

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nikolina Damašek

**Polimorfizmi u genima za glikoproteine trombocitne membrane u djece s
hemoragijskim moždanim udarom**

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod vodstvom dr. sc. Andrea Čeri i doc. dr. sc. Jasna Leniček Krleža spec. med. biochem. Rad je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

Uzorci genomske DNA korišteni za ovo istraživanje su prikupljeni u sklopu projekta „Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (broj projekta IP-2014-09-2047, voditeljica prof. dr. sc. Renata Zadro).

Popis kratica korištenih u radu

AIC	parametar za procjenu prediktivne mogućnosti pogreške i kvalitete modela (engl. <i>Akaike information criterion</i>)
AK	aminokiselina
bp	bazni par
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
ClinVar	baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa
dbSNP	baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. <i>Single nucleotide Polymorphism Database</i>)
D'	statistička vrijednost mjere neravnoteže veza
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DNaza	deoksiribonukleaza
dNTP	deoksinukleo-zid-trifosfati
F	nizvodna početnica (engl. <i>forward</i>)
FL	fluorescein
FRET	Försterov rezonantni prijenos energije (engl. <i>Förster resonance energy transfer</i> , FRET)
GP	glikoprotein
GP1BA	glikoprotein 1b trombocitne podjedinice α
HGVS	Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. <i>Human Genome Variation Society</i>)
HMU	hemoragijski moždani udar
HRM	krivulja taljenja visoke razlučivosti (engl. <i>high resolution melting</i>)
I/D	insercijsko-delecijski polimorfizam

ICH	intracerebralno krvarenje
ITGA2	integrinska podjedinica $\alpha 2$
kDa	kilodalton
LCRed640	LightCycler [®] Red 640
LD	neravnoteža povezivanja (engl. <i>linkage disequilibrium</i>)
MC	krivulja taljenja (engl. <i>melting curve</i>)
M-PCR	PCR s višestrukim umnažanjem (engl. <i>multiplex PCR</i>)
Mr	relativna molekularna masa
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
MU	moždani udar
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
OR	omjer rizika (engl. <i>odds ratio</i>)
P	P vrijednost
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-SSP	PCR uz pomoć početnica specifičnoga slijeda (engl. <i>sequence specific primer</i>)
pufer TBE	pufer tris-(hidroksimetil)-aminometana, borne kiseline i etilendiamintetraoctene kiseline
pufer TE	pufer Trisa i Na ₂ EDTA
Q-PCR	PCR u stvarnom vremenu (engl. <i>quantitative PCR</i>)
Q-PCR-HRM	PCR u stvarnom vremenu s analizom krivulje taljenja visoke razlučivosti (engl. <i>high resolution melting</i>)

Q-PCR-MC	PCR u stvarnom vremenu s analizom krivulje taljenja (engl. <i>melting curve</i>)
R	uzvodna početnica (engl. <i>reverse</i>)
RNaza	ribonukleaza
SAH	subarahnoidalno krvarenje
SELP	ljudski P-selektin
SNP	polimorfizam jednoga nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
T _m	temperatura mekšanja
Tris	tris-(hidroksimetil)-aminometan
UTR	nekodirajuća regija (engl. <i>untranslated region</i>)
VNTR	varijabilni broj tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. <i>variable number of tandem repeats</i>)
VWF	von Willebrandov čimbenik
χ^2	hi-kvadrat

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Moždani udar	1
1.2.	Hemoragijski moždani udar	1
1.3.	Etiologija HMU-a	2
1.4.	Subarahnoidalno krvarenje	2
1.5.	Intracerebralno krvarenje	2
2.	POLIMORFIZMI U GENIMA ZA GLIKOPROTEINE TROMBOCITNE MEMBRANE	3
2.1.	Kompleks GPIa/IIa	3
2.2.	Kompleks GPIb/IX/V	4
2.3.	GPVI	5
2.3.	P-selektin	6
3.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	8
4.	MATERIJALI I METODE	10
4.1	Ispitanici	10
4.2.	Molekularno-genetičke metode	11
4.2.1.	Izdvajanje genomske DNA	11
4.2.2.	Mjerenje koncentracije i čistoće DNA	11
4.2.3.	Dokazivanje polimorfizama <i>ITGA2</i> 807 T/C i 873 G/A, te <i>GPIBA</i> (-5) T/C	13
4.2.3.1.	Genotipizacija metodom Q-PCR-MC	14
4.2.4.	Dokazivanje polimorfizama <i>SELP</i> Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te <i>GP6</i> 13254 T/C	19
4.2.4.1.	Genotipizacija metodom Q-PCR-HRM	23
4.2.5.	Dokazivanje polimorfizma <i>SELP</i> Asn562Asp	27
4.2.6.	Dokazivanje polimorfizama <i>GPIBA</i> VNTR	33
4.3.	Statistička obrada podataka	36
5.	REZULTATI	39
5.1.	Karakteristike skupina ispitanika s dijagnozom HMU-a s obzirom na dob i spol	39
5.2.	Povezanost ispitivanih polimorfizama s dijagnozom HMU-a u djece	40
5.2.1.	Ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini	40
5.2.2.	Pojedinačni polimorfizmi i HMU u djece	42
5.3.	Povezanost odabranih haplotipova s HMU-om u djece	45

