

# Povezanost polimorfizma rs1045411 HMGB1 gena s pojavnošću IgA vaskulitisa kod djece

---

**Vučemilović-Jurić, Valentina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:181988>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Valentina Vučemilović-Jurić**

**POVEZANOST POLIMORFIZMA**  
**rs1045411 *HMGB1* GENA S**  
**POJAVNOŠĆU IgA VASKULITISA**  
**KOD DJECE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**  
**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Valentina Vučemilović-Jurić**

**POVEZANOST POLIMORFIZMA**  
**rs1045411 *HMGB1* GENA S**  
**POJAVNOŠĆU IgA VASKULITISA**  
**KOD DJECE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je izrađen u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: izv. prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović

Rad ima 33 listova, 6 tablica i 8 slika.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem svima koji su bili uz mene tijekom ovih (prebrzo prošlih) pet godina studiranja.*

*Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jasenki Wagner Kostadinović na vodstvu i savjetima koje mi je pružila tijekom izrade diplomskog rada te na prilici da se upoznam s genetikom i izvan okvira ovog rada. Hvala Vam na svemu što ste me naučili.*

*Zahvaljujem Neni Arvaj, zdr. lab. tehn., na pomoći, savjetima i nezaboravnom druženju u laboratoriju.*

*Zahvaljujem dr. med. Mateji Batnožić Vargi, spec. pedijatrije i subspec. pedijatrijske reumatologije na vodstvu kliničkog dijela istraživanja.*

*Zahvaljujem i prof. Kristini Kralik na izuzetnoj pomoći u statističkoj obradi rezultata ovog diplomskog rada.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. IgA vaskulitis.....	1
1.2. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) .....	4
1.3. Polimorfizam rs1045411 <i>HMGB1</i> gena .....	6
1.4. Genotipizacija metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu .....	7
2. HIPOTEZA .....	9
3. CILJEVI .....	10
4. ISPITANICI I METODE .....	11
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Ispitanici .....	11
4.3. Metode .....	11
4.3.1. Izolacija genomske DNA .....	11
4.3.2. Kvantifikacija DNA .....	12
4.3.3. Genotipizacija lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu .....	14
4.3.4. Statističke metode .....	15
5. REZULTATI.....	17
6. RASPRAVA.....	22
7. ZAKLJUČAK .....	25
8. SAŽETAK.....	26
9. SUMMARY .....	27
10. LITERATURA.....	28
11. ŽIVOTOPIS .....	33

## POPIS KRATICA

ANCA	antineutrofilna citoplazmatska protutijela
dNTP	deoksiribonukleotidni trifosfat
FRET	rezonantni prijenos energije fluorescencije
HMGB1	protein visoke pokretljivosti iz skupine 1
HSP	Henoch-Schönleinova purpura
IgA	imunoglobulin A
IgAV	IgA vaskulitis
IgAVN	nefritis razvijen u IgA vaskulitisu
MGB	mali utor (DNA) vezujući spoj (engl. <i>minor groove binder</i> )
NFQ	nefluorescencijski prigušivač
PCR	lančana reakcija polimerazom
SIRS	sindrom sistemskog upalnog odgovora
SNP	polimorfizam jednog nukleotida

## 1. UVOD

### 1.1. IgA vaskulitis

IgA vaskulitis (IgAV) ili Henoch-Schönleinova purpura (HSP) najučestaliji je sistemski vaskulitis djece i novorođenčadi (1). U Republici Hrvatskoj incidencija je 6,79/100 000 djece (2). Odrastanje je povezano sa smanjenjem incidencije; više od 90 % pacijenata s IgAV mlađe je od 10 godina. Također, uočeno je da više oboljevaju muška djeca (omjer muškog i ženskog spola 1,5 : 1) (3).

Dijagnostički kriteriji za IgAV su prisutnost palpabilne purpure s još najmanje jednom od manifestacija: abdominalna bol, taloženje IgA kompleksa, artritis/artralgija ili bubrežni simptomi (4). Kožna purpura većinom je prvi simptom oboljelih od IgAV. Osip može izazivati svrbež, no rijetko je bolan. Njegova morfologija, distribucija i redoslijed izražavanja mogu se razlikovati između pacijenata. Osip je uglavnom simetrične raspodjele te je prisutan na cijelom tijelu; posebice na udovima, stražnjici, nogama i stopalima, a manje na licu i trupu. Zasad nije utvrđena povezanost između lokacije osipa i zahvaćenosti bubrega i/ili pojave gastrointestinalnih simptoma. Tipičan osip uglavnom je hemoragičan, varira u veličini, blago je povišen od površine kože i ne blijedi na pritisak. Može se manifestirati kao eritem, makula, ekhimoza ili urtikarija. Postoje i atipične kožne manifestacije poput kožnih lezija koje izgledom podsjećaju na psorijazu. Također, u odraslih se može javiti i nekrotična ili hemoragična purpura. Stoga, biopsija kože igra važnu ulogu u dijagnostičkoj obradi IgAV-a.

Od gastrointestinalnih simptoma u IgAV-u javljaju se abdominalna bol, povraćanje, krv u stolici i dijareja. Ponekad u IgAV-u abdominalna bol kao simptom prethodi tipičnim kožnim simptomima, stoga treba razmotriti razvoj IgAV-a u bolesnika s abdominalnom boli koju je teško interpretirati te u slučajevima kad uobičajeno liječenje nije djelotvorno. Gastrointestinalno krvarenje u IgAV-u uglavnom je okultno; manifestira se kao krvava ili melanotična stolica. Ipak, u teškim gastrointestinalnim krvarenjima potrebna je transfuzija krvi. Invaginacija crijeva također je jedan od simptoma IgAV-a. Rana dijagnostika invaginacije provodi se ultrazvučno, a istraživanje njezinog položaja kolonoskopijom. Perforacija, rijetka komplikacija IgAV-a, obično je udružena s invaginacijom crijeva. Najčešća je u tankom crijevu, a posebno u ileumu. Ishemija sluznice zbog vaskulitisa jedan je od mogućih uzroka perforacije. Manifestacije ishemije crijeva su nespecifične i uključuju bolove u trbuhu i distenziju crijeva. Odgođena dijagnoza može rezultirati teškim ishodima, uključujući smrt.



Budući da zahvaća male krvne žile u cijelome tijelu, IgAV može uzrokovati razne simptome u različitim organima. Klinička slika većine pacijenata uključuje palpabilnu purpuru, ali i artritis, gastrointestinalne simptome te oštećenje funkcije bubrega. Ostale, rjeđe kliničke manifestacije su neurološki i urološki simptomi te kardiopulmonalna bolest. Djeca s IgAV obično ulaze u remisiju 4 – 6 tjedana od početka bolesti. S druge strane, u odraslih oboljelih od IgAV-a može doći do pojave ozbiljnije kliničke slike i visoko rizičnih komplikacija, zbog čega liječenje IgAV-a u odrasloj populaciji zahtjeva agresivniji pristup. Pri pojavi rijetkih manifestacija ili neuobičajenih komplikacija može doći do pogrešnog dijagnosticiranja bolesti, što posljedično odgađa pravilno liječenje IgAV-a. Iako je IgAV uglavnom samoograničavajuć, s prosječnim trajanjem od 4 tjedana i bez potrebe za terapijom, pogrešna dijagnoza može dovesti do loše prognoze. Poznavanje širokog spektra kliničkih manifestacija IgAV-a nužan je preduvjet za njegovu točnu i pravodobnu dijagnozu, kao i za adekvatno liječenje (5).

Obično prvi urinarni simptom slijedi nakon izražavanja simptoma ostalih organskih sustava, no ponekad inicijalni simptom IgAV-a bude upravo hematurija. Najčešće abnormalnosti urinarnog trakta u IgAV-u su albuminurija i mikroskopska hematurija, dok makroskopsku hematuriju ima manji broj pacijenata. No, najbitnija kronična komplikacija IgAV-a te ujedno i njegov glavni prognostički čimbenik je nefritis (IgAVN). IgAVN se razvije u 30 – 50 % bolesnika s IgAV-om i to uglavnom u blagom obliku, no mali postotak bolesnika ipak razvije nefrotski sindrom ili zatajenje bubrega, stoga bi se u IgAV-u bubrežno stanje trebalo pomno pratiti i, u slučaju jake zahvaćenosti, pravovremeno liječiti odgovarajućom terapijom. U oboljelih od IgAV-a bubrežni se simptomi mogu javiti i 6 mjeseci od početne manifestacije bolesti, stoga se preporučuje ponoviti ispitivanje mokraće 6 mjeseci nakon razvoja IgAV-a, čak i u bolesnika bez drugih simptoma ove bolesti. Također, vremenski tijek bubrežnog oštećenja je nepredvidiv; aktivna bubrežna bolest može se razviti i nakon početno blagog nefritisa ili pak nakon mnogo godina mokraćnih komplikacija koje su bile stabilne. Čini se da rizik od razvoja klinički ozbiljnog IgAV-a raste s godinama, a razvojem istog dolazi do dugotrajnih bubrežnih posljedica. Oštećenje bubrega uzrokuje taloženje imunih kompleksa s IgA, zbog čega dolazi do aktivacije sustava komplementa. U skladu s time, glavno obilježje bubrežne histologije u IgAV-u je nalaz taloženja glomerularnog IgA u mezangiju te subepitelnom i/ili subendotelnom prostoru. Pri odlučivanju o mogućem liječenju u obzir se uzimaju ozbiljnost početne kliničke slike i opseg promjena u biopsiji bubrega. Uz to, dugoročni ishod bubrežnog stanja korelira s prethodno navedenim kriterijima. Biopsija bubrega posebno je korisna u razlučivanju IgAV-a od ostalih bolesti, kao i u procjeni prognoze i potrebe za

