg mjehura. Glavno patohistološko obilježje PV je gubitak intraepidermalne adhezije odnosno akantoliza, što se vidi u obliku suprabazalnog mjehura sa slobodnim, akantolitičnim stanicama. Može biti prisutna i eozinofilna spongioza koja predstavlja nakupine eozinofilnih leukocita u epidermisu. U podležjećem se papilarnom dermisu mogu naći oskudni infiltrati limfocita uz rijetke neutrofile (12).

DIF pretragom bioptata perilezionalne kože nalazimo intercelularne depozite IgG i C3 komponente komplementa. Ovakva retikularna fluorescencija posljedica je vezanja protutijela na dezmostigleine. DIF pretraga je "zlatni standard" u dijagnostici svih autoimunih buloznih dermatozata (33).

IIF pretragom se u serumu bolesnika dokazuju cirkulirajuća protutijela. Kao supstrat za IIF može se koristiti zdrava ljudska koža ili jednjak majmuna (tkivo bogato dezmogleinima). U slučaju pozitivnog nalaza, nalaze se intercelularni depoziti IgG (33).

ELISA je metoda kojom se određuje postojanje i količina protutijela usmjerenih prema dezmogleinima 1 i 3 u serumu bolesnika. ELISA metoda koristi rekombinantne proteine ekstracelularne (EC) domene dezmogleina 1 i 3 (27).

Dijagnostičke metode imunoblot i imunoprecipitacija prvenstveno se koriste za znanstveno-istraživačke svrhe; nemaju primjenu u rutinskoj obradi bolesnika sa suspektnim PV.

### 1.1.5 Liječenje

Pemphigus vulgaris je bolest ozbiljnog tijeka koja značajno narušava kvalitetu života te je liječenje potrebno započeti što ranije. Uvođenje u terapiju sustavnih kortikosteroida sredinom prošlog stoljeća, dovela je do značajnog pada stope smrtnosti – od gotovo 75% do 10%, a zbog njihovog jakog protuupalnog i immunosupresivnog učinka (1,12,34,35). Najčešće se primjenjuje prednison u početnoj dozi od 1-2 mg/kg/TT (12). Nakon postizanja stabilne kontrole bolesti odnosno gotovo potpune epitelizacije svih erozija, bez pojave novih mjehura, doza se počinje snižavati. Reduciranje doze mora biti sporo i oprezno. Osobitu je pažnju potrebno posvetiti nuspojavama dugotrajne terapije prednisonom, kao što su arterijska hipertenzija, steroidni dijabetes, osteoporoza, kožne i sistavne infekcije, glaukom i katarakta. Zbog rizika razvoja navedenih nuspojava kortikosteroidne terapije, u liječenje se uvode i adjuvantni lijekovi s funkcijom omogućavanja što ranijeg snižavanja doze prednizona te što dužeg održavanja bolesnika u fazi remisije. U tu svrhu najčešće se koristi azatioprin (100-200 mg/d) (12,36). Unatrag 2 godine, a nakon velike studije koju su proveli Joly i sur. lijek prvog izbora postaje rituksimab (37,38). Rituksimab je kimerično monoklonalno anti-CD20 protutijelo koje dovodi do deplecije B limfocita, a ima učinak i na CD4+ limfocite T. Prvi slučaj uspješnog liječenja bolesnika s teškim oblikom PV, koji nije odgovarao na konvencionalnu terapiju, opisan je još 2002. godine (39). Od tada započinje primjena rituksimaba u liječenju PV. U gore navedenoj, prospektivnoj, multicentričnoj studiji koju su proveli Joly i sur. bilo je

uključeno 90 novootkrivenih bolesnika s PV, u dobi od 18 do 80 godina, koji prethodno nisu liječeni sustavnom terapijom. Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine koje su dobivale različiti protokol terapije. Prva skupina (44 bolesnika) dobila je prednizon u dozi od 1,0-1,5 mg/kg, uz postupno snižavanje doze u razdoblju od 12-18 mjeseci, a druga skupina (46 bolesnika) rituksimab u dozi od 1000 mg i.v. na dan 0 i 14, potom 500 mg nakon 12 i 18 mjeseci, uz kratkotrajnu terapiju prednisonom u dozi od 0,5-1,0 mg/kg uz postupno snižavanje u periodu od 3 do 6 mjeseci. Nakon 24 mjeseca, kompletnu kliničku remisiju postigao je 41 od 46 (89%) bolesnika koji su dobivali rituksimab te 15 od 44 (34%) bolesnika liječenih samo prednisonom. Kumulativna doza prednizona kao i učestalost ozbiljnih nuspojava liječenja bile su značajno niže u skupini bolesnika liječenih rituksimabom (37).

## 1.2 HLA sustav

Unatrag više od 40 godina opažena je povezanost PV i nekih antigena HLA (engl. *human leukocyte antigen*) sustava.

Glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (MHC) u čovjeka se naziva HLA budući je otkriven na leukocitima. Nalazi se na kraćem kraku kromosoma 6, pruga 21,3. Geni razreda I (A, B, C) smješteni su telomerno dok su geni razreda II (DP, DQ i DR) smješteni centromerno. Između prvih dviju regija nalazi se regija gena razreda III. Geni lokusa HLA A, B, C, DP, DQ i DR koji se nalaze na jednom kromosomu čine haplotip – skupinu gena koja se nasljeđuje zajedno. Svaka osoba nasljeđuje po jedan haplotip od oca i od majke. Oba nasljeđena haplotipa kodominantno su izražena na stanicama (40). Godine 1999. objavljena je cjelovita genska mapa HLA sustava (41).

Antigeni razreda I HLA sustava nalaze se na gotovo svim tjelesnim stanicama, osim na stanicama mozga i placenti. Njihova je funkcija predočavanje intracelularnih antigena stanicama imunološkog sustava. Antigeni razreda II HLA sustava izraženi su na limfocitima B, makrofazima, predočnim stanicama i monocitima kao i epitelnim stanicama crijeva. Radi se o transmembranskim receptorima koji su građeni od dvaju polimorfni lanaca,  $\alpha$  i  $\beta$ . Ekstracelularna domena  $\beta$  lanca,  $\beta 2$  domena, sadrži vezno mjesto za koreceptorsku molekulu CD4 na pomagačkim limfocitima (40).

Regija HLA razreda III sadržava gene čiji produkti sudjeluju primarno u imunološkim reakcijama; među njima je i sinteza komponentni komplekta C2 i C4 (40).

Važeće nazivlje za HLA sustav, ustrojeno od strane nadležnog odbora Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *WHO Committee for Factors of the HLA System*) u primjeni je od 2010. godine (42). Oznaka gena HLA sastoji se od oznake lokusa i identifikacijskog broja alela koji je zvjezdicom odvojen od lokusa. Nakon separatora (:) slijedi drugo polje koje opisuje specifičan alel. Kod HLA razreda II dodaje se i oznaka gena za polimorfni lanac (A za  $\alpha$  lanac, B za  $\beta$  lanac) (42).

Za brojne bolesti, osobito autoimune etiologije, dokazana je povezanost s antigenima sustava HLA.

### 1.2.1 Povezanost razreda II HLA sustava s PV

Brojne epidemiološke studije identificirale su povezanost specifičnih alelnih varijanti lokusa HLA-DR i HLA-DQ s pojavom PV. Prema rezultatima većine istraživanja u različitim populacijama, najveći rizik za pojavnost PV vezan je za alele HLA sustava DRB1\*04:02 i DQB1\*05:03 (43-53). U studiji Dhandha i sur. uočeni su značajno viši titrovi protutijela usmjerenih prema Dsg3 u bolesnika s PV koji su imali jedan od ovih alela u odnosu na oboljele koji nisu imali navedene alele (54). Više od 90% Aškenazi Židova koji boluju od PV imaju HLA-DRB1\*04:02 alel. Isti alel prisutan je samo u 8% zdave populacije Aškenazi Židova (53). Ovaj alel identificiran je u većoj frekvenciji u oboljelih od PV i u drugim populacijama odnosno državama: u Italiji, Francuskoj, Japanu, Španjolskoj i SAD-u (44-46,48,50,51). Alel DQB1\*05:03 povezan je s pojavom pemfigusa u Brazilu, Sjevernoj Americi, Iranu, Indiji, Italiji i Slovačkoj (44,47,55,57-59). Drugi lokus koji nosi veći rizik za pojavu PV je DRB1\*14. Alel DRB1\*14:04 utvrđen je u većoj frekvenciji u istraživanjima u Slovačkoj, Indiji, Srbiji, te među bijelcima i osobama indoazijskog podrijetla u Velikoj Britaniji (49,52,58,60). Prevalencija ovog alela među zdravom populacijom u jednom istraživanju bila je 0 (61). Veći rizik za pojavu PV u osoba bijele puti u Velikoj Britaniji nosi alel HLA-DRB1\*14:54 (60). Povećana učestalost ovog alela u

skupini bolesnika s PV u odnosu na zdrave ispitanike uočena je i u studijama u Turskoj, Španjolskoj i Japanu (43,46,50).

Za HLA sustav je karakteristična neravnoteža udruživanja (engl. *linkage disequilibrium*) čime se označava pojava da se neki aleli pojavljuju zajedno češće nego se to sa statističkog stajališta očekuje. Ova pojava nastaje kao rezultat niske učestalosti rekombinacija između lokusa HLA koji su blisko smješteni na kromosomu 6 (40). U studijama o povezanosti PV i određenih alela HLA sustava, razreda II, utvrđeni su stoga i rizični haplotipovi za razvoj bolesti. U populaciji Aškenazi Židova gotovo svi bolesnici s PV imaju haplotip HLA-DRB1\*04:02/-DQA1\*01:01/-DQB1\*03:02 ili HLA-DRB1\*14:01/-DQA1\*01:04/DQB1\*05:02 (56). Haplotip HLA-DRB1\*04:02/-DRB4\*01:01/-DQB1\*03:02 utvrđen je i u većine oboljelih od PV u Iranu (56). Među oboljelima od PV u Pakistanu haplotip HLA-DRB1\*14:04/-DQA1\*01:01/DQB1\*05:03 je bio značajno više zastupljen u skupini bolesnika s PV u odnosu na zdrave ispitanike (62). Isti haplotip povezan je i s većom sklonošću pojavi PV u studiji u Brazilu (55).



## 2 HIPOTEZA

---

U našoj skupini bolesnika s PV postoje imunopatološke osobitosti kao i rizični alel odnosno haplotip HLA sustava, razreda II, za pojavu bolesti.

### 3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

---

S obzirom da do sada nije rađeno slično istraživanje u našoj populaciji, opći cilj istraživanja jest identificirati imunopatološke osobitosti (nalaze direktne i indirektne imunofluorescencije i ELISA testa) te utvrditi eventualno prisutne rizične alele i haplotipove HLA sustava, razreda II, za pojavu PV u našoj skupini.

U ovom istraživanju postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

- Analizirati rezultate nalaza imunopatološke obrade;
- Istražiti eventualna odstupanja nalaza imunopatološke obrade;
- Istražiti razliku u učestalosti pojedinih alela i haplotipova HLA sustava, razreda II, u skupini bolesnika i u kontrolnoj skupini;
- Uspredbom rezultata sa studijama u drugim populacijama utvrditi eventualnu različitost odnosno specifičnost rizičnih alela i haplotipova u naših bolesnika s PV u odnosu na druge populacije.

## 4 ISPITANICI I METODE

---

### 4.1 Ispitanici

U ovo retrospektivno istraživanje uključeno je 30 bolesnika oba spola koji su u razdoblju od 01.01.2007. do 31.12.2010. liječeni u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zbog dijagnoze pemphigus vulgaris.

Istraživanje je provedeno u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u laboratoriju Odjela za molekularnu imunogenetiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

Uvjeti za uključivanje bolesnika u istraživanje bili su:

1. anamnestički podaci o pojavi mjehura odnosno erozija na koži i/ili sluznicama
2. patohistološki nalaz akantolize
3. DIF pretragom dokazani intercelularno smješteni depoziti IgG sa ili bez depozita C3 komponente komplementa
4. ELISA testom dokazana protutijela usmjerena prema dezmgoleinu 3 sa ili bez protutijela usmjerenih prema dezmgoleinu 1.

Svim bolesnicima, kojima je na temelju gore navedenih kriterija postavljena dijagnoza PV, uzet je uzorak krvi za HLA tipizaciju, za što su svi potpisali informirani pristanak. HLA tipizacija učinjena je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu.