5.3.1.	Ispitivanje neravnoteže povezanosti polimorfizama	45
5.3.2.	Haplotip <i>SELP</i> Ser290Asn/Asn562ASP/Val599Leu/Thr715Pro na kromosomu 1 i HMU u djece.....	46
5.3.3.	Haplotip <i>ITGA2</i> C807T/G873A na kromosomu 5 i HMU u djece.....	48
6.	RASPRAVA.....	50
7.	ZAKLJUČAK	55
8.	ZAHVALE	56
9.	LITERATURA	57
10.	SAŽETAK.....	60
11.	SUMMARY	62
12.	ŽIVOTOPIS	64

1. UVOD

1.1. Moždani udar

Moždani udar (MU) je akutni neurološki poremećaj koji je ujedno vodeći uzrok smrti i tjelesnog oštećenja. Znatno je veća prevalencija moždanog udara kod odrasle populacije, nego kod djece. MU ubrajamo u skupinu cerebrovaskularnih bolesti jer promjene moždanog parenhima nastaju uslijed patoloških promjena krvnih žila. Moždani udar uzrokuje nedovoljnu opskrbu moždanog tkiva kisikom zbog čega se javlja cerebralna insuficijencija. Posljedice MU-a ovise ponajviše o zrelosti mozga, mjestu i opsegu lezije, a veliki utjecaj ima i etiologija razvoja krvarenja. Moždani udar može biti uzrokovan od strane nasljednih i stečenih poremećaja, a etiologija mu je izrazito kompleksa i često nepoznata (1–3). MU je jedan od 10 najčešćih uzroka smrti s najvišom stopom smrtnosti u prvih godinu dana života (2). Osnovna podjela MU-a je na hemoragijski i ishemijski.

1.2. Hemoragijski moždani udar

Hemoragijski moždani udar (HMU) može se javiti u obliku intracerebralnog krvarenje (ICH) i subarahnoidalnog krvarenja (SAH), a nastaje zbog rupture krvne žile. Druga podjela HMU-a je prema dobi pa tako možemo razlikovati: perinatalni MU koji se događaju između 28. gestacijskog tjedna pa sve do 28. dana nakon rođenja, a MU koji se dogodi u razdoblju od 28. dana života pa sve do 18. godine nazivamo MU u djetinjstvu. Prevalencija HMU-a je 6,2 prema 100 000 živorođene djece (3). Dokazano je veće preživljenje djece nego odraslih s HMU-om, zbog plastičnosti mozga (2,4). Procijenjena je veća smrtnost za 10 – 20 % ako dijete ima dodatno hemostatske i srčane poremećaje. Stanja koja u najvećoj mjeri utječu na lošiji ishod ili smrt su: volumen krvarenja, odnosno omjer krvarenja i volumena mozga (ujedno i ključan prediktor ishoda), hidrocefalus, hernijacija mozga i rane promjene u mentalnom stanju. Mnogi pacijenti imaju dugotrajne i kratkotrajne neurološke, kognitivne, funkcionalne i adaptivne poteškoće koje mogu imati brojne posljedice za različite aktivnosti u svakodnevnom životu, socijalnu inteligenciju, školski uspjeh i životnu neovisnost (4).

1.3. Etiologija HMU-a

Čimbenici rizika za HMU uključuju kongenitalne bolesti srca, fetalni distres i hemostatske abnormalnosti. Neonatalni hemoragijski moždani udar nije jedinstvena cjelina. Najčešće je etiologija HMU-a idiopatsko intraparenhimsko krvarenje, hemoragijska transformacija postojećeg arterijskog infarkta, tromboza cerebralnih venskih sinusa i hipoksična ishemijska encefalopatija. Subduralno i subarahnoidalno krvarenje može biti veliko, ali je najčešće malo, infratentorijalno, asimptomatsko i brzo apsorbirajuće (1).

1.4. Subarahnoidalno krvarenje

SAH nastaje oštećenjem vena subarahnoidalnog vila. SAH kod djece rođene u terminu nastaje kao posljedica mehaničke traume glave s rupturom vena koje se nalaze na subarahnoidalnom području. Klinička slika ovisi o opsegu krvarenja, većinom djeca prolaze bez simptoma i neuroloških posljedica, dok veća krvarenja karakteriziraju napadaji cerebralnih konvulzija, a najčešće fokalne ili generalizirane konvulzije. Ako se u podlozi većeg masivnog krvarenja nalazi hipoksija, najvjerojatniji ishod je smrt ili će dijete imati teške neurološke posljedice (5).

1.5. Intracerebralno krvarenje

ICH može zahvatiti parenhim ili ventrikule (6). Veća je stopa preživljenja u slučajevima pedijatrijskog intracerebralnog krvarenja nego adultnog, ali naknadno se javlja znatno veća stopa dugotrajnih kognitivnih i neuroloških posljedica. Djeca često imaju velike psihosocijalne posljedice i krvarenje uzrokuje funkcionalnu neovisnost djeteta. Klinički simptomi najčešće uključuju glavobolje, povraćanja, napadaje, gubitak svijesti, a neurološki se deficit javlja kod 16 – 50 % djece (4).