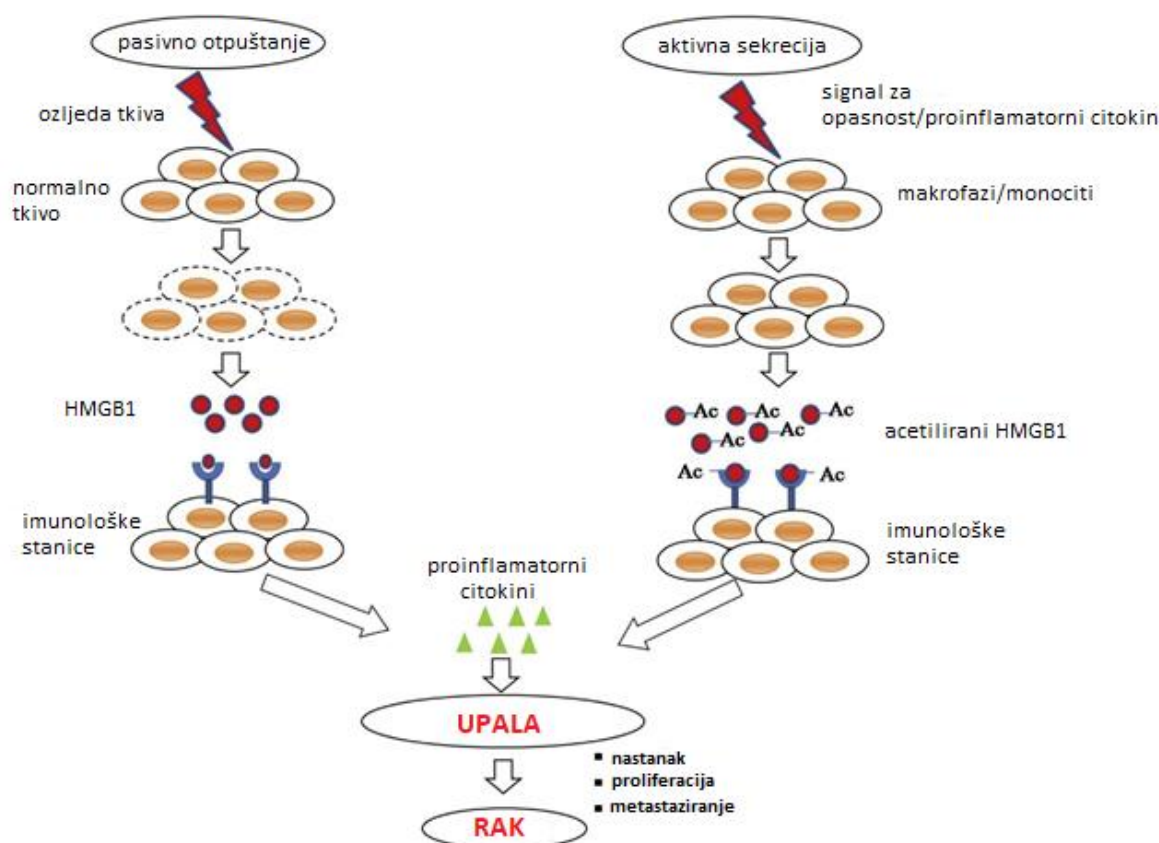
terapijom kod pacijenata čije je izlučivanje proteina mokraćom veće od 0,5 g po danu u razdoblju 1 – 2 mjeseca od razvoja IgAV. Ipak, prediktivna vrijednost bubrežnih biopsija u IgAV-u može biti upitna zbog potencijalno pogrešnih uzorkovanja bioptata i odražavanja samo onih patoloških procesa koji su se odigrali u vrijeme provođenja biopsije. Zbog rijetke pojavnosti teških glomerulonefritisa u IgAV-u otežano je provesti studije kontroliranog liječenja, stoga se i dalje u liječenju istog koriste različiti terapijski režimi. S obzirom da IgAVN u IgAV-u može dovesti do kronične bubrežne bolesti i završne faze zatajenja bubrega, opravdano je njegovo liječenje imunosupresivima (6,7).

Patofiziologija IgAV-a i dalje nije potpuno razjašnjena, no poznato je da IgA ima značajnu ulogu u njenom razvoju. Imuni kompleksi IgA-antitijela mogu biti uzrokovani izloženošću antigenima u infekciji ili pak primjenom nekih lijekova. Infekcije gornjih dišnih putova su najčešće; međutim, razvoju IgAV-a mogu prethoditi i gastrointestinalna ili faringealna infekcija. Imuni se kompleksi potom talože u malim žilama (uglavnom kapilarama) u koži, zglobovima, bubrežima i gastrointestinalnom traktu. Posljedično dolazi do otpuštanja upalnih medijatora, kao što su npr. prostaglandini. Dolazi do aktivacije komplementa te se limfociti mogu vezati s imunim kompleksima i taložiti u stjenkama žila, što pridonosi stvaranju pojačanog upalnog odgovora. Taloženje imunih kompleksa u koži uzrokuje palpabilnu purpuru i petehije, dok taloženje istih u gastrointestinalnom traktu može uzrokovati krvarenje. Artritis ili artralgiya javljaju se u čak 75 % slučajeva oboljelih od IgAV (8). Bol u zglobovima može biti sa ili bez otekline te uglavnom zahvaća gležnjeve i koljena. Također, ostali zglobovi šaka i stopala mogu biti zahvaćeni (7). Smatra se da bi etiopatogeneza IgAV-a mogla uključivati brojne interakcije između različitih okolišnih i genetskih čimbenika. Geni povezani s imunološkim i upalnim odgovorom, a pogotovo polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism* – SNP), mogli bi biti uključeni u etiopatogenezu IgAV-a. Osim što bi mogli dati odgovor o predispoziciji za razvoj IgAV-a, SNP-ovi bi mogli biti i indikatori težine oboljenja. Mnogo je truda uloženo u otkrivanje uloge genetike u IgAV-u. Većina genetskih studija provedenih u ovom području za cilj je imala otkrivanje polimorfizama ili skupova genetskih varijanti unutar određenih lokusa. Ti su polimorfizmi odabrani prema svojim biološkim funkcijama ili položaju u regiji za koju je već utvrđeno da je povezana s određenom bolešću. Ipak, tijekom posljednjih godina prioritetno je postalo sekvencioniranje visoke propusnosti (engl. *high-throughput sequencing*) s ciljem otkrivanja genskih komponenti IgAV-a. Dosadašnji rezultati ukazuju na složenost genetske komponente uključene u patogenezu

IgAV-a. Smatra se da je njezina kompleksnost rezultat interakcije više gena, za razliku od postojanja jednog gena koji ima specifičnu ulogu u patogenezi neke bolesti (9,10).

## 1.2. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1)

Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (engl. *High mobility group box 1 protein* – *HMGB1*) stanični je protein koji se oslobađa iz nekrotičnih stanica ili aktivno izlučuje iz monocita i makrofaga nakon traume ili jakog staničnog stresa. Osim monocita i makrofaga, otpustiti ga mogu i neutrofil i endotelne stanice prilikom stimulacije u obliku upale. U jezgri, HMGB1 sudjeluje u organizaciji DNA i nukleosoma te regulira transkripciju. Usljed ozljede stanice, HMGB1 iz jezgre može prijeći u citoplazmu, gdje je uključen u aktivaciju upale i piroptozu, kao i u regulaciju ravnoteže između autofagije i apoptoze. Kada se aktivno izlučuje ili pasivno izlazi u izvanstanični prostor, HMGB1 posjeduje citokinu, kemokinu, neuroimunu i metaboličku aktivnost. Izvanstanični HMGB1 pokreće upalu i regrutira leukocite na mjesto oštećenja tkiva. Utvrđeno je da se zbog staničnih ozljeda aktiviraju obrambeni mehanizmi koji se ne razlikuju od reakcija koje su odgovor na patogene. Dakle, HMGB1 kao signalna molekula ima presudnu ulogu u informiranju stanica da je došlo do njenog oštećenja ili invazije. HMGB1 stoga ima višestruku ulogu u patogenezi upalnih bolesti. On posreduje imunološke reakcije koje se kreću od upale i obrane organizma od bakterija pa sve do obnavljanja tkiva (11,12).

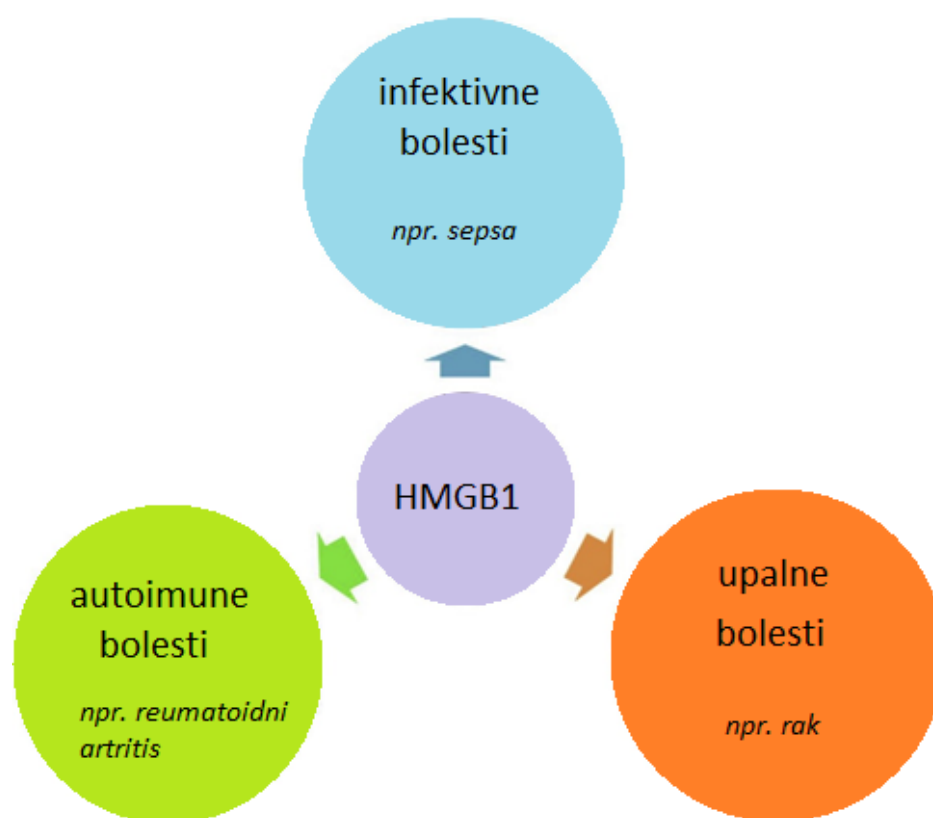


Slika 1. Prikaz mehanizama aktivne sekrecije i pasivnog otpuštanja HMGB1 proteina.

