

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

VESELIN ŠKRABIĆ

**POLIMORFIZMI U GENIMA
RECEPTORA
INTERLEUKINA-1 I VITAMINA D
KAO ČIMBENICI PRIMLJIVOSTI
ZA NASTANAK
ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1**

Doktorska disertacija

Split, 2005.

Rad je izrađen u kabinetu za molekularnu biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu i na Klinici za dječje bolesti KB Split.

Voditelj rada je doc. dr. sc. Tatijana Zemunik.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorici doc.dr.sc. Tatijani Zemunik na potpori u zajedničkom znanstveno-istraživačkom radu.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Janošu Terziću na stručnoj pomoći, idejama i korisnim savjetima.

Vms. Ljiljana Repanić je zdušno pomagala u dobivanju i pripremi materijala a vms. Nerina Cvjetković i Krešo Vukušić u grafičkoj pripremi.

Hvala supruzi Romani i sinovima Marku i Roku na razumijevanju i potpori.

SADRŽAJ

	stranica	
1.0	UVOD	2
1.1	Genetska podloga šećerne bolesti tipa 1	4
1.1.1	Dodatni dokazi za genetsku podlogu šećerne bolesti tipa 1 : obiteljske i blizanačke studije	5
1.1.2	Dodatni dokaz za genetsku podlogu šećerne bolesti tipa 1 : različnost incidencije u različitim populacijama	6
1.1.3	Dodatni dokaz za genetsku podlogu šećerne bolesti tipa 1: prisustvo protutijela	7
1.1.4	Metode detekcije ili otkrivanja primljivih gena	7
1.1.4.1	Metoda određivanja povezanosti (<i>engl.</i> Linkage analysis)	8
1.1.4.2	Metoda određivanja udruženosti (<i>engl.</i> Association analysis)	8
1.1.5	Primljivi geni za šećernu bolest tipa 1	9
1.2	Čimbenici okoliša i razvoj šećerne bolesti tipa 1	9
2.0	POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA INTERLEUKIN- 1 RECEPTOR TIP 1 I GENA ZA VITAMIN D RECEPTOR S NASTANKOM ŠEĆERNE BOLESTI TIP 1	10
2.1	Receptor interleukina 1 i veza sa šećernom bolesti tipa 1	10
2.2	Receptor vitamina D i veza sa šećernom bolesti tipa 1	13
3.0	CILJ ISTRAŽIVANJA	18
4.0	ISPITANICI I METODE RADA	18
4.1	Ispitanici	18
4.2	Izdvajanje deoksiribonukleinske kiseline iz pune krvi	19
4.3	Polimerazna lančana reakcija i polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka	19
4.3.1	Polimorfni biljezi gena za za vitamin D-receptor i gena za interleukin-1 receptor tip 1	21
4.3.2	Analiza umnoženih produkata DNK	22

4.3.3	Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata gena za za vitamin D-receptor i gena za interleukin-1 receptor tip 1	23
4.4	Statistička analiza podataka	25
5.0	POŠTOVANJE ETIKE	26
6.0	REZULTATI RADA	27
6.1	Rezultati analize četiriju polimorfnih biljega gena za vitamin D receptor	27
6.2	Rezultati analize triju polimorfnih biljega gena za interleukin-1 receptor tip 1	34
6.3	Analiza po spolu i dobnim skupinama	39
7.0	RASPRAVA	43
8.0	ZAKLJUČAK	53
9.0	SAŽETAK	55
9.0	SUMMARY	57
10.0	LITERATURA	58
11.0	ŽIVOTOPIS	65

1.0 UVOD

Dijabetes melitus tip 1 ili šećerna bolest tip 1 (T1ŠB) je složena, poligenetska, autoagresivna bolest koju uzrokuje više različitih čimbenika (1). Prije se je smatrala bolešću od koje isključivo obolijevaju djeca, adolescenti i mlađe odrasle osobe, pa su je nazivali i mladenački (engl. *juvenile*) dijabetes. Novija saznanja upućuju da bolest može nastati u bilo kojoj životnoj dobi. Smatra se da 5 do 30 % odraslih pacijenata s početnom dijagnozom šećerne bolesti tipa 2 (T2ŠB) ima prikriveni, autoimunski T1ŠB (engl. *latent autoimmune diabetes of adults*, LADA) (2-5).

Najvažnija obilježja triju tipova šećerne bolesti navedena su u Tablici 1.

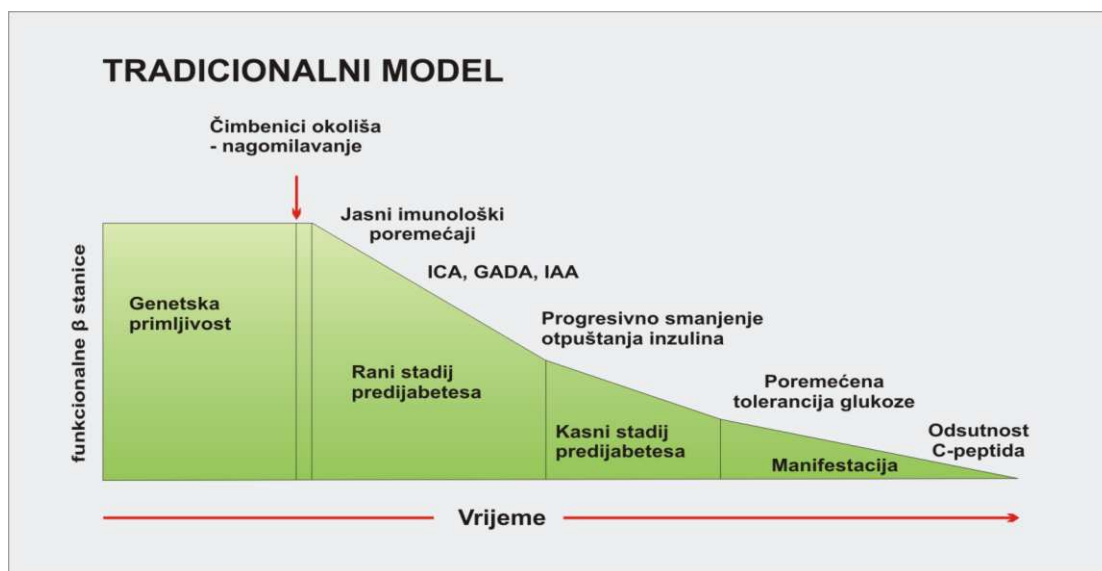
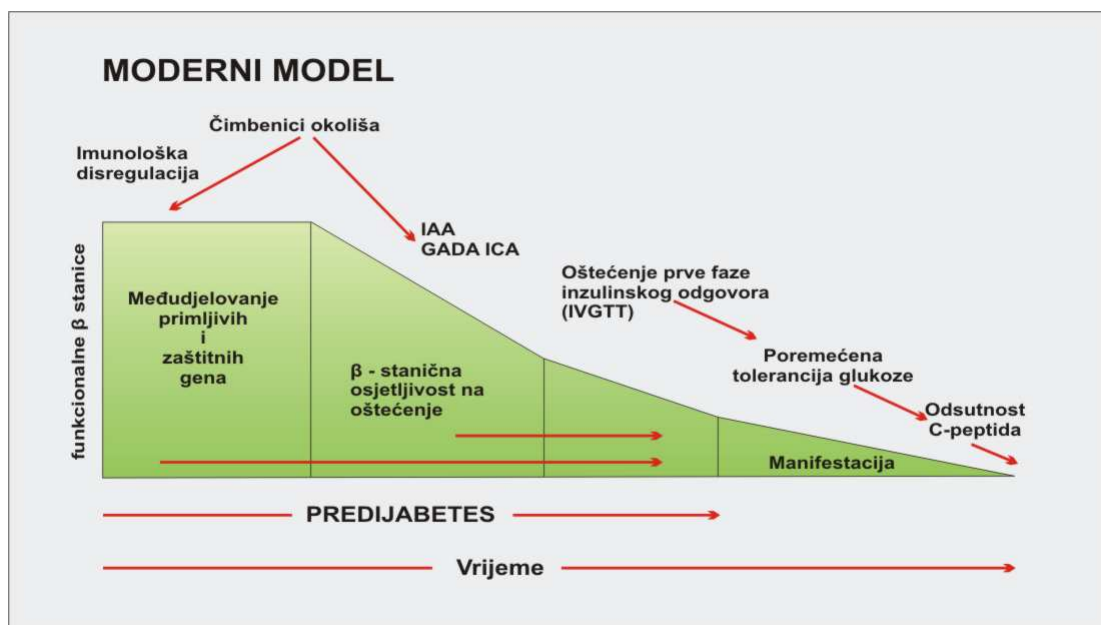
Tablica 1. Glavna obilježja T2ŠB, LADA i T1ŠB (4).

	T2ŠB	LADA	T1ŠB
DOB JAVLJANJA (godina)			
od - do	30-90	35-70	0-35
izrazito	>40	35-50	<20
postotak šećernih bolesnika	70-80%	10-20%	10%
prisutnost protutijela	ne	da (35%)	da (64%)
veza s HLA*	ne	da	da
povećani rizik za autoimunosne bolesti	ne	da	da
vrijeme u godinama do inzulinske terapije	8 (6-10)	4 (2-6)	0
funkcija beta stanica u vrijeme dijagnoze	povećana ili normalna	normalna ili smanjena	smanjena ili odsutna
otpornost na inzulin	izrazito povećana	povećana	ne
prevalencija komplikacija			
1. makrovaskularne	vrlo visoka	visoka	niska
2. mikrovaskularne	relativno niska	relativno visoka	visoka
prevalencija metaboličkog sindroma	vrlo visoka	manje učestala	nije prisutna

* HLA (engl. *human leukocyte antigen complex*, HLA): sustav antigena tkivne podudarnosti

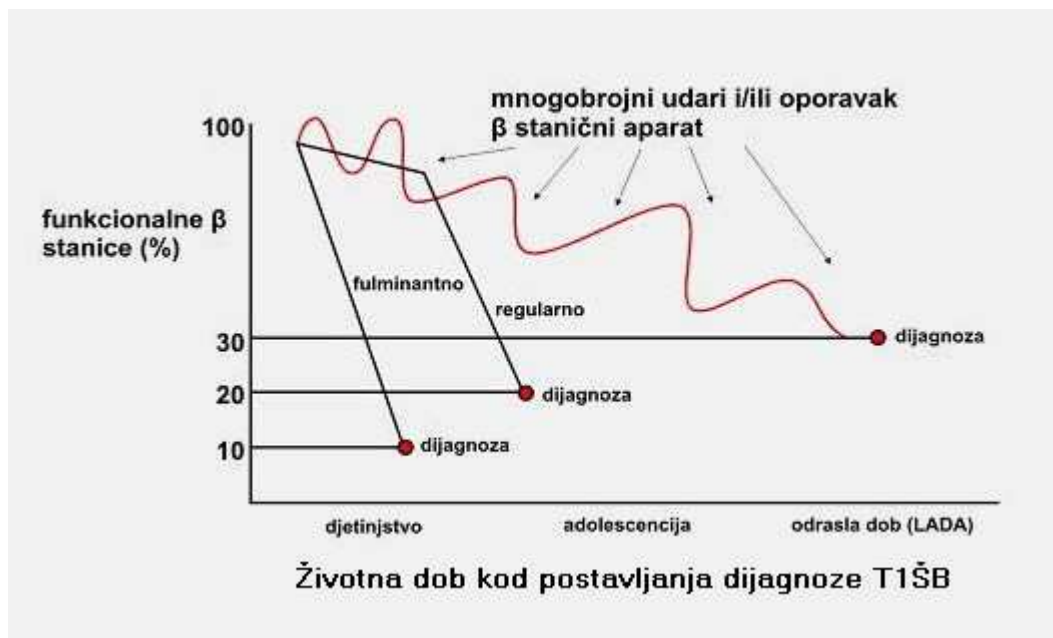
Moderni model tumačenja nastanka T1ŠB uvažava najnovija saznanja o poremećenoj imunskoj regulaciji, o poremećaju rada beta stanica gušterače i međudjelovanju primljivih i zaštitnih gena u kombinaciji s djelovanjem čimbenika

okoliša (Slika 1). Taj je model u suprotnosti s tradicionalnim modelom koji je naglašavao ulogu čimbenika okoliša u započinjanju uništavanja beta stanica. Moderni model tvrdi da čimbenici okoliša djeluju različitom snagom i u različito vrijeme dugog patogenetskog puta nastanka T1ŠB kao tzv. usklađivači (Slika 1) (2).



Slika 1. Moderni i tradicionalni model nastanka T1ŠB (2). ICA - protutijela na antigen citoplazme stanica Langerhansovih otočića, GADA - protutijela na membranski protein beta stanica, IAA - protutijela na endogeni inzulin, IVGTT – intravenski test tolerancije glukoze

Pojavi T1ŠB prethodi dugotrajni, prikriveni proces samorazaranja beta stanica, tzv. predijabetes. Nakon uništenja 70 do 90% beta stanica dolazi do simptoma T1ŠB (Slika 2) (1,2).



Slika 2. Propadanje beta stanica u odnosu na dob pojave T1ŠB (5)

Važnu ulogu u razvoju T1ŠB imaju T-stanice i povećana proizvodnja citokina koji uzrokuju apoptozu (6-8). Kod oboljelih, kao i kod osoba u stadiju predijabetesa, prisutna je infiltracija stanica gušterače limfocitima T (CD8+ i CD4+), limfocitima B i makrofagima, tzv. insulitis. Vjerojatni mehanizam uništavanja beta stanica jest citotoksičnost pokrenuta limfocitima CD8+ preko Fasa i apoptogenoga pobudnog Fas liganda (FasL). Fas (CD95/Apo-1) po svojoj građi pripada receptorskoj obitelji čimbenika nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, *TNF*) i neuronskog čimbenika rasta. Fas ligand se nalazi u mononuklearnim stanicama, ponajprije u pobuđenim limfocitima T. Fas i Fas-L su imunohistokemijski dokazani u beta stanicama osoba s insulitisom, ali ne i u onih bez insulitisa. Vjerojatni mehanizam samorazaranja je upalnim citokinima potaknut izražaj Fasa kod beta stanica gušterače, dok mononuklearne stanice izlažu FasL. Spajanje Fas/Fas-L potiče apoptozu beta stanica gušterače, dovodeći do autoagresivnog T1ŠB (8).

1.1 Genetska podloga šećerne bolesti tipa 1

Populacijske, obiteljske i blizanačke studije navode na zaključak po kojemu je većina oboljelih (vjerojatno svi) genetski primljiva za nastanak bolesti. Glavno mjesto primljivosti nalazi se u blizini centromere šestog kromosoma, u regiji koja kodira glavni sustav antigena tkivne podudarnosti (engl. *human leukocyte antigen complex*, HLA). Najznačajniji su geni HLA skupine II koji pridonose oko 44 % primljivosti za T1ŠB. Kako HLA antigeni skupine II sudjeluju u predočavanju antigena limfocitima T, što može biti važno u autoimunskim bolestima, logična je i njihova uloga u nastanku T1ŠB (9,10).

Oznaka gena HLA sastoji se od mjesta, iza kojeg slijedi identifikacijski broj alela, zvjezdicom odvojen od oznake mjesta. U nazivlju gena skupine II, uz oznaku mjesta dodaje se i oznaka gena za polimorfni lanac: A za alfa lanac, a B za beta lanac (npr. DQA1*0101 i DQB1*0501). Regija HLA razreda II ima tri podskupine (DQ, DP i DR), a njihovi proteinski produkti prisutni su na površini stanica koje predočavaju antigen. Utvrđeno je da alel DQA1 koji na 52-aminokiselinskom mjestu kodira arginin (tzv. Arg52-plus aleli) i DQB1 alel, koji na 57-aminokiselinskom mjestu ne kodira asparagin (tzv. Asp57-minus aleli), znatno povećavaju rizik pojave T1ŠB te se smatraju primljivim genima (Tablica 2). Osobe homozigotne za alele DQA1 (Arg52-plus) i DQB1 (Asp57-minus) imaju najveći relativni rizik za pojavu T1ŠB. Nazočnost arginina na mjestu 52 DQA1 i odsutnost aspartata na mjestu 57 DQB1 lanca dopušta autoantigenu smještanje u predočnu molekulu (u tzv. Borkmanov kanal), nakon čega slijedi prepoznavanje autoantigena i pobuda limfocita T (11). Nadalje, uočeno je da do 90 % oboljelih od T1ŠB imaju HLA-DR3 ili –DR4 ili DQB*0201 ili *0302 (tzv. T1ŠB potencijalno primljivi lokus broj 1).

Osim primljivih, postoje i zaštitni aleli HLA. Tako dvadeset posto ljudi bijele rase u Europi i Americi ima zaštitni haplotip HLA-DR2 (DQB1*0602), dok je manje od 1 % djece s T1ŠB pozitivno na taj genski biljeg. Stoga izgleda da je nastanak T1ŠB uvjetovan poremećajem ravnoteže učinaka zaštitnih i primljivih gena (2,9,12).

Ispitanici s LADA tipom šećerne bolesti imaju nešto nižu učestalost rizičnih HLA genotipova i drugih primljivih gena, ili možda snažnije zaštitne gene koji odgađaju i usporavaju pojavu bolesti (2,4,5).

Tablica 2. Rizik za nastanak T1ŠB i prisutnost haplotipova HLA-DR i HLA-DQ (2).

Brojevi označavaju alele koji se povezuju s nastankom T1ŠB

RIZIK	HLA		
	HLA DRB1	HLA DQA1	HLA DQB1
Visoki	0401,0402, 0405,0301	0301 0501	0302 0201
umjeren	0801 0101 0901	0401 0101 0301	0402 0501 0303
slab ili umjeren	0401 0403 0701 1101	0301 0301 0201 0501	0301 0302 0201 0301
zaštita	1501 1401 0701	0102 0101 0201	0602 0503 0303

1.1.1 Dodatni dokazi za genetsku podlogu šećerne bolesti tipa 1: obiteljske i blizanačke studije

Učestalost T1ŠB je 15 puta veća u bliskih srodnika oboljelih, nego u općoj populaciji. Naime, učestalost T1ŠB u bliskih srodnika šećernih bolesnika u dobi do 30 godina iznosi 6 %, dok je učestalost u općoj populaciji oko 0,4 % (9,13). Djeca oboljelih od T1ŠB imaju učestalost obolijevanja od oko 3–6 %. Zanimljivo je da ako majka boluje od T1ŠB, rizik obolijevanja djeteta do njegove 20. godine života je 1 do 3 puta manji nego u slučaju bolesti oca (9,13). Dva su objašnjenja: prvo - šećernoj bolesti skloni fetusi oboljelih majki češće se spontano pobace, drugo - primljivi geni su slabijeg učinka kada se nasljeđuju od majke, nego kada se nasljeđuju od oca (9,14).

Stopa podudaranja bolesti u jednojajčanih-monozigotnih (MZ) blizanaca, koji imaju istovjetan nasljedni materijal, veća je nego u dvojajčanih-dizigotnih (DZ) blizanaca. U dobi do 30 godina je stopa podudaranja bolesti u MZ blizanaca 34 %, unutar 12 godina od pojave bolesti kod jednog blizanca je 43 %, a unutar 40 godina je

50 % (9,13). Iako su MZ blizanci genetski istovjetni te su izloženi učinku istih čimbenika okoliša u prenatalnom periodu, vjeruje se da različiti negenetski čimbenici (virusne upale, prehrana, otrovi, cijepljenje) kojima su izloženi kasnije u životu pridonose nastanku T1ŠB (15-22).

Smatralo se da je dob nastanka bolesti određena različitim genima, ali najnovije studije ističu ulogu čimbenika okoliša koji se mogu vezati uz dob (23-25). U oboljelih MZ blizanaca povezanost životne dobi i nastanka T1ŠB je veća nego u oboljelih u bliskom srodstvu (23).