Kontrolnu skupinu čini 190 zdravih, nesrodnih dragovoljnih davatelja krvi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu.

## 4.2 Metode

### 4.2.1 Histološka analiza

Uzorak kože, svježa vezikula ili rub mjehura, fiksiran je u 10%-nom formaldehidu, potom uklopljen u parafin, rezan u rezove debljine 4 $\mu$ m, a zatim obojan hemalaun-eozinom. Nalaz je očitao pod svjetlosnim mikroskopom.

### 4.2.2 Direktna imunofluorescencija

Uzorak perilezionalne kože smrznut je na -24°C, potom je učinjeno 8 kriostatskih rezova debljine 6 $\mu$ m. Nakon fiksacije na predmetnom staklu, sušenja na zraku kroz 10 minuta, ispiranja u fosfatom puferiranoj fiziološkoj otopini, svaki je preparat prekriven antihumanim imunoglobulinom (IgG, IgA i IgM) te antihumanim C3, C4 i fibrinogenom. Antihumana protutijela obilježena su fluorescein izotiocijanatom (sekundarna protutijela Dako, Glostrup, Danska). Nakon inkubacije u vlažnoj komori tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, ispiranja dva puta u fosfatom puferiranoj fiziološkoj otopini u trajanju od 15 minuta, preparati su fiksirani puferiranim glicerinom. Nalaz je očitao pod fluorescentnim mikroskopom (450-490 nm).

### 4.2.3 Indirektna imunofluorescencija

Serum bolesnika razrijeđen je fosfatom puferiranom fiziološkom otopinom u odnosu od 1:10 do 1:320. Potom je serum (30  $\mu$ L) nakapan na supstrat. U ovom ispitivanju kao supstrat je korištena zdrava ljudska koža, dobivena iz Ambulante za male kirurške zahvate, nakon ekscizije dobroćudnih promjena kože. Nakon inkubacije od 30 minuta, slijedi ispiranje s fosfatom puferiranom fiziološkom otopinom. Na preparat se, nakon sušenja, dodaje fluorescein-izocijanatom obilježeni antihumani imunoglobulin G (sekundarna protutijela Dako, Glostrup, Danska). Potom slijedi ponovna inkubacija od 30 minuta te ispiranje. Nalaz je očitao pod fluorescentnim mikroskopom (450-490 nm).

#### 4.2.4 ELISA test za utvrđivanje protutijela usmjerenih prema Dsg1 i Dsg3

Primjenjen je komercijalni anti-Dsg1 i anti-Dsg3 ELISA test (MESACUP Desmoglein test, Medical and Biological Laboratories, Nagano, Japan). Prema uputama proizvođača, serum je razrijeđen u odnosu 1:100. Nakon primarne inkubacije, a radi imobilizacije protutijela (na 23°C tijekom 60 minuta) i ispiranja, uslijedila je konjugirana inkubacija dodavanjem peroksidaze konjugirane antihumanim IgG protutijelima (na 23°C tijekom 60 minuta). Potom je slijedilo ispiranje i dodavanje tetrametilbenzidin supstrata uz inkubaciju od 30 minuta. Enzimska reakcija zaustavljena je dodavanjem otopine za zaustavljanje enzimske reakcije. Apsorpcija jažica očitana je pomoću automatskog čitača (Asys Hitech Model Expert Plus) na valnoj duljini 240 nm. Bile su uključene pozitivne i negativne kontrole, prema uputi proizvođača.

#### 4.2.5 HLA tipizacija

Geni HLA razreda II određeni su polimeraznom lančanom reakcijom (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) koristeći alel-specifične oligonukleotidne začetnike (engl. *primer*) za određene sekvence pojedinih HLA alela (PCR-SSP; engl. *polymerase chain reaction-sequence specific primers*). Polazni materijal za metodu HLA tipizacije je genomska DNA.

##### 4.2.5.1 Izolacija genomske DNA iz leukocita pomoću testnog paketa

Izolacija dezoksiribonukleinskih kiselina iz biološkog materijala pomoću silika-gel membrane temeljena je na postupku vezanja-ispiranja-eluiranja. Nukleinske kiseline se adsorbiraju na silika-gel membranu u prisutnosti kaotropnih soli koje uklanjaju vodu iz hidratiziranih molekula u otopini. Svi ostali stanični dijelovi koji po sastavu nisu nukleinske kiseline, kao što su polisaharidi i proteini se ne adsorbiraju, te se uklanjaju ispiranjem. Nakon ispiranja, pročišćena nukleinska kiselina visokog prinosa se eluira s kolone u malom volumenu pufera ili bidestilirane vode i spremna je za uporabu u molekularnim metodama.

Svim je ispitanicima uzet uzorak periferne krvi na EDTA, u epruvete Vacutainer (Becton-Dickinson, Heidelberg, Njemačka) od 3 ml. Uzorci su centrifugirani 10

min na 2500 okretaja, a zatim je izdvojen sloj polimorfonuklearnih stanica (PMNS) u čistu epruvetu. Za izolaciju genomske DNA upotrebljen je komercijalni QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Njemačka).

#### 4.2.5.2 Izolacija DNA iz plazme /seruma, pune krvi ili leukocita pomoću QIAamp DNA Blood Mini kita

Priprema reagensa :

- Radni reagens za nosač RNA; dodati u omjeru 1:1 elucijskog pufera AE na  $\mu\text{g}$  liofiliziranog "nosača" RNA. Otopljeni sadržaj promiješati, alikvotirati i pohraniti na  $-20^{\circ}\text{C}$  do upotrebe. RNA nosač upotrebljava se za viruse i prijenatnu fetalnu DNA izolaciju.
- Radna otopina proteinaze; u bočicu sa liofiliziranom proteinazom dodati proteinaza otapalo prema uputi na naljepnici bočice. Otopljeni sadržaj promiješati, alikvotirati i pohraniti na  $-20^{\circ}\text{C}$  do upotrebe.
- Pufer AW1; dodati apsolutni etanol u pufer AW1 prema uputi na naljepnici bočice.
- Pufer AW2; dodati apsolutni etanol u pufer AW2 prema uputi na naljepnici bočice.

Postupak izolacije:

- U epruvetu od 1,5 mL dodati 20  $\mu\text{L}$  proteinaze, 200  $\mu\text{L}$  plazme/seruma, pune krvi ili *buffy coat*-a. Za uzorke manje od 200  $\mu\text{L}$ , nadopuniti do 200  $\mu\text{L}$  sa fiziološkom otopinom. Ukoliko povećamo volumen uzorka plazme/seruma, pune krvi ili *buffy-coat*-a potrebno je proporcionalno povećati volumen lizirajućeg pufera, proteinaze i apsolutnog etanola (96-100%). RNA nosač-dodaje se po uzorku 2  $\mu\text{L}$  na 200  $\mu\text{L}$  lizirajućeg pufera (AL) .
- Zatim dodati 200  $\mu\text{L}$  lizirajućeg pufera (AL) i mućkati pomoću vortex-a 15 sek. Uzorak inkubirati 10 minuta na  $56^{\circ}\text{C}$ .
- Dodati 200  $\mu\text{L}$  apsolutnog etanola (96-100%) i snažno mućkati pomoću vortex-a 15 sek.

- Mix dodati na kolonu postavljenu u 2 ml-sku epruvetu i centrifugirati 1 minutu na 11500 okretaja u minuti.
- Kolonu prenijeti u novu 2 ml-sku epruvetu, a epruvetu s filtratom baciti. Dodati 500  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje kolone (pufer AW1). Centrifugirati 1 min na 11500 okretaja/min.
- Odbaciti epruvetu s eluatom, a kolonu prenijeti u novu epruvetu. Dodati 500  $\mu\text{L}$  pufera za ispiranje na kolonu (AW2). Centrifugirati 3 min na 14000 okretaja.
- Eluat baciti. Kolonu postaviti na istu praznu epruvetu i ponovo centrifugiranjem kroz jednu minutu na maksimalnom broju okretaja odstraniti ostatke pufera za ispiranje kolone.
- Epruvetu s eluatom odbaciti, a kolonu postaviti u novu 1,5 mL-sku epruvetu i dodati pažljivo izravno na kolonu 50-300  $\mu\text{L}$  pufera za eluciju (AE pufer) ili bidestilirane vode.
- Volumen za eluciju izolirane DNA ovisi o metodi za koju se DNA priređuje. DNA izolirana iz *buffy-coat*-a za HLA tipizaciju, eritrocitne krvne grupe, genotipizacije HPA i HNA eluira se u 300 $\mu\text{L}$ ; a DNA izolirana iz plazme/seruma eluira se u 50 $\mu\text{L}$ .
- Ostaviti stajati na sobnoj temperaturi 5 min.
- Centrifugirati 1 min. na 11500 okretaja/min.
- Ponovljenim dodavanjem AE pufera ili destilirane vode, te centrifugiranjem od 1 minute može se povećati prinos DNA za 15-20 %.
- Elucija se može provesti i s TE puferom pH 8,0 ili bidestiliranom vodom.

#### 4.2.5.3 Umnožavanje ciljne sekvence DNA polimeraznom lančanom reakcijom sa specifičnim začetnicima za sekvencu (PCR-SSP)

PCR je reakcija umnožavanja dijela DNA pomoću Taq polimeraze, koristeći specifične oligonukleotidne začetnike (*primere*), koji prepoznaju i vežu se na komplementarne dijelove DNA (kalupa).

PCR-SSP metoda koristi grupno specifične (niska rezolucija) ili alel specifične začetnike (visoka rezolucija HLA tipizacije) te začetnike za internu kontrolu koja služi za kontrolu umnožavanja.

#### 4.2.5.4 Pribor i materijali

- genomska DNA kao kalup
- epruvete od 2,0 mL za master mix
- pipete od 10, 100 i 1000  $\mu\text{L}$
- Taq DNA polimeraza 5 U/ $\mu\text{L}$
- aqua pro injectione (HZTM)
- Komercijalni HLA-SSP setovi *primera* koji sadrže PCR pločice s prepipetiranim, liofiliziranim primerima za HLA tipizaciju, te master mix (OLERUP-SSP AB, Švedska)
- HLA-SSP setovi niske rezolucije za pojedine HLA lokuse (HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DQB1)
- HLA-SSP setovi visoke rezolucije za pojedine grupe alela (DQA1, DPB1)
- PCR uređaj (Applied Biosystems, SAD)

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

U epruvetu od 2 mL treba dodati:

- 6  $\mu\text{L}$  master-mix-a (sadržanog u SSP kitovima)
- 9,45  $\mu\text{L}$  aqua pro injectione
- 4  $\mu\text{L}$  DNA (30-50 ng/ $\mu\text{l}$ )
- 0,15  $\mu\text{L}$  Taq DNA polimeraze
- Treba dodati 10  $\mu\text{L}$  priređene PCR mješavine u svaku jažicu PCR pločice i zatvoriti ju.

Svi postupci pripreme za PCR izvode se u kabinetu s laminarnim protokom zraka.

Polimerazna lančana reakcija

- Smjestiti pločicu u PCR uređaj.
- Izabrati određeni program i uključiti uređaj



## Program umnožavanja

94°C	2 min	}	10 ciklusa
94°C	10 sek		
65°C	60 sek		
94°C	10 sek	}	20 ciklusa
61°C	50 sek		
72°C	30 sek		
4°C	∞		

### 4.2.5.5 Gel elektroforeza

Detekcija produkata PCR amplifikacije se vrši pomoću elektroforeze na 1,5% agaroznom gelu u 0,5 X TBE puferu ili gotovim PCR CheckIT Wide Mini gelovima 4X25 uz etidijev bromid (AL-Diagnostic GMBH, Austrija). Cjelokupni sadržaj (10 µL) svake pojedine jažice otpipetirati na gel. Etidijev bromid je supstancija koja se umrežava u DNA, a obasjana UV svjetlom svijetli. Nakon završene elektroforeze, gel pogledati pod UV iluminatorom na 312 nm i dokumentirati umnožene vrpce pomoću fotografiranja kamerom.

### 4.2.5.6 Interpretacija nalaza

Specifičnost svake pojedine amplifikacije provjeravala se pomoću tablica za interpretaciju, koje se nalaze priložene u svakom komercijalnom HLA SSP setu ili pomoću HELMBERG SCORE Software-a.