Prilagođeno iz (13)

Dosadašnja istraživanja dokazala su postojanje korelacije između ekspresije HMGB1 i razvoja raka. HMGB1 bi se mogao koristiti kao marker za prognozu raka, a mogao bi i biti usmjeren na zaustavljanje ekspresije, sprečavajući tako rak i dovodeći do njegovog izlječenja. U tijeku su istraživanja uporabe različitih lijekova i mikro RNA za kontrolu ekspresije HMGB1 (13). Brojne studije ukazuju na povišene razine HMGB1 u serumu ili plazmi pacijenata s autoimunim bolestima u usporedbi s kontrolnim uzorcima zdrave populacije, što upućuje na to da bi HMGB1 mogao imati bitnu ulogu u patogenezi autoimunih bolesti. Istraživanja su također pokazala da su razine HMGB1 u serumu ili plazmi znatno povišene kod pacijenata s aktivnom bolesti u odnosu na pacijente s bolesti u inaktivnom stadiju. Dakle, razine HMGB1 u serumu ili plazmi mogle bi biti biljeg aktivnosti autoimunih bolesti. Povišene razine HMGB1 zabilježene su u bolesnika s vaskulitisom malih žila, sistemskim eritemskim lupusom, reumatoidnim artritismom, ankilozirajućim spondilitisom i Sjögrenovim sindromom. Zbog važnosti u patogenezi navedenih bolesti, HMGB1 bi se potencijalno mogao koristiti kao njihov biomarker i meta u biološkoj terapiji. Budući da posjeduje sposobnosti poput migracije stanica, moduliranja adhezivnosti te poticanja proliferacije i neoangiogeneze, HMGB1 mogao bi biti uključen i u sam razvoj bolesti. Osim toga, izvanstanični HMGB1 može inducirati oslobađanje

proupalnih medijatora, što rezultira povišenom razinom proupalnih citokina u serumu, a potom uzrokuje aktivaciju imunološkog sustava i invaziju upalnih stanica, produljujući tako upalne procese (14,15). Brojna su istraživanja zabilježila prekomjernu ekspresiju HMGB1 kod raznih karcinoma. Štoviše, postoje dokazi koji sugeriraju da je prekomjerna ekspresija HMGB1 usko povezana i sa samim razvojem tumora – upravo posredovanjem proliferacije, invazije i migracije stanica raka. HMGB1 je protein s mnoštvom uloga, unutar stanice i izvan nje, a očito ima ulogu i u razvoju raka i metastaza. Međutim, puni opseg te uloge i dalje ostaje nedefiniran. Razvoj novih terapija možda otkrije opseg sudjelovanja HMGB1 u brojnim staničnim procesima, uključujući rak (16,17). Nadalje, razine HMGB1 značajno su povišene i u sepsi (18). Smatra se da HMGB1 ima ključnu ulogu u patogenezi sepse i multiorganskog zatajenja (19).



Slika 2. Klinički značaj HMGB1 proteina. Prilagođeno iz (13)

### 1.3. Polimorfizam rs1045411 *HMGB1* gena

*HMGB1* je protein kodirajući gen koji se nalazi na kromosomu 13 (13q12.3). Poznat je i pod nazivima *HMG1*; *HMG3*; *HMG-1* i *SBP-1*. Uloga ovog gena jest kodiranje HMGB1 proteina koji se nalazi u gotovo svim tipovima stanica u ljudskom organizmu. Opisano je

nekoliko *HMGB1* polimorfizama i za neke od njih već je utvrđeno da imaju proupalno djelovanje. Naime, neki SNP-ovi povezani su s teškim upalnim odgovorom ili čak povećanim rizikom od smrtnosti u sepsi ili kod bolesnika sa sindromom sistemskog upalnog odgovora (engl. *systemic inflammatory response syndrome – SIRS*). Utvrđeno je da su rs41369348, rs2249825, rs1045411 i rs1060348 povezani s povećanim rizikom od smrtnosti u sepsi ili SIRS-u, dok je rs2249825 povezan s razvojem kolorektalnog karcinoma i hipertenzije. Prema studiji koja je po prvi put istražila kliničku važnost SNP rs1045411 kod pacijenata sa sepsom, teškom sepsom ili septičnim šokom, navedeni polimorfizam vjerojatno ima značajnu ulogu u patofiziologiji navedenih stanja. No, broj ispitanika te studije bio je relativno malen, stoga autori vjeruju da bi to mogao biti razlog zašto nije utvrđena povezanost između SNP rs1045411 i kliničkog ishoda poput dužine boravka pacijenta u jedinici intenzivne njege ili trajanja mehaničke ventilacije. Provođenjem studija s više ispitanika i uključivanjem ispitanika različite etničnosti dobili bismo priliku za bolje razumijevanje kliničkog značenja ovog polimorfizma (19-22).

Nova istraživanja pokazala su da je *HMGB1* rs1045411 polimorfizam povezan s povećanim rizikom za razvoj određenih karcinoma kao što su karcinom želuca, karcinom dojke, hepatocelularni karcinom i karcinom usne šupljine (23-25). Budući da se SNP rs1045411 nalazi u 3'UTR regiji gena *HMGB1*, može utjecati na stabilnost mRNA i vezanje na mikroRNA, čime modulira ekspresiju gena (24,26). SNP rs1045411 ima značajan utjecaj na ekspresiju *HMGB1* mRNA u tumorskim tkivima, stoga bi se mogao koristiti kao prognostički marker u kombinaciji s tradicionalnim markerima za uspostavljanje kliničke prognoze (24).

#### **1.4. Genotipizacija metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu**

Genotipizacija obuhvaća određivanje definiranih alelnih mutacija metodama molekularne dijagnostike te prepoznavanju heterozigotnih i homozigotnih nositelja mutiranih alela. Za provođenje genotipizacije potrebno je prikupiti malu količinu uzorka (krvi ili tkiva) i rezultati analize dostupni su u kratkom roku. Osim toga, na rezultate takve analize ne utječe zdravstveni status bolesnika ili hrana i lijekovi kojima je izložen, a dobiveni rezultat (genotip) ostaje nepromijenjen cijeli život (27).

SNP-i nastaju kao posljedica supstitucije samo jedne baze. Značajni su za procjenu osjetljivosti za razvoj bolesti, patogenezu bolesti i učinkovitosti određenih lijekova, stoga ih je

u kliničke svrhe važno prepoznavati. Metode otkrivanja i razlikovanja pojedinih SNP-a moraju biti visoke specifičnosti i točnosti te osigurati ponovljivost rezultata analize. Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) pruža analitičke performanse potrebne za ovakav tip laboratorijske analize (28).

Lančana reakcija polimeraze metoda je kojom se u *in vitro* uvjetima kratki dio DNA sekvence umnožava u veliki broj identičnih kopija. Za PCR reakcije ne postoji jedinstveni protokol, već je potrebno optimizirati uvjete za svaku reakciju. Naime, mora se poznavati slijed nukleotida DNA odsječka koji će se u analizi umnožiti kako bi se mogao odabrati odgovarajući par početnica. Početnice su kratke oligonukleotidne sekvence koje predstavljaju granice odsječka DNA koji se umnaža; komplementarne su krajevima sekvence ciljne DNA. Jedna je početnica komplementarna 3' kraju odsječka jednog DNA lanca koji se umnaža, a druga početnica 3' kraju drugog DNA lanca. Lančana reakcija polimeraze temelji se na djelovanju DNA (Taq) polimeraze koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi komplementarni lanac. Osnovni koraci svih PCR protokola su: denaturacija dvolančane DNA u dva jednolančana lanca, specifično vezanje početnica na komplementarne odjeljke DNA i sinteza komplementarnog lanca, odnosno produljivanje DNA lanca. Uspješnost PCR reakcije provjerava se elektroforezom produkata reakcije u agaroznom gelu.

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction* – *real time PCR*) inačica je prethodno opisanog klasičnog PCR-a. Budući da se radi o analizi u stvarnom vremenu, *real-time PCR* podrazumijeva praćenje PCR umnožavanja tijekom cijele reakcije. Također, velika prednost lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu u odnosu na tradicionalni PCR jest izostanak potrebe za detekcijom produkata reakcije na agaroznim gelovima. Metoda je visoko osjetljiva, što se postiže uporabom fluorescentnih početnica (29). Inovativni pristupi, kao i tehnička poboljšanja, zaslužni su za napredak metoda za analizu SNP-a.

## **2. HIPOTEZA**

Incidencija i pojavnost polimorfizma jednog nukleotida rs1045411 gena za HMGB1 može se povezati s pojavom IgA vaskulitisa, posebice za pojavu bubrežnih manifestacija u sklopu kliničke slike.



### **3. CILJEVI**

Istraživanjem će se utvrditi postoji li povezanost polimorfizma jednog nukleotida rs1045411 gena za HMGB1 i pojave IgA vaskulitisa metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

## 4. ISPITANICI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je provedeno u obliku studije slučajeva i kontrola (engl. *case-control study*).

### 4.2. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 176 ispitanika; 76 uzoraka krvi djece (36 djevojčica i 40 dječaka) s uputnom dijagnozom IgA vaskulitisa te 100 kontrolnih uzoraka zdrave muške i ženske djece (60 djevojčica i 40 dječaka) koja nemaju medicinsku dokumentaciju koja bi potvrđivala IgAV ili bilo koju drugu autoimunu bolest. Ispitanici s IgAV upućeni su iz Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Kliničkog bolničkog centra Osijek. Pribavljen je informirani pristanak roditelja/skrbnika za sve ispitanike te je pohranjen u arhiv Laboratorija za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku. Krv ispitanika uzorkovana je radi genotipizacije lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu s ciljem određivanja prisutnosti polimorfizma jednog nukleotida gena za HMGB1 (rs1045411). Krv je uzorkovana minimalno invazivno; jednokratnom venepunkcijom periferne krvi u epruvete s antikoagulansom EDTA. Jedinstvenim laboratorijskim brojem označen je svaki uzorak. Uzorci su pohranjeni na -20 °C u Laboratoriju do analize. Svim ispitanicima napravljena je genotipizacija real-time PCR metodom na uređaju 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) koristeći TaqMan SNP genotyping assays. Provođenje istraživanja odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolira se iz 2 ml periferne venske krvi upotrebom komercijalnog kita prema protokolu proizvođača (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Uzorci krvi se do analize pohranjuju se na -20 °C, a neposredno prije izolacije odmrzavaju na sobnoj temperaturi. Prije izolacije genomske DNA, potrebno je pripremiti reagense prema uputi proizvođača (Qiagen, Hilden, Germany), kao i potreban materijal. U tubice za centrifugiranje od 15 ml pipetira se 200 µl proteinaze K, enzima koji služi za neselektivnu razgradnju proteina. Dodaje se 2 ml uzorka pune krvi i 2,4 ml AL pufera koji služi za liziranje stanica. Smjesa promiješa i zatim inkubira na 70 °C kroz 10 minuta. Nakon inkubacije dodaje se 2 ml etanola