2. POLIMORFIZMI U GENIMA ZA GLIKOPROTEINE TROMBOCITNE MEMBRANE

Trombociti su krvne pločice koje imaju višestruku ulogu, sudjeluju u procesima tromboze, hemostaze, ali i u upalnim procesima, a to ostvaruju zahvaljujući receptorima glikoproteinima (GP) koje imaju na svojoj membrani (7). Trombociti ostvaruju interakcije s krvnim žilama, fibrinogenom i von Willebrandovim čimbenikom (VWF), a GP-i imaju ključnu ulogu u interakcijama koje trombociti ostvaruju. Najznačajniji GP-i su GPIb/IX/V, GPVI, receptori aktivirani proteazom, receptori za adenozin difosfat, integrini i drugi. Trombocitni integrini su heterodimerni transmembranski GP-i sastavljeni od različitih α i β podjedinica (8). Promjene u strukturi i funkciji proteina trombotične membrane mogu utjecati na promjene u staničnoj signalizaciji, a posljedično tome dolazi do promjena u funkciji trombocita. Posljedica su patofiziološki procesi, primjerice tromboza, ateroskleroza, MU ili sepsa, koji nastaju zbog promijenjene funkcije trombocita, adhezije i agregacije (7,9). Dokazano je da krvno-moždana barijera svoju potpunu funkcionalnost postiže tek nakon rođenja, a trombociti su uključeni u formiranje moždane vaskulature (7).

Za razumijevanje funkcije trombocita u fiziološkim uvjetima održavanja hemostaze, ključno je istraživanje slabo istraženih polimorfizama trombotičnih GP receptora i adhezijskih molekula, P-selektina.

2.1. Kompleks GPIa/IIa

Kompleks GPIa/IIa je heterodimer sastavljen od podjedinica $\alpha 2$ i $\beta 1$, a zbog svoje strukture se naziva i integrin $\alpha 2\beta 1$. Primarno je prisutan u epitelnim stanicama, trombocitima/makrocitima i fibroblastima. Podjedinica $\alpha 2$ sadrži izvanstaničnu domenu I koja je homologna domeni A VWF-a, podtipovima kolagena i komponentama komplementa te posreduje u njihovom specifičnom vezanju. Domena I sadrži vezno mjesto za katione, Mg^{2+}/Mn^{2+} koji su ključni za vezanje s kolagenom. Kompleks ima veliki afinitet vezanja za kolagen tipa I, ali ostvaruje veze i s drugim izoformama kolagena i nekolagenskih liganada. Veze između kompleksa GPIa/IIa i kolagena su čvrste, a važne su u adheziji i aktivaciji trombocita u subendotelu nakon vaskularne ozljede. Interindividualne varijacije u ekspresiji kompleksa GPIa/IIa u populaciji su značajne i posljedica su genskih varijacija. Podjedinica $\alpha 2$

GPIa/IIa kodirana je genom *ITGA2* koji se nalazi na kratkom kraku 5. kromosoma (lokus 5q11.2), a podjedinica $\beta 1$ kodirana je genom *ITGB1* na 10. kromosomu (lokus 10p11.2). Polimorfizmi *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A, prikazani u Tablici 1, su međusobno povezani, ne dovode do promjene aminokiselina, ali mogu utjecati na stabilnost mRNA, a time utječu na ekspresiju kompleksa GPIa/IIa (9,10).

Tablica 1. Polimorfizmi u *ITGA2* (11–13).

Nazivlje HGVS	Referentni broj prema dbSNP	Zamjena nukleotida*	Zamjena AK*
NM_002203.4:c.759C>T	rs1126643	759 C/T (807 C/T)	Phe253Phe (Phe224Phe)
NM_002203.4:c.825G>A	rs1062535	825 G/A (873 G/A)	Thr275Thr (Thr246Thr)

*Navedeni su podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK prema nazivlju HGVS (13) te bazama podataka dbSNP (11) i ClinVar (12). U zagradama su navedeni podaci o položajima zamjena nukleotida u AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi. HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina.

2.2. Kompleks GPIb/IX/V

Kompleks GPIb/IX/V se sastoji od polipeptidnih podjedinica: GPIb α je disulfidnom vezom vezan s GPIb β te nekovalentnim vezama s GPIX i GPV u omjeru 2:2:2:1. Ovaj kompleks započinje adheziju trombocita na imobilizirani VWF na stjenci krvnih žila u različitim stanjima, primjerice aterosklerozi, srčanom i moždanom udaru (9,14). Nakon aktivacije kompleksa GPIb/IX/V dolazi do aktivacije integrina α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) koji veže VWF ili fibrinogen i pridonosi adheziji trombocita (14). GPIb α je multifunkcionalni receptor koji, osim što veže VWF i endotelni P-selektin i time omogućuje kotrljanje i vezanje trombocita za oštećeni endotel, djeluje i kao receptor za brojne ligande poput trombina i faktora zgrušavanja XI/XIIa. Gen za *GP1BA* se nalazi na 17. kromosomu (lokus 17p13.2), a genske varijacije utječu na ekspresiju i funkciju kompleksa GPIb/IX/V, a istraživane su prikazane u Tablici 2 (9).

Tablica 2. Genske promjene u *GP1BA* (11–13).

Naziv	Nazivlje HGVS	Referentni broj prema dbSNP	Zamjena nukleotida*	Učinak
Kozak	NM_000173.7:c.-5T>C	rs2243093	(-5) T/C	5' UTR
VNTR	NM_000173.7:c.1321_1359del	rs125934995	I/D 39 ili 78	I/D 13 ili 26
A/B/C/D/E	NM_000173.7:c.1282_1359del**	rs869060239**	bp	AK

*Navedeni su podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK prema nazivlju HGVS (13) te bazama podataka dbSNP (11) i ClinVar (12). U zagradama su navedeni podaci o položajima zamjena nukleotida u AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi. **Za *GP1BA* VNTR navedeni su podaci za dva alela. HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*), VNTR – varijabilni broj tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. *Variable number of tandem repeats*), I/D – insercijsko-delecijski polimorfizmi, AK – aminokiselina.