1.1.2 Dodatni dokazi za genetsku podlogu šećerne bolesti tipa 1: različitost incidencije u različitim populacijama

Zapažene su velike razlike u prevalenciji i incidenciji T1ŠB u različitim dijelovima svijeta. Vjeruje se da različiti genetski čimbenici, kao i čimbenici okoliša kojima su izložene različite populacije, uvjetuju razlike među rasama i narodima. T1ŠB je učestaliji u europskim i američkim državama u odnosu na Aziju i Afriku, a razlika u incidenciji iznosi gotovo 400 puta između 100 analiziranih populacija (25). Najveća incidencija bolesti u životnoj dobi do 14 godina uočena je u Finskoj – 36 na 100.000 ispitanika iste životne dobi. U Hrvatskoj incidencija iznosi 8, a u Zunyi, regiji u Kini, samo 0,1 (25,26).

Iz godine u godinu povećava se incidencija T1ŠB, a razlozi za takvo povećanje su nejasni. Studija provedena u 44 europske zemlje i Izraelu pokazala je da je povećanje incidencije u nekim tranzicijskim zemljama istočne i centralne Europe brže nego u ostalim europskim zemljama, a bolest se sve češće javlja u mlađoj životnoj dobi (27). Tijekom posljednjih 15 godina je u dobi do 4 godine incidencija porasla za 6,3 %, u dobi od 5 do 9 godina za 3,1 %, dok je u dobi od 10 do 14 godina porasla za 2,4 % (28). Na osnovi različitih modela izračunato je da će 2010. godine incidencija T1ŠB biti 40 % veća u odnosu na 1997. godinu.

Polarno-ekvatorijalni ili sjeverno-južni geografski položaj nema tako snažan učinak na incidenciju T1ŠB kao što se vjerovalo. Većina populacija s visokom incidencijom bolesti su europskog porijekla, ali je visoka incidencija uočena i u nekim drugim populacijama, kao što su Portoriko i Kuvajt. Dvije zemlje s najvišom incidencijom su Finska i Sardinija, a udaljene su oko 3000 km jedna od druge, dok Estonija ima tek jednu četvrtinu incidencije T1ŠB svog prvog susjeda Finske (29-31).

1.1.3 Dodatni dokazi za genetsku podlogu šećerne bolesti tipa 1: protutijela

Manifestaciji bolesti prethodi dugotrajni, prikriveni proces razaranja beta stanica gušterače – tzv. predijabetes. Tijekom tog razdoblja mononuklearne stanice (primarno limfociti T) ulaze u otočiće beta stanica te potiču njihovo razaranje. Osim staničnih elemenata, i humoralni dio imunološkog sustava ima ulogu u nastanku T1ŠB. Dokazana su različita protutijela kao što su: protutijela na još nepoznati antigen citoplazme stanica Langerhansovih otočića (ICA), protutijela na endogeni inzulin (IAA), protutijela usmjeren na membranski protein beta stanica (GADA), te protutijela na protein tirozin fosfatazu (IA-2). Spomenuta protutijela se često pojavljuju u krvi novooboljelih te u osoba u fazi predijabetesa (32-35). Nejasno je jesu li protutijela nastala kao posljedica uništavanja beta stanica i izlaganja do tada nepoznatim antigenima ili su imala početnu ulogu u razaranju stanica (36). S obzirom na pojavu protutijela u kasnoj dojenačkoj i ranoj dječjoj dobi, moguće je da autoagresivni proces posredovan protutijelima počinje vrlo rano (37-39). Kako su protutijela tzv. biljezi predijabetesa, važno je znati jesu li znak prisutnosti genetske primljivosti ili možda nastaju kao posljedica djelovanja negenetskih T1ŠB čimbenika (npr. virusa). U općoj je populaciji učestalost pojedinačne pojave ICA, IAA, GADA, IA-2 protutijela od 2 do 4 %, u braće i sestara oboljelih 6 do 11 %, u DZ blizanaca od 39 %, a u MZ blizanaca do 50 % (40-43). Navedeno podupire tvrdnju o sudjelovanju genetskih (različitost učestalosti pojavljivanja protutijela u MZ i DZ blizanaca), ali i negenetskih čimbenika (različitost učestalosti pojavljivanja protutijela u DZ blizanaca i najbližih srodnika oboljelih) u nastanku T1ŠB. Treba istaknuti kako samo prisutnost više različitih protutijela u visokom titru i u ispitanika iz rizične skupine (srodnici oboljelih), i u onih u općoj populaciji, donosi izgledan rizik za razvoj T1ŠB (44,45). Može se pretpostaviti da primljivi geni povećavaju sklonost nastanku T1ŠB djelujući na ranu fazu beta stanične autoagresivnosti, a ako su i virusi uključeni u početak autoagresivnosti, onda genetske različitosti u imunom odazivu prema virusima mogu djelovati na primljivost za T1ŠB.

1.1.4 Metode detekcije ili otkrivanja primljivih gena

Postoje dvije različite, ali nadopunjujuće metode.

1.1.4.1 Metoda određivanja povezanosti (engl. *Linkage analysis*)

Metoda određivanja vjerojatnosti povezanosti između bolesti i određenoga genskog lokusa unutar obitelji s dvoje i više oboljele djece. Testira se zajedničko nasljeđivanje određenog lokusa (gena) i pojava bolesti. Njihovo zajedničko nasljeđivanje upućuje na moguću uzročno-posljedičnu povezanost. Za ovu analizu istraživač treba pretpostaviti obrazac nasljeđivanja lokusa, prodiranje svakog genotipa i učestalost alela, i tada spomenuta metoda postaje najснаžnija metoda za lokalizaciju gena bolesti. Pošto su mnoge odrednice često nepoznate, za multigenске bolesti se koristi tzv. model neovisne metode, kojim se procjenjuje prosječna proporcija alela na označenom lokusu u dvoje oboljelih u bliskom srodstvu (braća i sestre). Ako pretraženi sumnjivi lokus ima udjela više od 50 %, znači da pokazuje primljivost za bolest (46,47).

1.1.4.2 Metoda određivanja udruženosti (engl. *Association analysis*)

Metoda uspoređivanja genotipske učestalosti ili označenih alela između nesrodnih oboljelih ispitanika i nesrodnih zdravih ispitanika usporedne skupine. Koristi se u populacijskim i obiteljskim studijama. Ako se uoči neravnomjerna raspodjela testiranog alela između skupina oboljelih i zdravih ispitanika, onda to upućuje na povezanost gena i bolesti, tj. vjerojatno znači funkcijsku ulogu testiranog alela u nastanku bolesti. Neravnomjernost razdiobe alela procjenjuje se s obzirom na razdiobu koja bi bila slučajna (tj. prema Hardy-Weinbergovom zakonu). Tako se otkrila primljivost HLA-DRB1, DQB1*0302, DQA1 genotipa (tzv. T1ŠB primljivi lokus broj 1) te zaštitnost HLA-DR2, DRB1*1501, DQB1*0602 genotipa (48,49).

S obzirom na problem etničke različitosti ispitivanih populacija, razvijena je metoda nazvana AFBAC (engl. *Affected-Family-Based Controls-AFBAC*), kojom se uspoređuje učestalost prenesenih i neprenesenih alela s roditelja na bolesno dijete (50). Drugi, obiteljski temeljen, asocijacijski test je TDT (engl. *Transmission Disequilibrium Test-TDT*), kojim se pronađena učestalost prijenosa alela s heterozigotnih roditelja na oboljelo dijete uspoređuje s 50 % očekivanom slučajnošću (51).

Asocijacijske analize su primjenjivije od linkage analiza u pronalaženju gena slabog ili umjerenog učinka na nastanak bolesti (9).

1.1.5 Primljivi geni za šećernu bolest tipa 1

Do sada je pronađeno više od 20 potencijalno primljivih gena (Tablica 3).

Tablica 3. Potencijalno primljivi genski lokusi za T1ŠB (2). Označene su kromosomske regije i ime lokusa

LOKUS	REGIJA	BILJEG
T1ŠB 1	6p21.3	<i>HLA-DRB1, DQB1, DQA1</i>
T1ŠB 2	11p15	<i>INS VNTR</i>
T1ŠB 3	15q26	D15S107
T1ŠB 4	11q13	<i>FGF3, D11S1337</i>
T1ŠB 5	6q25	<i>ESR</i>
T1ŠB 6	18q21	<i>JK, D18S487</i>
T1ŠB 7	2q31	<i>HOXD8, D2S152</i>
T1ŠB 8	6q27	D6S264, D6S446
T1ŠB 9	3q21-q25	D3S1576
T1ŠB 10	10p11-q11	D10S193
T1ŠB 11	14q24.3-q31	D14S67
T1ŠB 12	2q33	<i>CTLA4</i>
T1ŠB 13	2q35	D2S164
T1ŠB 14	-	-
T1ŠB 15	6q21	D6S283
T1ŠB 16	14q32.3	D14S542, <i>IGH</i>
T1ŠB 17	10q25	D10S554
T1ŠB 18	5q33-q34	<i>IL12B</i>
T1ŠB neoznačen	1q42	D1S1617
T1ŠB neoznačen	16q22-q24	D16S3098
T1ŠB neoznačen	19p13	D19S247
T1ŠB neoznačen	19q13	D19S225
T1ŠB neoznačen	Xp13-p11	DXS1068
T1ŠB neoznačen	7p13	<i>GCK</i>
T1ŠB neoznačen	12q14-q15	<i>IFNG</i>

1.2 Čimbenici okoliša i razvoj šećerne bolesti tipa 1

Prema dosadašnjim istraživanjima, rizični čimbenici okoliša za razvoj T1ŠB svrstavaju se u tri grupe: a) virusne upale (posebno s citomegalo virusima i coxackiae

virusima); b) način prehrane u dojenačkoj dobi (dojenje u odnosu prema ranom uvođenju kravljeg mlijeka) i; c) otrovi (npr. N-nitritni derivati). Opisuju se i drugi rizični negenetski čimbenici, kao što su: program cijepljenja, psihološki stres i klimatski učinci. Treba naglasiti da postoji više studija u kojima nije dokazana povezanost bolesti s nekim gore navedenim čimbenicima poput dojenja i prehrane kravljim mlijekom, programom cijepljenja te enterovirusnim upalama (15-22).

Teško je odrediti čimbenike okoliša koji imaju najsnažniji učinak na razvoj bolesti, a zbog teškoća u prepoznavanju i izračunavanju dužine trajanja i jačine njihovih učinaka u prvim godinama života, posebno stoga jer čimbenici okoliša djeluju neistodobno i mnogostruko (20-22).

2.0 POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA INTERLEUKIN-1 RECEPTOR TIP 1 I GENA ZA VITAMIN D RECEPTOR S NASTANKOM ŠEĆERNE BOLESTI TIPA 1

Dva su načina pristupa u proučavanju povezanosti polimorfizma određenih gena i nastanka T1ŠB. Populacijske studije uspoređuju polimorfizam između oboljelih i zdravih ispitanika te obiteljske studije u kojima se želi pokazati način nasljeđivanja gena koji se povezuju s nastankom bolesti.

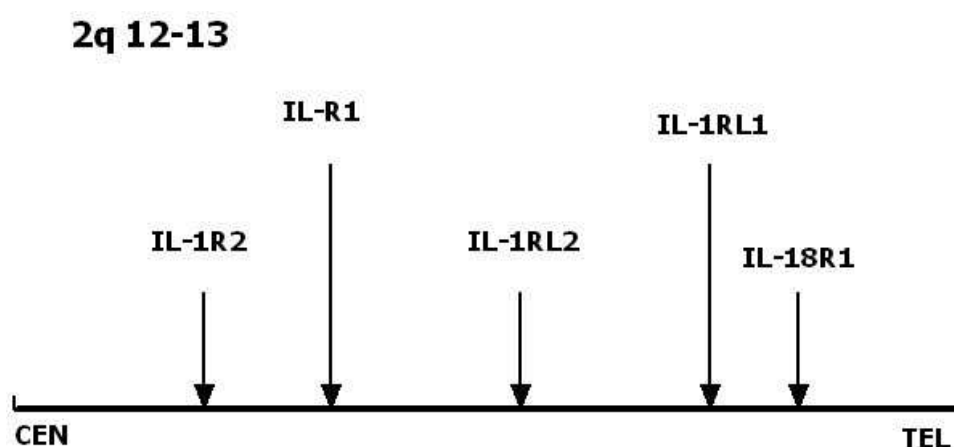
Gen za tip 1 receptor interleukina-1 (IL-1R1) i gen za receptor vitamina D (VDR) su izgleda uključeni u razvoj i nastanak T1ŠB (52-67).

2.1 Receptor interleukina-1 i veza sa šećernom bolesti tipa 1

Interleukin-1 (IL-1) je citokin koji nastaje nakon pobude makrofaga i ima višestruku ulogu u fiziološkim i patološkim procesima (66). Ubraja se u važne posrednike upalnih bolesti i autoagresivnih endokrinih bolesti kao što je T1ŠB (67-68). IL-1 je citotoksičan za beta stanice gušterače sudjelujući u Fas/FasL pokrenutoj beta staničnoj apoptozi, što dovodi do smanjenja stvaranja inzulina (8). Polimorfizam samog gena za IL-1 nije pokazao povezanost s nastankom T1ŠB (69).

Dva oblika IL-1, tzv. interleukin-1 alfa (IL-1 α) i interleukin-1 beta (IL-1 β), zajedno sa strukturno povezanim antagonistom, interleukin-1 receptor antagonistom

(IL-1ra) su različiti genski produkti, ali se vežu na zajednički membranski receptor, interleukin-1 receptor (IL-1R). IL-1R1 je prijenosnik signala za IL-1. Receptor je pronađen na mnogim stanicama, uključujući i T limfocite i beta stanice (70). Regulacija izražaja IL-1R1 gena ima glavnu ulogu u kontroliranju učinka IL-1 na stanice (52). Nejasno je jesu li pojedinačne razlike u IL-1R1 izražaju povezane s različitostima unutar regulatornog područja gena. Pokazalo se da su beta stanice gušterače jako osjetljive na IL-1 pa trebaju neočekivano visoku koncentraciju IL-1ra da bi spriječile IL-1 pokrenute promjene funkcijske stanične aktivnosti (67). Gen za IL-1R1 se nalazi u skupini IL-1R gena na kromosomu 2 (slika 3).



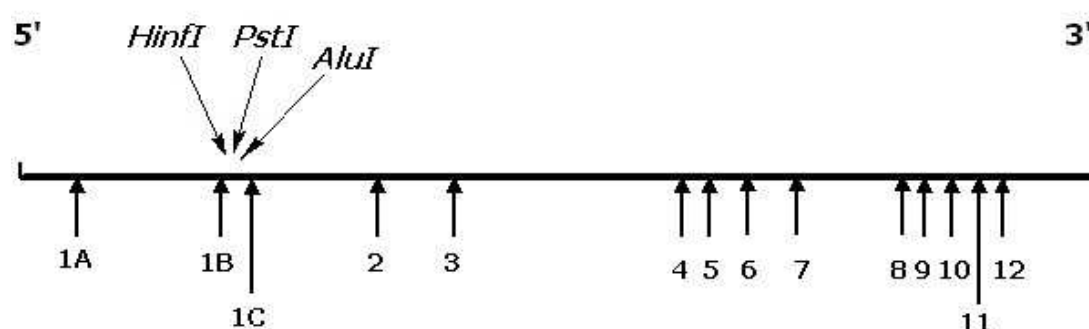
Slika 3. Shema ustroja skupine (engl. cluster) ljudskog gena interleukin-1 receptora (IL-1R) na kromosomu 2q12-13. CEN-centromera; TEL-telomera; gen za IL-1R2 (tip 2 receptor interleukina-1); gen za IL-1R1 (tip 1 receptor interleukina-1); gen za IL-1RL2 (interleukin-1 receptoru pridruženi protein 2); gen za IL-1RL1 (interleukin-1 receptoru pridruženi protein 1); gen za IL-18R1 (interleukin-18 receptor 1) (54)

Gen za IL-1R1 dug je 74 kb, ima tri različita promotora i dvanaest egzona. Tri različite glasničke ribonukleinske kiseline (engl. messenger ribonucleic acid, mRNA) 5' kraja kodirane su egzonima 1A, 1B, 1C. Na 3' kraju je slijed koji određuje izrezivanje mRNA. Egzon 2 kodira 5' neprepisujuće područje. Uputa za sintezu signalnog peptida nalazi se u egzonu 3. Izvanstanični dio receptorskog proteina kodiran je egzonima 4 – 9. Transmembransko područje receptora je kodirano egzonom 10. Dio citoplazmatskoga receptorskog proteina je kodiran egzonima 11 – 12.

Do sada je ispitivano više polimorfizama gena za IL-1R1 unutar egzona 1B i unutar područja koje razgraničava egzone 1B i 1C (52-4). U našoj studiji ispitivana su tri polimorfizma smještena unutar područja koje razgraničava egzone 1B i 1C: *HinfI* G→A i *PstI* G→A u uzvodnom dijelu introna, te *AluI* T→C u nizvodnom dijelu introna (54) (slika 4).

HinfI, *PstI*, *AluI* polimorfizmi nemaju za sada poznat izravni funkcijski učinak.

IL-1R1



Slika 4. Shema ustroja ljudskog gena za interleukin-1 receptor tip 1 (IL-1R1). Egzoni su označeni brojevima. Pozicija restrikcijskih mjesta *HinfI*, *PstI*, *AluI* smještena je između egzona 1B i 1C (52-54)

Saznanja o utjecaju IL-1R1 na primljivost za T1ŠB su sporna. U pokusima na životinjama je primjena topivog IL-1R1 u tzv. NOD (engl. *non-obese diabetic*) miševa spriječila pojavu eksperimentalnog T1ŠB (71). U populacijskim studijama u Danskoj i Velikoj Britaniji uočena je povezanost polimorfizma gena za IL-1R1 i T1ŠB, što kasnije nije potvrđeno u obiteljskim studijama (52-54).

Analiza do sada objavljenih rezultata polimorfizma gena za IL-1R1 i T1ŠB: **Bergholdt i sur.** pokazali su povezanost polimorfnog biljega *PstI* s nastankom T1ŠB. Polimorfizam je rezultat zamjene baze citozina s timinom u egzonu 1B gena za tip 1 receptor interleukina-1 (52).

Metcalf i sur. napravili su populacijsku studiju u tri etnički vrlo različite skupine s različitom incidencijom T1ŠB. U ispitanika iz Velike Britanije pronašli su povezanost polimorfnog biljega *PstI* smještenog u egzonu 1B gena za IL-1R1 i nastanka T1ŠB, u ispitanika iz Finske potvrđena je povezanost samo kod oboljelih od T1ŠB koji nemaju

visoko rizične haplotipove HLA-DR3 I DR4, a u ispitanika iz južne Indije nije uočena povezanost (53).

Bergholdt i sur. u svojoj drugoj studiji pokazali su značajnu vezu polimorfnog biljega *HinfI* unutar područja koje razgraničava egzone 1B i 1C i nastanka T1ŠB. Grupa oboljelih imala je veću koncentraciju IL-1R1, ali rezultat nije bio značajan. Homozigoti s prisutnim restrikcijskim mjestom za endonukleazu *HinfI* imali su više koncentracije IL-1R1, a isti genotip bio je češći u oboljelih (54).

Tablica 4. Sažetak do sada objavljenih rezultata polimorfizama gena za tip 1 receptor interleukina-1 i T1ŠB

Autori	Tip studije	Populacija	Ispitanici		Rezultati
			Oboljeli	Usporedba	
Bergholdt i sur.	Kombinirana	Danske	162+165	189	Povezanost polimorfnog biljega <i>PstI</i> egzona 1B i T1ŠB
Metcalf i sur.	Populacijska	Velike Britanije	117	62	Povezanost polimorfnog biljega <i>PstI</i> egzona 1B i T1ŠB
		Finske	153	96	Povezanost polimorfnog biljega <i>PstI</i> egzona 1B i T1ŠB
		Indije	81	96	Nije uočena povezanost
Bergholdt i sur.	Obiteljska	Danske	103+150	112+138	Povezanost polimorfnog biljega <i>HinfI</i> introna 1A i T1ŠB

2.2 Receptor vitamina D i veza sa šećernom bolesti tipa 1

Nekoliko je dokaza povezanosti vitamina D, VDR i T1ŠB.