(96 – 100 %) radi precipitacije DNA. Nakon miješanja pola se sadržaja otopine prebacuje u QIAamp Midi kolone smještene u tubice za centrifugiranje od 15 ml. Kolona se zatvori i centrifugira na  $1850 \times g$  kroz 3 minute. Supernatant se odlije, kolona se premjesti u novu tubicu za centrifugiranje od 15 ml te se dodaje druga polovica početne otopine. Ponavlja se postupak centrifugiranja ( $1850 \times g$  u trajanju od 3 min). Opet se odbacuje supernatant, a kolona se stavlja u novu tubicu za centrifugiranje u koju se dodaje 2 ml pufera AW1. Slijedi centrifugiranje na  $4500 \times g$  kroz 1 minutu. Postupak se ponavlja s dodavanjem pufera AW2, ali centrifugiranje se provodi u trajanju od 15 minuta. Tijekom postupka koriste se različiti puferi radi promjena ionske jakosti. Naime, visoka ionska jakost omogućuje vezanje DNA za kolonu te se nečistoće potom mogu isprati. Na kraju se dodaje 200  $\mu l$  AE pufera niske ionske jakosti koji potiče otpuštanje DNA. Slijedi inkubacija u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi prije centrifugiranja na  $4500 \times g$  kroz 2 minute. DNA se čuva u AE puferu na  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  do analize.

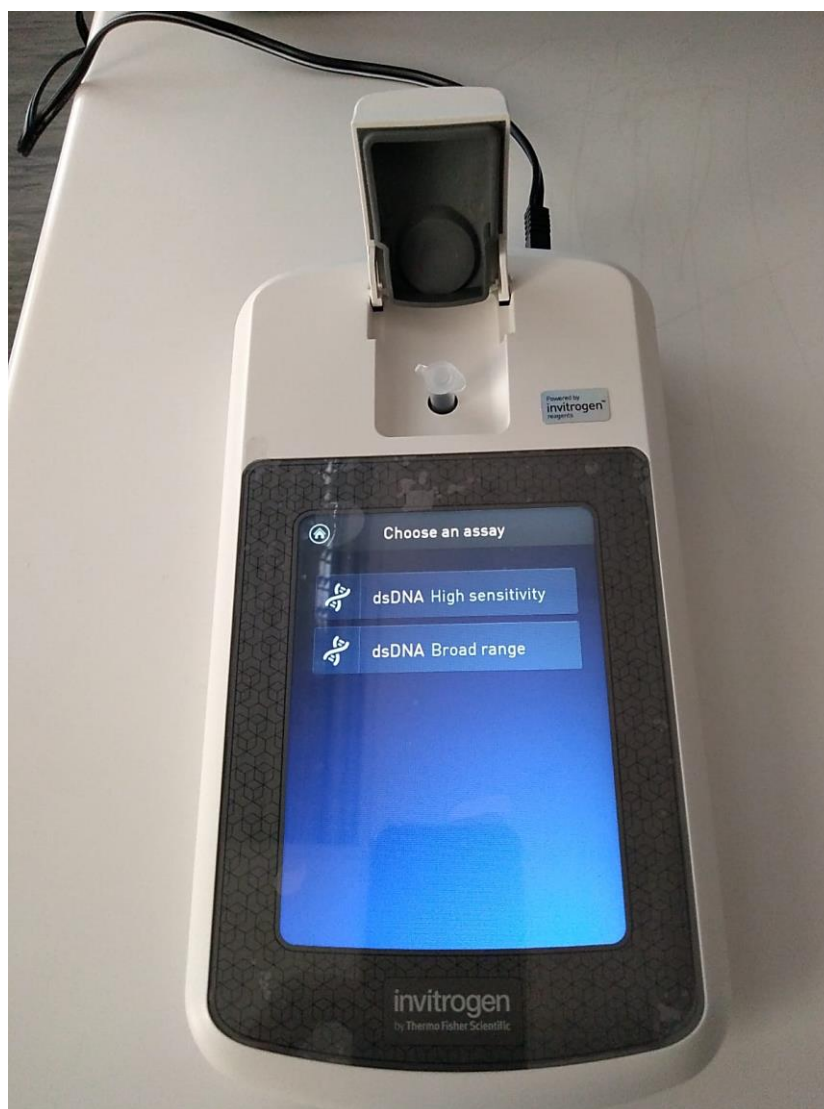
#### 4.3.2. Kvantifikacija DNA

Kvantifikacija DNA postupak je određivanja količine izolirane DNA iz uzorka. Provodi se kako bi se provjerilo odgovara li koncentracija izolirane DNA koncentraciji koja je potrebna za provedbu genotipizacije. Koncentracija izolirane DNA određuje se fluorometrijski (Qubit dsDNA BR Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Qubit uređaj kalibrira se pomoću 2 standarda, a potom se redom očitaju koncentracije uzoraka.

Prvo je potrebno pripremiti dvije Qubit Assay tubice za DNA standarde i po jednu tubicu za svaki od uzoraka. Pripremi se 200  $\mu l$  Mix-a za svaki standard i uzorak otapajući Qubit dsDNA BR reagens u Qubit dsDNA BR puferu u omjeru 1 : 200 (1  $\mu l$  Qubit dsDNA BR reagens i 199  $\mu l$  Qubit dsDNA BR pufera čine 200  $\mu l$  radne otopine). Reagens sadrži specifičnu fluorescentnu probu koja intenzivno fluorescira nakon interkalacije u molekuli DNA. Pripremljeni Mix se ne vorteksira, već se lagano promiješa. Ovaj komercijalni kit sadrži dva DNA standarda, Qubit dsDNA BR standard 1 i Qubit dsDNA BR standard 2. Koncentracija DNA u standardu 1 iznosi 0 ng/ $\mu l$ , a u standardu 2 iznosi 100 ng/ $\mu l$ . Priprema standarda odvija se na način da se na ukupan volumen od 200  $\mu l$  doda 190  $\mu l$  Mix-a i 10  $\mu l$  svakog od standarda, a zatim slijedi vorteksiranje u trajanju od 2 do 3 sekunde. Uzorci se pripremaju tako da se na ukupan volumen od 200  $\mu l$  doda 195  $\mu l$  Mix-a i 5  $\mu l$  svakog od uzoraka te vorteksira 2 – 3 sekunde. Slijedi inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 minute. Volumen uzorka za pripremu može biti od 1 do 20  $\mu l$ , no ukupan volumen mora iznositi 200  $\mu l$ . Prvo se očitaju

standardi 1 i 2 radi kalibracije uređaja, a zatim se očitaju uzorci. Volumen uzorka kojem određujemo koncentraciju DNA obavezno je navesti.

Ukoliko su dobivene vrijednosti pri 260/230 nm niske, moguća je kontaminacija ostacima soli ili organskim otapalima. Niske vrijednosti dobivene pri 260/280 ukazuju na prisutnost ostataka proteina. U navedenim slučajevima, potrebno je ponovno pročitati DNA prema uputama proizvođača (Qiagen, Hilden, Germany) i kalibrirati spektrofotometer koristeći odgovarajući pufer. Ukoliko je prisutna kontaminacija s RNA, doći će do lažno povećanih vrijednosti DNA pri mjerenju jer DNA i RNA imaju apsorbanciju pri istim valnim duljinama. Takav se uzorak smatra nekvalitetnim i za nastavak rada potrebno je ponovno pročitati DNA.



Slika 3. Uređaj Invitrogen Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, SAD)

(Fotografija snimljena u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, travanj 2021.)

### 4.3.3. Genotipizacija lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu

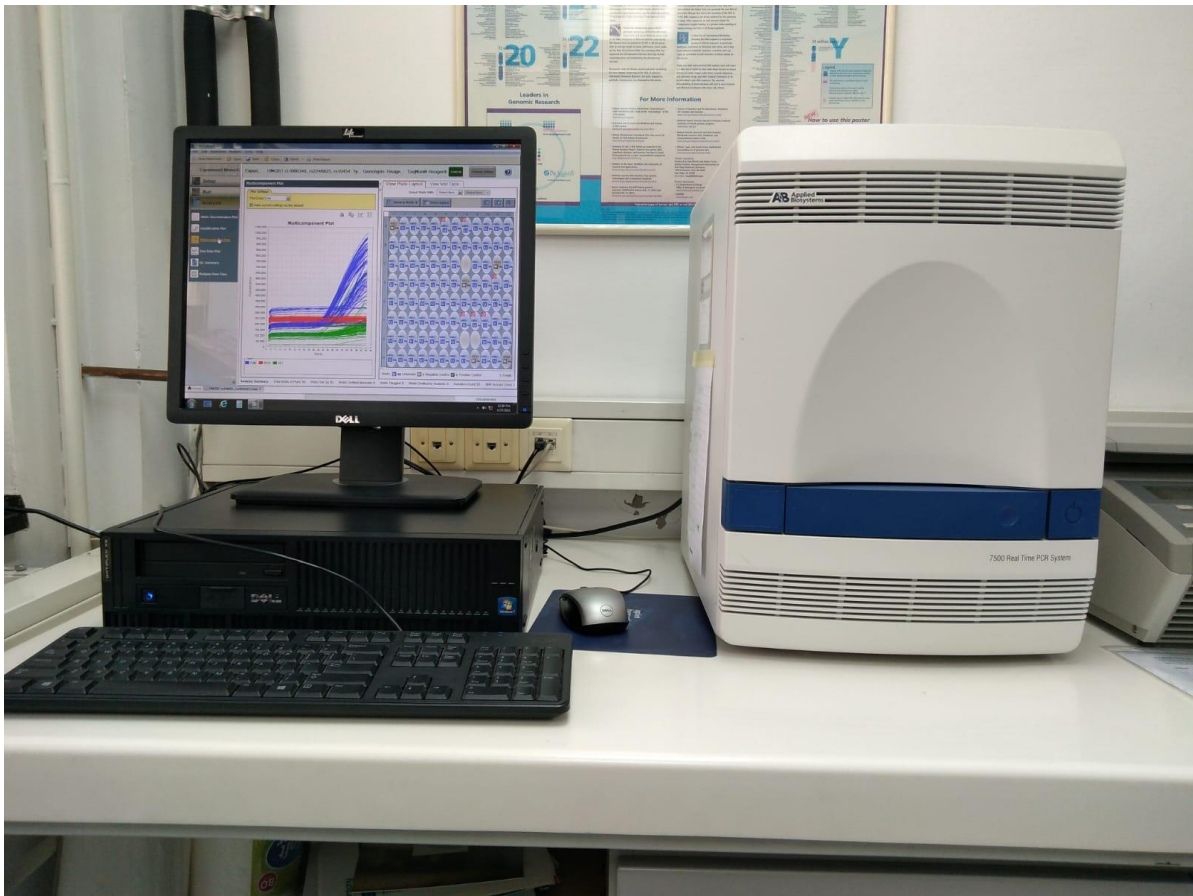
Nakon izolacije i kvantifikacije DNA, učinjena je genotipizacija polimorfizma jednog nukleotida rs1045411 za gen *HMGB1*, odnosno umnažanje DNA lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*). Za provođenje genotipizacije lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu korišten je uređaj 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) podešen na program za genotipizaciju uz uporabu TaqMan sonde (TaqMan SNP Genotyping Assays, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD).