U nizu Kozak na položaju -5 uočen je T/C polimorfizam *GP1BA*. Kozakov niz predstavlja obrazac prema kojemu svim funkcionalnim AUG tripletima prethodi purin na poziciji -3 i nakon AUG na poziciji +1, a prikazuje se na sljedeći način: (GCC)GCCAGCCA UGG. Ovaj niz je nužan za prepoznavanje ribosoma i predstavlja početno mjesto za translaciju proteina (9).

Polimorfizam *GP1BA* kojeg karakterizira varijabilan broj tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. *variable number of tandem repeats*, VNTR) sekvencija od 39 bp u genu, odnosno sekvencije od 13 AK-a u proteinu. Različiti aleli označavaju različit broj ponavljanja, pa tako razlikujemo A (četiri ponavljanja), B (tri ponavljanja), C (dva ponavljanja), D (jedno ponavljanje) i E (delecija), gdje su aleli A i E izrazito rijetki (9).

2.3. GPVI

GPVI je transmembranski GP eksprimiran na megakariocitima i trombocitima, a glavni je kolagenski receptor. Strukturno se može podijeliti u tri dijela: izvanstaničnu regiju koja se sastoji od dvije disulfidno povezane domene nalik imunoglobulinu, transmembransku domenu u kojoj Arg252 povezuje GPVI solnim mostom s aspartatnim ostatkom u aktivacijskom

tirozinskom motivu imunoreceptora koji se nalazi u transmembranskoj domeni γ -lanca Fc receptora, te citoplazmatski rep (15).

GPVI kodiran je genom *GP6* na drugom kraku 19. kromosoma (lokus 19q13.42). Polimorfizmi *GP6* su povezani uz povećanu mogućnost razvoja bolesti kao što su infarkt miokarda i MU. Postoji istraživanje koje je pokazalo da je disfunkcionalnost tromba praćena defektom u GPVI-u, a klinički profili pacijenata ukazuju na teška, ponekad i po život opasna krvarenja (7,15,16).

Tablica 3. Polimorfizam u *GP6* koji dovodi do zamjene aminokiselina (11–13,16).

Nazivlje HGVS	Referentni broj prema dbSNP	Zamjena nukleotida*	Zamjena AK*	Regija
NM_001083899.2:c.655C>T	rs1613662	655 C/T (13254 T/C)	Pro219Ser (Ser199Pro)	izvanstanična regija

*Navedeni su podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK prema nazivlju HGVS (13) te bazama podataka dbSNP (11) i ClinVar (12). U zagradama su navedeni podaci o položajima zamjena nukleotida u AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi. HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina.

Polimorfizam *GP6* 13254 T/C, prikazan u Tablici 3, osim što dovodi do zamjene AK-a u izvanstaničnoj regiji dovodi do promjene potencijalnog mjesta posttranslacijske O-glikozilacije, što posljedično utječe na konformaciju GPVI i nizvodnu signalizaciju (15,16).

2.3. P-selektin

P-selektin je najveći poznati selektin s Mr od 140 kDa, integralni je membranski GP smješten u α granulama trombocita i Weibel-Paladovim tjelešcima, a nalaze se i u plazmi u topljivom obliku. Membranski P-selektin sastoji se od N-terminalne domene C-tipa, niza od devet tandemskih ponavljanja, transmembranske domene i C-terminalnog citoplazmatskog repa. P-selektini omogućuju stvaranje veze između trombocita i leukocita ili endotelnih stanica preko receptora P-selektin glikoproteinskog liganda-1 koji je konstitutivno izražen u gotovo

svim leukocitima, a time se ostvaruje adhezija i kotrljanje leukocita tijekom upale i tromboze (17).

P-selektin je kodiran genom *SELP* koji se nalazi na 1. kromosomu (lokus 1q24.2). Polimorfizmi u nekodirajućoj regiji imaju učinak na funkciju i ekspresiju P-selektina na trombocitima (Tablica 4). Polimorfizam *SELP* Thr715Pro se povezuje uz promjenu u brzini transporta P-selektina unutar stanice, a posljedično dolazi do smanjenog broja interakcija s drugim stanicama. Polimorfizmi *SELP* Val599Leu, Asn562Asp i Ser290Asn su povezani uz tromboze (9). U slučaju MU-a P-selektini se velikom brzinom translociraju, leukociti se aktiviraju i čvrsto prijanjaju na mjestu ozljede. Veće količine selektina mogu biti povezane uz dodatne komplikacije poput edema mozga (18).

Tablica 4. Pregled polimorfizama u genu *SELP* (11–13).

Nazivlje HGVS	Referentni broj prema dbSNP	Zamjena nukleotida	Zamjena AK*
NM_003005.4:c.992G>A	rs6131	929 G/A	Ser331Asn (Ser290Asn)
NM_003005.3:c.1807G>A	rs6127	1807 A/G	Asn603Asp (Asn562Asp)
NM_003005.3:c.1918G>T	rs6133	1918 G/T	Val640Leu (Leu599Val)
NM_003005.3:c.2266A>C	rs6136	2266 A/C	Thr756Pro (Thr715Pro)

*Navedeni su podaci o točnim položajima zamjena nukleotida i AK prema nazivlju HGVS (13) te bazama podataka dbSNP (11) i ClinVar (12). U zagradama su navedeni podaci o položajima zamjena nukleotida u AK-a korišteni u prethodno objavljenoj literaturi. HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina.