### 4.2.6 Statistička analiza

Frekvencije HLA alela pobrojane su direktno iz podataka o genotipizaciji, a frekvencije haplotipova su dobivene korištenjem tablica kontingencije. Statistička obrada podataka provedena je korištenjem statističkog programskog paketa STATISTICA, verzija 12 ([www.statsoft.com](http://www.statsoft.com). StatSoft, Inc. Tulsa, OK,

SAD) te web stranice VassarStats: Website for Statistical Computation (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>). Razredbene (kvalitativne) varijable prikazane su kao učestalost te udio (%) te su uspoređene među skupinama (PV i zdravi donori) korištenjem Fisherovog egzaktnog testa, a dob je prikazana kao aritmetička sredina te raspon. Normalnost raspodjele koncentracije antitijela ocijenjena je korištenjem Kolmogorov-Smirnov testa te su koncentracije antitijela prikazane kao medijan, interkvartilni raspon (IQR, engl. *interquartile range*) i raspon. Usporedba među skupinama vezano uz prisustvo HLA DRB1\*04:02 i/ili HLA DQB1\*05:03 provedena je korištenjem Mann-Whitney U-testa, a među skupinama prema kliničkoj slici korištenjem Kruskal-Wallis analize varijance (ANOVA, engl. *analysis of variance*) za rangove s post-hoc analizom za višestruke usporedbe. Za utvrđivanje stupnja povezanosti između HLA alela te haplotipova i PV korišten je omjer šanse (OR, engl. *odds ratio*) i 95%-tni intervali pouzdanosti (95% CI). OR i 95%-tni CI za haplotipove koji su učestaliji u skupini oboljelih od PV-a izračunati su približno kako bi se dobio uvid u veličinu povezanosti. Za korekciju višestrukih usporedbi korištena je prilagodba P-vrijednosti prema Benjamini-Hochberg metodi. Dvostrana P-vrijednost (ili korigirana P-vrijednost)  $<0,05$  je korištena kao statistički značajna.

## 5 REZULTATI

### 5.1 Opis uzorka

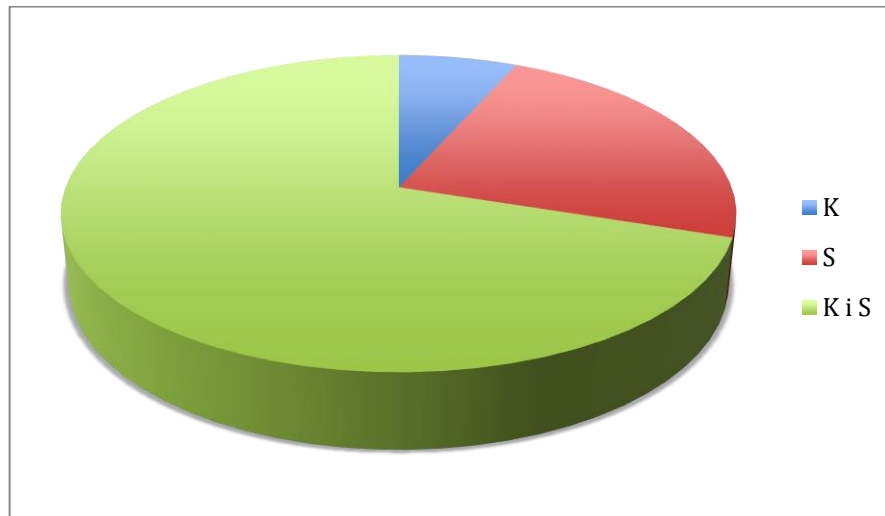
U istraživanje je uključeno 30 bolesnika s dijagnosticiranim PV, od kojih su 20 bile žene, a 10 muškaraci. Raspodjela ispitanika prema spolu i dobi prikazana je u Tablici 1. Prosječna dob bolesnika (AS) je 54 godine (raspon 33-82 god). Kontrolnu skupinu činilo je 190 dobrovoljnih davatelja krvi, od kojih 149 muškaraca i 41 žena prosječne dobi 40 godina (raspon 18-71 god) (Tablica 1).

Tablica 1. Dobna i spolna raspodjela bolesnika s PV i kontrolne skupine

	BOLESNICI S PV			KONTROLNA SKUPINA		
	N	Dob (god.)		N	Dob (god.)	
<b>SPOL</b>		AS	Raspon		AS	Raspon
<b>Muški</b>	10	54	36-82	149	41	18-70
<b>Ženski</b>	20	53	33- 72	41	37	21-71

Legenda: N= broj , AS= aritmetička sredina

U našem istraživanju uočili smo da su žene bile češće zastupljene u skupini bolesnika s PV (66,7%) u odnosu na muškarce (33,3%). Raspon dobi kod muških bolesnika bio je od 36 do 82 godine (AS=54), a kod žena od 33 do 72 godine (AS=53).



Legenda: K=zahvaćenost kože, S=zahvaćenost sluznica.

Slika 1. Klinička slika u bolesnika s PV

Među našim ispitanicima s PV, 21 (70%) bolesnika je imalo mukokutani oblik bolesti, 7 (23,3%) bolesnika je imalo promjene samo na sluznici, dominantno usne šupljine, a 2 (6,7%) bolesnika je imalo samo lezije na koži.

## 5.2 Učestalost alela HLA sustava, razreda II

Učestalost pojedinih HLA-alela (DRB1, DQB1 i DQA1) u ispitivanim skupinama (oboljeli od PV te kontrolna skupina) prikazani su u tablicama 2, 3 i 4.

Tablica 2. Učestalost HLA alela HLA-DRB1\* u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni CI te sirove i korigirane P-vrijednosti

DRB1	PV		K		Statistika				
	N	%	N	%	P*	P <sub>kor</sub> *	OR	-95%CI	+95%CI
*0402	19	31,67	7	1,84	7,29*10 <sup>-13</sup>	2,55*10 <sup>-11</sup>	24,693	9,795	62,252
*1104	6	10,00	29	7,63	0,605496	1	1,345	0,534	3,390
*1601	6	10,00	37	9,74	1	1	1,030	0,415	2,557
*1401	4	6,67	13	3,42	0,268546	0,854465	2,017	0,635	6,403
*1454	4	6,67	0	0,00	6,59E-05	0,001153	27,071	3,350	218,773
*1101	3	5,00	38	10,00	0,245455	0,854465	0,474	0,142	1,586
*1602	3	5,00	6	1,58	0,11095	0,63188	3,281	0,798	13,487
*0101	3	5,00	36	9,47	0,333431	0,972506	0,503	0,150	1,688
*0701	3	5,00	24	6,32	0,784735	1	0,781	0,228	2,677
*0401	2	3,33	13	3,42	1	1	0,991	0,218	4,505
*1501	1	1,67	34	8,95	0,068093	0,595815	0,173	0,023	1,284
*1301	1	1,67	24	6,32	0,228298	0,854465	0,251	0,033	1,894
*0801	1	1,67	13	3,42	0,703748	1	0,479	0,061	3,726
*1404	1	1,67	0	0,00	0,136364	0,63188	Inf	NaN	Inf
*0804	1	1,67	6	1,58	1	1	1,057	0,125	8,933
*0302	1	1,67	0	0,00	0,136364	0,63188	Inf	NaN	Inf
*1201	1	1,67	8	2,11	1	1	0,788	0,097	6,417
*0102	0	0,00	5	1,32	0,61804	1	0	0	NaN
*0103	0	0,00	3	0,79	1	1	0	0	NaN
*0301	0	0,00	37	9,74	0,009396	0,109621	0	0	NaN
*0403	0	0,00	2	0,53	1	1	0	0	NaN
*0404	0	0,00	7	1,84	0,60062	1	0	0	NaN
*0405	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*0407	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*0812	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*1001	0	0,00	6	1,58	0,603815	1	0	0	NaN
*1103	0	0,00	3	0,79	1	1	0	0	NaN
*1111	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*1302	0	0,00	16	4,21	0,14443	0,63188	0	0	NaN
*1303	0	0,00	2	0,53	1	1	0	0	NaN
*1305	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*1405	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*1408	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*1502	0	0,00	3	0,79	1	1	0	0	NaN
*0901	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
Ukupno	60	100,00	380	100,00					

\*Statistička analiza provedena je Fisherovim egzaktnim testom uz korekciju višestrukih usporedbi prema Benjamini-Hochberg metodi.

Legenda: N=učestalost određenog alela, %=udio, P= p vrijednost, p<sub>kor</sub>= korigirana p vrijednost, OR= omjer šanse, Ci=interval pouzdanosti.

U Tablici 2 prikazana je raspodjela alelnih varijanti lokusa HLA-DRB1\* kod bolesnika s PV i u kontrolnoj skupini. Rezultati su pokazali statistički značajno veću učestalost alela HLA-DRB1\*04:02 (OR=24,69; 95%-tni CI=9,80-62,25;  $P_{kor}=2,55 \cdot 10^{-11}$ ; Fisherov egzaktni test) i alela HLA-DRB1\*14:54 (OR=27.07; 95%-tni CI 3,35-218,77;  $P_{kor}=0,0011$ ; Fisherov egzaktni test) u bolesnika s PV u usporedbi s kontrolnom skupinom. Za ostale alele lokusa HLA-DRB1\* nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli između ispitivanih skupina.

Tablica 3. Učestalost HLA alela HLA-DQB1\* u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni CI te sirove i korigirane P-vrijednosti

DQB1	PV		K		Statistika				
	N	%	N	%	P*	P <sub>kor</sub> *	OR	-95%CI	+95%CI
<b>*0302</b>	<b>21</b>	<b>36,21</b>	<b>23</b>	<b>6,05</b>	<b>2,35*10<sup>-9</sup></b>	<b>3,76*10<sup>-8</sup></b>	<b>8,809</b>	<b>4,456</b>	<b>17,417</b>
<b>*0503</b>	<b>9</b>	<b>15,52</b>	<b>13</b>	<b>3,42</b>	<b>0,000853</b>	<b>0,006821</b>	<b>5,185</b>	<b>2,107</b>	<b>12,762</b>
<b>*0502</b>	9	15,52	42	11,05	0,376976	0,502635	1,478	0,678	3,224
<b>*0301</b>	8	13,79	93	24,47	0,093052	0,248139	0,494	0,226	1,079
<b>*0501</b>	3	5,17	51	13,42	0,086506	0,248139	0,352	0,106	1,17
<b>*0402</b>	2	3,45	12	3,16	1	1	1,095	0,239	5,024
<b>*0303</b>	2	3,45	5	1,32	0,234091	0,374546	2,679	0,507	14,140
<b>*0602</b>	1	1,72	33	8,68	0,067471	0,248139	0,185	0,025	1,376
<b>*0603</b>	1	1,72	26	6,84	0,154532	0,309065	0,239	0,032	1,795
<b>*0321</b>	1	1,72	0	0,00	0,13242	0,302675	Inf	NaN	Inf
<b>*0202</b>	1	1,72	20	5,26	0,335955	0,488662	0,316	0,042	2,399
<b>*0201</b>	0	0,00	39	10,26	0,010321	0,055045	0	0	NaN
<b>*0304</b>	0	0,00	4	1,05	1	1	0	0	NaN
<b>*0307</b>	0	0,00	2	0,53	1	1	0	0	NaN
<b>*0601</b>	0	0,00	3	0,79	1	1	0	0	NaN
<b>*0604</b>	0	0,00	14	3,68	0,232458	0,374546	0	0	NaN
<b>Ukupno</b>	<b>58</b>	<b>100,00</b>	<b>380</b>	<b>100,00</b>					

\*Statistička analiza provedena je Fisherovim egzaktnim testom uz korekciju višestrukih usporedbi prema Benjamini-Hochberg metodi.

Legenda: N=učestalost određenog alela, %=udio, P= p vrijednost, p<sub>kor</sub>= korigirana p vrijednost, OR= omjer šanse, Ci=interval pouzdanosti.

U Tablici 3 prikazana je raspodjela alelnih varijanti lokusa HLA-DQB1\* kod bolesnika s PV i u kontrolnoj skupini. Rezultati su pokazali značajno veću učestalost alela HLA-DQB1\*03:02 (OR=8,81; 95%-tni CI=4,46-17,42; P<sub>kor</sub>=3,76\*10<sup>-8</sup>; Fisherov egzaktni test) i alela HLA-DQB1\*05:03 (OR=5,19; 95%-tni CI=2,11-12,76; P<sub>kor</sub>=0,0068; Fisherov egzaktni test) u bolesnika s PV u usporedbi s kontrolnom skupinom. Za ostale alele lokusa HAL-DQB1\* nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli između ispitivanih skupina.