TaqMan komplet za genotipizaciju (TaqMan SNP Genotyping Assays, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) sastoji se od para neobilježenih početnica i dviju TaqMan sonde na 5' kraju, nefluorescencijskog prigušivača (engl. *nonfluorescent quencher* – NFQ) i molekule TaqMan MGB (engl. *minor groove binder* – MGB) koja se veže na mali utor DNA na 3' kraju. Jedna je TaqMan sonda obilježena fluorescencijskom bojom FAM, a druga fluorescencijskom bojom VIC.

U lančanoj reakciji polimeraze u stvarnom vremenu količina DNA mjeri se automatski nakon svakog ciklusa umnažanja. DNA molekule detektiraju se fluorescentnim bojama na način da uređaj mjeri promjene u fluorescenciji tijekom reakcije u stvarnom vremenu, odnosno kontinuirano mjeri povećanje fluorescencijskog signala koje je izravno povezano s povećanjem broja molekula DNA. Lančanom reakcijom polimeraze specifično se umnažaju i detektiraju određeni aleli genomske DNA. Reakcijska smjesa sastoji se od genomske DNA, uzvodne i nizvodne početnice, dvije oligonukleotidne TaqMan sonde i TaqMan Genotyping MasterMix-a. Svaka sonda se specifično veže za komplementarni slijed DNA, ako je takav slijed prisutan. Dok je TaqMan sonda u potpunosti vezana na DNA, prigušivač (NFQ) osigurava da ne dolazi do fluoresciranja reporterske boje (VIC ili FAM) zbog rezonantnog prijenosa energije fluorescencije (engl. *fluorescence resonance energy transfer* – FRET). DNA polimeraza svojom egzonukleaznom aktivnošću razgrađuje TaqMan sondu vezanu na DNA i dolazi do odvajanja reporterske boje od prigušivača, stoga reporterska boja (VIC ili FAM) fluorescira. Do toga dolazi ukoliko je umnoženi ciljani slijed DNA komplementaran TaqMan sondi. Ovisno o fluorescencijskom signalu koji je prisutan nakon umnožavanja DNA, raspoznaje se koji su aleli prisutni. Rezultati reakcija prate računalno koristeći softverski program SDS 7500 Software Version 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). PCR reakcijska smjesa ukupnog volumena od 25  $\mu$ l za svaku jažicu sastoji se od 2  $\mu$ l genomske DNA, 12,5  $\mu$ l TaqMan Genotyping PCR Master Mix-a (2X), 0,625  $\mu$ l SNP Assay Mix-a (40X) i 9,875  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. TaqMan

Genotyping Master Mix sastoji se od AmpliTaq Gold DNA polimeraze – Ultra Pure (UP), deoksiribonukleotidnih trifosfata (dNTPs), ROX boje (pasivna referentna boja) i puferskih komponenti. Korištena je MicroAmp PCR ploča (engl. *plate*) s 96 jažica (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

Protokol za PCR amplifikaciju bio je sljedeći: inicijalna denaturacija na 95 °C kroz 10 min; 40 ciklusa denaturacije na 92 °C kroz 15 sekundi i 40 ciklusa vezanja sondi i sinteze DNA 1 na 60 °C tijekom 60 sekundi; završni korak sinteze od 1 minute na 60 °C.



Slika 4. Uređaj 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)  
(Fotografija snimljena u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, travanj 2021.)

#### 4.3.4. Statističke metode

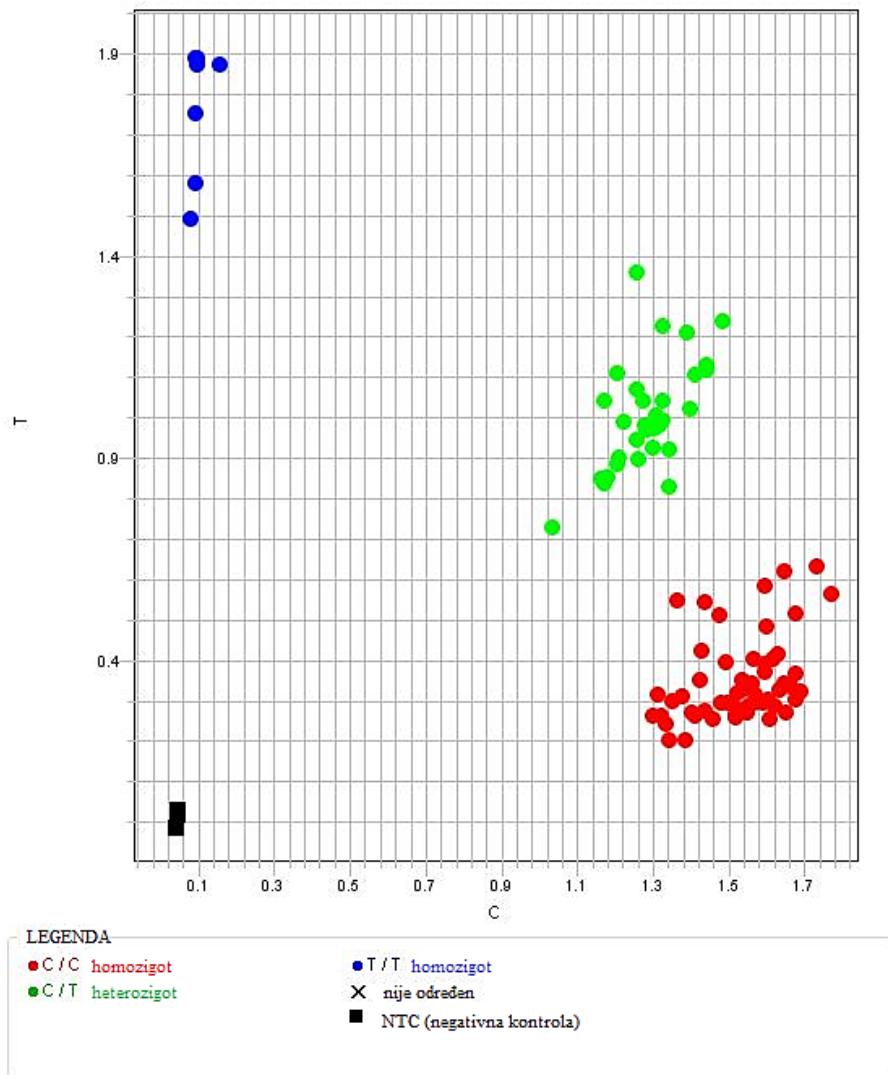
Kategorijski podatci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike u kategorijskim varijablama testirane su  $\chi^2$  testom, po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na Alpha = 0,05. Za statističku

analizu korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 19.6 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020).

## 5. REZULTATI

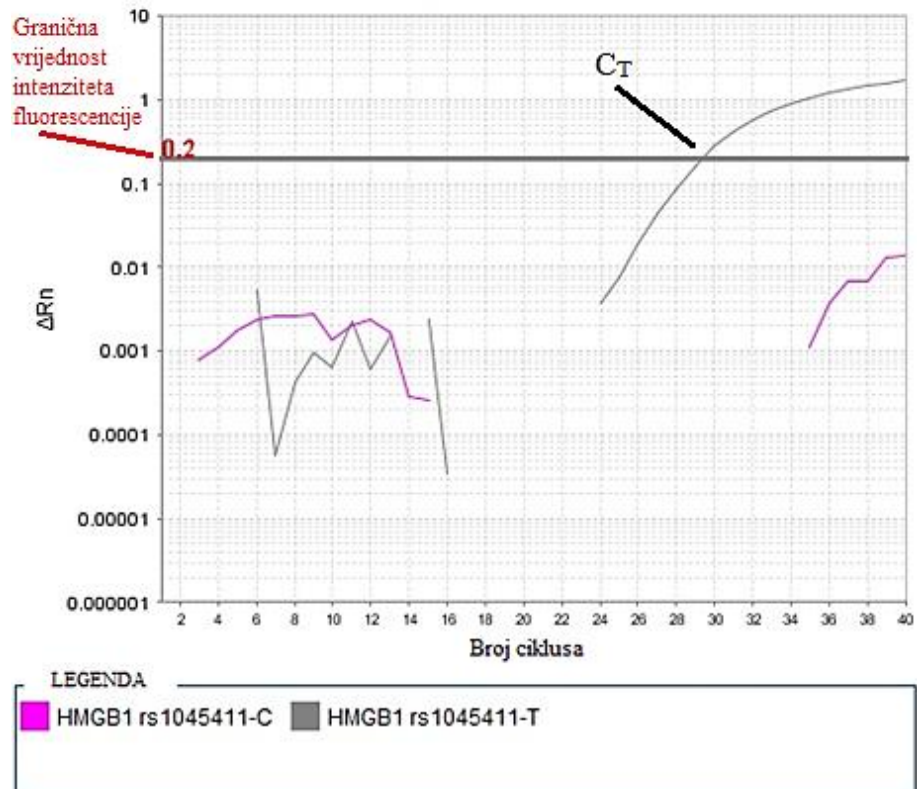
Uspješno su određeni genotipovi svih 176 uzoraka: 100 uzoraka kontrolne skupine i 76 uzoraka skupine ispitanika s dijagnozom IgAV-a .