3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja je da su polimorfizmi u genima za glikoproteine trombocitne membrane povezani s pojavom HMU-a u djece u Hrvatskoj. Ciljevi ovog istraživanja su:

1. u skupini djece s HMU-om i u kontrolnoj skupini genotipizirati devet polimorfizama u četiri gena, koji kodiraju za GP-e trombocitne membrane prikazane u Tablici 5,
2. ispitati povezanost pojedinačnih polimorfizama s HMU-om u djece u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno ispitati povezanost ispitivanih polimorfizama kao mogućih rizičnih čimbenika u razvoju HMU-a,
3. ispitati povezanost ispitivanih haplotipova s HMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu, odnosno ispitati moguću povezanost haplotipova kao mogućih rizičnih čimbenika u razvoju HMU-a.

Genske varijacije uključene u ovo istraživanje većinom još uopće nisu ispitivane u djece s HMU-om ili postoji jako mali broj radova objavljenih za samo pojedine polimorfizme. Ovim istraživanjem nastojat će se prikupiti nove informacije o pojedinačnim i zajedničkim ulogama genskih čimbenika u razvoju HMU-a u djece.

Tablica 5. Pregled genskih varijacija obuhvaćenih u ovom ispitivanju.

Gen	Lokus gena	Polimorfizam	Nazivlje HGVS	Referentni broj prema dbSNP	Učinak
<i>ITGA2</i>	5q11.2	807 C/T	NM_002203.4:c.759C>T	rs1126643	zamjena AK
		873 G/A	NM_002203.4:c.825G>A	rs1062535	zamjena AK
<i>GP1BA</i>	17p13.2	(-5) T/C	NM_000173.7:c.-5T>C	rs2243093	5' UTR
		VNTR	NM_000173.7:c.1321_1359del NM_000173.7:c.1282_1359del	rs125934995 rs869060239	I/D 13 ili 26 AK
<i>GP6</i>	19q13.42	13254 T/C	NM_001083899.2:c.655C>T	rs1613662	zamjena AK
<i>SELP</i>	1q24.2	Ser290Asn	NM_003005.4:c.992G>A	rs1613	zamjena AK
		Asn562Asp	NM_003005.3:c.1807G>A	rs6127	zamjena AK
		Val599Leu	NM_003005.3:c.1918G>T	rs6133	zamjena AK
		Thr715Pro	NM_003005.3:c.2266A>C	rs6136	zamjena AK

*HGVS – Udruženje za varijacije ljudskoga genoma (engl. *Human Genome Variation Society*), dbSNP – baza podataka polimorfizama jednoga nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*), ClinVar – baza podataka odnosa između genomskih varijacija i fenotipa, AK – aminokiselina, UTR – nekodirajuća regija (engl. *untranslated region*), VNTR – varijabilni broj tandemskih ponavljajućih sljedova (engl. *Variable number of tandem repeats*), I/D – insercijsko-delecijski polimorfizmi

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Ispitanici

U ovom istraživanju je bilo uključeno 32 djece s dijagnozom HMU-a u dobi do 18 godina. Djeca su zaprimljena na Neurološkom odjelu Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i na Neuropedijatrijskom odjelu Klinike za dječje bolesti Zagreb. Za svakog uključenog ispitanika prikupljeni su osnovni epidemiološki i klinički podaci o spolu, dobi dijagnoze i dobi ispitivanja. Ispitanicima je dijagnoza potvrđena primjenom slikovnih tehnika morfoloških prikaza mozga (kompjutorizirana tomografija, magnetska rezonanca i magnetska rezonanca-angiografija). Kontrolnu skupinu za ovo istraživanje činilo je isti broj ispitanika, starosne dobi do 18 godina, iz istog geografskog područja, kod kojih nisu bili ustanovljeni neurološki i tromboembolijski poremećaji, podudarnih po dobi i spolu djeci s HMU-om, a kojima je uzorkovana krv u svrhu rutinske laboratorijske obrade prije manjeg operativnog zahvata (npr. tonzilektomije) u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti Zagreb. U ispitivanju su bili korišteni uzorci genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNA) svih ispitanika izdvojeni iz preostalih uzorka periferne krvi koji su korišteni za rutinske laboratorijske analize, a prikupljeni su u sklopu projekta „Genski polimorfizmi i ishemijski moždani udar u djece“ financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost (broj projekta IP-2014-09-2047, voditeljica prof. dr. sc. Renata Zadro).

Istraživanje je bilo provedeno na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta u skladu s etičkim načelima i svim primjenjivim smjernicama, čiji je cilj osigurati pravilno provođenje i sigurnost osoba koje sudjeluju u istraživanju, uključujući zakon o zaštiti pacijenata, Pravilnik o dobroj kliničkoj praksi i Helsinšku deklaraciju. Informativni pristanak zatražen je od roditelja sve djece uključene u istraživanje nakon detaljnog objašnjenja istraživanja, a dodatno je zatraženi samostalan pristanak za svu djecu stariju od 12 godina. Za provedbu istraživanja dobivena je suglasnost Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

4.2. Molekularno-genetičke metode

Svi biološki materijali koristili su se sukladno propisima dobre laboratorijske prakse, a medicinski otpad zbrinuo prema važećim zakonima u Republici Hrvatskoj.

4.2.1. Izdvajanje genomske DNA

Genomska DNA izdvojena je iz leukocita iz uzoraka periferne pune krvi s antikoagulantom K₃EDTA ili Na-citratom (0,105 M). Ovisno o količini preostale pune krvi, genomska DNA izolirana je ručnom metodom isoljavanjem ili automatiziranom metodom izdvajanja DNA.