Tablica 4. Učestalost HLA alela HLA-DQA1\* u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni CI te sirove i korigirane P-vrijednosti

DQA1	PV		K		Statistika				
	N	%	N	%	P*	P <sub>kor</sub> *	OR	-95%CI	+95%CI
<b>*0301</b>	<b>19</b>	<b>33,33</b>	<b>23</b>	<b>6,05</b>	<b>4,16*10<sup>-8</sup></b>	<b>6,66*10<sup>-7</sup></b>	<b>7,761</b>	<b>3,879</b>	<b>15,529</b>
*0102	9	15,79	95	25,00	0,137081	0,438659	0,563	0,266	1,189
<b>*0104</b>	<b>9</b>	<b>15,79</b>	<b>16</b>	<b>4,21</b>	<b>0,002247</b>	<b>0,011981</b>	<b>4,266</b>	<b>1,786</b>	<b>10,185</b>
*0505	8	14,04	40	10,53	0,493584	0,987167	1,388	0,614	3,139
*0101	3	5,26	42	11,05	0,24322	0,648587	0,447	0,134	1,493
*0201	3	5,26	24	6,32	1	1	0,824	0,240	2,830
*0103	2	3,51	26	6,84	0,406944	0,930158	0,495	0,114	2,145
*0401	2	3,51	14	3,68	1	1	0,951	0,210	4,297
*0402	1	1,75	0	0,00	0,130435	0,438659	Inf	NaN	Inf
*0303	1	1,75	10	2,63	1	1	0,661	0,083	5,261
*0105	0	0,00	6	1,58	0,60776	1	0	0	NaN
*0302	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
<b>*0501</b>	<b>0</b>	<b>0,00</b>	<b>80</b>	<b>21,05</b>	<b>0,000283</b>	<b>0,00226</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.05</b>
*0502	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*0503	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
*0601	0	0,00	1	0,26	1	1	0	0	NaN
<b>Ukupno</b>	<b>57</b>	<b>100,00</b>	<b>380</b>	<b>100,00</b>					

\*Statistička analiza provedena je Fisherovim egzaktnim testom uz korekciju višestrukih usporedbi prema Benjamini-Hochberg metodi.

†OR i 95% CI za alel koji je učestaliji u kontrolnoj skupini izračunati su približno kako bi se dobio uvid u veličinu povezanosti.

Legenda: N=učestalost određenog alela, %=udio, P= p vrijednost, p<sub>kor</sub>= korigirana p vrijednost, OR= omjer šanse, CI=interval pouzdanosti.

U Tablici 4 prikazana je raspodjela alelnih varijanti lokusa HLA-DQA1\* kod bolesnika s PV i u kontrolnoj skupini. Rezultati su pokazali statistički značajno veću učestalost alela HLA-DQA1\*03:01 (OR=7,76; 95%-tni CI=3,88-15,53; P<sub>kor</sub>=6,66\*10<sup>-7</sup>; Fisherov egzaktni test) i alela HLA-DQA1\*01:04 (OR=4,27; 95%-tni CI=1,79-10,19; P<sub>kor</sub>=0,01198; Fisherov egzaktni test) te statistički značajno manju učestalost alela HLA-DQA1\*05:01 (OR=<0.01; 95%-tni CI=<0,001-<0,05; P<sub>kor</sub>=0,00226; Fisherov egzaktni test) u bolesnika s PV u usporedbi s kontrolnom skupinom. Za ostale alele lokusa HLA-DQA1\* nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli između ispitivanih skupina.



### 5.3 Učestalost HLA-DRB1\*-DQB1-DQA1 haplotipova

Tablica 5. Učestalost HLA-DRB1\*-DQB1\*-DQA1\* haplotipova u skupini oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu, OR uz 95%-tni interval CI te sirove i korigirane P-vrijednosti

HAPLOTIP	PV		K		Statistika				
	N	%	N	%	P*	P <sub>kor</sub> *	OR†	-95%CI†	+95%CI†
DRB1*0402-DBQ1*0302-DQA1*0102	5	8,33	0	0,00	4,07*10 <sup>-5</sup>	0,000244	>350	>40	>3000
DRB1*0402-DBQ1*0302-DQA1*0104	5	8,33	0	0,00	4,07*10 <sup>-5</sup>	0,000244	>350	>40	>3000
DRB1*0402-DBQ1*0301-DQA1*0301	4	6,67	0	0,00	0,000317	0,00095	>270	>30	>2500
DRB1*1454-DBQ1*0503-DQA1*0301	4	6,67	0	0,00	0,000317	0,00095	>270	>30	>2500
DRB1*1601-DBQ1*0502-DQA1*0301	3	5,00	0	0,00	0,002427	0,005824	>200	>20	>2000
DRB1*0301-DQB1*0201-DQA1*0501	0	0,00	40	10,53	0,013588	0,027177	0	0	NaN
DRB1*1101-DQB1*0301-DQA1*0501	0	0,00	36	9,47	0,018991	0,027177	0	0	NaN
DRB1*1104-DQB1*0301-DQA1*0501	0	0,00	30	7,89	0,022897	0,032556	0	0	NaN
DRB1*1601-DQB1*0502-DQA1*0102	0	0,00	29	7,63	0,043218	0,057623	0	0	NaN
DRB1*1501-DQB1*0602-DQA1*0102	0	0,00	23	6,05	0,056892	0,062064	0	0	NaN
DRB1*1301-DQB1*0603-DQA1*0103	0	0,00	23	6,05	0,056892	0,062064	0	0	NaN
DRB1*0101-DQB1*0501-DQA1*0101	0	0,00	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN	NaN

\*Statistička analiza provedena je Fisherovim egzaktnim testom uz korekciju višestrukih usporedbi prema Benjamini-Hochberg metodi.

†OR i 95% CI za haplotipove koji su učestaliji u skupini oboljelih od PV-a izračunati su približno kako bi se dobio uvid u veličinu povezanosti.

Legenda: N=učestalost određenog alela, %=udio, P= p vrijednost, p<sub>kor</sub>= korigirana p vrijednost, OR= omjer šanse, Ci=interval pouzdanosti.

U Tablici 5 prikazana je učestalost haplotipova HLA-DRB1\*-DQB1\*-DQA1\* kod bolesnika s PV u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati su pokazali statistički značajno veću učestalost haplotipova HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:02 (P<sub>kor</sub>=0,000244; Fisherov egzaktni test), HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:04 (P<sub>kor</sub>=0,000244; Fisherov egzaktni test), HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:01-DQA1\*03:01 (P<sub>kor</sub>=0,00095; Fisherov egzaktni test), HLA-DRB1\*14:54-DQB1\*05:03-DQA1\*03:01 (P<sub>kor</sub>=0,00095; Fisherov egzaktni test) HLA-DRB1\*16:01-DQB1\*05:02-DQA1\*03:01 (P<sub>kor</sub>=0,0058; Fisherov egzaktni test) kod oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu. Kako u kontrolnoj skupini nisu utvrđeni navedeni haplotipovi u tablici 5 prikazani OR-i te 95%-tni CI su približne vrijednosti kako bi se dobio uvid u veličinu povezanosti.

Statistički značajno manja učestalost kod oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu utvrđena je za haplotipove HLA-DRB1\*03:01-DQB1\*02:01-DQA1\*05:01 ( $P_{kor}=0,027$ ; Fisherov egzaktni test), HLA-DRB1\*11:01-DQB1\*03:01-DQA1\*05:01 ( $P_{kor}=0,027$ ; Fisherov egzaktni test) i HLA-DRB1\*11:04-DQB1\*03:01-DQA1\*05:01 ( $P_{kor}=0,033$ ; Fisherov egzaktni test).

#### 5.4 Koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmogleinima 1 i 3 u prisutnosti određenih alela HLA sustava, razreda II

Tablica 6. Prikaz koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmogleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo alela HLA-DRB1\*04:02

protutijelo	DRB1*04:02	N	Median	Minimum	Maksimum	IQR
anti-Dsg1	NEG	11	36,52	1,27	168,83	12,05-79,90
antii-Dsg1	POZ	19	29,92	0,42	156,71	11,42-92,30
anti-Dsg3	NEG	11	76,62	0,92	156,71	2,49-25,76
anti-Dsg3	POZ	19	180,68	38,42	298,92	148,93-201,22

Legenda: N= broj, IQR= interkvartilni raspon

U Tablici 6 prikazana je koncentracija protutijela usmjerenih prema dezmogleinima 1 i 3 u bolesnika s PV u odnosu na prisustvo alela HLA-DRB1\*04:02. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmogleinu 3 u bolesnika koji su imali DRB1\*04:02 u odnosu na bolesnika bez navedenog alela (Mann-Whitney test,  $z=-3,701$ ,  $p=0,00$ ). Za protutijela usmjerena prema dezmogleinu 1 nije bilo statistički značajne razlike između bolesnika koji su imali HLA-DRB1\*04:02 alel u odnosu na koji ga nemaju.

Tablica 7. Prikaz koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo alela HLA-DQB1\*05:03.

protutijelo	DQB1*05:03	N	Median	Minimum	Maksimum	IQR
anti-Dsg1	NEG	21	35,45	1,38	168,83	17,95-92,30
anti-Dsg1	POZ	9	22,55	0,42	150,23	1,27-56,62
anti-Dsg3	NEG	21	156,71	0,92	298,92	91,28-196,83
anti-Dsg3	POZ	9	131,85	34,66	185,98	60,50-153,63

Legenda: N= broj, IQR= interkvartilni raspon

U Tablici 7 prikazana je koncentracija protutijela usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u bolesnika s PV u odnosu na prisustvo alela HLA-DQB1\*05:03. Statističkom obradom nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u bolesnika koji su imali ovaj alel u odnosu na one koji ga nemaju (Mann-Whitney U test,  $z=1,267$ ,  $p=0,205$ ).

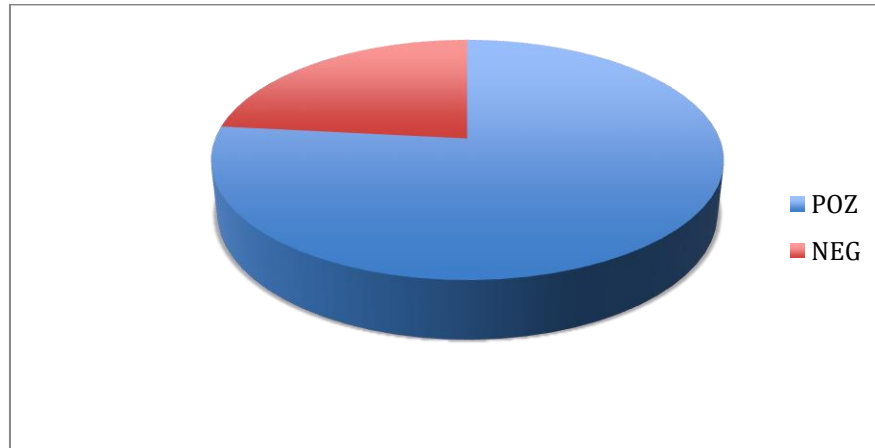
Tablica 8. Prikaz koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo alela DRB1\*04:02 ili DQB1\*05:03.

	DRB1*04:02 ili DQB1*05:03	N	Median	Minimum	Maksimum	IQR
anti-Dsg1	0	7	36,52	12,05	168,83	14,52-116,52
anti-Dsg1	1	23	29,92	0,42	156,71	11,42-79,21
anti-Dsg3	0	7	76,62	0,92	156,71	2,49-91,28
anti-Dsg3	1	23	162,72	34,66	298,92	131,85-196,83

Legenda: N= broj, IQR= interkvartilni raspon

U Tablici 8 prikazana je koncentracija protutijela u bolesnika s PV usmjerenih prema dezmgoleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo alela HLA-DRB1\*04:02 ili HLA-DQB1\*05:03. Statističkom analizom utvrđena je značajna razlika u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmgoleinu 3 u bolesnika koji su imali DRB1\*04:02 ili DQB1\*05:03 alel u odnosu na bolesnike koje ne nose ove alele (Mann-Whitney U test,  $z=-2,942$ ,  $p=0,03$ ). Za koncentracije protutijela usmjerenih prema dezmgoleinu 1 nije bilo statistički značajne razlike.