In vitro pokusima, u beta stanicama rahitičnih životinja pokazan je poremećaj stvaranja i izlučivanja inzulina. Nakon terapije s najaktivnim oblikom vitamina D kalcitriolom, funkcija beta stanica se potpuno vratila u normalne okvire (72-74). U NOD miševa s nedostatkom vitamina D uočio se raniji i agresivniji početak bolesti i

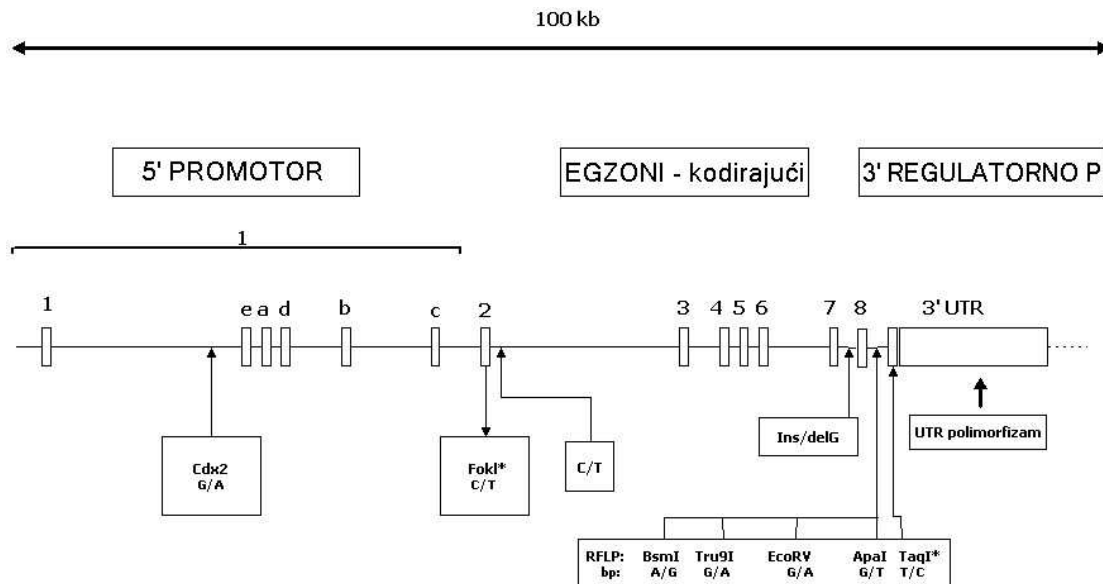
veća incidencija T1ŠB, a pokazano je da visoke doze kalcitriola sprječavaju nastanak bolesti, posebno ako se liječenje započne u ranoj životnoj dobi (75).

Djeca koja primaju dopune vitamina D kao profilaksu protiv nastanka rahitisa, imaju nižu incidenciju T1ŠB (76,77). Nadalje, davanje vitamina D trudnicama snizuje incidenciju T1ŠB u potomstva (78).

Kalcitriol potiče stvaranje i izlučivanje inzulina, djeluju imunosupresivno sprječavajući pobudu T-limfocita te štiteći beta stanicu od oštećenja upalnim citokinima. Kalcitriol regulira diferencijaciju i sazrijevanje dendritičnih stanica koje su važne u indukciji T-stanično posredovanoga imunološkog odaziva (72,79-84).

Receptor za vitamin D (VDR) je unutarstanični receptor i ujedno transkripcijski čimbenik. Vezivanjem kalcitriola receptori se pobude, vežu na specifične genske pobuđivače te potiču izražaj gena koji sadržavaju takve pobuđivače. VDR je pronađen u više tkiva, uključujući beta stanice gušterače, monocite, dendritične stanice i pobuđene T-limfocite. Gen za VDR nalazi se na kromosomu 12q12-q14, sadrži osam kodirajućih egzona (egzoni 2-9), promotorsko i regulacijsko područje te pripadajuće introne. Promotorsko područje regulira stvaranje mRNA, regulacijsko područje je uključeno u stabilnost/degradaciju mRNA, a njihovo međudjelovanje na raspoloživost mRNA za translaciju u VDR bjelančevinu (85-87).

Do sada je opisano više polimorfizama, a najčešće su ispitivana četiri: *FokI* T→C, *BsmI* A→G, *ApaI* G→T i *TaqI* C→T. *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* polimorfizmi nemaju za sada poznat izravni funkcijski učinak. *FokI* polimorfizam se naziva potencijalno funkcijskim jer se pokazalo da je "F" alel transkripcijski aktivniji u odnosu na "f" oblik. (85,87) (slika 5).



Slika 5. Shema ustroja ljudskog gena za vitamin D-receptor. Egzoni su označeni brojevima. Pozicija restriksijskih mjesta pokazana je strelicama. * su označeni polimorfizmi u egzonima. P.= područje (87)

Posljednjih godina u nekoliko populacijskih i obiteljskih studija, u Velikoj Britaniji (u Indijaca), Njemačkoj, Tajvanu, Japanu, Rumunjskoj, Mađarskoj te u Dalmaciji, utvrđena je veza između gena za VDR i T1ŠB (55-64). Jedna studija opisuje povezanost polimorfizma gena za i T2ŠB (88).

Analiza do sada objavljenih rezultata polimorfizma gena za VDR:

McDermott i sur. u obiteljskoj studiji indijskih Azijata opisali su povezanost triju polimorfizma gena za VDR i nastanka T1ŠB. Pokazali su da se aleli "b" polimorfnog biljega *BsmI* u prvom redu prenosi na oboljele potomke. Analizirajući dva alela, značajnost u prijenosu je pokazao haplotip "bT" polimorfni biljega *BsmI* i *TaqI*, dok je analiza triju alela, uključujući polimorfni biljeg *ApaI*, pokazala značajnost u prijenosu haplotipa "bAT" (55).

Pani i sur. u obiteljskoj studiji u Njemačkoj analizirali su četiri polimorfna biljega *FokI*, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* gena za VDR i njihovu povezanost s T1ŠB. Pokazali su da se haplotip "BAT" prenosi na potomstvo s učestalošću od 64 %. Kombinacija alela "At" i "Bt" pokazala je primljivost za T1ŠB. Nije uočena povezanost u nastanku T1ŠB s polimorfni biljegom *FokI* (56).

Chang i sur. pokazali su da je učestalost alela polimorfnog biljega *BsmI* gena za VDR pokazala razliku između oboljelih i usporednih ispitanika, pokazujući četiri puta učestaliji genotip "BB" među oboljelima (57).

Ban i sur. analizirali su polimorfne biljege *BsmI* i *FokI* gena za VDR. Pokazali su da je genotip homozigota s prisutnim restrikcijskim mjestom za restrikcijsku endonukleazu *FokI* značajno učestaliji među oboljelima od T1ŠB s pozitivnim GADA (58).

Guja i sur. ispitali su povezanost polimorfnih biljega *FokI*, *ApaI*, *TaqI* gena za VDR i nastanka T1ŠB. Transmisija alela "F" s roditelja na oboljelu djecu, kao i prijenos alela "T" s roditelja na zdravu djecu bila je učestalija, ali nije dosegla prag statističke značajnosti (59).

Fassbender i sur. u populacijskoj studiji u Njemačkoj ispitali su povezanost polimorfnih biljega *BsmI*, *TaqI* i *FokI* gena za VDR i nastanak T1ŠB. Pokazali su povezanost genotipa "TT" s nastankom T1ŠB. Uočili su da su homozigotne osobe za prisutnost reznog mjesta za restrikcijsku endonukleazu *FokI* (genotip "ff") ranije manifestirali bolest u odnosu na oboljele heterozigote ("Ff") i one bez prisutnosti restrikcijskog mjesta ("FF") (60).

Gyorffy i sur. u populacijskoj studiji u Mađarskoj analizirali su polimorfne biljege *ApaI*, *BsmI*, *FokI*, *TaqI* i *TruI* gena za VDR u ispitanika mlađe životne dobi. Uočili su da prisutnost alela "b", "a" i "u" donosi primljivost za T1ŠB u djevojčica (61).

Škrabić i sur. objavili su rezultate populacijske studije u Dalmaciji. Genotipizacija gena za VDR s restrikcijskim enzimima *BsmI*, *ApaI* i *TaqI*, pokazala je da genotip "BBAAtt" donosi primljivost za nastanak T1ŠB (62).

Motohashi i sur. su u populacijskoj studiji analizirali polimorfni biljeg *BsmI* gena za VDR. Alel "B" bio je učestaliji u oboljelih u odnosu na zdrave te u onih s akutno nastalim T1ŠB (63).

Turpeinen i sur. analizirali su tri polimorfna biljega *ApaI*, *BsmI* i *FokI* gena za VDR. Dobili su značajnu različitost učestalosti alela i pojedinačnih genotipova gena za VDR u populacijama triju različitih regija Finske, graničnu statističku značajnost u učestalosti polimorfizma polimorfnih biljega *BsmI* i *FokI* između oboljelih i zdravih, te povećani prijenos haplotipa "AA", "bb" i "FF" s roditelja na oboljele muške potomke. Nakon korekcije multiplog testiranja zaključili su da navedena tri polimorfizma gena za VDR nisu povezana s nastankom T1ŠB (64).

Tablica 5. Sažetak do sada objavljenih rezultata polimorfizama gena za vitamin D receptor u odnosu na T1ŠB

Autori	Tip studije	Populacija	Ispitanici		Rezultati
			Oboljeli	Kontrola	
Mc Dermott	obiteljska	Indije	93	0	Prijenos alela "b", haplotipa "bT" i haplotipa "bAT" na oboljele
Pani	obiteljska	Njemačke	152	0	Prijenos haplotipa "BA" na potomstvo u 64% slučajeva, kombinacija alela "A" i "B" pokazuje primljivost za T1ŠB
Chang	populacijska	Tajvana	157	248	Genotip "BB" četiri puta učestaliji u oboljelih od T1ŠB
Ban	populacijska	Japana	110	250	Genotip "ff" je učestaliji u oboljelih od T1ŠB
Guja	obiteljska	Rumunjske	212	0	Moguća primljivost alela "F" i protektivnost alela "T" u oboljelih od T1ŠB
Fassbender	populacijska	Njemačke	75	57	Genotip "TT" učestaliji u oboljelih od T1ŠB
Gyorffy	populacijska	Mađarske	107	103	Aleli "b", "a", "u" su primljivi za nastanak T1ŠB u djevojčica
Škrabić	populacijska	Hrvatske Dalmacije	134	132	Genotip "BBAAtt" četiri puta učestaliji u oboljelih od T1ŠB
Motohashi	populacijska	Japana	203	222	Alel "B" učestaliji u bolesnih i u onih s akutno nastalim T1ŠB
Turpeinen	populacijska obiteljska	Finske	1064 544	2000	Nakon korekcije multiplog testiranja nema značajne povezanosti polimorfnih biljega <i>ApaI</i> , <i>BsmI</i> i <i>FokI</i> i T1ŠB

Ortlepp i sur. su analizirali povezanost polimorfnog biljega *BsmI* gena za VDR u oboljelih od T2ŠB. Prevalencija T2ŠB i koronarne arterijske bolesti ovisila je o frekvenciji alela "B". 8% ispitanika s T2ŠB imalo je haplotip "BB" (88).

3.0 CILJ ISTRAŽIVANJA

1.) Utvrditi je li polimorfizam unutar svakog polimorfnog biljega gena za IL-1R1 i gena za VDR povezan s nastankom T1ŠB u populaciji Dalmacije. Usporedit ćemo učestalost različitih pojedinačnih genotipova i kombinacije genotipova testiranih polimorfni biljega kod oboljelih i zdravih ispitanika.

2.) Pridonijeti saznanjima koja bi omogućila uvrštavanje (ili odbacivanje) gena za IL-1R1 i gena za VDR u postojeću skupinu primljivih gena za nastanak T1ŠB.

4.0 ISPITANICI I METODE RADA

4.1 Ispitanici

Istraživanje smo proveli među stanovništvom Dalmacije na 134 djece oboljele od T1ŠB i 132 kontrolna ispitanika.

Skupinu oboljelih činili su ispitanici s T1ŠB koji se manifestirao između 1 – 16 godine života. Dijagnoza bolesti je postavljena na osnovi kriterija Svjetske zdravstvene organizacije (89). Na kontrolnim pregledima ili tijekom bolničkog liječenja, kada se oboljelima vadila venska krv radi procjene stanja metabolizma, istodobno smo izdvojili epruvetu s 1 do 2 ml pune krvi na EDTA potrebnu za ovo ispitivanje i pohranili je na -20°C. Prikupljanje uzoraka krvi trajalo je 5 mjeseci. Obuhvatili smo 134 rodbinski nepovezana ispitanika s T1ŠB (72 ili 53,7% dječaka i 62 ili 46,3% djevojčica), srednje životne dobi 8.6 ± 4.3 godine (srednja vrijednost \pm standardna devijacija). U Klinici za dječje bolesti u razdoblju prikupljanja uzoraka za ovu studiju bilo je registrirano 149 ispitanika.

Usporednu skupinu predstavljali su slučajno odabrani i rodbinski nepovezani ispitanici u dobi od 1 do 16 godina koji su se primali u Kliniku za dječje bolesti radi liječenja i medicinske obrade. Odsutnost T1ŠB u ispitanika potvrdili smo

anamnestičkim i kliničkim pokazateljima. Prisutnost T1ŠB i T2ŠB u roditelja ispitanika i podatak o prisutnosti neke od znanih autoagresivnih bolesti u ispitanika bili su kriteriji za isključenje iz usporedne skupine. Iz venske krvi uzete za procjenu hematoloških i biokemijskih pokazatelja potrebnih za nadzor i liječenje njihovih bolesti, izdvojili smo epruvetu s 1 do 2 ml pune krvi na EDTA potrebne za naše ispitivanje, i pohranili na -20°C. Prikupljanje uzoraka krvi trajalo je 4 mjeseca. Obuhvatili smo 132 djece i adolescenata (62 ili 47% dječaka i 70 ili 53% djevojčica). Srednja životna dob u toj skupini iznosila je 8.2 ± 4.9 godina (srednja vrijednost \pm standardna devijacija).

4.2 Izdvajanje deoksiribonukleinske kiseline iz pune krvi

Genomsku deoksiribonukleinsku kiselinu (engl. *deoxyribonucleic acid, DNA*) izdvojili smo iz leukocita periferne krvi pomoću *Perfect gDNA Blood Mini* kitova (Eppendorf, Hamburg, Njemačka).

Prema protokolu proizvođača, uzeli smo 20 μ l proteinaze K u 1.5 ml tubice. Dodali smo 200 μ l pune krvi u tubice i 350 μ l otopine G1 (pufer-detergent otopina). Izmiješali smo na *Vortexu*, na velikoj brzini 5 s. Inkubirali smo u termomikseru na 70°C, 900 okretaja u minuti, 10 minuta. Centrifugirali smo 3 minute pri 15000 okretaja u minuti. Supernatant smo ulili u čistu tubicu. Dodali smo 200 μ l G2 otopine (isopropanol-detergent otopina) u tubicu koja sadrži supernatant. Uzorak smo miješali na velikoj brzini 5 sekundi. Zatim smo uzorak prebacili u novu tubicu s fiksiranim filtrom. Uzorak smo inkubirali na sobnoj temperaturi 1 minutu, pa ponovno centrifugirali 2 minute na 12000-16000 okretaja u minuti. Filtar smo isprali prikladnim puferom, a na kraju smo DNA oslobodili s filtra pomoću 200 μ l pufera za otapanje (engl. *elution buffer*). Uzorak smo inkubirali na 70°C 3 min. Nakon centrifugiranja dobili smo genomski DNA koji smo pohranili na -20°C.

4.3 Polimerazna lančana reakcija i polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka

Umnožavanje željenih odsječaka slijeda nukleotida DNA gena za VDR i gena IL-1R1 napravili smo metodom polimerazne lančane reakcije (engl. *polymerase*

chain reaction, PCR). Produkt reakcije PCR cijepali smo uz pomoć specifičnih restriksijskih enzima. Zatim je uslijedila analiza polimorfizama duljine restriksijskih ulomaka (engl. *restriction fragment length polymorphism, RFLP*). Rezultati duljine restriksijskih ulomaka određeni su elektroforezom na gelu agaroze (90,91).

PCR je metoda selektivnog umnožavanja DNA segmenata. Sastoji se od serije ponavljajućih ciklusa koji se temelje na korištenju termostabilne DNA polimeraze u proizvodnji milijuna kopija određene sekvencije, počevši od vrlo male količine biološkog materijala. Reakcija obuhvaća oko 30 ponavljajućih ciklusa grijanja i hlađenja. Segmenti su definirani specifičnim početnim oligonukleotidima (90). U novije su vrijeme metode rekombinantnog DNA omogućile da se kao genetski biljezi koriste kratki slijedovi DNA koji se razlikuju među normalnim jedinkama. Široko korišteni biljezi temelje se na ovisnosti o načinu na koji male razlike u slijedu DNA mogu mijenjati uzorak cijepanja restriksijskih enzima. Razlika u jednom paru nukleotida na određenoj poziciji u kromosomu može dovesti do nastanka ili nestanka mjesta cijepanja restriksijskog enzima. Posljedica te razlike je promjena u dužini restriksijskih ulomaka. Sama metoda PCR nakon koje slijedi digestija s odgovarajućim enzimom temelji se na tome da se metodom PCR umnoži željeni ulomak slijeda nukleotida DNA, te se zatim produkt reakcije PCR podvrgne cijepanju uz pomoć specifičnoga restriksijskog enzima (90,91).

Polimorfizam predstavlja dvije ili više varijanti nukleotidnih slijedova koji su u populaciji zastupljeni određenom učestalošću. Slobodnije govoreći, polimorfizmi su: a) bilo koje promjene slijeda nukleotida s učestalošću u populaciji većom od 1%, ili b) su to nepatogenetske nukleotidne promjene bez obzira na njihovu učestalost (92). Polimorfizam koji ne dovodi do promjene u aminokiselinskom slijedu bjelančevina zove se tiha mutacija (eng. *silent mutation*) (92).

Moguće funkcijske posljedice polimorfizama mogu se očitovati na različitim razinama: 1) razini mRNA (različita stabilnost mRNA, različito izrezivanje pre-mRNA); 2) na razini bjelančevina (stabilnost, različiti oblici, međudjelovanje); 3) na razini stanice (mijenjanje transkripcijske pobude, sprječavanje staničnog rasta); 4) na razini organizma-jedinke (razina hormona, apsorpcija kalcija) (87).

4.3.1. Polimorfni biljezi gena za vitamin D-receptor i gena za interleukin-1 receptor tip 1

Gen za VDR analizirali smo na četiri polimorfna biljega. *BsmI* i *ApaI* smješteni su između egzona 8 i 9, polimorfni biljeg *TaqI* smješten je unutar egzona 9, dok je polimorfni biljeg *FokI* smješten u početnom dijelu egzona 2 (57,58,59,85,87).

Gen za IL-1R1 analizirali smo na tri polimorfna biljega: *PstI*, *HinfI* i *AluI*. Polimorfni biljezi smješteni su unutar promotora, u području koje razgraničava egzon 1B i 1C (54).

Tablica 6. Specifični početni oligonukleotidi za pojedini polimorfni biljeg gena za VDR i gena za IL-1R1, temperature sparivanja i veličine produkata PCR reakcije

Polimorfni biljeg	Specifični početni oligonukleotidi	Temperatura sparivanja	Veličina produkta reakcije PCR
Gen za VDR			
<i>BsmI</i>	5'CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA3' 5'AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG3'	60°C	825 bp
<i>ApaI</i>	5'CAGAGCATGGACAGGGAGC3' 5'AGGAGAGGCAGCGGTACTG3'	69°C	480 bp
<i>TaqI</i>	5'CAGAGCATGGACAGGGAGC3' 5'AGGAGAGGCAGCGGTACTG3'	69°C	480 bp
<i>FokI</i>	5'AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCT3' 5'ATGGAACACCTTGCTTCTTCCCTC3'	60°C	265 bp
Gen za IL-1R1			
<i>PstI</i>	5'TTGCTATGACCCTGGTGGTGT3' 5'AAATCCTGGTGTGTTAGGCCA3'	61°C	537 bp
<i>HinfI</i>	5'CAGGGATGACAGTCTCCACCTT3' 5'GTGTCCAAATGGCAGTTCTGAA3'	64°C	499 bp
<i>AluI</i>	5'TGATCTGAATTCTCACATGACCTTG3' 5'GGCACCACAACTTGGAGAATAG3'	60°C	499 bp

Reakcija PCR se odvijala u volumenu od 50 µl, koji je činilo 5 µl komercijalno dostupnog 10X PCR pufera (Eppendorff, Hamburg, Njemačka) (25

mM TRIS-HCl pH 8,0; 35 mM KCl; 0.1 mM EDTA; 1mM DTT, 50% glicerola), smjesa nukleotida (dNTP tj. dATP, dTTP, dCTP, i dGTP, do konačne koncentracije 10 mmol/l) (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), početni oligonukleotidi (100 ng svaki), 100 ng DNA, 1 jedinica Taq polimeraze te QH₂O. Svaki od 30 ciklusa reakcije PCR sastojao se od tri faze. Denaturacija je trajala 30 sekundi pri 94°C, faza sparivanja trajala je 30 sekundi pri temperaturama navedenim u tablici 6. i 7., dok je faza produljivanja lanaca trajala 45 sekundi pri 72°C.