Metoda izdvajanja genomske DNA isoljavanjem zahtjeva volumen ostatnog uzorka krvi 2 – 7 mL, a temelji se na selektivnoj lizi eritrocita, zatim lizi stanica sa jezgrom, odnosno, leukocita iz kojih dolazi do oslobađanja genomske DNA. Potrebno je izdvojiti DNA od staničnih proteina isoljavanjem i centrifugiranjem. Završni korak uključuje taloženje genomske DNA apsolutnim etanolom, sušenje istaložene DNA i konačno otapanje u puferu Trisa i Na₂EDTA (pufer TE).

Automatizirana metoda izdvajanja nukleinskih kiselina zahtjeva volumen ostatnog uzorka krvi 0,25 – 2,00 mL, a izdvajanje se provodi uz pomoć uređaja MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) i pripadajućeg kompleta za izdvajanje DNA MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska).

Neovisno o metodi izdvajanja, izdvojena DNA pohranjena je na +4 °C.

4.2.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija i čistoća izdvojene DNA izmjerena je mikrovolumnim spektrofotometrom DS-11 FX (DeNovix, Wilmington, DE, SAD). Korišteno je svega 1 µL otopine izdvojene DNA u kojemu su izmjerene apsorbancije na 260 i 280 nm, te iz izmjerenih vrijednosti izračunata koncentracija i čistoća dvolančane DNA u uzorku.

Korišteni materijali

- mikrovolumni spektrofotometar DS-11 FX (DeNovix, Wilmington, DE, SAD) plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 10 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatska pipeta volumena 0,1 – 10 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna miješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- pufer Tris-a i Na₂EDTA (pufer TE), pH 7,5, pohranjen na +4 °C, sljedećeg sastava: 10 mM Tris (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), 1 mM Na₂EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), pH prilagođen uz pomoć 37 % HCl i 1M NaOH
- destilirana sterilna voda
- staničevina

Postupak

1. Nakon paljenja uređaja priključivanjem na izvor struje, u izborniku je izabran program mjerenja koncentracije i čistoće dvolančane DNA.
2. Podizanjem ručice uočeno se mjerno polje.
3. Na mjerno polje pipetirano je 1 μ L pufera TE za slijepu probu, ručica je spuštena i odabrana je tipka za mjerenje, po završetku je ručica podignuta te je obrisano mjerno polje staničevinom kako bi se postavila bazna linija (engl. *blank*) mikrovolumnog spektrofotometra.
4. Uzorak je dobro promiješan na vrtložnoj miješalici i nakon čega je 1 μ L uzorka pipetiran na mjerno područje, stisnuta je tipka za početak mjerenja i dobiveni rezultat je zapisan.
5. Nakon svakog uzorka ručica je podignuta i staničevinom prebrisano mjerno polje.
6. Postupak opisan u točkama 4. i 5. je ponovljen za svaki uzorak.
7. Nakon završetka mjerenja, mjerno polje je prebrisano staničevinom namočenom u destiliranu vodu, nakon toga prebrisano suhom staničevinom te je uređaj ugašen isključivanjem iz izvora struje.

4.2.3. Dokazivanje polimorfizama *ITGA2* 807 T/C i 873 G/A, te *GP1BA* (-5) T/C

Polimorfizmi *ITGA2* 807 T/C i 873 G/A, te *GP1BA* (-5) T/C dokazani su umnažanjem genomske DNA lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u stvarnom vremenu (engl. *quantitative PCR*, Q-PCR), nakon čega su PCR produkti analizirani krivuljom taljenja (engl. *melting curve*, MC), odnosno metodom Q-PCR-MC (engl. *quantitative-PCR-melting curve*). LightCycler® 480 kombinira uređaj za PCR i mikrovolumni fluorometar te ima sposobnost brzog i jednostavnog otkrivanja mutacija. Višestruke varijacije u slijedu se razlikuju pomoću fluorescentno obilježenih hibridizacijskih sonda i krivulja taljenja.

Prvi korak ove metode je Q-PCR kojim su specifični dijelovi genomske DNA umnoženi pomoću specifičnih početnica. Tijekom faze sljepljivanja na umnoženi slijed vežu se tzv. HybProbe sonde koje su komplementarne genotipu jednog alela. Jedna HybProbe sonda sastoji se od dva fluorescentno obilježena hibridizirajuća oligonukleotida, jedan oligonukleotid označen je na 5' kraju akceptorskom fluorescirajućom bojom LightCycler® Red 640 (LCRed640), a 3' kraj je modificiran fosforilacijom (P), s ciljem inhibicije produljenja oligonukleotida. Drugi oligonukleotid je označen na 3' kraju donorskom fluorescirajućom bojom fluorescein (FL). Fluorescencija HybProbe sonde se odvija ako su obje oligonukleotidne sonde hibridizirane za ciljnu DNA. Fluorescencija je temeljena na tzv. FRET-u (engl. *Förster resonance energy transfer*), odnosno, reakciji između donorske i akceptorske sonde koje se nalaze blizu jedna druge prilikom čega dolazi do fluorescencije akceptorske boje LCRed640. To svojstvo fluorescencije u stvarnom vremenu ne samo da je korišteno u fazi sljepljivanja početnica, već je korišteno i u analizi krivulje taljenja (19,20).