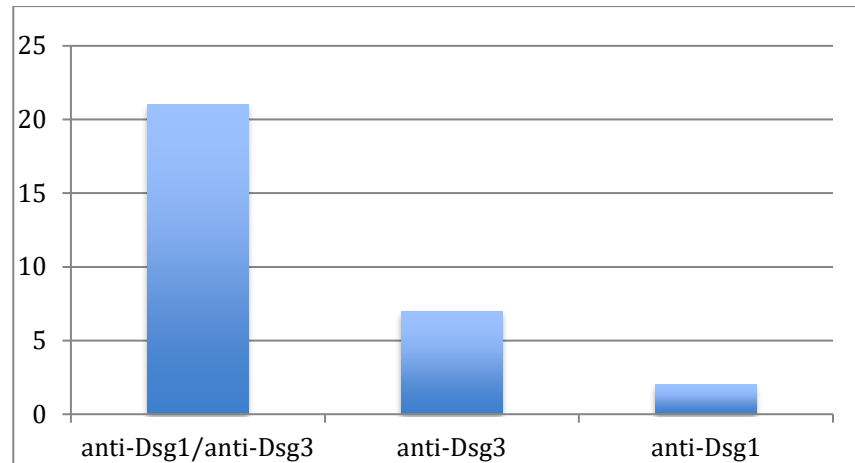
## 5.5 Osjetljivost metode indirektne imunofluorescencije (IIF)



Slika 2. Osjetljivost metode indirektne imunofluorescencije (IIF) u ispitanika (N=30)

U skupini ispitanika, u 23 (76,7%) bolesnika utvrđena su metodom IIF-e cirkulirajuća protutijela, smještena intercelularno; u 7 (23,3%) bolesnika nismo utvrdili cirkulirajuća protutijela. Raspon titra utvrđenih protutijela u bolesnika s pozitivnim nalazom IIF-e kretao se od 1:40 do 1:320 (AS=160).

## 5.6 Prikaz utvrđenih protutijela usmjerenih prema dezmogleinu 1 i dezmogleinu 3 metodom ELISA



Slika 3. Rezultati nalaza ELISA testa u ispitanika (N=30)

U 21 (70%) ispitanika s PV utvrđena su protutijela usmjerenjena i prema dezmogleinu 1 i prema dezmogleinu 3; 7 (23,3%) ispitanika imalo je protutijela usmjerenjena samo prema dezmogleinu 3, u 2 (6,7%) bolesnika utvrđena su protutijela usmjerenjena prema dezmogleinu 1.

U 28 (93,3%) bolesnika utvrđena su protutijela usmjerenjena prema dezmogleinu 3.

## 6 RASPRAVA

---

Etiopatogeneza PV, iako rijetke bolesti, neprestano je u središtu istraživanja u dermatovenerologiji, kako zbog ozbiljnog kliničkog tijeka, tako i zbog bitnog utjecaja na kvalitetu života.

Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje o povezanosti određenih alela i haplotipova HLA sustava s pojavom PV u Republici Hrvatskoj.

U literaturi se navode različiti podaci o pojavnosti PV u odnosu na spol. Polman i suradnici navode podjednaku zastupljenost spolova u oboljelih od PV, što nije u skladu s činjenicom da se autoimune bolesti češće pojavljuju u žena (12,63). Drugi autori uočili su češću pojavnost u žena (2,8,64,65). U ovom istraživanju uzorak je obuhvatio 20 žena i 10 muškaraca što bi odgovaralo omjeru 2:1. Ovakav rezultat može biti posljedica nezaobilaznog ograničenja ove studije u smislu malog uzorka, ali i očekivani rezultat s obzirom na autoimunu prirodu PV.

Povezanost pojave PV i nekih HLA antigena opažena je unatrag gotovo pedeset godina. Na temelju dosadašnjih istraživanja smatra se da PV nastaje složenom interakcijom genetskih i okolišnih čimbenika (66). Uloga HLA sustava u etiopatogenezi PV odnosi se na njegovo izravno uključivanje u imunološke reakcije.

Uspoređujući učestalost alela HLA sustava, razreda II, u različitim populacijama, u skupinama bolesnika s PV u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, u bolesnika s PV opažena je značajno veća učestalost više alela. Unutar lokusa DRB1\* do sada je utvrđeno 11 različitih alelnih varijanti koje se povezuju s pojavom PV: DRB1\*04:02, DRB1\*04:03, DRB1\*04:06, DRB1\*08:02, DRB1\*08:04, DRB1\*14:01, DRB1\*14:04, DRB1\*14:05, DRB1\*14:06, DRB1\*14:08 i DRB1\*14:54 (43-60). Iz ove skupine svakako je bitno izdvojiti DRB1\*04:02. U gotovo svim populacijama dokazana je značajno veća učestalost ovog alela kod bolesnika s PV u odnosu na zdrave ispitanike.

Podaci iz našeg istraživanja u skladu su s navedenim; zabilježena je statistički značajno veća učestalost alela DRB1\*04:02 (OR=24,69) u skupini bolesnika s PV u odnosu na kontrolnu skupinu. Učestalost ovog alela je 31,67% u skupini oboljelih dok isti alel ima samo 1,84% zdravih ispitanika. Danas se smatra da ovaj gen ima bitnu ulogu u etiopatogenezi PV. Eming i sur. su na modelu HLA-DRB1\*04:02 transgeničnog miša dokazali da je ovaj antigen uključen u aktivaciju specifičnih autoagresivnih CD4+ limfocita T, koji imaju ključnu ulogu u indukciji i održavanju limfocita B odnosno plazma stanica koje proizvode protutijela usmjerena prema Dsg3 (67). Ovakav T-limfocitni odgovor u bolesnika s PV dokazan je u više studija (68-70). Unatoč čvrstim dokazima da su protutijela usmjerena prema dezmostoleinima 1 i 3 patogena, odnosno da izazivaju akantolizu, imunološki mehanizam koji regulira njihovo stvaranje još nije poznat. Rezultati ovih istraživanja daju novi pogled na imunopatologiju pemfigusa tako da se PV može smatrati i limfocitima T posredovanom autoimunom bolesti, što svakako otvara i nove mogućnosti liječenja.

U našoj skupini ispitanika utvrdili smo i statistički značajnu razliku u učestalosti alela HLA-DRB1\*14:54 u odnosu na kontrolnu skupinu (OR=27,07). Značajno veća učestalost ovog alela dokazana je među Europljanima bijele puti u istraživanju Sahe i sur (60). I u skupini bolesnika s PV u Slovačkoj utvrđena je značajna razlika u učestalosti HLA-DRB1\*14:54 u odnosu na kontrolnu skupinu (58). Među oboljelima od PV u Brazilu alel HLA-DRB1\*08:04 je imao veću učestalost u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom da je bio udružen u haplotipove s alelima koji ne nose rizik za pojavu PV, zaključak je da upravo alel HLA-DRB1\*08:04 povezan s pojavom PV (55). U našoj skupini bolesnika nitko nije imao izražen navedeni alel.

Unutar gena HLA-DQB1\* do sada je utvrđena povezanost alela HLA-DQB1\*05:03 i DQB1\*03:02 s pojavom PV. Međutim, s obzirom na snažnu neravnotežu udruživanja između DR i DQ lokusa, kao što je primjerice udruženost DRB1\*14:01 i DQB1\*05:03 ili DRB1\*04 i DRB1\*03, postavlja se pitanje koji od ovih alela predstavlja rizik za pojavu PV. Lee i sur. su u svojoj studiji utvrdili da su haplotipovi DRB1\*04:02-DQB1\*03:02 i DRB1\*04:02–bez DQB1\*03:02 češće izraženi kod bolesnika s PV (44). Nakon što su odvojili



bolesnike koji nose HLA-DRB1\*04:02 alel, nisu utvrdili statistički značajnu razliku u učestalosti DQB1\*03:02 alela. Sličan nalaz dobiven je i u studiji Sanza-Cantele i sur. među bolesnicima s PV u Venezueli (51). Lee i sur. su također opazili da HLA-DRB1\*14:01 sam po sebi ne nosi rizik za pojavu PV, već se opet zbog neravnoteže udruživanja često nalazi zajedno s HLA-DQB1\*05:03 (44). Danas se smatra da su ključni aleli koji su izravno uključeni u imunopatogenezu PV HLA-DRB1\*04:02 i HLA-DQB1\*05:03 (12,66). Veldman i sur. izvijestili su da samo one antigen-prezentirajuće stanice koje izražavaju HLA-DRB1\*04:02 i HLA-DQ1\*05:03 imaju sposobnost predočiti dezmoglein 3 autoreaktivnim CD4+ T limfocitima (70). Među našim ispitanicima utvrdili smo značajno veću učestalost alela HLA-DQB1\*03:02 (OR=8,81) i alela HLA-DQB1\*05:03 (OR=5,19) u bolesnika s PV u usporedbi s kontrolnom skupinom. Za ostale alele lokusa HLA-DQB1\* nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli između ispitivanih skupina.

Unutar lokusa HLA-DQA1\* u našoj skupini bolesnika s PV bolesnika dokazali smo statistički značajno veću učestalost alela HLA-DQA1\*03:01 (OR=7,76) i alela HLA-DQA1\*01:04 (OR=4,27) u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovakav rezultat u skladu je sa sličnim studijama koje su provedene u Iranu i Brazilu (55,56). S obzirom da su u središtu istraživanja lokusi DRB1\* i DQB1\* zbog njihove uloge u etiopatogenezi PV, malo je literaturnih izvješća o povezanosti gena lokusa DQA1\* i PV. U našem istraživanju dokazali smo statistički značajno manju učestalost alela HLA-DQA1\*05:01 (OR=<0.01) u bolesnika s PV u usporedbi s kontrolnom skupinom. Ovakav rezultat ukazuje na moguću zaštitnu ulogu ovog alela u smislu pojave PV. Isti rezultat potvrdili su i Shams i sur. u skupini bolesnika s PV u Iranu (59). Ovdje je ponovno potrebno istaknuti da se radi o relativno malom broju ispitanika. Opisana je i negativna povezanost ovog alela i psorijaze (71). U istraživanju među oboljelim od PV u Turskoj aleli s mogućom zaštitnom ulogom bili su HLA-DRB1\*03, HLA-DQB1\*02 i HLA-DQB1\*06 (72). U drugim studijama negativna povezanost s PV utvrđena je za HLA-DRB1\*07, DRB1\*11, DRB1\*13, DRB1\*15, DRB1\*03:01, DQB1\*02, DQB1\*15 i za DQB1\*03:01 (43,47,49,52,56,59,60). Uloga ovih alela s mogućom zaštitnom ulogom u smislu pojave PV nije poznata.

Do sada je rađeno i više studija o učestalosti određenih haplotipova u skupinama bolesnika s PV u različitim populacijama. Među ispitanicima u Srbiji značajno češći haplotip u oboljelih od PV bio je HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02 (52).

Shams i sur. izvjestili su da je u Iranu najčešći haplotip u bolesnika s PV HLA-DRB1\*04-DQB1\*14:01-DQA\*03:01 (59). Gil i sur. u Brazilu su među oboljelim od PV utvrdili češću zastupljenost haplotipova HLA-DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1+03:02 i HLA-DRB1\*14-DQA1\*01:01-DQB1\*05:03 (55).

Rezultati našeg istraživanja su pokazali statistički značajno veću učestalost haplotipova HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:02 ( $P_{kor}=0,000244$ ), HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:04 ( $P_{kor}=0,000244$ ), HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:01-DQA1\*03:01 ( $P_{kor}=0,00095$ ), HLA-DRB1\*14:54-DQB1\*05:03-DQA1\*03:01 ( $P_{kor}=0,00095$ ) i HLA-DRB1\*16:01-DQB1\*05:02-DQA1\*03:01 ( $P_{kor}=0,0058$ ) kod oboljelih od PV u odnosu na kontrolnu skupinu. Kako u kontrolnoj skupini nisu utvrđeni navedeni haplotipovi, prikazani OR-i te 95%-tni CI su približne vrijednosti kako bi se dobio uvid u jačinu povezanosti. Ovdje je međutim potrebno naglasiti da je 76% haplotipova naših ispitanika sadržavalo ili HLA-DRB1\*04:02 ili HLA-DQB1\*05:03. Shodno tome, možemo zaključiti da određeni haplotipovi pokazuju statistički značajno manju povezanost s pojavnošću PV u odnosu na pojedinačne alele HLA sustava, razreda II.