4.3.2 Analiza umnoženih produkata DNA

Uzorke dobivene umnožavanjem reakcijom PCR provjerili smo horizontalnom elektroforezom na 1,5%-tnom gelu agaroze (Sigma, Njemačka) (91).

1. grijanjem se otopi 0.75 g agaroze u 100 ml 1X TBE puferu uz dodatak etidium bromida do konačne koncentracije od 0,5 µg/ml te se izlije u odgovarajuće kalupe i ostavi da se skrutne,
2. 7 µl umnoženog DNA pomiješa se s odgovarajućom količinom bromfenolnog plavila i ksilencijanola,
3. kao obilježivač veličine koristili su se DNA biljezi (ROSCHE Diagnostics Corporatio, Indianapolis, USA)
4. zdenci u agaroznom gelu napune se uzorcima te se gel izvrgne istosmjernom električnom polju napona 80V, 20-30 minuta,
5. gel se izloži ultraljubičastom svjetlu da bi se vidio umnoženi DNA koji fluorescira zbog interakcije s etidijbromidom te se napravi fotografija.

Nakon što se dokaže postojanje fragmenta odgovarajuće veličine, pristupi se njihovoj daljnjoj analizi RFLP tehnologijom (91).

4.3.3 Analiza polimorfizma duljine restrikcijskih ulomaka gena za vitamin D-receptor i gena za interleukin-1 receptor tip 1

Da bismo odredili status alela na temelju postojanja polimorfnog mjesta, produkt koji smo dobili reakcijom PCR, pocijepali smo odgovarajućim enzimom te analizirali na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Homozigoti bez prisutnog reznog mjesta označeni su velikim slovima prema korištenoj restrikcijskoj endonukleazi, heterozigoti velikim i malim slovom, a homozigoti koji posjeduju restrikcijsko mjesto za korišteni restrikcijski enzim označeni su malim slovima.

Tablica 7. Restriksijski enzim za pojedini polimorfni biljeg gena za VDR i gena za IL-1R1, temperatura inkubacije, produkt restrikcije i pripadajući aleli

Polimorfni biljeg	Restriksijski enzim	Sekvence restriksijskih mjesta	Temperatura inkubacije (°C)	Produkt reakcije RFLP (restriksijski profil, bp)	Alel
Gen za VDR					
<i>BsmI</i>	<i>BsmI</i>	5'...GATGCN↓...3' 3'...CTTAC↑GN...5'	65	N-825 N/M-825+650+175 M-650+175	BB Bb bb
<i>ApaI</i>	<i>ApaI</i>	5'...GGGCC↓C...3' 3'...C↑CCGGG...5'	25	N-480 N/M-480+250+230 M-250+230	AA Aa aa
<i>TaqI</i>	<i>TaqI</i>	5'...T↓CGA...3' 3'...AGC↑T...5'	65	N-480 N/M-480+280+200 M-280+200	TT Tt tt
<i>FokI</i>	<i>FokI</i>	5'...GGATG(N9) ↓...3' 3'...CTAC(N13) ↑...5'	37	M-265 N/M- 265+196+69 N-196+69	FF Ff ff
Gen za IL-1R1					
<i>PstI</i>	<i>PstI</i>	5'...CTGCA↓G...3' 3'...G↑ACGTC...5'	37	N-537 N/M-537+440+97 M-440+97	PP Pp pp
<i>HinfI</i>	<i>HinfI</i>	5'...AG↓CT...3' 3'...TC↑GA...3'	37	N-274+232 N/M- 274+232+129+103 M-274+129+103	HH Hh hh
<i>AluI</i>	<i>AluI</i>	5'...AG↓CT...3' 3'...TC↑GA...5'	37	N-445+54 N/M-445- 406+54+39 M-406+54+39	AA Aa aa

bp = parova baza; N = normalni; M = mutirani

Postupak reakcije:

1. uzme se 15 µl produkta PCR reakcije,

2. dodaju se 2 μ l 10X restrikcijskog pufera (pufer za enzim *BsmI*: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9; pufer za enzime *ApaI* i *FokI*: 50 mM potassium acetate, 20 mM Tris acetate, 10 mM magnesium acetate, 10 mM DTT, pH 7,9; pufer za enzim *TaqI*: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl, pH 8,4; pufer za enzime *HinfI* i *PstI*: 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl, 10 mM DTT, 1000 mM NaCl, pH 7,5; pufer za enzim *AluI*: 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl, 10 mM DTT, pH 7,5),
3. dodaju se 2 jedinice odgovarajuće restrikcijske endonukleaze,
4. konačni volumen reakcijske smjese iznosi 20 μ l,
5. inkubira se na odgovarajućoj temperaturi, navedenoj u Tablici 7., preko noći,
6. tako dobiveni uzorci analiziraju se na 1.5-3% agaroznom ili 12% poliakrilamidnom gelu na sličan način kao i uzorci dobiveni nakon lančane reakcije polimeraze.

Priprema 12%-tnoga poliakrilamidnog gela:

2.4 ml 30% akrilamida (Sigma, Njemačka), 0.6 ml 10XTBE, 3 ml deionizirane vode, 25 μ l amonijpersulfata (APS) (Sigma, Njemačka) i 10 μ l Temeda (Sigma, Njemačka) izlije se u odgovarajući kalup i ostavi da se skrutne.

4.4 Statistička analiza podataka

Usporedba ispitanika istraživane i usporedne grupe obavljena je χ^2 testom (uz Yates korekciju) i tzv. "stepwise" logističkom regresijom (metoda "Forward" po Waldu). Logističkom regresijom izračunali smo relativnu šansu (engl. *Odds ratio*, *OR*). Koristili smo statistički paket SPSS 11.0. P-vrijednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

5.0 POŠTOVANJE ETIKE

Za istraživanje je zatražena i dobivena privola Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Split i Medicinskog fakulteta u Splitu. U istraživanju su se poštovala etička načela u skladu s etičkim normama određenim hrvatskim zakonima (Hrvatski liječnički zbor – Kodeks medicinske etike i deontologije, Zagreb, 2002.) i međunarodnim konvencijama (World Medical Association Declaration of Helsinki – 52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October, 2000.).

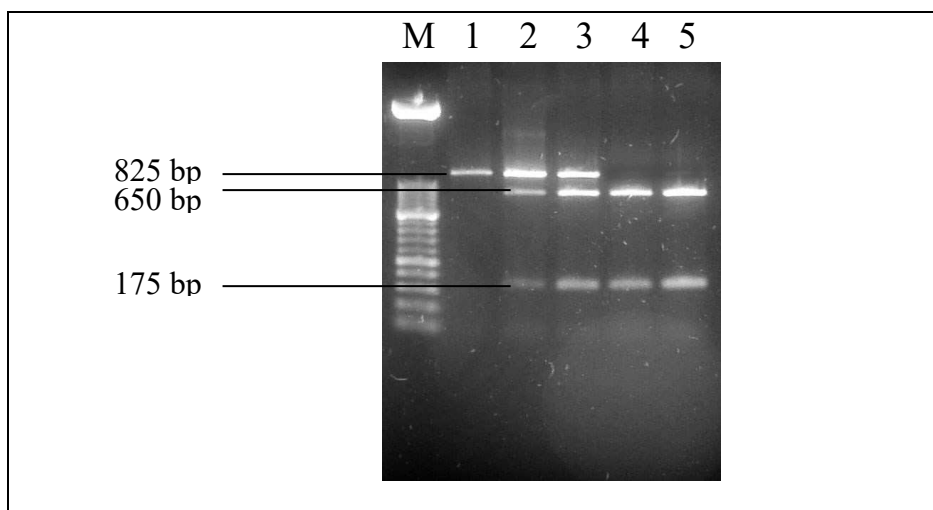
Krv ispitanika uzimala se uz suglasnost predstojnika Klinike i roditelja ispitanika. Materijal se koristio isključivo za dobivanje znanstvenih rezultata i neće se koristiti u svrhu stjecanja dobiti.

5.0 REZULTATI RADA

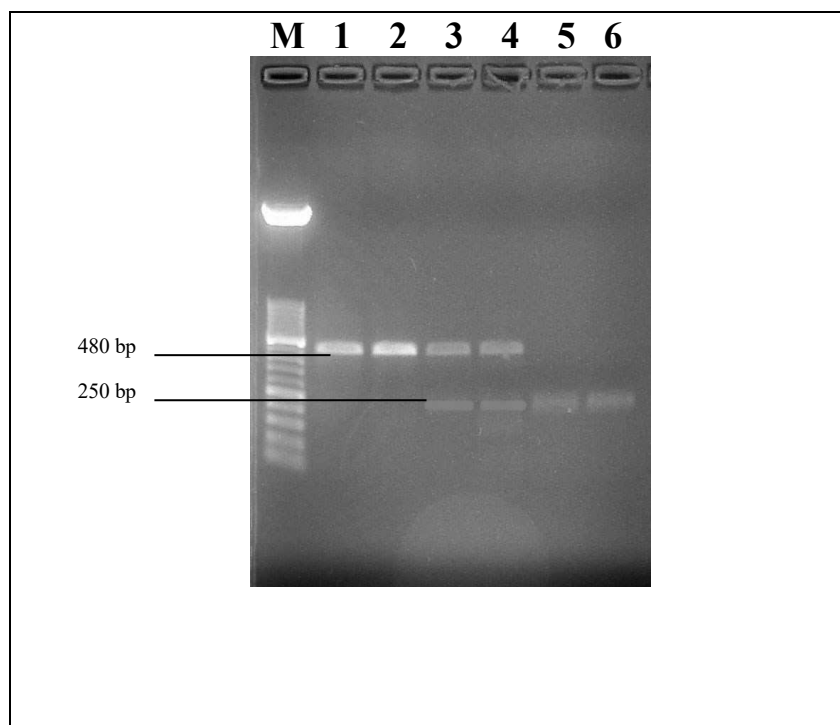
6.1 Rezultati analize četiriju polimorfnih biljega gena za vitamin D receptor

Nakon što smo umnožili PCR fragmente smještene između egzona 8 i 9, egzona 9 i egzona 2 gena za VDR, podvrgnuli smo ih restrikciji s četiri restrikcijske endonukleaze *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *FokI*.

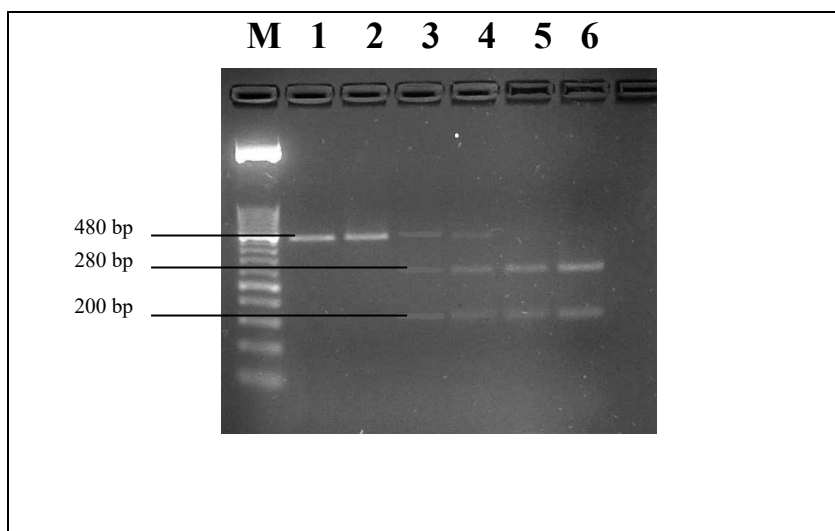
Slike 4, 5, 6 i 7 pokazuju rezultate cijepanja s restrikcijskim endonukleazama *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *FokI* gena za VDR.



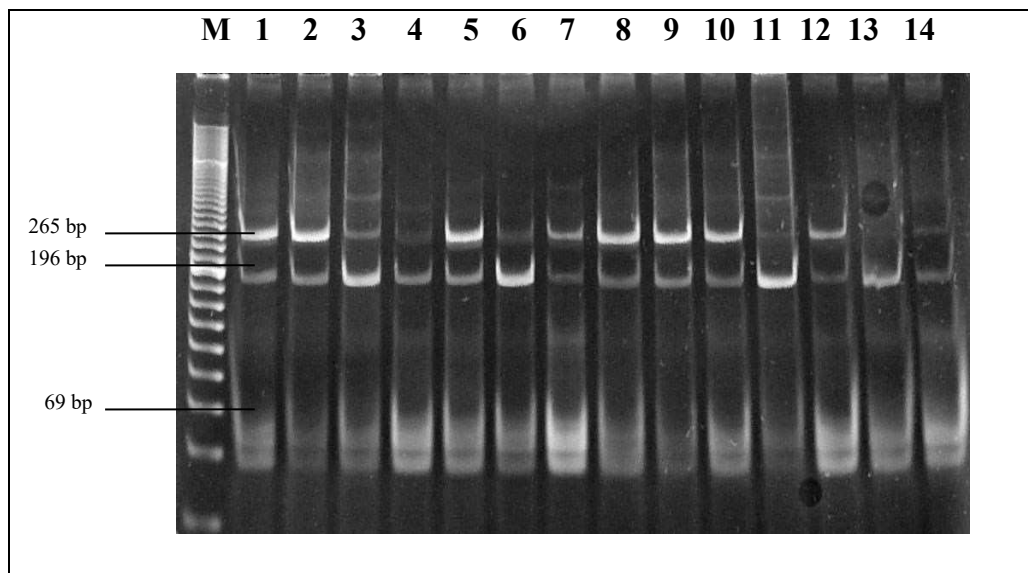
Slika 6. Rezultati restrikcije na polimorfnom biljegu *BsmI* gena za VDR. PCR produkt dug je 825 baznih parova (bp). U slučaju prisutnosti reznog mjesta nastaju fragmenti sa 650 i 175 baznih parova. M – biljeg veličine DNA ulomaka. Jedinka 1 ima genotip BB, jedinka 2 i 3 Bb, jedinka 4 i 5 bb



Slika 7. Rezultati restrikcije na polimorfnom biljegu ApaI gena za VDR. PCR produkt dug je 480 baznih parova (bp). Fragment je podvrgnut digestiji s ApaI restrikcijskom endonukleazom koja ga u slučaju prisutnosti reznog mjesta reže na 250 i 230 baznih parova. M - DNA biljeg. Jedinke 1 i 2 imaju genotip AA, jedinke 3 i 4 Aa, jedinke 5 i 6 aa



Slika 8. Rezultati restrikcije na polimorfnom biljegu TaqI gena za VDR. PCR produkt dug je 480 baznih parova (bp). U slučaju prisutnosti reznog mjesta nastaju fragmenti s 280 i 200 baznih parova. M - DNA biljeg. Jedinke 1 i 2 imaju genotip TT, jedinke 3 i 4 Tt, jedinke 5 i 6 tt



Slika 9. Rezultati restrikcije na polimorfnom biljegu FokI gena za VDR. PCR produkt dug je 265 baznih parova (bp), a prisutnost reznog mjesta cijepa ga na fragmente dužine 196 i 69 baznih parova. M-DNA biljeg. Jedinke 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 12 i 14 imaju genotip Ff. Jedinke 3, 4, 6, 11 i 13 imaju genotip ff

Zastupljenost pojedinačnih genotipova ispitivanih polimorfni biljega *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *FokI* gena za VDR u bolesnika s T1ŠB i usporednih ispitanika prikazana je u Tablici 8.

Raspodjela učestalosti pojedinačnih genotipova polimorfni biljega *TaqI* (T/t) među skupinama pokazala je znakovitu razliku ($\chi^2=8.04$, $p=0.018$). Genotip "tt" gena za VDR pojavljivao se učestalije u T1ŠB bolesnika (Tablica 8.). Učestalost polimorfni biljega *FokI* među skupinama također je pokazala znakovitu razliku ($\chi^2=8.30$, $p=0.016$), s VDR genotipom "ff" koji se pojavljivao učestalije u oboljelih (Tablica 8). Razlika u učestalosti genotipova polimorfni biljega *BsmI* i *ApaI* nije zapažena (Tablica 8.).

Tablica 8. Raspodjela pojedinačnih genotipova za polimorfne biljege *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *FokI* gena za VDR u populaciji Dalmacije, u oboljelih od T1ŠB i usporednih ispitanika

Polimorfni biljeg i genotip	T1ŠB br.(%) N=134	Usporedna grupa br.(%) N=132	χ^2	p-vrijednost
GEN ZA VITAMIN D RECEPTOR				
<i>Bsm I</i> : - bb	52 (38.8)	41 (31.0)	4.42	0.11
- BB	24 (17.9)	17 (12.9)		
- Bb	58 (43.3)	74 (56.0)		
<i>Apa I</i> : - aa	16 (11.9)	15 (11.2)	3.6	0.17
- AA	66 (49.3)	51 (38.9)		
- Aa	52 (38.8)	66 (50.4)		
<i>Taq I</i> : - tt	25 (18.6)	11 (8.4)	8.04	0.018
- TT	54 (40.2)	48 (36.6)		
- Tt	55 (41.0)	72 (55.0)		
<i>Fok I</i> : - ff	29 (21.7)	12 (9.1)	8.30	0.016
- FF	42 (31.3)	44 (33.3)		
- Ff	63 (47.0)	76 (57.6)		

Logističkom regresijom u koju smo uključili kao pretkazivače: dobnu skupinu ispitanika (I. – od 1.0 do 3.9 godina starosti, II. - od 4.0 do 8.9 godina, III. - od 9.0 do 13.9 godina i skupina IV. – stariji od 14.0 godina), spol (muško, žensko), te polimorfizme gena za VDR polimorfni biljega *BsmI* (BB,Bb,bb), *TaqI* (TT,Tt, tt), *ApaI* (AA,Aa,aa) i *FokI* (FF, Ff, ff), dobili smo da je relativna šansa za nastanak T1ŠB za 1.8 puta veća u ispitanika s genotipom "tt" prema ispitanicima s genotipom "TT" (95% CI 0.1-4.1). Relativna šansa za 2.2 puta veća je u ispitanika s genotipom "ff" prema onim s genotipom "FF" (95% CI 0.99-4.99) (Tablica 9).

Tablica 9. Rezultati logističke regresije kojom su obuhvaćeni dob, spol te *BsmI*, *TaqI*, *ApaI* i *FokI* polimorfni biljezi gena za VDR kao zavisne varijable

Varijabla*	Baza	Relativna šansa	95% CI	P-vrijednost
<i>TaqI</i>	TT			
Tt		0.68	0.4 - 1.2	
tt		1.8	0.8 - 4.1	0.042
<i>FokI</i>	FF			
Ff		0.79	0.46 - 1.4	
ff		2.22	0.99 - 4.99	0.029

*rezultati koji nisu statistički značajni nisu prikazani

Učestalost združenih genotipova za tri polimorfna biljega *BsmI*, *ApaI* i *TaqI* koji su u genu smješteni između egzona 8 i 9 te u egzonu 9, prikazana je u Tablici 10.

Genotip "BBAAtt" pokazao je veću šansu za nastanak T1ŠB jer je četiri puta učestaliji u skupini oboljelih (p=0.004, OR 4.46, 95% CI 1.62-12.26). Genotip "BbAaTt" učestaliji je u skupini usporednih ispitanika (p=0.04, OR 0.52, 95% CI 0.3-0.94).