Nakon provedenog PCR-a, umnoženi produkti su kratko denaturirani porastom temperature i zatim su naglo renaturirani spuštanjem temperature, a nakon vezanja fluorescentno obilježenih sonda dolazi do tvorbe homodupleksa, ali i heterodupleksa ako postoji promjena slijeda u umnoženom produktu. Uz kontinuirani porast temperature reakcijske smjese dolazi do istovremenog praćenja smanjenja fluorescencije. Porastom temperature dolazi do taljenja homodupleksa i heterodupleksa, odnosno fluorescirajuće sonde prestaju fluorescirati jer se taljenjem odvajaju. Temperatura mekšanja (T_m) označava temperaturu pri kojoj je 50 % sonda disociralo s DNA slijeda. Veličina T_m -a ovisi o broju

nukleotida između sonde i DNA koji nisu u potpunosti komplementarni, odnosno za svaki uzorak dobivamo grafički prikaz derivacije bilježene fluorescencije s porastom temperature u obliku pikova koji nam omogućuju razlikovanje genotipa uzoraka. Obično česti homozigoti imaju višu T_m homodupleksa, rijetki homozigot ima nižu T_m heterodupleksa, a heterozigoti imaju dva pika koji odgovaraju T_m homodupleksa i heterodupleksa (19,20).

4.2.3.1. Genotipizacija metodom Q-PCR-MC

Korišteni materijali

- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 μ L i 0,1 – 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 μ L i 0,1 – 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna miješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- LightCycler[®] 480 Multiwell pločice s 96 reakcijskih jažica i adhezivnom folijom (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- rashladna centrifuga 5810R i pripadajući njišući rotor s adapterima za pločice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- uređaj za Q-PCR LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) i LightCycler[®] 480 Software, verzija 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- LightCycler[®] 480 Genotyping Master (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), 5 × koncentriran, pohranjen na -20 °C, zaštićen od svjetla, a sastoji se od:
 - modificirane DNA-polimeraze Taq
 - reakcijskog pufera s 15 mM MgCl₂
 - dNTP-ova (dATP, dCTP, dGTP i dUTP)
- otopine oligonukleotidnih početnica, 10 μ M (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), pohranjene na -20 °C
 - *ITGA2* 807 C/T-F: 5'- AAT GAT TGT AGC AAC ATC CC -3'

- *ITGA2* 807 C/T-R: 5'- TTT AAC TTT CCC AGC TGC C -3'
- *ITGA2* 873 G/A-F: 5'- GCA AGT CTT TAT TTA ATT TTA TC -3'
- *ITGA2* 873 G/A-R: 5'- CTC AGT ATA TTG TCA TGG TTG -3'
- *GP1BA* (-5) T/C-F: 5'- GCA GGG GGA TCC ACT CAA -3'
- *GP1BA* (-5) T/C-R: 5'- GGT TGT GTC TTT CGG CAG G -3'
- otopina fluorescentno obilježenih oligonukleotidnih sonda, 8 μ M (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), pohranjene na -20 °C zaštićene od svjetla
 - *ITGA2* 807 C/T-S1: 5'-LCRed640- TGT TTG TGA GGT CCC CAC CAT ATT GG -PH-3'
 - *ITGA2* 807 C/T-S2: 5'- CTT GCA TAT TGA ATT GCT CCG AAT -FI-3'
 - *ITGA2* 873 G/A-S1: 5'-LCRed640- AAT GGT AGT TGT AAC TGA CGG TGA AT -Ph-3'
 - *ITGA2* 873 G/A-S2: 5'- GCG ACG AAG TGC TAC GAA AG -FI-3'
 - *GP1BA* (-5) T/C-S1: 5'-LCRed640- CCT CCT CTT GCT GCT CCT GCT GCC - Ph-3'
 - *GP1BA* (-5) T/C-S2: 5'- CCA CAG GCC CTC ATG CCT C -FI-3' (sonda je komplementarna rjeđem alelu u slučaju kojeg je očekivana Tm sonde veća)
- destilirana sterilna voda
- pufer TE, pH 7,5, pohranjen na +4 °C, sljedećeg sastava: 10 mM Tris (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), 1 mM Na₂EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), pH prilagođen uz pomoć 37 % HCl i 1M NaOH

Postupak

Reakcijska smjesa za svaki pojedini uzorak i polimorfizam pripremljena je na ledu, miješanjem odgovarajuće količina genomske DNA, prethodno razrijeđene sterilnom destiliranom vodom do koncentracije 50 μ g/mL, odgovarajućih otopina F, R, S1, S2, LightCycler[®] 480 Genotyping Master otopine i destilirane sterilne vode do ukupnog volumena od 20 μ L, prema protokolu iz Tablice 6. Svi sastojci su prije pipetiranja promiješani u vrtložnoj miješalici, osim LightCycler[®] 480 Genotyping Master otopine koja je lagano promiješana prevrtanjem i spuštenu na dno kratkim centrifugiranjem pomoću male stolne centrifuge. Za svaku seriju uzoraka svakog polimorfizma korištene su slijepa proba i referentna pozitivna

kontrola heterozigotnoga genotipa. Slijepa proba, odnosno, negativna kontrola pripremljena je dodavanjem destilirane sterilne vode umjesto genomske DNA, u istom volumenu. Reakcijske smjese su pipetirane na pločicu s 96 reakcijskih jažica, u svaku jažicu po jedan uzorak, a nakon toga pločica je prekrivena adhezivnom folijom i centrifugirana na brzini od $1000 \times g$ tijekom 1 min na temperaturi od $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Na taj način se osigurava da je sav sadržaj reakcijske smjese spušten na dno jažice, te da u jažicama ne postoje mjehurići zraka.