Klinička slika PV je raznolika, s obzirom na zahvaćenost samo sluznica ili kože i sluznica, na tijek bolesti, na brojnost lezija te na učinkovitost liječenja. Tijek bolesti ne može se predvidjeti. U studiji Dhandhe i sur. utvrđeno je da bolesnici s lezijama na sluznicama kao i oni koji imaju i sluznične i kožne lezije imaju značajno veće vrijednosti protutijela usmjerenih prema Dsg3 u odnosu na bolesnike koji imaju samo promjene na koži (54). U istom istraživanju utvrđeno je da bolesnici koji imaju PV duže od 10 godina imaju značajno više vrijednosti IgG anti-Dsg3 protutijela u odnosu na bolesnike koji boluju od PV manje od 2 godine (54). U daljnjem istraživanju izvijestili su da su vrijednosti navedenih protutijela bile značajno veće u bolesnika koji su imali ili HLA-DRB1\*04:02 ili HLA-DQB1\*05:03 alel (54). U izvješću Svecove koja je pratila 44 bolesnika s PV u dvadesetogodišnjem periodu navodi se povezanost HLA-DRB1\*04:02 s teškim, mukokutanim oblikom PV (73). HLA-DQB1\*03:02 bio je povezan s težim

oblikom PV samo u osoba ženskog spola (73). Osim povezanosti određenih alela HLA sustava sa samom pojavom PV, svakako treba razmišljati i o utjecaju ovih alela i na tijek bolesti odnosno na heterogenost kliničke slike. Antigeni HLA sustava mogli bi imati ulogu i na učinak različitih imunosupresivnih lijekova.

U našem istraživanju dokazali smo statistički značajnu razliku u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmozogleinu 3 u bolesnika koji su imali HLA-DRB1\*04:02 alel u odnosu na bolesnike koji nemaju navedeni alel. Isto tako, dokazana je statistički značajna razlika u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmozogleinu 3 u onih bolesnika koji su imali ili HLA-DRB1\*04:02 ili HLA-DQB1\*05:03 alel u odnosu na bolesnike koji iste nemaju. S obzirom na navode u literaturi da postoji korelacija između koncentracije protutijela i kliničke slike (73-75), nameće se zaključak o utjecaju ovih alela, dominantno HLA-DRB1\*04:02 na težinu kliničke slike i u naših ispitanika. Ovdje nije moguće učiniti daljnju analizu budući kod ove retrospektivne studije nismo bolesnicima učinili stupnjevanje težine bolesti (ABSIS - engl. *Autoimmune Bullous Skin Disorder Intesity Score*).

U ovom istraživanju jedan od uvjeta za uključivanje ispitanika je bio i pozitivan nalaz direktne imunofluorescentne pretrage (DIF) odnosno dokazani intercelularno smješteni depoziti IgG sa ili bez depozita C3 komponente komplementa u bioptatu perilezionalne kože. Sukladno tome, može se zaključiti da je osjetljivost metode bila 100%, zbog čega se ova pretraga i smatra «zlatnim standardom» u dijagnostici ne samo PV, već i drugih bolesti iz skupine stečenih autoimunih buloznih dermatoza (33,77). Prema navodima iz literature, osjetljivost ove metode je 91% uz specifičnost do 98% (78). Rezultat dobiven u našem istraživanju može se objasniti relativno malim brojem ispitanika.

Metodom indirektne imunofluorescencije (IIF) dokazuju se cirkulirajuća protutijela u serumu bolesnika. Osjetljivost IIF-e u dijagnostici PV kreće se u rasponu od 81 do 100%, a specifičnost u rasponu od 89 do 100% (78). Kao supstrat koriste se različita tkiva: ljudska koža, jednjak majmuna ili jednjak zamorca. U našem istraživanju kao supstrat je korištena zdrava ljudska koža. U 23 (76,7%) naših bolesnika utvrdili smo cirkulirajuća IgG protutijela, smještena intercelularno, a negativan nalaz IIF-a utvrdili smo u 7 (23,3%) bolesnika. Osjetljivost metode IIF-e u našem istraživanju bila je 76,7%. Ovako niža osjetljivost u odnosu na literaturne navode, rezultat je korištenja ljudske kože kao

supstrata. Naime, gore navedeni podatci o osjetljivosti i specifičnosti IIF-e odnose se na jednjak majmuna kao korišteni supstrat; sluzničko tkivo bogato dezmozgleinom 3, glavnim autoantigenom u PV. Ovakav rezultat nameće potrebu korištenja jednjaka majmuna kao supstrata za dokazivanje cirkulirajućih protutijela u dijagnostičkom algoritmu PV. Ovdje je ipak bitno naglasiti da se metodom IIF-e ne može utvrditi vrsta protutijela. U tu svrhu koristi se ELISA test, kojim se dokazuje vrsta (anti-Dsg1 i anti-Dsg3) protutijela i njihova koncentracija.

U većine bolesnika s PV klinička slika odgovara «profilu» protutijela (protutijela usmjerena prema Dsg1, prema Dsg3 ili prema i Dsg1 i Dsg3) utvrđenih ELISA testom. Rezultat je to «kompenzacijske teorije», koja je opisana u uvodu ove disertacije. Ako bolesnik ima cirkulirajuća protutijela usmjerena prema Dsg3, tada u kliničkoj slici nalazimo samo erozije na sluznicama, bez pridruženih promjena na koži. Kod mukokutanog oblika PV, u serumu bolesnika prisutna su protutijela usmjerena i prema Dsg1 i Dsg3, dok kod isključivo kožnih promjena nalazimo samo protutijela usmjerena prema Dsg1. Ipak, u manjeg broja bolesnika klinička slika nije sukladna utvrđenim protutijelima (79). Marinović i sur. opisali su bolesnicu s PV koja je imala promjene samo na koži lica, bez erozija na sluznicama uz potvrđena protutijela prema Dsg3, a ne prema Dsg1, što bi bilo za očekivati (80).

U našoj skupini oboljelih od PV utvrđena vrsta protutijela bila je u korelaciji s kliničkom slikom.

Među našim ispitanicima s PV, 21 (70%) bolesnik je imao mukokutani oblik bolesti, 7 (23,3%) bolesnika je imalo promjene samo na sluznici, dominantno usne šupljine, a 2 (6,7%) bolesnika su imali samo lezije na koži. Ovdje je bitno naglasiti da je histološki nalaz svježe vezikule ili ruba bule kod svih bolesnika ukazivao na PV; nije bilo opisanih promjena u vidu subkornealnog mjehura što bi ukazivalo na drugu bolest iz skupine intraepidermalnih stečenih buloznih dermatosa - pemphigus foliaceus. Kod svih bolesnika s mukokutanom oblikom bolesti utvrđena su protutijela usmjerena prema Dsg1 i Dsg3; bolesnici sa sluzničkim lezijama imali su samo anti-Dsg3 protutijela dok je kod 2 bolesnika koji su imali promjene na koži utvrđena prisutnost samo anti-Dsg1 protutijela. U 28 (93,3%) od 30 naših bolesnika utvrdili smo protutijela usmjerena prema Dsg3, što je sukladno činjenici da je upravo Dsg3 glavni autoantigen u PV.

Naposljetku, potrebno je osvrnuti se na ograničenja provedene studije. Nezaobilazno ograničenje ovog istraživanja jest mali uzorak. Iako je PV rijetka bolest, s procijenjenom incidencijom u Republici Hrvatskoj od 3,7 novo otkrivenih slučajeva na milijun stanovnika godišnje, potrebne će biti studije s većim brojem ispitanika, osobito ako će se istraživati utjecaj gena HLA sustava na etiopatogenezu PV, budući je HLA sustav najpolimorfiji sustav u biologiji općenito. Za sada nije za očekivati da će HLA tipizacija biti dio standardnog dijagnostičkog algoritma kod PV, kao što je npr. kod dermatitis herpetiformis Dühring.

Prema dosadašnjim otkrićima, dva su alela HLA sustava, razreda II, čija je povećana frekvencija utvrđena u gotovo svim ispitivanim populacijama, izravno uključena u patofiziologiju PV – HLA-DRB1\*04:02 i HLA-DQB1\*05:03. Isti su statistički značajno više zastupljeni i u naših bolesnika s PV u odnosu na zdrave ispitanike. S obzirom na dokazanu ulogu HLA-DRB1\*04:02 u imunološkoj reakciji koja dovodi do akantolize, postavlja se pitanja kako ista nastaje u bolesnika koji ne nose navedeni alel.

## 7 ZAKLJUČCI

---

Cilj ove studije, provedene retrospektivno na bolesnicima koji su liječeni od PV u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od početka 2007. do kraja 2010. godine bio je istražiti imunopatološke i imunogenetičke značajke ove bolesti.

Učinjenom analizom podataka utvrdili smo da u našoj populaciji bolesnika s PV postoji statistički značajno veća učestalost alela HLA, sustava, razreda II: HLA-DRB1\*04:02, HLA-DRB1\*14:54, HLA-DQB1\*03:02, HLA-DQB1\*05:03, HLA-DQA1\*03:01 i HLA-DQA1\*01:04 te statistički značajno manju učestalost alela HLA-DQA1\*05:01 u odnosu na kontrolnu skupinu. Značenje ovog «negativno» povezanog alela s pojavnošću PV nije poznato.

Rezultati su pokazali i statistički značajno veću učestalost haplotipova HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:02, HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:04, HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:01-DQA1\*03:01, HLA-DRB1\*14:54-DQB1\*05:03-DQA1\*03:01 i HLA-DRB1\*16:01-DQB1\*05:02-DQA1\*03:01 u skupini bolesnika s PV u odnosu na kontrolnu skupinu.

Utjecaj alela sustava HLA, razreda II, na imunopatološka obilježja PV u naših bolesnika ispitan je određivanjem koncentracije protutijela prema dezmogleinima 1 i 3 u odnosu na prisustvo odeđenog alela. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmogleinu 3 u bolesnika koji su imali DRB1\*04:02 u odnosu na bolesnika bez navedenog alela. Statističkom analizom utvrđena je i značajna razlika u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmogleinu 3 u bolesnika koji su imali DRB1\*04:02 ili DQB1\*05:03 alel u odnosu na bolesnike koje ne nose ove alele.

Ovakvi nalazi u skladu su s istraživanjima povezanosti HLA sustava, razreda II i u drugim populacijama. U budućim će istraživanjima svakako trebati istražiti utjecaj određenih alela, primarno HLA-DRB1\*04:02, na težinu kliničke slike.

Imunopatološka obilježja naših ispitanika nisu odstupala od ranije utvrđenih spoznaja. U 28 (93,3%) od 30 ispitanika utvrđena su protutijela usmjerena prema dezmogleinu 3, glavnim autoantigenom u PV. Nalazi utvrđenih protutijela usmjerenih prema dezmogleinima bili su sukladni s kliničkom slikom, tj. bolesnici kojima su utvrđena protutijela usmjerena prema Dsg3 imali su samo sluzničke lezije, bolesnici s protutijelima usmjerenim i prema Dsg1 i prema Dsg3 imali su promjene i na koži i na sluznicama dok su bolesnici s utvrđenim protutijelima prema Dsg1 imali promjene ograničene samo na kožu. Osjetljivost metode IIF-e (76,7%) manja je u odnosu na podatke iz drugih istraživanja, a rezultat je korištenja ljudske kože kao supstrata.

## 8 KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

*Pemphigus vulgaris* (PV) je rijetka, organ-specifična autoimuna bulozna dermatoza, klinički obilježena pojavom mjehura na koži i sluznicama, histološki akantolizom, a imunopatološki tkivno-vezanim i cirkulirajućim protutijelima usmjerenim prema površinskim strukturama keratinocita - dezmozogelinu 1 i dezmozogleinu 3. Etiopatogeneza PV nije još razjašnjena iako je poznato da bolest nastaje složenom interakcijom genetskih i okolišnih čimbenika.

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti imunopatološka i imunogenetička obilježja bolesnika s PV u Hrvatskoj. Istraživanje je uključilo 30 bolesnika s PV koji su liječeni od PV u Klinici za dermatovenerologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od početka 2007. do kraja 2010. godine. Dijagnoza PV postavljena je na temelju kliničke slike, histopatološke i imunofluorescentne pretrage te nalaza ELISA testa za kvantitativno određivanje protutijela usmjerenih prema Dsg1 i Dsg3. Svim bolesnicima je uzeta krv za HLA tipizaciju, za što su potpisali informirani pristanak.