Tablica 10. Raspodjela združenih genotipova za tri polimorfna biljega *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* gena za VDR u populaciji Dalmacije. Združeni genotipovi koji nisu zastupljeni nisu prikazani

Združeni genotip	T1ŠB Br. (%) N=134	Usporedna grupa Br.(%) N=132	χ^2	p-vrijednost
BBAAtt	20 (14.9)	5 (3.8)	8.42	0.04
bbAaTT	24 (17.9)	12 (9.0)	3.70	0.05
BbAATT	4 (3.0)	5 (3.8)	0.0005	0.98
BBAATt	2 (1.5)	5 (3.8)	0.62	0.43
BbAaTT	0 (0.0)	4 (3.0)	2.33	0.13
BbAaTt	25 (18.8)	40 (30.3)	4.27	0.04
bbAATT	10 (7.6)	12 (9.1)	0.07	0.79
bbAa Tt	1 (0.7)	5 (3.8)	1.58	0.21
BBAatt	0 (0.0)	3 (2.3)	1.38	0.24
bbaaTT	13 (9.7)	9 (6.8)	0.4	0.53
BbAATt	25 (18.7)	19 (14.4)	0.59	0.44
BBAaTT	0 (0.0)	1 (0.7)		
BBAaTt	1 (0.7)	1 (0.7)		
bbAATt	0 (0.0)	1 (0.7)		
BBaaTT	0 (0.0)	1 (0.7)		
BbaaTT	2 (1.5)	3 (2.3)		
BbAAtt	1 (0.7)	2 (1.5)		
BbAatt	1 (0.7)	1 (0.7)		
bbaaTt	1 (0.7)	2 (1.5)		
bbAAtt	3 (2.2)	0 (0.0)		
BBAATT	1 (0.7)	1 (0.7)		

Analiza združenih genotipova za sva četiri ispitivana polimorfna biljega *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *FokI*, gena za VDR, prikazana je u Tablici 11.

Združeni genotip "BBAAttFf" više je od šest puta učestaliji u oboljelih nego u usporednih ispitanika (13 ispitanika prema 2 ispitanika), ($p=0.009$, OR 6.93, 95% CI 1.5-31.4), te genotip "bbAaTTFF" prisutan u sedam bolesnika, a nije zabilježen u skupini zdravih, usporednih ispitanika ($p=0.02$, OR 15.5, 95% CI 0.9-273.9). Druga združivanja genotipova nisu pokazala značajnu razliku u pojavljivanju između dvije skupine.

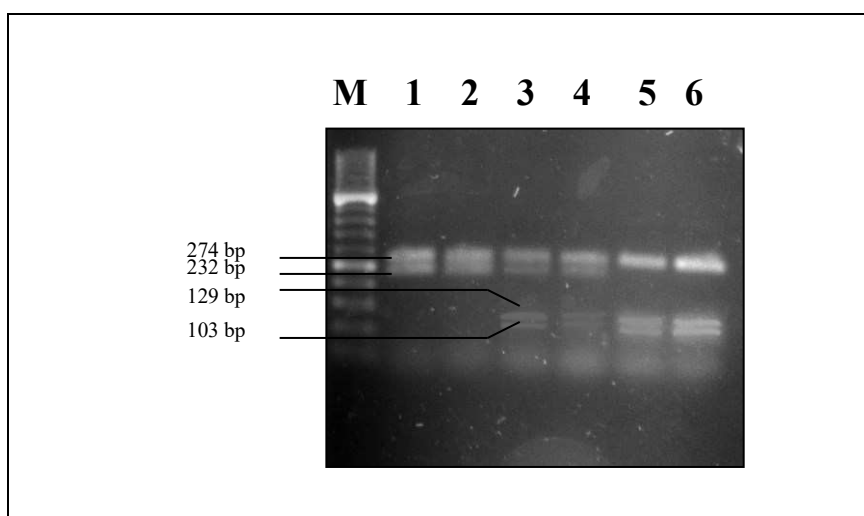
Tablica 11. Raspodjela združenih genotipova za četiri polimorfna biljega BsmI, ApaI, TaqI i FokI gena za VDR, u populaciji Dalmacije. Združivanja koja nisu zastupljena nisu prikazana

Združeni genotip	T1ŠB Br. (%) N=134	Usporedna grupa Br.(%) N=131	χ^2	p- vrijednost
BbAaTtFf	11 (8,2)	22 (16,7)	3.7	0.05
BbAaTtff	9 (6,7)	14 (10,7)	0.8	0.35
BbAaTTfF	11 (8,2)	8 (6,1)	0.18	0.67
BbAATtff	13 (9,7)	8 (6,1)	0.73	0.39
BbAATtFf	10 (7,5)	10 (7,6)	0.003	0.96
BbaaTTfF	9 (6,7)	6 (4,5)	0.24	0.63
BBAAttFf	13 (9,7)	2 (1,5)	7.3	0.009
BbAaTTFF	7 (5,2)	0 (0,0)	5.14	0.02
BbAaTtFF	5 (3,7)	3 (2,2)	0.11	0.74
BBAAttFF	4 (3,0)	1 (0,7)	0.77	0.38
bbAATTfF	4 (3,0)	3 (2,2)	0.12	0.72
BbAaTTff	5 (3,7)	4 (3,0)	0.09	0.76
BbAATTff	4 (4,0)	6 (4,5)	0.13	0.72
BbAAttFf	1 (0,7)	1 (0,7)		
BbAATTff	2 (1,5)	4 (3,0)		
BbAATTFF	1 (0,7)	0 (0,0)		
BBAAttff	3 (2,2)	2 (1,5)		
BbaaTTff	2 (1,5)	2 (1,5)		
BbAattFf	1 (0,7)	1 (0,7)		
BBAATTfF	1 (0,7)	0 (0,0)		
BbaaTTff	1 (0,7)	1 (0,7)		
BbAATTff	1 (0,7)	1 (0,7)		
BBAATtff	2 (1,5)	1 (0,7)		
BbaaTtFF	1 (0,7)	0 (0,0)		
bbAATTFF	2 (1,5)	3 (2,2)		
BbaaTTFF	2 (1,5)	1 (0,7)		
BbAaTtFF	2 (1,5)	2 (1,5)		
BbAaTtff	1 (0,7)	1 (0,7)		
BbAAttff	1 (0,7)	0 (0,0)		
BbAAttFF	2 (1,5)	0 (0,0)		
BbaaTTFF	1 (0,7)	0 (0,0)		
BBAaTtFF	1 (0,7)	0 (0,0)		
BbAaTtFF	1 (0,7)	0 (0,0)		
BbAaTtFf	0 (0,0)	4 (3,0)		
BBAATtFf	0 (0,0)	4 (3,0)		
BBAaTtFf	0 (0,0)	1 (0,7)		
BbaaTTfF	0 (0,0)	2 (1,5)		
BbAaTTfF	0 (0,0)	2 (1,5)		
BBAaTTfF	0 (0,0)	1 (0,7)		
BbAAttff	0 (0,0)	1 (0,7)		
BbaattFf	0 (0,0)	1 (0,7)		
BbAATtff	0 (0,0)	1 (0,7)		
BBAATTFF	0 (0,0)	1 (0,7)		
BBAattFF	0 (0,0)	1 (0,7)		
BBAattFf	0 (0,0)	2 (1,5)		
BbAaTTff	0 (0,0)	1 (0,7)		
BbaaTtff	0 (0,0)	1 (0,7)		
BbaaTtFf	0 (0,0)	1 (0,7)		

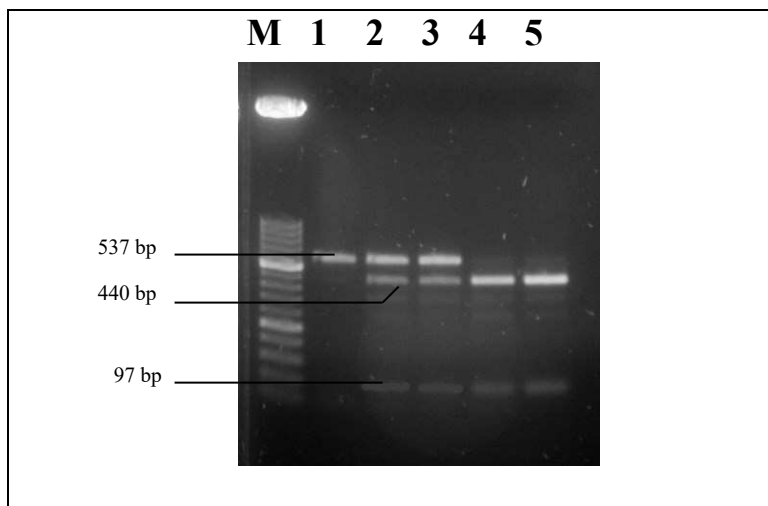
6.2 Rezultati analize triju polimorfnih biljega gena za interleukin-1 receptor tip 1

Nakon što smo umnožili PCR fragmente smještene u promotorskoj regiji koja razgraničava egzon 1B i 1C gena za IL-1R1 podvrgnuli smo ih restrikciji s tri restrikcijske endonukleaze *PstI*, *HinfI* i *AluI*.

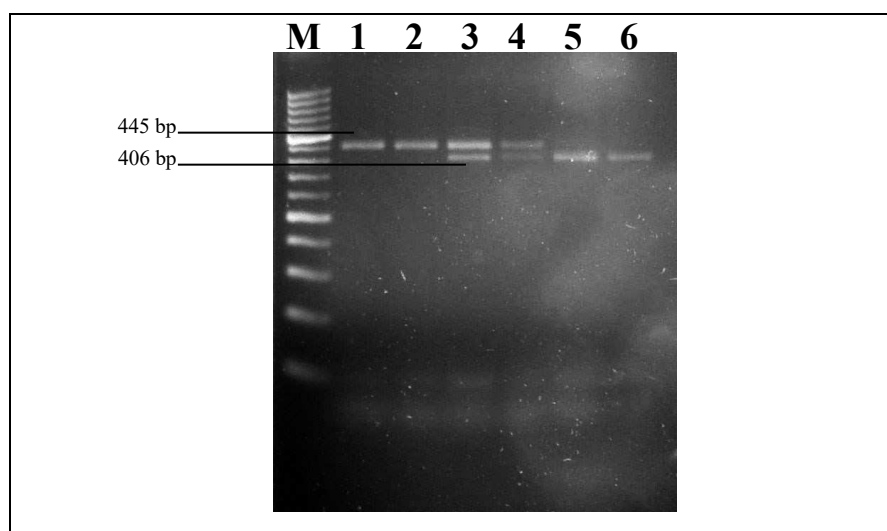
Slike 8, 9, 10 i 11 pokazuju rezultate cijepanja s restrikcijskim endonukleazama *PstI*, *HinfI* i *AluI* gena za IL-1R1.



Slika 10. Rezultati restrikcije na polimorfnom biljegu *HinfI* gena za IL-1R1. PCR produkt dug 499 baznih parova (bp) podvrgnut je digestiji s restrikcijskom endonukleazom koja ga je u slučaju prisutnosti dvaju reznih mjesta rezala na 274, 129 i 103 bazna para. M - DNA biljeg. Jedinke 1 i 2 imaju genotip HH, jedinke 3 i 4 imaju genotip Hh, jedinke 5 i 6 imaju genotip hh



Slika 11. Rezultati restrikcije na polimorfnom biljegu PstI gena za IL-1R1. PCR produkt dug 537 baznih parova (bp) podvrgnut je digestiji s restrikcijskom endonukleazom koja ga je u slučaju prisutnosti reznog mjesta rezala na 440 i 97 baznih parova. M - DNA biljeg. Jedinke 1 ima genotip PP, jedinke 2 i 3 imaju genotip Pp, jedinke 4 i 5 imaju genotip pp



Slika 12. Rezultati restrikcije na polimorfnom biljegu AluI gena za IL-1R1. PCR produkt dug 499 baznih parova (bp) podvrgnut je digestiji s restrikcijskom endonukleazom koja ga je u slučaju prisutnosti dvaju reznih mjesta rezala na 406, 39 i 54 bazna para. M - DNA biljeg. Jedinke 1 i 2 imaju genotip AA, jedinke 3 i 4 imaju genotip Aa, jedinke 5 i 6 imaju genotip aa

Zastupljenost pojedinačnih genotipova za polimorfne biljege *PstI*, *HinfI* i *AluI* promotorske regije gena za IL-1R1 u oboljelih od T1ŠB i usporednih ispitanika nije pokazala znakovitu razliku (Tablica 12).

Tablica 12. Raspodjela pojedinačnih genotipova za polimorfne biljege *PstI*, *HinfI* i *AluI* gena za IL-1R1 u populaciji Dalmacije u oboljelih od T1ŠB i usporednih ispitanika

Polimorfni biljeg i genotip	T1ŠB br.(%) N=134	Usporedna grupa br.(%) N=132	χ^2	p-vrijednost
GEN ZA INTERLEUKIN-1 RECEPTOR TIP 1				
<i>Pst I:</i> - pp - PP - Pp	73 (54)	72 (55)	0.25	0.88
	9 (7)	7 (5)		
	52 (39)	53 (40)		
<i>Hinf I:</i> - hh - HH - Hh	75 (56)	76 (57)	0.2	0.9
	11 (8)	9 (7)		
	48 (36)	47 (36)		
<i>Alu I:</i> - aa - AA - Aa	28 (21)	34 (26)	5.29	0.07
	20 (15)	31 (23)		
	86 (64)	67 (51)		

Logističkom regresijom u koju smo uključili kao promjenjive vrijednosti: dobnu skupinu ispitanika (I. – od 1.0 do 3.9 godina starosti, II. - od 4.0 do 8.9 godina, III. - od 9.0 do 13.9 godina i skupina IV. – stariji od 14.0 godina), spol (muško, žensko) te polimorfizme gena za IL-1R1 polimorfni biljega *PstI* (PP, Pp, pp), *HinfI* (HH, Hh, hh) i *AluI* (AA, Aa, aa), nismo dobili povezanost ispitivanih promjenjivih vrijednosti sa sklonošću nastanku T1ŠB.

Zastupljenost združenih genotipova za polimorfne biljege *PstI*, *HinfI* i *AluI* gena za IL-1R1 prikazana je u Tablici 13. Nijedna kombinacija genotipova nije pokazala značajne razlike u zastupljenosti između oboljelih od T1ŠB i usporednih ispitanika.

Tablica 13. Raspodjela združenih genotipova za tri polimorfna biljega: *PstI*, *HinfI* i *AluI* gena za IL-1R1 u proučavanoj populaciji. Združivanja koja nisu zastupljena nisu prikazana

Združeni genotip	T1ŠB Br. (%) N=134	Usporedna skupina Br.(%) N=132	χ^2	p- vrijednost
PPHHAA	4 (2,9)	6 (4,5)	0.001	0.97
PPHHAa	41 (30,5)	32 (24,4)	1.35	0.25
PPHHaa	28 (20,8)	32 (24,4)	0.43	0.51
PpHhAA	8 (6,0)	14 (10,7)	1.88	0.17
PpHhAa	40 (29,8)	31 (23,7)	1.38	0.24
pphhAA	5 (3,7)	7 (5,3)	0.11	0.74
pphhAa	4 (2,9)	0 (0,0)		
PPHhAa	0 (0,0)	1 (0,7)		
PPHhaa	0 (0,0)	1 (0,7)		
PpHHAA	1(0,7)	2 (1,5)		
PpHHAa	1(0,7)	3 (2,3)		
PpHHaa	0 (0,0)	1 (0,7)		
PphhAA	2 (1,5)	2 (1,5)		

Raspodjela združenih genotipova obaju ispitanih gena, VDR i IL-1R1, u oboljelih od T1ŠB i usporednih ispitanika prikazana je u Tablici 14.

Nijedna kombinacija genotipova nije pokazala značajniju prisutnost u jednoj od skupina, zbog čega nije napravljena statistička obrada.

Tablica 14. Raspodjela združenih genotipova za četiri polimorna biljega (*BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *FokI*) gena za VDR i tri polimorfna biljega (*PstI*, *HinfI* i *AluI*) gena za IL-1R1 u skupini oboljelih od T1ŠB i usporednoj skupini

Združeni genotip	T1ŠB br. (%) N=134	Usporedna skupina br.(%) N=131	Ukupno
BbAaTtFf/PPHHAa	3	4	7
BbAaTtff/PHHAa	3	7	10
bbAaTTfF/PHHAa	4	6	10
BbAATtff/PHHAa	3	2	5
BbAaTtFf/PPHHaa	6	2	8
BbAaTtff/PPHHaa	4	2	6
BbAaTtFf/PpHhAa	5	4	9
BbAATtff/PpHhAa	3	2	5
BbAATtFf/PpHhAa	5	2	7
bbaaTTfF/PpHhAa	3	3	6
BBAAttFf/PpHhAa	4	1	5
Ukupno	43	35	78

Logističkom regresijom u koju smo uključili : dobnu skupinu (I. - od 1.0 do 3.9 godina starosti, II. - od 4.0 do 8.9 godina, III. - od 9.0 do 13.9 godina i skupina IV. – stariji od 14.0 godina), spol (muško, žensko), polimorfizme gena za VDR za polimorfne biljege *BsmI* (BB,Bb,bb), *TaqI* (TT, Tt, tt), *ApaI* (AA, Aa, aa), *FokI* (FF, Ff, ff), te polimorfizme IL-1R1 gena za polimorfne biljege *PstI* (PP, Pp, pp), *HinfI* (HH, Hh, hh) i *AluI* (AA, Aa, aa), relativna šansa za nastanak T1ŠB veća je 2.2 puta među heterozigotima "Aa" (za polimorfni biljeg *AluI*) u odnosu na homozigote za odsutnost restriksijskog mjesta "AA" (95% CI 1.14-4.42). Relativna šansa raste u skupini homozigota za prisutnost restriksijskog mjesta "tt" (za polimorfni biljeg *TaqI*) prema homozigotima za odsutnost restriksijskog mjesta "TT" za 2 puta (95% CI 0.89-4.6). Relativna šansa za nastanak T1ŠB veća je za 2.2 puta i u skupini homozigota za prisutnost restriksijskog mjesta "ff" (za polimorfni biljeg *FokI*) prema homozigotima za odsutnost restriksijskog mjesta "FF" (95% CI 0.95-4.9) (Tablica 15).

Tablica 15. Rezultati logističke regresije kojom su obuhvaćeni dob, spol te BsmI, TaqI, ApaI i FokI polimorfni biljezi gena za VDR i PstI, HinfI i AluI polimorfni biljezi gena za IL-1R1 kao zavisne varijable

Varijabla*	Baza	Relativna šansa	95% CI	P-vrijednost
<i>AluI</i>	AA			
	Aa	2.24	1.14 – 4.42	0.048
	aa	1.5	0.67 – 3.2	
<i>TaqI</i>	TT			
	Tt	0.68	0.4 - 1.2	0.027
	tt	2.0	0.89 - 4.6	
<i>FokI</i>	FF			
	Ff	0.78	0.45 - 1.4	0.035
	ff	2.2	0.95 - 4.9	

*rezultati koji nisu statistički značajni nisu prikazani

6.3 Analiza po spolu i dobnim skupinama

Između skupine oboljelih od T1ŠB i usporedne skupine nije bilo razlike u zastupljenosti spolova ($\chi^2=3.2$, $p=0.36$) (Tablica 16), ni u razdiobi po dobnim skupinama ($\chi^2=1.8$, $p=0.18$) (Tablica 17.).