Na Slici 5. nalazi se primjer grafičkog prikaza raspodjele genotipova (engl. *Allelic Discrimination Plot*) za proučavan polimorfizam, a na slikama 6. – 8. prikazani su primjeri semilogaritamskih prikaza krivulja amplifikacije (engl. *Amplification Plot*) za svaki od dobivenih genotipova. Krivulje amplifikacije lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu prikazuju ovisnost fluorescencije o broju ciklusa. Na amplifikacijskim krivuljama označena je granična vrijednost intenziteta fluorescencije i  $C_T$ ;  $\Delta R_n$  – fluorescencija umnažanja normalizirana u odnosu na pasivnu fluorescencijsku boju.

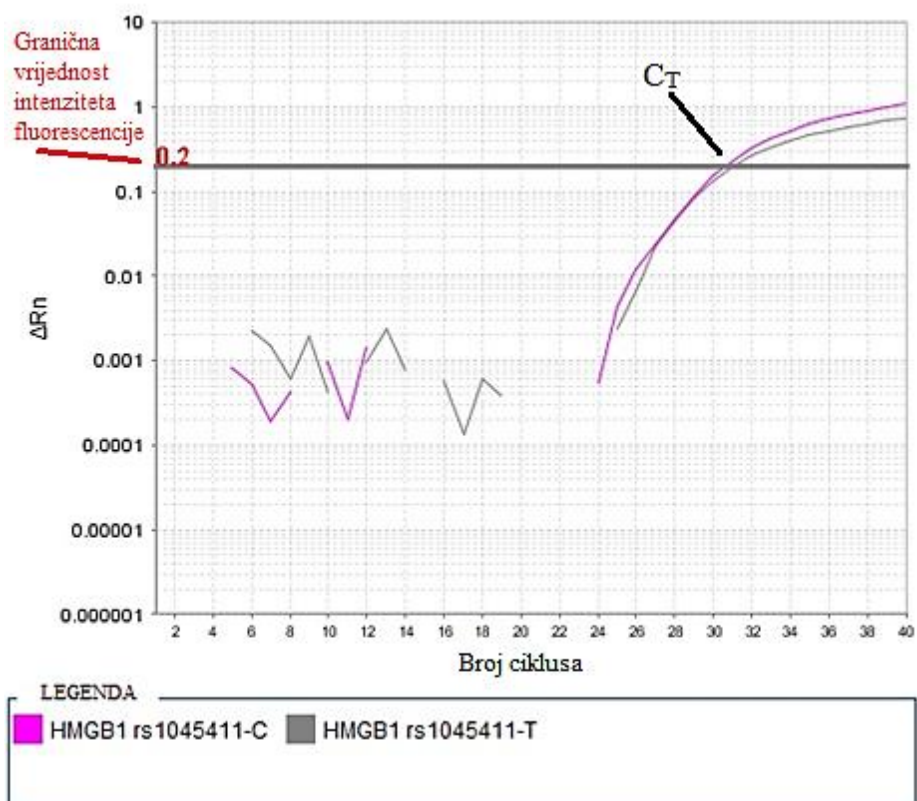


Slika 5. Primjer grafičkog prikaza raspodjele genotipova za proučavan polimorfizam

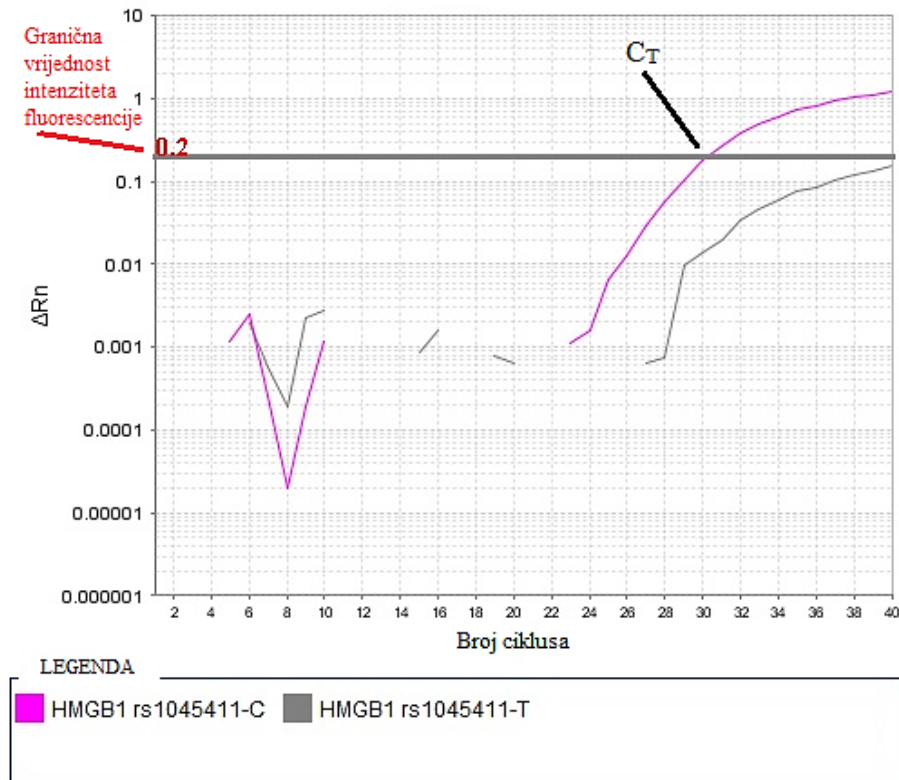




Slika 6. Primjer amplifikacijske krivulje za TT genotip za proučavan polimorfizam



Slika 7. Primjer amplifikacijske krivulje za CT genotip za proučavan polimorfizam



Slika 8. Primjer amplifikacijske krivulje za CC genotip za proučavan polimorfizam

Od 100 uzoraka kontrolne skupine, 40 (40 %) djece je muškog spola, a 60 (60 %) ženskog spola, dok je od 76 uzoraka skupine ispitanika 40 (53 %) djece muškog spola, a 36 (47 %) ženskog spola. Nije utvrđena statistički značajna razlika u obolijevanju od IgAV-a u ovisnosti o spolu ( $p = 0,10$ ) (Tablica 1).

Tablica 1. Prikaz ispitanika prema spolu i pripadajućoj skupini (kontrola/ispitanici)

	Broj (%)			P*
	Kontrola (n = 100)	Ispitanici (n = 76)	Ukupno (n = 176)	
Spol				
Muški	40 (40)	40 (53)	80 (46)	0,10
Ženski	60 (60)	36 (47)	96 (55)	

\* $\chi^2$  test

I u kontrolnoj i u ispitivanoj skupini istražena su tri genotipa; homozigot divljeg tipa (CC), heterozigot (CT) i homozigot mutant (TT). Homozigot divljeg tipa (CC) bio je najčešći genotip u obje skupine ispitanika. Normalni CC genotip nađen je kod 58 (58 %) zdravih kontrola i 41 (54 %) bolesnih, heterozigotni CT genotip nađen je kod 33 (33 %) zdrave i 29 (38 %) oboljele djece, a homozigotni mutantski TT genotip nađen je kod 9 (9 %) zdravih i 6 (8

%) oboljelih. Kad je frekvencija genotipova HMGB1 genskog polimorfizma u IgAV pacijenata uspoređena s frekvencijom genotipova u kontrolnoj skupini, nije pronađena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ) (Tablica 2).

Tablica 2. Prikaz učestalosti genotipova u kontrolnoj i ispitivanoj skupini

Genotip	Broj (%)			P*
	Kontrola (n = 100)	Bolesnici (n = 76)	Ukupno (n = 176)	
CC	58 (58)	41 (54)	99 (56)	0,77
CT	33 (33)	29 (38)	62 (35)	
TT	9 (9)	6 (8)	15 (9)	

\* $\chi^2$  test

Kategorizacijom pacijenata u skupinu onih sa CC genotipom i u skupinu sa CT/TT genotipom, nije utvrđena statistički značajna razlika u obolijevanju od IgAV. Također, nije uočena statistički značajna razlika u obolijevanju od IgAV analizom frekvencije alela (Tablica 3).

Tablica 3. Prikaz raspodjele genotipova i učestalosti alela unutar kontrolne i ispitivane skupine

Genotip	Broj (%)			OR* (95 % CI <sup>†</sup> )	P <sup>‡</sup>
	Kontrola (n = 100)	Bolesnici (n = 76)	Ukupno (n = 176)		
CC	58 (58)	41 (54)	99 (56)	1,18 (0,65 – 2,15)	0,59
CT/TT	42 (42)	35 (46)	77 (44)		
Alel					
C	146 (74)	111 (73)	260 (74)	0,95 (0,59 – 1,53)	0,82
T	51 (26)	41 (27)	92 (26)		

\*Omjer izgleda

<sup>†</sup>Interval pouzdanosti

<sup>‡</sup> $\chi^2$  test

Od 76 pacijenata s IgAV-om, njih 21 (28 %) razvilo je IgAVN, od toga 8 (38 %) dječaka i 13 (62 %) djevojčica, pri čemu ne postoji povezanost između spola djeteta i razvoja IgAVN ( $p = 10$ ) (Tablica 4). Homozigot divljeg tipa (CC) bio je najčešći genotip kod oboljelih od IgAV-a koji su razvili nefritis, ali i kod bolesnika koji ga nisu razvili. Od 21 ispitanika koji su razvili nefritis, 13 (62 %) ih je CC genotipa, 6 (29 %) je CT genotipa, a 2 (9 %) ispitanika je TT genotipa, pri čemu nije uočena povezanost između genotipa i razvoja IgAVN ( $p = 0,57$ ) (Tablica 5).

Tablica 4. Prikaz ispitanika oboljelih od IgA vaskulitisa prema spolu i razvoju nefritisa

	Broj (%) prema nefritisu			P*
	Ne (n = 55)	Da (n = 21)	Ukupno (n = 76)	
Spol				
Muški	32 (58)	8 (38)	40 (53)	0,10
Ženski	23 (42)	13 (62)	36 (47)	

\* $\chi^2$  test

Tablica 5. Prikaz učestalosti genotipova s obzirom na razvoj nefritisa u IgA vaskulitisu

	Broj (%) prema nefritisu			P*
	Ne (n = 55)	Da (n = 21)	Ukupno (n = 76)	
Genotip				
CC	28 (51)	13 (62)	41 (54)	0,57†
CT	23 (42)	6 (29)	29 (38)	
TT	4 (7)	2 (9)	6 (8)	

\* $\chi^2$  test

†Fisherov egzakti test

Kategorizacijom pacijenata u skupinu onih sa CC genotipom i u skupinu sa CT/TT genotipom, nije utvrđena statistički značajna razlika u razvoju IgAVN. Također, nije uočena statistički značajna razlika u razvoju IgAVN analizom frekvencije alela (Tablica 6).