Statističkom analizom dobivenih podataka utvrdili smo da postoji značajno veća učestalost alela HLA, sustava, razreda II: HLA-DRB1\*04:02, HLA-DRB1\*14:54, HLA-DQB1\*03:02, HLA-DQB1\*05:03, HLA-DQA1\*03:01 i HLA-DQA1\*01:04 te statistički značajno manja učestalost alela HLA-DQA1\*05:01 u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati su pokazali i statistički značajno veću učestalost haplotipova HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:02, HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:04, HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:01-DQA1\*03:01, HLA-DRB1\*14:54-DQB1\*05:03-DQA1\*03:01 i HLA-DRB1\*16:01-DQB1\*05:02-DQA1\*03:01 u skupini bolesnika s PV u odnosu na kontrolnu skupinu. S obzirom na ključnu ulogu alela HLA-DRB1\*04:02 u imunopatogenzi PV, uspoređena je koncentracija protutijela prema Dsg1 i Dsg3 u odnosu na prisustvo ili odsutnost navedenog alela. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku u koncentraciji protutijela usmjerenih prema dezmozogleinu 3 u bolesnika koji su imali DRB1\*04:02 u odnosu na bolesnika bez navedenog alela.



S obzirom na izraziti polimorfizam HLA sustava, potrebna su daljnja istraživanja s većim brojem ispitanika. Za sada nije za očekivati da će HLA tipizacija biti dio standardnog dijagnostičkog algoritma kod PV, kao što je npr. kod dermatitis herpetiformis Dühring.

## 9 KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU

### IMMUNOPATHOLOGIC AND IMMUNOGENETIC FEATURES IN PEMPHIGUS VULGARIS PATIENTS IN CROATIA

Ines Lakoš Jukić, 2020.

The aim of this study was to determine immunopathologic and immunogenetic characteristics in group of our patients with PV.

This retrospective study sampled patients (N=30) treated for PV at the Department of Dermatology and Venereology, University Hospital Center Zagreb, from January 2007 to 31 December 2010. The diagnosis of PV was based on clinical, histological and immunofluorescence studies as well on ELISA testing for detection of serum antibodies against Dsg1 and Dsg3. Additionally, serum samples were collected for HLA typing, for which all patients have signed informed consent.

Results of the study revealed significantly higher frequencies of HLA-DRB1\*04:02, HLA-DRB1\*14:54, HLA-DQB1\*03:02, HLA-DQB1\*05:03, HLA-DQA1\*03:01 and HLA-DQA1\*01:04 allele in PV patients compared to healthy blood donors. HLA-DQA1\*05:01 allele was significantly underrepresented in group of PV patients. We have also observed positive association between HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:02, HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:02-DQA1\*01:04, HLA-DRB1\*04:02-DQB1\*03:01-DQA1\*03:01, HLA-DRB1\*14:54-DQB1\*05:03-DQA1\*03:01 and HLA-DRB1\*16:01-DQB1\*05:02-DQA1\*03:01 haplotypes and PV. Additionally, regarding the role of HLA-DRB1\*04:02 in pathogenesis of PV, we have determined values of autoantibodies against Dsg3 in group of PV patients who carried this allele compared to those without it. Anti-Dsg3 antibody levels were significantly higher in patients carrying HLA-DRB1\*04:02.

Because polymorphism is hallmark of HLA system, further studies with a larger patient series are needed to clarify the role of genetics in pathophysiological mechanism of PV.

## 10 LITERATURA

---

1. Kridin K. Pemphigus group: overview, epidemiology, mortality, and comorbidities. *Immunol Res* 2018;66:255-70.
2. Hiatanen J, Salo OP. Pemphigus: an epidemiological study of patients treated in Finnish hospitals between 1969 and 1978. *Acta Derm Venereol* 1982;62:491-6.
3. Thomas M, Paul C, Berard E, Fortenfant F, Mazereeuw-Hautier J, Livideanu C, et al. Incidence of auto-immune pemphigus in the Midi-Pyrenees region in 2002-2006. *Dermatology* 2009;220:97-102.
4. Naldi I, Bertoni M, Cainelli T. Feasibility of a registry of pemphigus in Italy: two years experience. Gruppo Italiano studi epidemiologici in dermatologia (GISED). *Int J Dermatol* 1993;33:287-8.
5. Kridin K, Zelber-Sagi S, Bergman R. Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: differences in epidemiology and mortality. *Acta Derm Venerol* 2017;97:1095-9.
6. Pisanti S, Sharav Y, Kaufman E, Posner LN. Pemphigus vulgaris: incidence in Jews of different ethnic groups, according to age, sex and initial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;38:382-7.
7. Gazit E, Loewenthal R. The immunogenetics of pemphigus vulgaris. *Autoimmun Rev* 2005;4:16-20.
8. Simon DG, Kritchhoff D, Kaslow RA, Zarbo R. Pemphigus in Hartford County, Connecticut, from 1972 to 1977. *Arch Dermatol* 1980;116:1035-7.

9. Hahn-Ristic K, Rzany B, Amagai M, Brocker EB, Zillikens D. Increased incidence of pemphigus vulgaris in southern Europeans living in Germany compared with native Germans. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002;16:68-71.
10. Vodo D, Sarig O, Sprecher E. The genetics of pemphigus vulgaris. *Front Med* 2018;5:226.
11. Marinovic B, Lipozencic J, Jukic IL. Autoimmune blistering diseases: incidence and treatment in Croatia. *Dermatol Clin* 2011:677-9.
12. Pollman R, Schmidt T, Eming R, Hertl M. Pemphigus: a comprehensive review on pathogenesis, clinical presentation and novel therapeutic Approaches. *Clin Rev Allerg Immunol* 2018;54:1-25.
13. Starzycki Z, Chorzelski TP, Jablonska S. Familial pemphigus vulgaris in mother and daughter. *Int J Dermatol* 1998;37:211-4.
14. Ozkesici B, Uzun S. Familial pemphigus vulgaris occurred in a father and son as the first confirmed cases. *Case Rep Dermatol Med* 2016; ID 1653507: doi.org/10.1155/2016/1653507.
15. Salathiel AM, Brochado MJ, Kim O, Deghade NH, Donadi EA, Roselino AM. Family study of monozygotic twins affected by pemphigus vulgaris. *Hum Immunol* 2016;77:600-4.
16. Parameswaran A, Attwood K, Sato R, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Identification of a new disease cluster of pemphigus vulgaris with autoimmune thyroid disease, rheumatoid arthritis and type I diabetes. *Br J Dermatol* 2015;172:729-38.
17. Leshem YA, Katzenelson V, Yosipovitch G, David M, Mimouni D. Autoimmune diseases in patients with pemphigus and their first-degree relatives. *Int J Dermatol* 2011;50:827-31.

18. Firooz A, Mazhar A, Ahmed AR. Prevalence of autoimmune diseases in the family members of patients with pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1994;31:434-7.
19. Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Beutner EH, i sur. Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the major histocompatibility complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med* 1993;177:419-24.
20. Brandsen R, Frusic-Zlotkin M, Lyubimov H, Yunes F, Michel B, Tamir A. Circulating pemphigus IgG in families of patients with pemphigus: comparison of indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence and immunoblotting. *J Am Acad Dermatol* 1997;36:44-52.
21. Kricheli D, David M, Frusic-Zlotkin M, Goldsmith D, Rabinov M, Sulkes J, i sur. The distribution of pemphigus vulgaris-IgG subclasses and their reactivity with desmoglein 3 and 1 in pemphigus patients and their first-degree relatives. *Br J Dermatol* 2000; 14:337-42.
22. Štulhofer Buzina D, Marinović B. From pemphix to desmogleins. *Clin Dermatol* 2011;29:355-9.
23. Beutner EH, Jordon RE. Demonstration of skin antibodies in sera of pemphigus vulgaris patients by indirect immunofluorescent staining. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964;117:505-10.
24. Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991;67:869-77.
25. Amagai M. Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins. *Proc Jpn Acad* 2010;86:524-36.

26. Sar-Pomian M, Rudnicka L, Olszewska M. The significance of scalp involvement in pemphigus: A Literature Review. *Biomed Res Int* 2018;2018: 6154397.
27. Mahoney MG, Wang Z, Rothenberger K, Koch PJ, Amagai M, Stanley JR. Explanation for the clinical and microscopic localization of lesions in pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Clin Immunol* 1999;103:461-8.
28. Mindorf S, Detrmann IM, Kruger S, Fuhrmann T, Rentzsch K, Karl I, i sur. Routine detection of serum antidesmocolin autoantibodies is only useful in patients with atypical pemphigus. *Exp Dermatol* 2017;26:1267-70.
29. Kitajima Y. Desmosomes and autoimmune disease: perspective of dynamic remodeling and its impairment in pemphigus. *Cell Common Adhes* 2014;21:269-80.
30. Sinha AA, Sajda T. The evolving story of autoantibodies in pemphigus vulgaris: development of the “super compensation hypothesis”. *Front Immunol* 2018;5:1-16.
31. Bystryń JC, Rudolph JL. Pemphigus. *Lancet* 2005;366:61-73.
32. Porro AM, Seque CA, Ferreira MCC, Enokihara MMS. Pemphigus vulgaris. *An Bras Dermatol* 2019;94:264-78.
33. Lakoš Jukić I, Marinović B. Significance of immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune bullous dermatoses. *Clin Dermatol* 2011;29:389-97.
34. Ahmed AR, Moy R. Death in pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 1982;7:221-8.

35. Risser J, Lewis K, Weinstock MA. Mortality of bullous skin disorders from 1979 to 2002 in the United States. *Arch Dermatol* 2009;145:1005-8.
36. Hertl M, Jedlickova H, Karpati S, Marinovic B, Uzun S, Yayli S, i sur. Pemphigus. S2 guideline for diagnosis and treatment-guided by European dermatology forum (EDF) in cooperation with the European Academy of Dermatology and Venereology (EADV). *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29:405-14.
37. Joly P, Maho-Vaillant M, Prost-Squarcioni C, Hebert V, Houivet E, Calbo S, i sur. First-line rituximab combined with short-term prednisone versus prednisone alone for the treatment of pemphigus vulgaris (Ritux 3): a prospective, multicentre, parallel-group, open label randomised trial. *Lancet* 2017;10083:2013-2041.
38. Murrel DF, Pena S, Joly P, Marinovic B, Hashimoto T, Diaz LA, i sur. Diagnosis and management of pemphigus: recommendations of an international panel of experts. *J Am Acad Derm* 2018;3;575-585.
39. Salopek TG, Logsetty S, Tredget EE. Anti CD-20 chimeric monoclonal antibody (rituximab) for the treatment of relapsing, life-threatening pemphigus vulgaris with implications in the pathogenesis of disorder. *J Am Acad Derm* 2002;47:785-8.
40. Marušić M, Grčević D. Glavni kompleks molekula tkivne podudarnosti. U: Taradi M, urednik. *Imunologija*. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada 2010:98-113.
41. The MHC sequencing consortium. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 1999;401:921-3.
42. Marsh SGE, Albert ED, Doherty WF, Bontrop RE, DuPont B, Erlich HA, i sur. Nomenclature for factors of HLA system. *Tissue Antigens* 2010;75:291-455.

43. Tunca M, Musabak U, Sagkan RI, Koc E, Akar A. Association of human leukocyte antigen class II alleles with pemphigus vulgaris in a Turkish population. *J Dermatol* 2010;37: 246-50.
44. Lee E, Lendas KA, Chow S, Pirani Y, Gordon D, Dionisio R, i sur. Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in north American caucasians with pemphigus vulgaris. *Hum Immunol* 2006;67:125-39.
45. Carcassi C, Cottoni F, Floris L, Vacca A, Mulargia M, Arras, i sur. HLA haplotypes and class II molecular alleles in Sardinian and Italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1996;48:662-7.
46. Gonzales-Escribano MF, Jimenez G, Walter K, Montes M, Perez-Bernal AM, Rodriguez MR, i sur. Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1998;52:275-8.
47. Lombardi ML, Mercurio O, Tecane G, Fusco C, Ruocco V, Salerno A, i sur. Molecular analysis of HLA DRB1 and DQB1 in Italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1996;47:228-30.
48. Lombardi ML, Mercurio O, Ruocco V, Lo Schiavo A, Lombardi V, Guerrera V, i sur. Common human leukocyte antigen in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol* 1999;113:107-10.
49. Delgado JC. Yumis DE, Bozon MV, Salazar R, Deulofeut R, Turbay D, i sur. MHC class II alleles and haplotypes in patients with pemphigus vulgaris from India. *Tissue Antigens* 1996;48:668-72.