Tablica 16. Raspodjela broja oboljelih od T1ŠB i usporednih ispitanika prema spolu

Spol	T1ŠB N=134	Usporedna skupina N=132	χ^2	p- vrijednost
Dječaci	72	60	3.2	0.36
Djevojčice	62	72		

Tablica 17. Raspodjela broja oboljelih od T1ŠB i usporednih ispitanika prema dobnim skupinama

Dobna skupina	T1ŠB N=134	Usporedna skupina N=132	χ^2	p
I. – od 1.0 do 3.9 godina	24	31	1.8	0.18
II – 4.0 do 8.9 godina	50	39		
III.– 9.0 do 13.9 godina	40	36		
IV. – stariji od 14 godina	20	26		

Analiza skupine oboljelih od T1ŠB:

U skupini oboljelih od T1ŠB nije bilo razlike po spolu u zastupljenosti pojedinačnih genotipova za četiri ispitivana polimorfna biljega gena za VDR (*BsmI*: $\chi^2=0.12$, $p=0.94$; *ApaI*: $\chi^2=0.19$, $p=0.91$; *TaqI*: $\chi^2=0.78$, $p=0.68$; *FokI*: $\chi^2=0.45$, $p=0.79$), ni tri ispitivana polimorfna biljega gena za IL-1R1 (*PstI*: $\chi^2=0.72$, $p=0.69$; *HinfI*: $\chi^2=2.3$, $p=0.32$; *AluI*: $\chi^2=4.3$, $p=0.12$)

U istoj skupini nije bilo razlike po spolu ni u zastupljenosti alela za četiri ispitivana polimorfna biljega gena za VDR (*BsmI*: $\chi^2=0.02$, $p=0.89$; *ApaI*: $\chi^2=0.019$, $p=0.97$; *TaqI*: $\chi^2=0.41$, $p=0.52$; *FokI*: $\chi^2=0.14$, $p=0.71$) ni tri ispitivana polimorfna biljega gena za IL-1R1 (*PstI*: $\chi^2=0.01$, $p=0.19$; *HinfI*: $\chi^2=0.001$, $p=0.98$; *AluI*: $\chi^2=1.38$, $p=0.24$).

Također nije zabilježena razlika u zastupljenosti najčešćih združenih genotipova četiriju polimorfni biljega gena za VDR u odnosu na spol ($\chi^2=12.9$, $p=0.07$), ni znakovita razlika u zastupljenosti najčešće uočenih združenih genotipova triju polimorfni biljega gena za IL-1R1 u odnosu na spol ($\chi^2=7.7$, $p=0.18$).

U skupini ispitanika s T1ŠB prema spolu i dobi nije bilo značajne razlike u zastupljenosti pojedinačnih genotipova, alela i združenih genotipova ($\chi^2=2.4$, $p=0.49$).

Zastupljenost pojedinačnih genotipova za ispitivane polimorfne biljege gena za VDR po dobnim skupinama (*BsmI*: $\chi^2=5.7$, $p=0.45$; *ApaI*: $\chi^2=10.5$, $p=0.11$; *TaqI*: $\chi^2=5.3$, $p=0.51$; *FokI*: $\chi^2=8.4$, $p=0.21$) i gena za IL-1R1 po dobnim skupinama (*PstI*: $\chi^2=5.3$, $p=0.51$; *HinfI*: $\chi^2=4.2$, $p=0.64$; *AluI*: $\chi^2=5.0$, $p=0.55$) nije se značajno razlikovala u skupini ispitanika s T1ŠB.

Nije zabilježena ni razlika u zastupljenosti pojedinih alela za ispitivane polimorfne biljege gena za VDR prema dobnim skupinama (*BsmI*: $\chi^2=4.28$, $p=0.23$; *ApaI*: $\chi^2=4.81$, $p=0.19$; *TaqI*: $\chi^2=4.2$, $p=0.24$; *FokI*: $\chi^2=2.04$, $p=0.56$), ni gena za IL-1R1 prema dobnim skupinama (*PstI*: $\chi^2=4.1$, $p=0.25$; *HinfI*: $\chi^2=0.72$, $p=0.87$; *AluI*: $\chi^2=2.4$, $p=0.49$) među oboljelima od T1ŠB.

Promatrajući najčešće združene genotipove za četiri polimorfna biljega gena za VDR prema dobnim skupinama u skupini oboljelih od T1ŠB, nije bilo značajne razlike ($\chi^2=5.7$, $p=0.77$). Ni u najčešćim združenim genotipovima za polimorfne biljege gena za IL-1R1 prema dobnim skupinama među oboljelima od T1ŠB nije zabilježena razlika koja se mogla statistički potvrditi.

Analiza usporedne skupine:

U usporednoj skupini nije bilo razlike po spolu u zastupljenosti pojedinačnih genotipova za četiri ispitivana polimorfna biljega gena za VDR (*BsmI*: $\chi^2=0.38$, $p=0.83$; *ApaI*: $\chi^2=1.4$, $p=0.51$; *TaqI*: $\chi^2=1.5$, $p=0.48$; *FokI*: $\chi^2=1.12$, $p=0.57$), ni tri ispitivana polimorfna biljega gena za IL-1R1 (*PstI*: $\chi^2=0.87$, $p=0.65$; *HinfI*: $\chi^2=0.58$, $p=0.75$; *AluI*: $\chi^2=0.21$, $p=0.9$).

U istoj skupini nije bilo razlike po spolu ni u zastupljenosti alela za četiri ispitivana polimorfna biljega gena za VDR (*BsmI*: $\chi^2=0.13$, $p=0.72$; *ApaI*: $\chi^2=0.54$, $p=0.46$; *TaqI*: $\chi^2=0.01$, $p=0.94$; *FokI*: $\chi^2=0.01$, $p=0.91$) ni tri ispitivana polimorfna biljega gena za IL-1R1 (*PstI*: $\chi^2=0.07$, $p=0.79$; *HinfI*: $\chi^2=0.09$, $p=0.76$; *AluI*: $\chi^2=0.08$, $p=0.78$).

U usporednoj skupini nije pokazana značajna razlika u zastupljenosti najčešćih združenih genotipova za četiri ispitivana polimorfna biljega gena za VDR u odnosu na spol ($\chi^2=12.9$, $p=0.07$), ni razlika u zastupljenosti najčešćih združenih genotipova triju ispitivanih polimorfni biljega gena za IL-1R1 u odnosu na spol ($\chi^2=6.9$, $p=0.23$).

U usporednoj skupini prema spolu i dobi nije bilo značajne razlike u zastupljenosti pojedinačnih genotipova, alela i združenih genotipova ($\chi^2=1.0$, $p=0.79$).

U usporednoj skupini zastupljenost pojedinačnih genotipova za ispitivane polimorfne biljege gena za VDR po dobnim skupinama (*BsmI*: $\chi^2=7.5$, $p=0.27$; *ApaI*:

$\chi^2=1.2$, $p=0.97$; *TaqI*: $\chi^2=6.5$, $p=0.37$; *FokI*: $\chi^2=2.5$, $p=0.87$) i gena za IL-1R1 po dobnim skupinama (*PstI*: $\chi^2=3.3$, $p=0.76$; *HinfI*: $\chi^2=4.02$, $p=0.67$; *AluI*: $\chi^2=5.5$, $p=0.5$) nije se značajno razlikovala.

U usporednoj skupini nije zabilježena nit razlika u zastupljenosti pojedinih alela za ispitivane polimorfne biljege gena za VDR po dobnim skupinama (*BsmI*: $\chi^2=5.04$, $p=0.17$; *ApaI*: $\chi^2=1.09$, $p=0.78$; *TaqI*: $\chi^2=2.04$, $p=0.56$; *FokI*: $\chi^2=0.8$, $p=0.85$), ni za ispitivane polimorfne biljege gena za IL-1R1 po dobnim skupinama (*PstI*: $\chi^2=0.5$, $p=0.92$; *HinfI*: $\chi^2=0.43$, $p=0.93$; *AluI*: $\chi^2=6.5$, $p=0.09$).

U usporednoj skupini promatrajući najčešće združene genotipove četiriju ispitivanih polimorfni biljega gena za VDR prema životnoj dobi, nismo uočili značajnu razliku ($\chi^2=8.6$, $p=0.47$). Ni u najčešćim združenim genotipovima triju ispitivanih polimorfni biljega gena za IL-1R1 prema dobnim skupinama nije zabilježena razlika koja se mogla statistički potvrditi.

7.0 RASPRAVA

U ovoj studiji pronašli smo povezanost u učestalosti pojavljivanja ispitivanih polimorfizama gena za VDR i sklonosti za obolijevanje od T1ŠB u populaciji Dalmacije, a odnosi se na razlike u raspodjeli pojedinačnih genotipova za polimorfne biljege *TaqI* i *FokI*.

Genotipovi "tt" i "ff" koji karakteriziraju prisutnost restrikcijskog mjesta bili su više od 2 puta učestaliji u oboljelih od T1ŠB. Relativna šansa za nastanak T1ŠB je 1.8 puta veća ako ispitanik ima pojedinačni genotip "tt" u odnosu na one s pojedinačnim genotipom "TT", dok 2.2 puta veću relativnu šansu imaju ispitanici s pojedinačnim genotipom "ff" u odnosu na one s pojedinačnim genotipom "FF".

Također smo pronašli da združeni genotip za tri ispitivana polimorfna biljega gena za VDR, združeni genotip "BBAAtt" donosi šansu za nastanak T1ŠB jer je četiri puta učestaliji u oboljelih. Šansu za nastanak T1ŠB donosi i združeni genotip za četiri ispitivana polimorfna biljega istog gena, združeni genotip "BBAAttFf", koji je šest puta učestaliji u oboljelih, a također i združeni genotip "bbAaTTFF" koji je bio prisutan u sedam bolesnika, dok takva kombinacija nije zabilježena u skupini zdravih, usporednih ispitanika.

Očekivali bismo da "suprotni" združeni genotipovi "bbaaTT" i "bbaaTTff"/"BBaAttff" donose zaštitnu ulogu za T1ŠB, ali to nije potvrđeno u našoj studiji i teško je objašnjivo. Združeni genotip "BbAaTt" bio je učestaliji u usporednoj skupini u odnosu na oboljele od T1ŠB, što bi govorilo u prilog njegovoj zaštitnoj ulozi u nastanku T1ŠB.

Dob i spol ispitanika nisu utjecali na raspodjelu alela, pojedinačnih genotipova i združenih genotipova.

Uspoređujući naše rezultate s već iznesenim rezultatima povezanosti polimorfizma gena za VDR i nastanka T1ŠB, nailazimo na sličnosti i razlike (55-64). Pani i sur. objavili su obiteljsku studiju napravljenu u populaciji Njemačke u kojoj su analizirali četiri polimorfna biljega, *BsmI*, *ApaI*, *TaqI* i *FokI*, gena za VDR i njihovu povezanost s nastankom T1ŠB. TDT testom pokazali su da haplotipske kombinacije "At" i "Bt" te najčešće "BAAt" utječu na sklonost nastanku T1ŠB, dok haplotipske kombinacije "at" i "AT" imaju značajno nisku transmisiju s roditelja na oboljelu djecu, što govori o njihovoj zaštitnoj ulozi za T1ŠB. Nije uočena povezanost nastanka T1ŠB

s polimorfnim biljgom *FokI* (56). Uspoređujući rezultate naše studije u Dalmaciji, gdje je združeni genotip "BBAAtt" učestaliji među oboljelima, primjećujemo sukladnost s opisanom primljivim haplotipom "BAAt" u njemačkoj populaciji, nama bliskoj europskoj populaciji. Valja naglasiti da je u Njemačkoj provedena obiteljska studija unutar 152 obitelji, a u Dalmaciji populacijska studija sa 134 oboljela od T1ŠB i 132 usporedna ispitanika (56,62). Nešto kasnije objavljena je populacijska studija koja je provedena u ispitanika bijele rase u Njemačkoj, gdje je pronađena povezanost haplotipa "TT" s nastankom T1ŠB (60). Ti noviji podaci u suprotnosti su s iznesenim rezultatima obiteljske studije iz Njemačke i populacijske studije iz Dalmacije (56,62). Različiti rezultati dviju studija napravljenih u populaciji Njemačke uvjetovani su dijelom, kako to i sami autori ističu, malim brojem ispitanika u populacijskoj studiji Fassbendera i suradnika (75 oboljelih od T1ŠB i 57 zdravih ispitanika) (60).

Chang i sur. 2000.godine objavili su populacijsku studiju napravljenu na Tajvanu, u kojoj su analizirali 157 oboljelih od T1ŠB i 248 usporednih ispitanika. Učestalost alela *BsmI*, gena za VDR, pokazala je razliku između oboljelih i usporednih ispitanika, pokazujući četiri puta učestaliji genotip "BB" među oboljelima. Oboljeli su bili u dobi od 15 ± 6 godina, dok je dob postavljanja dijagnoze T1ŠB bila $8,8 \pm 5,6$ godina. Analizirana je 71 djevojčica i 86 dječaka. Usporedna grupa nije bila usklađena po dobi (49 ± 11 godina), indeksu tjelesne mase ni spolu (156 muškaraca i 92 žene). Šećerna bolest je u usporednih ispitanika isključena testom oralnog opterećenja glukozom (57).

Motohashi i sur. u populacijskoj studiji napravljenoj u Japanu, među 203 oboljela od T1ŠB i 222 zdrava ispitanika analizirali su samo jedan, polimorfni biljeg *BsmI* gena za VDR. Alel "B" bio je učestaliji u oboljelih u odnosu na zdrave te u onih s akutno nastalim T1ŠB. Skupina oboljelih sastojala se od 96 muškaraca i 107 žena u dobi od 1 do 70 godina, srednje životne dobi $34,6 \pm 16,9$ godina.

Usporednu skupinu činili su 101 muškarac i 121 žena u dobi od 20 do 72 godine, srednje dobi $44,4 \pm 13,7$ godina. Dob i spol ispitanika nisu utjecali na raspodjelu genotipske učestalosti (63).

Ban i sur. napravili su populacijsku studiju u Japanu analizirajući polimorfne biljege *BsmI* i *FokI* gena za VDR. Analizirali su 110 oboljelih od T1ŠB (50 muškaraca i 60 žena, prosječne dobi javljanja bolesti $26,0 \pm 3,7$ godina), te 250 usporednih ispitanika (100 muškaraca i 150 žena, iste životne dobi) s negativnim kliničkim

znakovima i negativnom anamnezom na T1ŠB. Pokazali su da je genotip homozigota s prisutnim restrikcijskim mjestom za *FokI* restrikcijsku endonukleazu značajno učestaliji među oboljelima od T1ŠB s pozitivnim GADA (58). Ovi rezultati u skladu su s rezultatima dobivenim u populaciji Dalmacije gdje smo također pokazali da je genotip "ff" učestaliji među oboljelima od T1ŠB, što upućuje na povezanost navedenog genotipa i sklonosti obolijevanju od T1ŠB.

Fassbender i sur. u populacijskoj studiji u Njemačkoj također su ispitali povezanost polimorfnog biljega *FokI* gena za VDR i T1ŠB. U istraživanje su uključili 75 oboljelih ispitanika bijele rase (42 muškarca, 33 žene, srednja dob početka T1ŠB je bila $23,25 \pm 11,79$ godina) i 57 usporednih ispitanika (27 muškaraca, 30 žena, srednja životna dob $33,5 \pm 10,7$ godina). Uočili su da su homozigotne osobe za prisutnost reznog mjesta za restrikcijsku endonukleazu *FokI* (genotip "ff") ranije manifestirali bolest u odnosu na oboljele heterozigote ("Ff") i one bez prisutnosti restrikcijskog mjesta ("FF") (60). U oboljelih od T1ŠB u našoj populaciji značajno učestaliji pojedinačni genotip "ff" nije pokazao povezanost s dobi nastanka bolesti.

Moguće da polimorfni biljeg *FokI* pridonosi imunosnoj različitosti T1ŠB, a mehanizam nije potpuno razjašnjen. Polimorfni biljeg *FokI* izgleda kodira VDR izoform s višom transkripcijskom aktivnosti, te na taj način može utjecati na imunomodulatornu aktivnost vitamin D hormona (86,87).

Studije u populacijama Južne Azije (Indijci), Rumunjske, Mađarske i Finske pokazale su drukčiju raspodjelu genotipova za navedene polimorfizme gena za VDR nego što je pokazano u našoj populaciji (55, 59, 61, 64).

McDermott i sur. u obiteljskoj studiji indijskih Azijata opisali su povezanost triju polimorfnih biljega gena za VDR i T1ŠB. Pokazali su da se alel "b" polimorfnog biljega *BsmI* u prvom redu prenosi na oboljele potomke. Analizirajući dva alela važnost u prijenosu je pokazao haplotip "bT" za polimorfne biljege *BsmI* i *TaqI*, dok je analiza triju alela, uključujući polimorfni biljeg *ApaI*, pokazala važnost u prijenosu haplotipa "bAT" (55).

Guja i sur. u obiteljskoj studiji u Rumunjskoj ispitali su povezanost polimorfnih biljega *FokI*, *ApaI*, *TaqI* gena za VDR i nastanka T1ŠB. Prijenos alela "F" s roditelja na oboljelu djecu, kao i prijenos alela "T" s roditelja na zdravu djecu bio je učestaliji, ali nije dosegnuo prag statističke važnosti. Ispitano je 212 oboljelih (106 dječaka, 106 djevojčica, srednja dob početka bolesti je bila $12,1 \pm 6,7$ godina) i 544 člana (265 muškaraca i 279 žena) iz ukupno 204 obitelji (59).

Gyorffy i sur. u populacijskoj studiji u Mađarskoj analizirali su polimorfne biljege *Apal*, *BsmI*, *FokI*, *TaqI* i *Tru 9I* gena za VDR u ispitanika mlađe životne dobi. Uočili su da prisutnost alela "b", "a" i "u" povećava sklonost obolijevanju od T1ŠB u djevojčica. Utjecaj alela "t" i "T" nisu mogli ispitati jer rezultat nije bio u skladu s Hardy-Weinbergovom jednadžbom. Ispitanu grupu je činilo 107 oboljele djece (dob javljanja T1ŠB od 1 do 14 godine, srednja dob javljanja bolesti $5,8 \pm 3,2$ godine, 57 dječaka i 50 djevojčica) i 103 usporedna ispitanika, dobrovoljnih davalaca krvi (53 muškarca i 50 žena) (61).

Turpeinen i sur. u populacijsko-obiteljskoj studiji o 1064 oboljela od T1ŠB, 2000 usporednih ispitanika i 544 obitelji ispitali su tri polimorfna biljege *Apal*, *BsmI* i *FokI* gena za VDR. Svi oboljeli manifestirali su T1ŠB prije 15. godine, a 54% ih je bilo muškog spola. Dobili su značajnu različitost učestalosti alela i pojedinačnih genotipova gena za VDR u populacijama triju različitih regija Finske, graničnu statističku značajnost u učestalosti polimorfnih biljege *BsmI* i *FokI* između oboljelih i zdravih, te povećani prijenos haplotipa "AA", "bb" i "FF" s roditelja na oboljele muške potomke. Nakon korekcije multiplog testiranja zaključili su da navedena tri polimorfna biljege gena za VDR nisu povezana s T1ŠB (64).

Neskladnost iznesenih rezultata povezanosti opisanih polimorfizma gena za VDR i sklonosti za obolijevanje od T1ŠB nastaje zbog: prvo – više je uzročnih putova T1ŠB, drugo – u svim studijama nije obavljena korekcija multiplog testiranja kojom se smanjuje rizik od pojave lažno pozitivnih rezultata, treće – različita je veza pojedinih polimorfizama i nastanka bolesti u različitim populacijama. Različitost učestalosti alela u različitim etničkim skupinama može se objasniti različitim evolucijskim linijama.

S obzirom na iznesene rezultate o vezi opisanih polimorfizama gena za VDR i T1ŠB, moguće je da postoji različita nasljedna sklonost za obolijevanje od T1ŠB u različitim etničkim grupama.

Vitamin D ostvaruje svoju pleiotropnu, metaboličku i imunomodulatornu aktivnost preko receptora vitamina D koji pripada obitelji steroidnih receptora. Otkriće VDR u mnogim stanicama imunološkog sustava, uključujući B-limfocite, aktivirane T-limfocite, makrofage te u beta stanicama gušterače, pojačavalo je ideju o fiziološkoj ulozi vitamina D kao imunostnog usklađivača, pa je gen za VDR s pravom svrstan u grupu tzv. prirodnih gena kandidata za nastanak T1ŠB.

Do sada nisu potpuno razjašnjene funkcijske posljedice opisanih polimorfizama u genu za VDR. *BsmI* i *Apal* polimorfizmi nalaze se u intronima, nekodirajućim odsječcima gena, što bi značilo da opisane nukleotidne promjene ne bi trebale dovoditi do promjene aktivnosti genskog produkta.