Tablica 6. Prikaz raspodjele genotipova i učestalosti alela s obzirom na razvoj nefritisa u IgA vaskulitisu

	Broj (%) prema nefritisu			OR* (95 % CI†)	P‡
	Ne (n = 55)	Da (n = 21)	Ukupno (n = 76)		
Genotip					
CC	28 (51)	13 (62)	41 (54)	0,69 (0,25 – 1,94)	0,48
CT/TT	27 (49)	8 (38)	35 (46)		
Alel					
C	79 (72)	32 (76)	111 (73)	1,26 (0,55 – 2,86)	0,59
T	31 (28)	10 (24)	41 (27)		

\*Omjer izgleda

†Interval pouzdanosti

‡ $\chi^2$  test

## 6. RASPRAVA

IgAV, najčešći sistemski vaskulitis dječje dobi, prepoznatljiv je po palpabilnoj purpuri ili petehijama bez trombocitopenije pretežno na donjim ekstremitetima (30). Iako je IgAV uglavnom samoograničavajuća bolest, moguće je pojavljivanje njegovih simptoma kao što su kožni osip, artralgiya, gastrointestinalni simptomi i hematurija u razdobljima od nekoliko mjeseci pa do nekoliko godina od samog početka bolesti (7). Patofiziologija i etiopatogeneza ove bolesti i dalje nisu u potpunosti razjašnjene, no poznato je da su u njen razvoj uključeni IgA depoziti, kao i okolišni i genetski čimbenici. Cilj ovog rada bio je istražiti genetske komponente ove bolesti. Genetski čimbenici igraju važnu ulogu u razvoju autoimunih i upalnih poremećaja, poput reumatoidnog artritisa, upalnih bolesti crijeva, dijabetesa tipa 1, astme i celijakije. Povećanje komorbiditeta i pojavnost različitih autoimunih bolesti u obiteljima ukazuje na postojanje preklapanja u genetskoj pozadini ovih bolesti. Prijašnje studije su već uspjele povezati učestale genske komponente, odnosno SNP-ove, s razvojem imunoloških bolesti. Također, otkriveni su imunološki mehanizmi koji su zajednički nekim poremećajima povezanih s imunološkim sustavom. Identificiranje novih gena koji su povezani s više od jednim autoimunim ili kroničnim upalnim poremećajem moglo bi objasniti genetsku osnovu zajedničke patogeneze imunoloških bolesti. Spoznaje poput ovih doprinose boljem razumijevanju razvoja i posljedica ovakvih bolesti. Osim toga, razumijevanje zajedničke patogeneze različitih imunoloških bolesti može pružiti ciljeve za terapijsku intervenciju. Ciljanje putova umjesto gena u terapijskom postupku, kao i korelacija genskog profila pacijenta s učinkovitošću određene terapije može otvoriti nove putove u kliničkim ispitivanjima (31). Genetičke studije bolesti povezanih s imunološkim sustavom svoj bi fokus trebale usmjeriti na detekciju više gena odgovornih za razvoj bolesti te utvrđivanjem pravih uzročnih varijanti.

U ovom radu, fokus je na genu HMGB1 koji kao unutarstanični protein stabilizira strukturu nukleosoma, dok u izvanstaničnom prostoru ima ulogu proupalnog medijatora. Osim toga, povišene razine HMGB1 povezane su s upalnim stanjima i ozljedama tkiva, kao i već dobro istraženim bolestima poput raka i sepse (32-35). Također, HMGB1 ima ulogu u patogenezi brojnih upalnih i autoimunih bolesti poput sistemskog eritemskog lupusa, reumatoidnog artritisa, ANCA-vaskulitisa (engl. *antineutrophil cytoplasmic antibody* – antineutrofilna citoplazmatska protutijela) i Behcetove bolesti (14,36-39). Nekoliko je studija dokazalo povišenu razinu HMGB1 u serumu pacijenata oboljelih od IgAV, kao i povišene razine serumskog HMGB1 u pacijenata koji su razvili IgAVN u usporedbi sa zdravim

kontrolnim uzorcima (40-43). HMGB1 rs1045411 polimorfizam već je u prethodnim studijama povezan s razvojem određenih karcinoma poput karcinoma želuca, karcinom dojke, hepatocelularnog karcinoma i karcinoma usne šupljine (23-25). Također, dokazano je da HMGB1 ima ključnu ulogu u patogenezi sepse i multiorganskog zatajenja (19). S obzirom na sve navedeno, u ovom je radu provedena procjena potencijalne povezanosti između polimorfizma gena za HMGB-1 (SNP rs1045411) i pojave IgA vaskulitisa. No, usporedbom frekvencije genotipa i alela polimorfizma gena HMGB1 kod pacijenata s IgAV-om i učestalosti genotipa i alela u kontrolnoj skupini, nisu pronađene statistički značajne razlike. Također, ispitano je može li polimorfizam rs1045411 biti odgovoran za povećan rizik od bubrežnih komplikacija, odnosno je li povezan s razvojem IgAVN. Usporedbom frekvencije genotipa i alela oboljelih od IgAV sa zdravim kontrolama, također nije pronađena statistički značajna razlika.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da polimorfizam gena HMGB1 rs1045411 nije povezan s povećanim rizikom za razvoj IgAV-a, kao ni s povećanim rizikom za razvoj IgAVN-a. Nedostatak povezanosti između IgAV-a, IgAVN-a i polimorfizma rs1045411 u genu HMGB1 u ovoj je studiji bio neočekivan s obzirom na dokaze o uključenosti HMGB1 i rs1045411 u patogenezi prethodno navedenih upalnih stanja i autoimunih bolesti. Odsutnost međuovisnosti ne može isključiti bilo kakvu povezanost s drugom populacijom. Povezanost također može ovisiti o funkcionalnosti SNP-a ili alternativnom mehanizmu za aktivaciju HMGB1 u IgAV-u. Također, moguće je da patogenu ulogu HMGB1 u IgAV-u reguliraju neki drugi nukleotidni polimorfizmi koje je potrebno otkriti i proučiti. Iako je ovaj rad dio istraživanja koje je prvo do sada istraživalo povezanost između genetske varijacije u HMGB1 i IgAV-u, kao i povezanosti s razvojem IgAVN-a, postoje određena ograničenja ove studije. Na primjer, u budućnosti bi trebalo proučiti više SNP-ova gena HMGB1 i, iako je broj sudionika studije ispunio zahtjev za analizom, veličina uzorka studije bila je relativno mala, stoga bi se u budućnosti trebale provesti veće studije uzoraka kako bi se potvrdila ova povezanost.

Važno je detaljnije proučiti utjecaj raznih mutacija na predispoziciju za razvoj IgAV-a, kao i utjecaj na način na koji se bolest manifestira. Posebno je važno proučiti opseg zahvaćanja bubrega jer IgAVN, kao komplikacija u IgAV-u, ostavlja najdugoročnije posljedice. Potrebno je nastaviti potragu za genetskim biljezima za procjenu težine bolesti u IgAV-u, s naglaskom na genske varijante povezane s povećanim rizikom za razvoj IgAVN-a. S obzirom na dosadašnja saznanja, postaje evidentno da genetika igra važnu ulogu u određivanju vjerojatnosti za oboljenje i povezana je s težinom fenotipa koji će se razviti. No većina podataka o IgAV-u

prikupljena je iz studija koje su imale ispitanike dječje dobi. Iako je ovaj vaskulitis tipičan za djecu i rjeđe se javlja u odraslih, klinička je slika teža kod odrasle populacije te bolest u konačnici može rezultirati komplikacijama opasnima po život, kao što je završna faza zatajenja bubrega. Stoga u budućnosti je od velike važnosti formirati studije koje će uključiti veći broj odraslih pacijenata. Također, bilo bi korisno utvrditi postoje li određeni polimorfizmi gena koji utječu na osjetljivost na IgAV u odraslih osoba (9,10).

## 7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- U ovom istraživanju nije uočena povezanost između polimorfizma jednog nukleotida gena HMGB1 (rs1045411) i pojave IgAV-a.
- U ovom istraživanju nije uočena povezanost rs1045411 s povećanim rizikom od razvoja IgAVN-a u IgAV-u.



## 8. SAŽETAK

**Ciljevi istraživanja:** Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost polimorfizma gena za HMGB-1 (rs1045411) i pojave IgA vaskulitisa metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

**Ustroj studije:** Studija slučajeva i kontrola.

**Ispitanici i metode:** Ispitanici u ovom istraživanju su djeca, njih 176; 100 zdravih kontrola i 76 oboljelih s dijagnozom IgAV. Ispitanici s IgAV upućeni su iz Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Kliničkog bolničkog centra Osijek. Krv svih ispitanika uzorkovana je minimalno invazivno, jednokratnom venepunkcijom, za potrebe genotipizacije. Svim ispitanicima napravljena je genotipizacija real-time PCR metodom na uređaju 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) koristeći TaqMan SNP hibridizacijske probe.

**Rezultati:** Prilikom usporedbe frekvencije genotipa i alela HMGB genskog polimorfizma rs1045411 kod pacijenata oboljelih od IgAV s frekvencijom genotipa i alela u kontrolnoj skupini, nije pronađena statistički značajna razlika ( $p > 0,05$ ). Također, nije uočena povezanost između proučavanih genotipa i razvoja IgAVN kao komplikacije IgAV ( $p > 0,05$ ).

**Zaključak:** Ovim istraživanjem utvrđeno je da ne postoji povezanost polimorfizma gena za HMGB1 (rs1045411) i pojave IgAV, kao ni povezanost s povećanim rizikom od razvoja IgAVN u IgAV.

**Ključne riječi:** Henoch-Schönleinova purpura; *HMGB1* gen; HMGB1 protein; IgA vaskulitis; SNP

## 9. SUMMARY

### THE RELATIONSHIP OF rs1045411 HMGB1 GENE POLYMORPHISM AND INCIDENCE OF IgA VASCULITIS IN CHILDREN

**Objectives:** The aim of this study was to investigate the possible role of single nucleotide polymorphism rs1045411 of the HMGB1 gene in occurrence of IgAV vasculitis using real-time PCR genotyping.