50. Nizeeki H, Inoko H, Narimatsu H, Takata H, Sonoda A, Tadakuma T, i sur. HLA class II antigens are associated with Japanese pemphigus patients. *Hum Immunol* 1991;31:246-50.
51. Saenz-Cantele AM, Fernandez-Mestre M, Montagnani S, Calebotta A, Balbas O, Layrisse Z. HLA-DRB1\*04:02 haplotypes without DQB1\*0302 in Venezuelan patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 2007;69:318-25.
52. Zivanovic D, Bojic S, Medenica L, Andric Z, Popadic D. Human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles and haplotypes frequencies in patients with pemphigus vulgaris among Serbian population. *HLA* 2016;87:367-74.
53. Ahmmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, i sur. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci* 1991;58:5056-60.
54. Dhandha MM, Seiffert-Sinha K, Sinha AA. Specific immunoglobulin isotypes correlate with disease activity, duration and HLA association in pemphigus vulgaris. *Autoimmunity* 2012;45:516-26.
55. Gill MJ, Weber R, Rosales CB, Rodrigues H, Sennes LU, Kalil J, i sur. Study of the association between human leukocyte antigens (HLA) and pemphigus vulgaris in Brazilian patients. *Int J Dermatol* 2017;56, 557-62.
56. Mobini N, Yunis EJ, Alper CA, Yunis JJ, Delgado JC, Yunis DE, i sur. Identical MHC markers in non-Jewish Iranian and Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris: possible common central Asian ancestral origin. *Hum Immunol* 1997;57:42-67.

57. Loiseau P, Lecleah L, Prost C. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun* 2000;15:67-73.
58. Parnicka Z, Svecova D, Javor J, Shawkatowa I, Buc M. High susceptibility to pemphigus vulgaris due to HLA-DRB1\*14:54 in the Slovak population. *Int J Immunogenet* 2013;40:471-5.
59. Shams S, Amirzargar AA, Yousefi M, Rezaei N, Solgi G, Khosravi F, i sur. HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris. *J Clin Immunol* 2009; 29:175-9.
60. Saha M, Harrman K, Mortimer NJ. Pemphigus vulgaris in White European is linked with HLA class II allele HLA-DRB1\*14:54 but not DRB1\*14:01. *J Invest Dermatol* 2010;130:311-4.
61. Andric Z. Determination of human leukocyte antigen locus polymorphism in a population of potential stem donors in Serbia. PhD disertation. School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade 2014.
62. Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas AI, Rohman SB, i sur. Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1\*05:03 in Pakistani patients. *Hum Immunol* 1997;57:110-9.
63. Moroni L, Bianchi I, Lio A. Geoepidemiology, gender and autoimmune Disease. *Autoimmun Rev* 2012;11:386-92.
64. Hubner F, Recke A, Zillikens D, Linder R, Schmidt E. Prevalence and age distribution of pemphigus and pemphigoid diseases in Germany. *J Invest Dermatol* 2016;136:2595-98.
65. Schmidt E, Kasperkiewicz M, Joly P. Pemphigus. *Lancet* 2019;394:882-94.

66. Tron F, Gilbert D, Joly P, Mouquet H, Drouot L, Ayed MB, i sur. Immunogenetics of pemphigus: an update. *Autoimmunity* 2006;39:531-9.
67. Eming R, Hennerici T, Bäcklund J, Feliciani C, Visconti KC, Willenborg S, i sur. Pathogenic IgG antibodies against desmoglein 3 in pemphigus vulgaris are regulated by HLA-DRB1\*04:02-restricted T cells. *J Immunol* 2014;193:4391-99.
68. Takahashi H, Kuwana M, Amagai M. A single helper T cell clone is sufficient to commit polyclonal naïve B cells to produce pathogenic IgG in experimental pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2009;182:1740-5.
69. Zhu H, Chen Y, Zhou Y, Wang Y, Zheng J, Pan M. Cognate Th2-B cell interaction is essential for the autoantibody production in pemphigus vulgaris. *J Immunol* 2012;32:114-123.
70. Veldman C, Stauber A, Wassmuth R, Uter W, Schuller G, Hertl M. Dichotomy of autoreactive Th1 and Th2 cell responses to desmoglein 3 in patients with pemphigus vulgaris (PV) and healthy carriers of PV-associated HLA class II alleles. *J Immunol* 2003;170:635-42.
71. Shiou-Hwa J, Tsen-Fang P, Wei-Ling T, Shwu-Huey L, Chun-Hsiang C, Chung-Yi H. HLA DRB1\*0701 and DRB1\*1401 are associated with genetic susceptibility to psoriasis vulgaris in a Taiwanese population. *Br J Dermatol* 1998;139:978-83.
72. Dere G, Yavuz IH, Yavuz GO, Bayram Y, Bilgili SG, Ozturk M. Assessment of HLA-A, HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients with pemphigus vulgaris from eastern of Turkey. *J Cosmetic Derm* 2020;00:1-6.
73. Svecova D. Pemphigus vulgaris: a clinical study of 44 cases over a 20-year period. *Int J Dermatol* 2015;54:1138-44.

74. Kneisel A, Hertl M. Autoimmune bullous skin diseases. Part 2: Diagnosis and therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011;9:844-56.
75. Cheng SW, Kobayashi M, Tanikawa A, Kinoshita-Kuroda K, Amagai M, Nishikawa T. Monitoring disease activity in pemphigus with enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant desmoglein 1 and 3. *Br J Dermatol* 2002;147:261-5.
76. Didona D, Maglie R, Eming R, Hertl M. Pemphigus: Current and future therapeutic strategies. *Front Immunol* 2019;10:1-22.
77. Giurdanella F, Diercks GF, Jonkman MF, Pas HH. Laboratory diagnosis of pemphigus: direct immunofluorescence remains the gold standard. *Br J Dermatol* 2016;175:185-6.
78. Saschenbrecker S, Karl I, Komorowski L, Probst C, Dahnrich C, Fechner K, i sur. Serological diagnosis of autoimmune bullous skin diseases. *Front Immunol* 2019;10:1-18.
79. Baykal C, Azizlerli G, Thoma-Uszynski S, Hertl M. Pemphigus vulgaris localized on the nose and cheeks. *J Am Acad Derm* 2002;47:875-80.
80. Marinović B, Bukvić-Mokos Z, Basta-Juzbašić A, Lakoš Jukić I, Lončarić D, Hashimoto T, i sur. Atypical clinical appearance of pemphigus vulgaris on the face. Case report. *Acta Dermatovenerol Croat* 2005;13:233-6.

Rođena sam 07. srpnja 1970. godine u Šibeniku, gdje sam završila osnovnu i srednju školu medicinskog usmjerenja. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala sam 1994. godine. Pripravnički staž obavila sam u KBC "Sestre milosrdnice". Godine 1997. započela sam specijalizaciju iz dermatovenerologije u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski studij iz dermatovenerologije završila sam dvije godine kasnije. Specijalistički ispit iz dermatovenerologije položila sam 2001. godine. Znanstveni magistarski rad pod naslovom "*Helicobacter pylori* i preosjetljivost na hranu u kroničnoj urtikariji" obranila sam na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2004. godine. Sudjelovala sam kao suradnica u dodiplomskoj i poslijediplomskoj nastavi Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uključujući i studij na engleskom jeziku. Od siječnja 2019. u kumulativnom sam radnom odnosu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na mjestu asistenta. Aktivno sam sudjelovala na tečajevima stalnog medicinskog usavršavanja, znanstvenim simpozijima i kongresima u Republici Hrvatskoj i inozemstvu. Autorica sam poglavlja u pet udžbenika iz dermatovenerologije. Objavila sam 6 znanstvenih radova u časopisima citiranim u CC te više od 15 znanstvenih radova u časopisima citiranim u SCI i ostalim indeksima.



## KLINIKA ZA KOŽNE I SPOLNE BOLESTI

Kliničkog bolničkog centra Zagreb i  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
**Predstojnica: Prof. dr. sc. Jasna Lipozenčić**  
Šalata 4, 10000 Zagreb, Hrvatska  
Telefon/Telefaks: 01 4920 014

E-mail: [predstojnik\\_koz@kbc-zagreb.hr](mailto:predstojnik_koz@kbc-zagreb.hr) ili [jasna.lipozencic@zg.htnet.hr](mailto:jasna.lipozencic@zg.htnet.hr)



### INFORMACIJE O PROVOĐENJU KLINIČKOG ISTRAŽIVANJA U OKVIRU PROJEKTA AUTOIMUNE BULOZNE DERMATOZE U REPUBLICI HRVATSKOJ

**Projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH: 108-000000-0105**  
**Voditeljica: Doc.dr.sc. Branka Marinović**

Poštovana/poštovani,

Pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem će se istraživati etiopatogeneza vulgarnog pemfigusa, bolesti od koje Vi bolujete.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi da li je Vaša bolest povezana s genetskim etiološkim čimbenikom.

Istraživanje će obuhvatiti klinički pregled, uzimanje uzorka kože za patohistološku analizu i direktnu imunofluorescenciju. Uzet će se venska krv (5 ml ili jedna epruveta) za indirektnu imunofluorescenciju i za ELISA metodu utvrđivanja protutijela prema desmogleinu 1 i 3, te 7 ml krvi za HLA tipizaciju.

Navedeno istraživanje za Vas ne predstavlja proširenje dijagnostičkog postupka i ne izlaže Vas nikakvom dodatnom riziku.

Uzimanje uzorka kože se vrši u lokalnoj anesteziji. Nakon zahvata ponekad se može osjetiti slaba bol te se mogu javiti manja krvarenja. Tijekom cijeljenja rane (5-7 dana) prisutna je krasta, a nakon što otpadne zaostaje diskretan ožiljak. Moguće neželjene popratne pojave obuhvaćaju nelagodu, umjerenu bol i peckanje tijekom vađenja krvi te pojava manjeg hematoma koji nestaje tijekom nekoliko dana.

Spoznaje koje će se u okviru ovog istraživanja steći mogu pomoći u boljem razumijevanju složene etiopatogeneze Vaše bolesti.

Vaše sudjelovanje je dobrovoljno, što znači da u svakom trenutku možete odustati od daljnjeg sudjelovanja u istraživanju i to bez navođenja razloga. Odustajanje od sudjelovanja u istraživanju ni na koji način neće utjecati na liječenje Vaše bolesti, odnosno odnos medicinskog osoblja.

Vaši će se osobni podaci obrađivati bez bilježenja identiteta, a istraživači će se striktno pridržavati svih etičkih procedura koje jamče zaštitu osobnih podataka i Vaše privatnosti.



**KLINIKA ZA KOŽNE I SPOLNE BOLESTI**

Kliničkog bolničkog centra Zagreb i  
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

**Predstojnica: Prof. dr. sc. Jasna Lipozenčić**

Šalata 4, 10000 Zagreb, Hrvatska

Telefon/Telefaks: 01 4920 014

E-mail: [predstojnik\\_koz@kbc-zagreb.hr](mailto:predstojnik_koz@kbc-zagreb.hr) ili [jasna.lipozencic@zg.htnet.hr](mailto:jasna.lipozencic@zg.htnet.hr)



**SUGLASNOST INFORMIRANOG BOLESNIKA/ISPITANIKA  
ZA PROVOĐENJE KLINIČKOG ISTRAŽIVANJA U OKVIRU PROJEKTA AUTIMUNE  
BULOZNE DERMATOZE U REPUBLICI HRVATSKOJ**

**Projekt Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH: 108-000000-0105**

**Voditeljica: Doc.dr.sc. Branka Marinović**

Potvrđujem da sam upoznat/a s načinom provođenja kliničkog istraživanja. Objašnjeni su mi svi postupci koje istraživanje uključuje: uzimanje krvi za indirektnu imunofluorescenciju, za ELISA metodu utvrđivanja protutijela prema desmogleinu 1 i desmogleinu 3, kao i za HLA tipizaciju; postupak uzimanja uzorka kože za direktnu imunofluorescenciju i patohistološku analizu te s koristi i mogućim komplikacijama gore navedenih dijagnostičkih postupaka.

Dana mi je mogućnost postavljanja pitanja vezanih uz ovo istraživanje.

Moja anonimnost je zajamčena, što znači da će u rezultatima studije biti prikazani samo dob i spol te rezultati navedenih pretraga. Za sve dodatne informacije o istraživanju mogu se obratiti doc. dr. sc. Branki Marinović i dr. Ines Lakoš Jukić, Šalata 4, Zagreb, na broj telefona +385 1 2368932.

Pristanak na sudjelovanje u istraživanju potvrđujem vlastoručnim potpisom.

\_\_\_\_\_  
ime i prezime bolesnika/ispitanika      vlastoručan potpis      datum

\_\_\_\_\_  
ime i prezime liječnika kojem se  
daje pristanak      vlastoručan potpis      datum