Međutim, postoji mogućnost povezanosti opisanih nukleotidnih promjena s drugim, blizu smještenim primljivim genom za T1ŠB, s drugim nukleotidnim promjenama unutar samog gena za VDR, kao što su: dio egzona, aleli smješteni unutar promotorskog slijeda gena za VDR. Promjene intronskog slijeda ipak mogu djelovati na razinu transkripcije i/ili stabilnost mRNA, posljedično na proteinski izražaj i s tim na biološku aktivnost (56-59,62,85,86,87).

BsmI, *Apal* i *TaqI* polimorfizmi se nalaze u blizini 3' kraja gena, koji je uključen u regulaciju genskog izražaja kroz učinak na stabilnost mRNA, što može objasniti uočenu povezanost *BsmI*, *Apal* i/ili *TaqI* polimorfizama s T1ŠB.

Dvije 3' kraj varijante, povezane s najčešćim haplotipovima "baT" i "BAt" vjerojatno stabiliziraju VDR mRNA (93). Pretpostavlja se da je stabilnost mRNA moguće uzrokovana različitostima alela, ali se razmatraju i druge mogućnosti.

Zatim je pokazana različitost funkcije kodona u kojem je *FokI* polimorfizam i područja nazvanog poli(A) slijed unutar 3' kraja. U staničnim linijama fibroblasta s različitim VDR genotipom (genotip s "F" i "f" alelima te genotip s poli(A) slijedom dugih i kratkih alela), transkripcijska učinkovitost VDR bjelančevine se razlikovala. Jedno od mogućih objašnjenja jest i razlika u translacijskoj aktivnosti (više nego u stabilnosti mRNA) različitih varijanti mRNA (87).

Prema različitostima nivoa serumskih biljega (osteokalcin, kalcitriol, parathormon) pokušao se analizirati odaziv na različite VDR genotipove.

VDR djeluje na vitamin D gene odaziva (engl. *vitamin D responsiveness genes*) preko genski specifičnih elemenata odaziva (engl. *vitamin D responsive elements, VDREs*), što dovodi do izlučivanja bjelančevina u cirkulaciju. Obavljeno je sedamnaest takvih studija, najčešće je analiziran osteokalcin kao visoko specifična bjelančevina odaziva na vitamin D. Osteokalcin je pokazatelj mijene kostiju i često se mjeri u kliničkoj praksi. U osam studija su osobe s "BAt" haplotipom imale više vrijednosti osteokalcina (87)

In vivo studije odaziva na liječenje u odnosu na različite VDR genotipe su obavljane mjerenjem gustoće koštane mase a nakon uzimanja kalcitriola, kortikosteroida,

bifosfonata. Četiri studije pokazale su bolji terapijski odaziv kod osoba s "BA_T" haplotipom. Izgleda da ispitanici s "BA_T" haplotipom koji je povezan s kratkim poli(A) slijedom alela unutar 3' kraja gena bolje odgovaraju na liječenje nego ispitanici s "ba_T" haplotipom koji je povezan s dugim poli(A) alelima (87). Međudjelovanje promotorskog, kodirajućeg i regulacijskog (3' kraja) područja je pokazano u radu Whitfielda i suradnika (94). U normalno aktivnim stanicama polimorfizmi unutar promotora udruženo djeluju s polimorfizmima 3' kraja u reguliranju primjerene količine VDR mRNA. Zajedno, oni određuju izražaj *FokI* alela ("F" i "f") koji su funkcijski različite bjelančevine, a one utječu na vitamin D elemente odgovora da pobude izražaj gena. Primjer su osobe s "f" alelima koje imaju manju aktivnost VDR bjelančevina i koje slabije odgovaraju na djelovanje kalcitriola. Važno je spoznati sve polimorfizme VDR gena i njihovo međudjelovanje s ciljem određivanja VDR izražaja i aktivnosti.

Kalcitriol može utjecati na patogenezu T1ŠB, budući da je bolest autoagresivna i da kalcitriol djeluje na imunostani sustav.

Kalcitriol sprječava proliferaciju limfocita T i stvaranje IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF i interferona (IFN)- γ . Navedeni citokini igraju važnu ulogu u razvoju limfocita T, za koje se zna da sudjeluju u patogenezi nekoliko kroničnih, upalnih, autoagresivnih bolesti (79-81). Upalni citokini potiču izražaj kemokina koji pridonose nakupljanju imunostanih stanica u beta stanicama i procesu staničnog razaranja (75). Kalcitriol smanjuje stvaranje limfocita T i posljedično stvaranje protutijela (82-84).

Sljedeći način na koji vitamin D može zaštitno djelovati u T1ŠB je njegova imunomodulatorna sposobnost izražena kroz dokaze o sprječavanju nastanka šećerne bolesti u NOD miševa primjenom sintetskog analoga kalcitriola, te kroz podatke o poremećaju enzimatskog sustava 1-alfa hidroksilaze koji stvara kalcitriol, u makrofagima istih NOD miševa (74,75,94).

Nedostatak kalcitriola u ranom životnom periodu u NOD miševa vodi ranijem i agresivnijem početku T1ŠB i većoj konačnoj incidenciji bolesti. U imunostani sustavu miševa s nedostatkom kalcitriola nisu uočene promjene fagocitoze i kemotaksije makrofaga kao u miševa s rahitisom, već promjene citokinskog profila sa smanjenjem izražaja IL-1 i IL-6. Nedostatak je potvrđen smanjenom koncentracijom serumskog kalcitriola, a vrijednosti serumskog kalcija i sadržaja kalcija u koštanoj

masi nisu se razlikovale u odnosu na kontrolnu skupinu miševa bez nedostatka kalcitriola (75).

Kalcitriol ima zaštitnu ulogu i prema beta stanicama. VDR i kalcitriol djeluju na stvaranje i izlučivanje inzulina te sprječavaju oštećenje i uništavanje beta stanica citokinima (72,73,79,81-84).

Nedostatak kalcitriola dovodi do smanjenja nivoa mRNA inzulinskih receptora, do promjena u procesu glikolize i unutar Krebsovog ciklusa (73,87). Proces stvaranja i izlučivanja inzulina je ovisan o kalciju i energiji nastaloj razgradnjom glukoze unutar beta stanice. Radioaktivnim obilježavanjem glukoze izotopom tricija uočeno je smanjenje potroška glukoze (što navodi na promjene unutar glikolize), a obilježavanje glukoze izotopom ugljika smanjenje omjera oksidacija/potrošak glukoze (što navodi na promjene unutar Krebsovog ciklusa) (73,87). Nedostatka kalcitriola dovodi do promjene koncentracije unutarstaničnog kalcija u adipocitima i do povećanja lipogeneze, što uz spomenuti učinak na sekreciju inzulina predstavlja moguće objašnjenje povezanosti opisanih polimorfizama u genu za VDR i T2ŠB (87,98-100).

U dva velika istraživanja pokazana je povezanost između redovite primjene vitamina D u dojenačkom razdoblju i smanjenja incidencije T1ŠB (76,77).

U sedam europskih zemalja, smještenih na 42 do 57 stupnjeva geografske širine, je u studiji s 820 djece oboljele od T1ŠB i 2335 usporednih ispitanika slične dobi, izračunato da je šansa za pojavu bolesti do 15. godine za oko 1/3 manji u onih koji su primjereno prošli kroz program antirahitične profilakse u odnosu na one koji nisu (76). U Finskoj je antirahitična profilaksa bila povezana sa smanjenom učestalošću T1ŠB u 10 821 djeteta rođenog 1966. godine i praćenog sljedećih 30 godina. Ispitanici koji su redovito primali propisanu dozu od 2000 jedinica vitamina D tijekom prvih 12 mjeseci života, imaju manje izgleda obolijevanja od T1ŠB u usporedbi s onima koji su primali manju dozu od propisane ili su je primali neredovito. Izgledi obolijevanja od T1ŠB su tri puta veći u onih koji su očitovali hipovitaminski rahitis (77).

Slična zaštitna uloga vitamina D opisana je u Norveškoj gdje je primjena ribljege, bakalarova ulja u trudnica dovela do niže incidencije T1ŠB u njihovih potomaka. Autori razmišljaju o jačoj bioraspoloživosti vitamina D u ribljem ulju i mogućem učinku masnih kiselina kao zaštitnim čimbenicima (78).

Program antirahitične profilakse provodi se u mnogim zemljama, ali ne može se strogo kontrolirati. Svakodnevno davanje vitamina D često se izostavlja pa stanja

nedostatka vitamina D i/ili hipovitaminskog rahitisa u nekim zemljama nisu nikad iskorijenili. Ovo je mogući čimbenik porasta incidencije T1ŠB u nekim industrijskim zemljama, u prvom redu srednje i istočne Europe.

Zapaženi rezultati ipak ne podrazumijevaju i mijenjanje postojećeg programa profilakse rahitisa vitaminom D u dojenačkoj i ranoj dječjoj dobi. Izneseno može dovesti do oblikovanja novog programa primarne prevencije T1ŠB korištenjem vitamina D ili njegovih aktivnih metabolita u genetski primljivih osoba. Program primarne prevencije trebao bi biti široko prihvaćen da bismo nakon niza godina mogli procijeniti pozitivne učinke. Ograničeni tj. pojedinačni zahvati nisu poželjni obzirom na potencijalne nuspojave hormona na metabolizam kalcija. Na tom polju valja očekivati nastanak tzv. novoga normokalcemičkog analoga vitamina D koji bi zadržao svoj imunomodulatorni učinak na beta staničnu masu. Stoga su ovakva i slična istraživanja poželjna na različitim populacijama i na većem broju ispitanika kako bi zaključci bili precizniji i ispravniji.

Naše istraživanje nije pokazalo povezanost ispitivanih polimorfni biljega gena za IL-1R1 sa sklonošću obolijevanja od T1ŠB u populaciji Dalmacije.

IL-1R1 je prijenosnik signala za IL-1, citokin s važnom ulogom u imunološkom i upalnom odzivu i posrednik u nizu autoagresivnih bolesti, uključujući i T1ŠB. In vitro je IL-1 citotoksičan za beta stanice gušterače zajedno s citokinom faktorom tumorske nekroze alfa (TNF α) (67,68).

Dva oblika IL-1, IL-1 α i IL-1 β , zajedno s svojim strukturalno povezanim antagonistom IL-1ra, su različiti genski produkti, ali se vezuju na zajednički receptor IL-1R1 (66). Drugi stanični, površinski receptor IL-1R2 je "receptor mamač". IL-1R1 pronađen je na mnogim stanicama, uključujući T-limfocite i beta stanice, dok je IL-1R2 uočen na neutrofilima, monocitima, stanicama koštane srži i limfocitima. IL-1 u pikomolarnim i nanomolarnim koncentracijama izaziva citotoksični učinak na beta stanice u in vitro pokusima. Zanimljivo kako su beta stanice gušterače, za razliku od drugih stanica, jako osjetljive na IL-1 pa trebaju neočekivano visoku koncentraciju receptor antagonista da bi spriječile IL-1 pokrenute promjene funkcionalne stanične aktivnosti (67,68).

Gen za IL-1R1 je dio genskog sklopa koji se prostire na 530 kb kromosoma 2q12-22, a sadrži : 1) gen za IL-1R2; 2) gen za IL-1R1; 3) gen za IL-1RL2 (interleukin-1 receptoru pridruženi protein 2); 4) gen za IL-RL1 (interleukin-1

receptoru pridruženi protein 1) koji je sastavni dio gena za interleukinu-1 sličan citokin interleukin 18 (IL-18R1) (54,102).

Gen za IL-1R1 je dug 74 kb, sadrži promotorsko područje (egzon 1A, egzon 1B, egzon 1C), 11 kodirajućih egzona (2 do 12), te pripadajuće introne. Tri promotora upravljaju transkripcijom, oni nemaju tipične TATA i CAAT dijelove, te dijelom mogu biti regulirani s Sp-1 i AP-1 mjestom.

U području koje ograničava egzon 1B i 1C, u uzvodnom dijelu introna analizirali smo polimorfizme *HinfI* i *PstI*, te u nizvodnom dijelu introna polimorfizam *AluI*. Do sada se ne poznaje moguće funkcijsko transkripcijsko djelovanje ovih polimorfizama (54,102).

Među prvim studijama izneseni su rezultati animalnog pokusa u NOD miševa, gdje je primjena solubilnog IL-1R1 spriječila nastanak eksperimentalnog T1ŠB (71). Zatim je uslijedilo nekoliko genetskih studija s kontroverznim-dvojbjenim rezultatima o povezanosti ispitivanih polimorfizama gena za IL-1R1 na sklonost obolijevanju od T1ŠB.

Bergholdt i sur. pokazali su povezanost polimorfnog biljega *PstI*, gena za IL-1R1 s nastankom T1ŠB. Polimorfizam je rezultat zamjene baze citozina s timinom u egzonu 1B gena za IL-1R1. Ovaj rad je kombinacija obiteljske i populacijske studije, Analiza unutar 97 obitelji nije pokazala povezanost u prijenosu alela i izražavanju bolesti (52).

U svom drugom radu objavili su rezultate obiteljske studije napravljene u 103 obitelji s jednim oboljelim potomkom te u 150 obitelji s više oboljelih potomaka. Pokazana je značajna veza polimorfnog biljega *HinfI* unutar promotorske regije gena i sklonosti za obolijevanje od T1ŠB, dok polimorfni biljezi *PstI* i *AluI* iste regije nisu dali znakovite rezultate. Grupa oboljelih imala je veću koncentraciju IL-1R1, ali rezultat nije bio značajan. Homozigoti s prisutnim *HinfI* restrikcijom mjestom imali su više koncentracije IL-1R1, a isti genotip bio je češći u oboljelih (54).

Metcalf i sur. napravili su populacijsku studiju u tri etnički vrlo različite skupine s različitom incidencijom T1ŠB. U ispitanika iz Velike Britanije pronašli su povezanost polimorfnog biljega *PstI*, smještenog u egzonu 1B gena za IL-1R1 s nastankom T1ŠB, u ispitanika iz Finske potvrđena je povezanost samo s oboljelima od T1ŠB koji nemaju visoko rizične haplotipove HLA-DR3 i DR4, a u ispitanika iz južne Indije nije uočena povezanost (53).

U ovoj studiji pokazali smo povezanost polimorfizama unutar polimorfnih biljega *TaqI* i *FokI*, gena za VDR sa sklonošću za obolijevanje od T1ŠB u populaciji Dalmacije. Analiza dvaju polimorfnih biljega između egzona 8 i 9 te po jednog polimorfnog biljega u egzonu 2 i 9 upućuje da su združeni genotipovi "BBAAtt" i "BBAAttFf" zastupljeniji među oboljelima, što bi značilo da osobe s takvim genotipom imaju veću mogućnost da obole od T1ŠB. Važnost ove povezanosti, dakako, traži potvrdu u budućim studijama na našoj populaciji. Analizom triju polimorfnih biljega unutar promotorske regije gena za IL-1R1 pokazali smo da ne postoji povezanost između ispitivanih polimorfizama i sklonosti za obolijevanje od T1ŠB.

8.0 ZAKLJUČAK

1) Sklonost obolijevanju od T1ŠB u populaciji Dalmacije određena je različitostima u pojedinačnim i združenim genotipovima četiriju polimorfni biljega (*BsmI*, *AluI*, *TaqI*, *FokI*) unutar gena za VDR.

Distribucija pojedinačnih genotipova polimorfni biljega *TaqI* (genotip "tt") i *FokI* (genotip "ff") gena za VDR između oboljelih i ispitanika usporedne skupine se je razlikovala. Uočena je učestalost pojedinačnih genotipova "tt" i "ff" u skupini oboljelih.

Združeni genotip "BBAAtt" triju polimorfni biljega gena za VDR, izgleda povećava sklonost za obolijevanje od T1ŠB jer je četiri puta učestaliji u oboljelih, a genotip "BbAaTt" ima zaštitnu ulogu jer je učestaliji u skupini usporedni ispitanika.

Združeni genotip "BBAAttFf" za četiri polimorfna biljega gena za VDR povećava sklonost za obolijevanje od T1ŠB jer je šest puta učestaliji u oboljelih, a združeni genotip "bbAaTTFF" prisutan je u sedam bolesnika, a nije zabilježen u skupini usporedni ispitanika.

2) Povezanost polimorfizama gena za IL-1R1 sa sklonošću obolijevanju od T1ŠB u populaciji Dalmacije nije pokazana jer nije uočena različitost među ispitanim grupama u zastupljenosti pojedinačnih ni združenih genotipova za polimorfne biljege *PstI*, *HinfI* i *AluI* gena za IL-1R1.

3) Logističkom regresijom kojom smo združili sve ispitivane promjenjive veličine (dobnu skupinu, spol, polimorfizme gena za VDR i polimorfizme gena za IL-1R1) dobili smo da relativna šansa za nastanak T1ŠB raste dvostruko u skupini homozigota "tt" za prisutnost restrikcijskog mjesta prema homozigotima "TT" za odsutnost restrikcijskog mjesta (polimorfni biljeg *TaqI* gena za VDR). Relativna šansa za nastanak T1ŠB veći je 2.2 puta u skupini homozigota "ff" za prisutnost restrikcijskog mjesta prema homozigotima "FF" za odsutnost restrikcijskog mjesta (polimorfni biljeg *FokI* gena za VDR). Relativna šansa za nastanak T1ŠB raste 2.2 puta među heterozigotima "Aa" u odnosu na homozigote za odsutnost restrikcijskog mjesta "AA" (polimorfni biljeg *AluI* gena za IL-1R1).

4) Združivanjem genotipova obaju gena VDR i IL-1R1, nije se pokazala nijedna kombinacija kao značajna u nastanku T1ŠB u populaciji Dalmacije.

5) Postoji različita nasljedna sklonost za nastanak T1ŠB u različitim etničkim skupinama. Naši rezultati još jednom potvrđuju povezanost polimorfizma gena za VDR i sklonost obolijevanju od T1ŠB.

9.0 SAŽETAK

T1ŠB nastaje zbog samorazaranja beta stanica gušterače. Uzrok nastanka T1ŠB je međudjelovanje nasljednih čimbenika i čimbenika okoliša. Obiteljske i blizanačke studije pokazale su genetsku podlogu razvoja T1ŠB. Geni HLA sustava, pridonose najviše sklonosti za nastanak T1ŠB. Tijekom posljednjeg desetljeća postalo je moguće određivati ostale gene smještene unutar genoma, a koji povećavaju sklonost za nastanak T1ŠB. Do sada je izdvojeno više od dvadeset gena izvan HLA regije, oni imaju slabi ili umjereni učinak na primljivost. Izgleda da određeno međudjelovanje gena sa slabim i/ili umjerenim učinkom može imati snažan učinak na primljivost za bolest. Opisani učinak čini genetske postupke lokalizacije, izdvajanja i potvrde njihove uloge u neovisnim studijama prilično teškim.

U ovoj disertaciji istražena je zastupljenost alela, pojedinačnih i kombiniranih genotipova polimorfnih biljega u genima receptora IL-1 i vitamina D među oboljelima od T1ŠB i usporednim ispitanicima. Receptori su prijenosnici signala citokina IL-1 i hormona vitamina D za koje se vjeruje da sudjeluju u nastanku i razvoju T1ŠB. Sklonost za nastanak T1ŠB u populaciji Dalmacije određena je i različitostima u polimorfnim biljezima *TaqI* i *FokI* gena za VDR i genotipskim združivanjem četiriju polimorfnih biljega (*BsmI*, *AluI*, *TaqI*, *FokI*) istog gena. Pojedinačni genotipovi "tt" i "ff" gena za VDR učestaliji su u oboljelih od T1ŠB. Relativna šansa za nastanak T1ŠB veća je u ispitanika s genotipom "tt" prema ispitanicima s genotipom "TT", kao i u ispitanika s genotipom "ff" prema onim s genotipom "FF". Združeni genotipovi "BBAAAtt", "BBAAAttFf" i "bbAaTTFF" donose šansu obolijevanja od T1ŠB.

Povezanost gena za IL-1R1 s primljivošću za T1ŠB nije pokazana, jer nije uočena različitost zastupljenosti pojedinačnih i združenih genotipova polimorfnih biljega *PstI*, *HinfI* i *AluI* gena za IL-1R1. Združivanjem genotipova obaju gena VDR i IL-1R1 nije se izdvojilo nijedno sjedinjenje koje bimo mogli opisati kao rizično u nastanku T1ŠB. Logističkom regresijom dobili smo da je relativna šansa za nastanak T1ŠB veća među heterozigotima "Aa" (polimorfni biljeg *AluI*, gena za IL-1R1) u odnosu na homozigote za odsutnost restrikcijskog mjesta "AA".