**Study design:** Case-control study

**Participants and methods:** The subjects in this study were children, 176 of them; 100 healthy controls and 76 patients diagnosed with IgAV. The subjects with IgAV were referred from the Clinic for Pediatrics of the Clinical Hospital Centre Zagreb and the Clinical Hospital Centre Osijek. The blood of all subjects was sampled minimally invasively, with a single venipuncture, for the purposes of genotyping. All subjects were genotyped using real-time PCR on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using TaqMan SNP genotyping assays.

**Results:** When comparing the frequency of genotypes and alleles of the HMGB rs1045411 gene polymorphism in IgAV patients with the frequency of genotypes and alleles in the control group, no statistically significant difference was found ( $p > 0.05$ ). Also, no association was observed between the studied genotypes and the development of IgAVN as a complication of IgAV ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** This study has shown that there was no association between the polymorphism of the HMGB1 gene (SNP rs1045411) and the IgAV occurrence, nor an association with an increased risk of developing IgAVN in IgAV.

**Keywords:** Henoch-Schönlein purpura; *HMGB1* gene; HMGB1 protein; IgA vasculitis; SNP

**10. LITERATURA**

1. Píram M, Mahr A. Epidemiology of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein): current state of knowledge. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25:171–178.
2. Sapina M, Frkovic M, Sestan M, Srsen S, Ovuka A, Varga MB, i sur. Geospatial clustering of childhood IgA vasculitis and IgA vasculitis-associated nephritis. *Ann Rheum Dis*. 2020;80:1–7.
3. Gardner-Medwin JMM, Dolezalova P, Cummins C, Southwood TR. Incidence of Henoch-Schönlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins. *Lancet*. 2002;360:1197–202.
4. Ebert EC. Gastrointestinal Manifestations of Henoch-Schonlein Purpura. *Dig Dis Sci*. 2008;53:2011–9.
5. Du L, Wang P, Liu C, Li S, Yue S, Yang Y. Multisystemic manifestations of IgA vasculitis. *Clin Rheumatol*. 2021;40:43–52.
6. Pohl M. Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Pediatr Nephrol*. 2015;30:245–52.
7. Kawasaki Y, Ono A, Ohara S, Suzuki Y, Suyama K, Suzuki J, i sur. Henoch-Schönlein purpura nephritis in childhood: pathogenesis, prognostic factors and treatment. *Fukushima J Med Sci* [Internet]. 2013;59:15–26. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842510>. Pristup stranici: 4. 2. 2021.
8. Roache-Robinson P, Hotwagner DT. Henoch-Schonlein purpura. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537252/>. Pristup stranici: 4. 2. 2021.
9. Oni L, Sampath S. Childhood IgA Vasculitis (Henoch Schonlein Purpura)-Advances and Knowledge Gaps. *Front Pediatr*. 2019;7:257.
10. López-Mejías R, Castañeda S, Genre F, Remuzgo-Martínez S, Carmona FD, Llorca J, i sur. Genetics of immunoglobulin-A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura): An updated review. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2018;17:301–15. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.11.024>. Pristup stranici: 4. 2. 2021.

11. Venereau E, Schiraldi M, Uguccioni M, Bianchi ME. HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation. *Mol Immunol*. 2013;55:76–82.
12. Yang H, Wang H, Chavan SS, Andersson U. High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Mol Med*. 2015;21:6–12.
13. Tripathi A, Shrinet K, Kumar A. HMGB1 protein as a novel target for cancer. *Toxicol Rep* 2019;6:253–61. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.03.002>. Pristup stranici: 4. 2. 2021.
14. Zhu B, Zhu Q, Li N, Wu T, Liu S, Liu S. Association of serum/plasma high mobility group box 1 with autoimmune diseases. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018;97:e11531. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6086504/>. Pristup stranici: 6. 2. 2021.
15. Bobek D, Grčević D, Kovačić N, Lukić I, Jelušić M. The presence of high mobility group box-1 and soluble receptor for advanced glycation end-products in juvenile idiopathic arthritis and juvenile systemic lupus erythematosus. *Pediatr Rheumatol* [Internet]. 2014;12:50. Dostupno na: <https://pedrheum.biomedcentral.com/articles/10.1186/1546-0096-12-50>. Pristup stranici: 6. 2. 2021.
16. Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, Zeh HJ, Billiar T, Rubartelli A, i sur. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2836–48.
17. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, i sur. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000;405:354–360.
18. Kornblit B, Munthe-Fog L, Madsen HO, Strom J, Vindelov L, Garred P. Association of HMGB1 polymorphisms with outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care* [Internet]. 2008;12:R83. Dostupno na: <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/cc6935>. Pristup stranici: 7. 2. 2021.
19. Lee K, Chang Y, Song K, Park YY, Huh JW, Hong S-B, i sur. Associations between single nucleotide polymorphisms of high mobility group box 1 protein and clinical outcomes in Korean sepsis patients. *Yonsei Med J*. 2016;57:111–7.

20. Wang JX, Yu HL, Bei SS, Cui ZH, Li ZW, Liu ZJ, i sur. Association of HMGB1 gene polymorphisms with risk of colorectal cancer in a chinese population. *Med Sci Monit.* 2016;22:3419–25.
21. Yao Y, Guo D, Yang S, Jin Y, He L, Chen J, i sur. HMGB1 gene polymorphism is associated with hypertension in Han Chinese population. *Clin Exp Hypertens.* 2015;37:166–71.
22. Zeng L, Zhang AQ, Gu W, Chen KH, Jiang DP, Zhang LY, i sur. Clinical relevance of single nucleotide polymorphisms of the high mobility group box 1 protein gene in patients with major trauma in southwest China. *Surgery [Internet].* 2012;151:427–36. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2011.07.075>. Pristup stranici 7. 2. 2021.
23. Xia Q, Tao P, Xu J. Association of Polymorphism rs1045411 in the HMGB1 Gene with Cancer Risk: Evidence from a Meta-analysis. *Int J Med Sci* 2021;18:1348–55.
24. Bao G, Qu F, He L, Zhao H, Wang N, Ji G, i sur. Prognostic Significance of Tag SNP rs1045411 in HMGB1 of the Aggressive Gastric Cancer in a Chinese Population. *PLoS One.* 2016;11:e0154378.
25. Supic G, Kozomara R, Zeljic K, Stanimirovic D, Magic M, Surbatovic M, Jovic N, Magic Z. HMGB1 genetic polymorphisms in oral squamous cell carcinoma and oral lichen planus patients. *Oral Dis.* 2015;21:536–43.
26. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281–97.
27. Božina N. Farmakogenomika-genski polimorfizam i primjena lijekova. U: Francetić I, Vitezić D. *Klinička farmakologija.* 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 247–61.
28. Matsuda K. PCR-Based Detection Methods for Single-Nucleotide Polymorphism or Mutation: Real-Time PCR and Its Substantial Contribution Toward Technological Refinement. *Adv Clin Chem.* 2017;80:45–72.
29. Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Četković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, i sur. *Metode u molekularnoj biologiji.* Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007.

30. Jelušić M, Frković M. Vaskulitisi u dječjoj dobi. *Reumatizam*. 2016;63:80–5.
31. Zhernakova A, Diemen CC Van, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet*. 2009;10:43–55.
32. Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, i sur. New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J*. 2001;20:4337–40.
33. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:469–78.
34. Urbonaviciute V, Voll RE. High-mobility group box 1 represents a potential marker of disease activity and novel therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *J. Intern Med*. 2011;270:309–18.
35. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, i sur. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum*. 2003;48:971–81.
36. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:331–42.
37. Ahn JK, Cha HS, Bae EK, Lee J, Koh EM. Extracellular high-mobility group box 1 is increased in patients with Behcet's disease with intestinal involvement. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2011;26:697–700. Dostupno na: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21532866](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21532866). Pristup stranici: 15. 3. 2021.
38. Kaur I, Behl T, Bungau S, Kumar A, Mehta V, Setia D, i sur. Exploring the therapeutic promise of targeting HMGB1 in rheumatoid arthritis. *Life Sci* [Internet]. 2020;258:118164. Dostupno na: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118164>. Pristup stranici: 15. 3. 2021.
39. Wang C, Gou SJ, Chang DY, Yu F, Zhao MH, Chen M. Association of circulating level of high mobility group box 1 with disease activity in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Arthritis Care Res*. 2013;65:1828–34.

40. Chen T, Guo ZP, Wang WJ, Qin S, Cao N, Li MM. Increased serum HMGB1 levels in patients with Henoch-Schönlein purpura. *Exp Dermatol.* 2014;23:419–23.
41. Feng-Ying W, Xing-Mei J, Man L. Expression and clinical significance of serum high-mobility group protein box 1 in children with Henoch-Schönlein purpura. *Chin J Contemp Pediatr.* 2015;17:792–5.
42. Wang LH, Wu MH, Chen PC, Su CM, Xu G, Huang CC, i sur. Prognostic significance of high-mobility group box protein 1 genetic polymorphisms in rheumatoid arthritis disease outcome. *Int J Med Sci.* 2017;14:1382–8.
43. Sato F, Maruyama S, Hayashi H, Sakamoto I, Yamada S, Uchimura T, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 in patients with renal diseases. *Nephron Clin Pract.* 2008;108:194–201.

## 11. ŽIVOTOPIS

Valentina Vučemilović-Jurić

Datum i mjesto rođenja:

- 11. 11. 1997., Našice

Adresa:

- Ivana Mažuranića 11, 31500 Našice

Obrazovanje:

- 2019. – 2021.: Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2016. – 2019.: Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2012. – 2016.: Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavoga Našice

Dodatna edukacija:

- 2012 – 2016.: DSD program naprednog učenja njemačkog jezika, Srednja škola Isidora Kršnjavoga Našice

Stručna i znanstvena aktivnost:

- Vučemilović-Jurić V, Kadivnik M, Arvaj N, Bebek D, Krstanović I, Muller A, Šijanović S, Wagner J. Role of progesterone receptor gene single nucleotide polymorphism in preterm birth. OSCON 2020, Osijek 13. – 14. 2. 2020. // Knjiga sažetaka, urednik: Ivana Jurić, str. 84 (usmeno izlaganje)