T1ŠB je izgleda jedinstvena autoagresivna bolest jer između primljivih i zaštitnih gena postoji stalno nadmetanje. Cilj idućih istraživanja bio bi otkriti sve gene koji su uključeni u nastanak T1ŠB i njihovo međudjelovanje, te protumačiti razlike među populacijama. Tek tada ćemo genetsku informaciju moći koristiti u otkrivanju osoba primljivih za razvoj T1ŠB. Krajnji cilj bio bi odgoditi nastanka ili sprječavanje bolesti. Oblikovanje djelotvornih metoda prevencije uključuje i razumijevanje kako i koji negenetski čimbenici djeluju na sklonost za nastanak T1ŠB.

9.0 SUMMARY

POLYMORPHISMS OF INTERLEUKIN-1 AND VITAMIN D RECEPTOR GENE AND SUSCEPTIBILITY TO TYPE 1 DIABETES

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) results from the autoimmune destruction of the insulin-producing beta cells of the pancreas. A combination of genetic and environmental factors is most likely the cause of T1DM.

Family and twins studies have shown clearly that T1DM has a genetic basis. It is clear that HLA region genes collectively contribute to the major susceptibility for this metabolic syndrome. Within past decade has been possible to identify the genes distributed across the genome that increase susceptibility to this disorder. More than 20 putative diabetes predisposing genes have been localised in addition to HLA region. The overall effects of non-HLA predisposing genes could be weak or modest, probably by acting in concert with other such genes to cause disease.

We have therefore studied the influence of vitamin D receptor (VDR) gene and interleukin-1 type 1 receptor gene (IL-1R1) on T1DM susceptibility in Dalmatian population. Receptors are signal transducers of cytokine interleukin-1 and vitamin D which have been suggested to play a role in pathogenesis of T1DM.

With shown differences about single polymorphism and genotype combinations of four polymorphisms (*BsmI*, *AluI*, *TaqI*, *FokI*) within VDR gene, we confirm that vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to T1DM correlation exists.

Correlation between IL-1R1 gene and T1DM was not proved, we did not notice differences between frequencies of single polymorphism and genotype combinations of three polymorphisms (*PstI*, *HinfI* i *AluI*) within IL-1R1 gene.

Combined polymorphisms of both, VDR and IL-1R1 genes did not show which genotype carries susceptibility for T1DM.

In conclusion we can say that associaion between VDR gene polymorphisms and susceptibility for T1DM exists in Dalmatian population.

10.0 LITERATURA

1. Atkinson MA, Maclaren NK. Mechanisms of disease: the pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994;331: 1428-36.
2. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001;358: 221-9.
3. Turner R, Stratton I, Horton V, Manley S, Zimmet P, Mackay IR et al. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Lancet* 1997;350: 1299-93.
4. Scherthaner G, Hink S, Kopp HP, Muzyka G, Streit G, Kroiss A. Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type 1,5 diabetes). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109: 94-108.
5. Pozzilli P, Mario Di U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (Latent Autoimmune Diabetes of the Adult) – definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care*, 2001;24: 1460-7.
6. Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP, Mordes JP. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Rev* 1993;1: 43-75.
7. Todd JA. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunol Today* 1990;1: 122-9.
8. Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Yamagata K et al. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42: 1332-40.
9. Field LL. Genetic linkage and association studies of type 1 diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia* 2002;45: 21-35.
10. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta genes contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987;329: 599-604.
11. Khalil I, d Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I et al. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990;85: 1315-9.
12. Todd JA. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *BioEssays* 1999;21: 164-74.
13. Buzzeti R, Quattrocchi CC, Nistico L. Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabetes Metab Rev* 1998;14: 111-28.
14. Warram JH, Krolewski AS, Kahn CR. Determinants of IDDM and perinatal mortality in children of diabetic mothers. *Diabetes* 1998; 37: 1328-34.
15. Knip M, Akerblom HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107: 93-100.
16. Dalquist GG. Viruses and other perinatal exposures as initiating events for beta-cell destruction. *Ann Med* 1997;29: 413-7.

17. Ellis TM, Atkinson MA. Early infant diets and insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1996;347: 1464-5.
18. Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Yu L, Hoffman M, Chase HP et al. Lack of association between early exposure to cows milk protein and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Autoimmunity Study in Young. JAMA* 1996;276: 609-14.
19. Graves PM, Barriga KJ, Norris JM, Hoffman MR, Yu L, Eisenbarth GS et al. Lack of association between early childhood immunizations and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Care* 1999;22: 1694-7.
20. Hummel M, Fuchtenbusch M, Schenker M, Ziegler AG. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB Study. *Diabetes Care* 2000;23: 969-74.
21. Hyponen E, Kenward MG, Virtanen SM, Piitulainen A, Virta-Autio P, Tuomilehto J et al. Infant feeding, early weight gain, and risk of type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care* 1999;22: 1961-5.
22. Lonrot M, Salminen K, Knip M, Savola K, Kulmala P, Leinikki P et al. Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) study group. *J Med Virol* 2000; 61: 214-20.
23. Fava D, Gardner S, Pyke D, Leslie RD. Evidence that the age at diagnosis of IDDM is genetically determined. *Diabetes Care* 1998;21: 925-9.
24. Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS et al. Heterogeneity of Type 1 Diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 2001;44: 354-62.
25. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. For the WHO DIAMOND Project group. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993;36: 883-892.
26. Stipančić G, Kadrnka-Lovrenčić M, Radica A. Incidence of childhood onset insulin dependent diabetes mellitus in Croatia (Abstracts). *Diabetologia* 2000; 1 Suppl 43: 359.
27. Anonymous. EURDIAB ACE study group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* 2000;355: 873-6.
28. Onkamo P, Vonnens S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type 1 diabetes – the analysis of data on published incidence trends. *Diabetologia* 1999;42: 1395-403.
29. LaPorte RE, Tajima N, Akerblom HK, Berlin N, Brosseau J, Christy M et al. Geographic differences in the risk of insulin-dependent diabetes mellitus: the importance of registries. *Diabetes Care* 1985; 1 Suppl 8: 101-7.
30. Green A, Gale EA, Patterson CC, for the EURODIAB ACE study. Incidence of childhood-onset insulin dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE study. *Lancet* 1992;339: 905-9.
31. Muntoni S. New insights into the epidemiology of type 1 diabetes in Mediterranean countries. *Diabetes Metab Res Rev* 1999;15: 133-40.

32. Rossini AA, Greiner DL, Friedman HP, Mordes JP. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes Review* 1993;1: 43-75.
33. Todd JA. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunology Today* 1990;11: 122-29.
34. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocrinology Review* 1994;15: 516-42.
35. Wilkin TJ. Autoantibodies as mechanisms, markers and mediators of B-cell disease. *Diabetes Metab Rev* 1991;7 :105-120.
36. Leslie RDG, Atkinson MA, Notkins AL. Autoantigens IA-2 and GAD in Type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1999;42: 3-14.
37. Roll U, Christie MR, Fuchtenbusch M, Payton MA, Hawkes CJ, Ziegler AG. Perinatal autoimmunity in offspring of diabetic parents. The German Multicenter BABY-DIAB study: detection of humoral immune responses to islet antigens in early childhood. *Diabetes* 1996;45: 967-73.
38. Lindberg B, Ivarsson SA, Landin-Olsson M, Sundkvist G, Svanberg L, Lernmark A. Islet autoantibodies in cord blood from children who developed Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus before 15 years of age. *Diabetologia* 1999;42; 181-7.
39. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offsprings of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 1999;48: 460-8.
40. Hagopian WA, Sanjeevi CB, Kockum I, Landin-Olsson M, Karlens AE, Sundkvist G et al. Glutamate decarboxylase, insulin, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest* 1995;95: 1505-11.
41. Lipton RB, Atchison J, Dorman JS, Dugesnoy RJ, Eckenrode K, Orchard TJ et al. Genetic, immunological, and metabolic determinants of risk for type 1 diabetes mellitus in families. *Diabet Med* 1992;9: 224-32.
42. Redondo MJ, Rewers M, Yu T, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB et al. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *BMJ* 1999;318: 698-702.
43. Petersen JS, Kyvik KO, Bingley PJ, Gale EA, Green A, Dyrberg T et al. Population based study of prevalence of islet cell autoantibodies in monozygotic and dizygotic Danish twin pairs with insulin dependent diabetes mellitus. *BMJ* 1997;314: 1575-9.
44. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA et al. Prediction on type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996;45: 926-33.
45. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK, Genovese S, Bottazzo GF, Gale EA. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997;46: 1701-10.
46. Landler E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995;11: 241-7.

47. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. II. The power of affected relative pairs. *Am J Hum Genet* 1990;46: 229-41.
48. Sheehy Mj, Scarf SJ, Rowe JR, Neme de Gimenez MH, Meske LM, Erlich HA et al. A diabetes susceptibility HLA haplotype is best defined by combination of HLA-DR and –DQ alleles. *J Clin Invest* 1989;83: 830-5.
49. Ridgway WM, Fathman CG. The association of MHC with autoimmune diseases: understanding the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86: 3-10.
50. Thomson G. HLA disease associations: a model for the study of complex human genetic disorders. *Annu Rev Genet* 1988;22: 31-50.
51. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission distortion test for linkage: the insulin gene and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hum Genet* 1993;52: 506-16.
52. Bergholdt R, Karlsen A, Johannesen J, Hansen PM, Dinarello C, Nerup J. et al. Characterization of polymorphisms of an interleukin-1 receptor type 1 gene (IL1R1) promoter region (P2) and their relation to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Cytokine* 1995; 7: 727-33.
53. Metcalfe KA, Hitman GA, Pociot F, Bergholdt R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J et al. An association between type 1 diabetes and the interleukin-1 receptor type 1 gene. *Hum Immunol* 1996;51: 41-8.
54. Bergholdt R, Larsen ZM, Andersen NA, Johannesen OP, Mandrup-Poulsen T, Nerup J et al. Characterization of new polymorphisms in the 5' UTR of the human interleukin-1 receptor type 1 (IL1R1) gene: linkage to type 1 diabetes and correlation to IL-1RI plasma level. *Genes Immunol* 2000;1: 495-500.
55. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolde BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ et al. Allelic variations in the vitamin D receptor influences susceptibility to IDDM in Indian Asians. *Diabetologia* 1997;40: 971-5.
56. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type I diabetes in Germans. *Diabetes* 2000; 49: 504-7.
57. Chang TJ, Lei HH, Yeh JI, Chiu KC, Lee KC, Chen MC et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 575-80.
58. Ban Y, Taniyama M, Yanagawa T, Yamada S, Maruyama T, Kasuga A et al. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism influences genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Japanese population. *BMC Med Genet* 2001; 2-7.
59. Guja C, Marshall S, Welsh K, Merriman M, Smith A, Todd JA et al. The study of CTLA-4 and vitamin D receptor polymorphisms in the Romanian type 1 diabetes population. *J Cell Mol Med* 2002;6: 75-81.

60. Fassbender WJ, Goertz B, Weismuller K, Steinhauer B, Stracke H, Auch D et al. VDR gene polymorphisms are overrepresented in German patients with type 1 diabetes compared to healthy controls without effect on biochemical parameters of bone metabolism. *Horm Metab Res* 2002;34: 330-7.
61. Gyorffy B, Vasarhelyi B, Krikowzky D, Madacsy L, Tordai A, Tulassay T et al. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2002;147: 803-8.
62. Škrabić V, Zemunik T, Šitum M, Terzić J. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Res Clin Prac* 2003; 59: 31-5.
63. Motohashi Y, Yamada S, Yanagawa T, Maruyama T, Suzuki R, Niino M et al. Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88: 3137-40
64. Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine AP, Simell O, Knip M et al. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in Finnish population. *Eur J Endocrinol* 2003;149: 591-6.
65. Guilietu A, Gysemans C, Stoffels K, Etten van E, Decallonne B, Overbeegh L et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2004;47: 451-62.
66. Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol* 1998;16: 457-99.
67. Mandrup-Poulsen T, Zumsteg U, Reimers J, Pociot J, Morch L, Heqvist S et al. Involvement of interleukin-1 and interleukin-1 antagonist in pancreatic β -cell destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytokine* 1993;5: 185-91.
68. Mandrup-Poulsen T. The role of interleukin-1 in pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1996;39: 1005-29.
69. Kristiansen OP, Pociot F, Johannesen J, Bergholdt R, Dinarello CA, Nerup J. et al. Linkage disequilibrium testing of four interleukin-1 gene-cluster polymorphisms in Danish multiplex families with insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytokine*, 2000;12: 171-5.
70. Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG et al. Interleukin-1 signaling occurs exclusively via the type 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 6155-9.
71. Nicoletti F, Marco RD, Barcellini W, Magro G, Schorlemmer HU, Kurrle R et al. Protection from experimental autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse with soluble interleukin-1 receptor. *Eur J Immunol* 1994;24: 1843-7.
72. Frankel BJ, Heldi AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 1980;209: 823-5.
73. Billaudel S, Barakat L, Faure-Dussert A. Vitamin D3 deficiency and alterations of glucose metabolism in rat endocrine pancreas. *Diabetes Metab* 1998;24: 344-50.
74. Mathieu C, Laureys J, Sobis H. 1,25-Dihydroxy vitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice. *Diabetes* 1992;41: 1491-5.

75. Giulietti A, Gysemans C, Stoffels K, Etten van E, Decallonne B, Overbeegh L et al. Vitamin D deficiency in early life accelerates Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2004;47: 451-62.
76. The EURODIAB Substudy I Study Group. Vitamin D supplement in early childhood and risk for type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42: 51-4.
77. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001;358: 1500-3.
78. Stene LC, Ulriksen J, Magnus P, Joner G. Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type 1 diabetes in the offspring. *Diabetologia* 2000;43: 1093-8.
79. Muler K, Bendtzen K. Inhibition of human T lymphocyte proliferation and cytokine production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Differential effects on CD45RA+ and CD45RO+ cells. *Autoimmunity* 1992;14: 37-43.
80. D Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R et al. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest* 1998;101:252-62.
81. Rigby WFC, Denome S, Fanger MW. Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Clin Invest* 1987;79: 1659-64.
82. Tsoukas CD, Provedini SC, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3: a novel immunoregulatory hormone. *Science* 1984;224: 1438-40.
83. Lemire JM. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;53: 599-602.
84. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppress human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol* 1985;134: 3032-5.
85. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S et al. Structural organisation of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 1997;11: 1165-79.
86. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13: 325-49.
87. Uitterlinden AU, Fang Y, van Meurs YBJ, Pols HAP, van Leeuwen PTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004;338: 143-56.
88. Ortlepp J, Lauscher J, Hoffmann R, Hanrath P, Joost H. The vitamin D receptor gene variants is associated with the prevalence of Type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet Med* 2001;18: 842-5.
89. Harris MI, Hadden WC, Knowler WC, Bennet PH. International criteria or the diagnosis of diabetes and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 1985;8: 562-7.
90. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, Editors. PCR a practical approach. New York: Oxford University Press, 1991.

91. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY. 1982.
92. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*. 2nd ed. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1999: 553.
93. Gross C, Krishan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D. The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants. *J Bone Miner Res* 1998;13: 1691-9.
94. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:6665-9).
95. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 2001;177: 145-59.
96. Overbeegh L, Decallone B, Valecx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J et al. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 2000;120: 139-46.
97. Sandler S, Buschard K, Bendtzen K. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the analogues MC903 and KH 1060 on interleukin-1 beta-induced inhibition of rat pancreatic islet beta-cell function in vitro. *Immunol Lett* 1994;41: 73-7.
98. Aterini S, Pacini S, Amato M, Ruggiero M. Vitamin D receptor gene polymorphism and diabetes mellitus prevalence in hemodialysis patients. *Nephron* 2000;2: 84-6.
99. Hitman GA, Mannan N, McDermott MF, Agauna E, Ogunkolade BW, Hales CN et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence insulin secretion in Bangladeshi Asians. *Diabetes* 1998;4: 688-90.
100. Boucher BJ, Mannan N, Noonan K, Hales CN, Evans SJ. Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians. *Diabetologia* 1995;38: 1239-45.
101. Ye K, Dinarello CA, Clark BD. Identification of the promoter region of human interleukin-1 type-I receptor gene – multiple initiation sites, high G+C content, and constitutive expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90: 2295-9.
102. Sims JE, SL, Painter SL, Gow IR. Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. *Cytokine* 1995;7: 483-90.

11.0 ŽIVOTOPIS

Rođen sam 20.11.1956. godine u Splitu. Oženjen sam, otac dvoje djece.

Obrazovanje:

1963. – 1975. Osnovna i srednja škola (klasična gimnazija) u Splitu
1975. – 1980. Medicinski fakultet Sveučilišta u Ljubljani
1987. – 1989. Poslijediplomski studij iz kliničke pedijatrije
1990. – 1992. Poslijediplomski studij iz endokrinologije, metabolizma i dijabetologije dječje dobi
1985. – 1989. Specijalizacija iz pedijatrije
specijalistički ispit položen 14.11.1989. godine
1997. Magistarski rad “Procjena plućne funkcije u djece s dijabetesom ovisnim o inzulinu”, obrana pred povjerenstvom Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Sudjelovao sam na brojnim tečajevima, sastancima, simpozijima i kongresima u zemlji i inozemstvu.

Održao sam niz predavanja iz područja šećerne bolesti i endokrinologije na tečajevima, sastancima, simpozijima, kongresima.

Bio sam voditelj stručnog tima u ljetnom kampu za djecu oboljelu od šećerne bolesti, društva “Veliki za male sa šećernom bolešću”, u tri navrata.

Stručne škole

- 1.) STENO DIABETES Course of Practical Diabetology (Copenhagen-Danska, 1998. godine).
- 2.) European Society of Pediatric Endocrinology - ESPE Winter school (Prag-Češka, 2000. godine).

Znanstveni projekti

1. Na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, projekt pod nazivom “**Bolesti nadbubrežnih žlijezda u djece**” - broj 109063 (grupa Istraživanje humane reprodukcije, broj 3-09), glavni istraživač prof.dr.sc. Miroslav Dumić, bio sam suradnik u ulozi istraživača iz druge ustanove.

2. Na Medicinskom fakultetu u Splitu, projekt pod nazivom "**Genetska studija šećerne bolesti tip 1 u populaciji Dalmacije**", šifra 0216011, glavni istraživač doc.dr.sc. Tatijana Zemunik, u ulozi suradnika.

Nastavni rad

Sudjelujem u obavljanju nastave (seminari, vježbe) za studente medicine. Asistent sam na Medicinskom fakultetu u Splitu i Mostaru.

Radovi (6 radova objavljenih u citiranoj međunarodnoj literaturi):

J. Meštrović, V. Krželj, L. Balarin, M. Meštrović, **V. Škrabić**.
Congenital syphilis associated with hyperlipoproteinemia.
Pediatric Dermatology 1997; 14:226-8.

Nikmarn S, Cerame BI, Wei J.Q, Dumić M, Žunec R, Brkljačić Lj, **Škrabić V**, New I.M, Wilson RC. Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) without demonstrable genetic mutations. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1999:84; 378-81.

Nikmarn S, Cerame BI, Wei J.Q, Dumić M, Žunec R, Brkljačić Lj, **Škrabić V**, New I.M, Wilson RC. Congenital adrenal hyperplasia without demonstrable genetic mutations. Authors response. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1999:84; 2976-7.

Barić I, **Škrabić V**, Begovic D, Sarnavka V, Superti-Furga A. A 17-month old boy with bowed legs. European Journal of Pediatrics, 2000:159; 863-5.

Škrabić V, Zemunik T, Šitum M, Terzić J. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in dalmatian population. Diabetes Research and Clinical Practice, 2003:59; 31-5.

Dumić M, Ille J, Žunec R, Plavšić V, Plavšić V, Francetić I, **Škrabić V**, Janjanin N, Špehar A, Wei J, Wilson RC, New MI. Nonclassic 21-hydroxylase deficiency in Croatia. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2004:17; 57-64.