Tablica 6. Protokol za izradu Q-PCR-MC smjese za dokazivanje polimorfizama *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A, te *GP1BA* (-5) T/C.

Reagencija	V(μL)	C
LightCycler [®] 480 Genotyping Master	4,0	1 \times
početnica F	1,0	0,5 μM
početnica R	1,0	0,5 μM
sonda S1	1,0	0,4 μM
sonda S2	0,5	0,2 μM
destilirana sterilna voda	10,5	/
genomska DNA	2,0	5,0 $\mu\text{g/mL}$

*V – volumen; C – konačna koncentracija u PCR smjesi; F – uzvodna početnica; R – nizvodna početnica; S1 – sonda obilježena akceptorskom fluorescirajućom bojom; S2 – sonda obilježena donorskom fluorescirajućom bojom; DNA – deoksiribonukleinska kiselina.

Uvjeti provođenja PCR-a u uređaju za Q-PCR uz pripadajući računalni program su:

- početna denaturacija na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 10 min,
- 40 ciklusa umnažanja koji uključuju:
 - denaturaciju na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 10 s,
 - sljepljivanje početnica na $58 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 10 s kada je provedeno i mjerenje fluorescencije u svrhu praćenja količine umnoženih produkata,
 - produljenja početnica na $72 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 15 s.

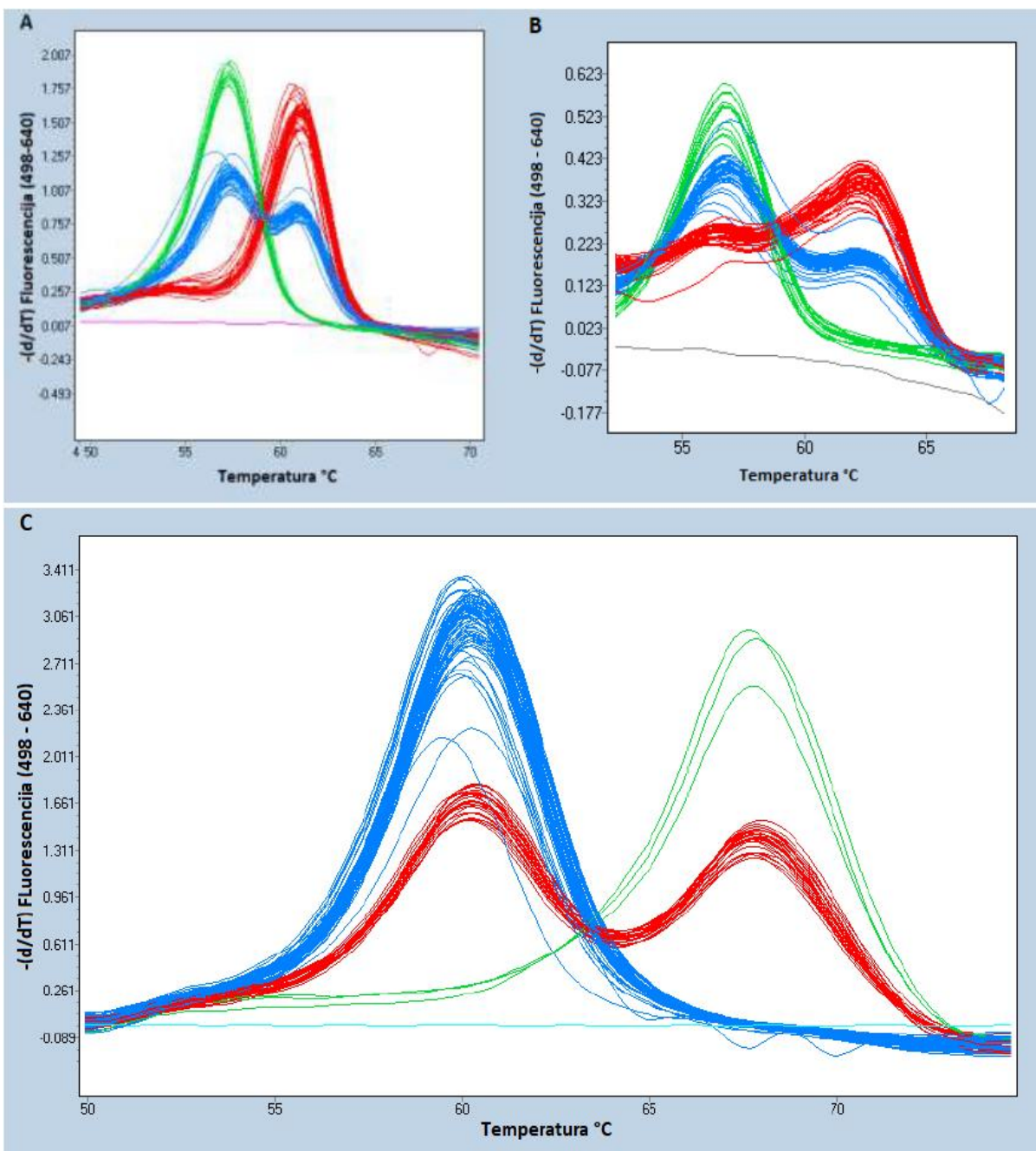
Po završetku PCR-a provedeno je taljenje umnoženih produkata na istom uređaju pri sljedećim uvjetima:

- denaturacija na $95 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 1 min,

- renaturacija i sljepljivanje sondi na 40 °C,
- postupno zagrijavanje do 85 °C uz kontinuirano mjerenje fluorescencije,
- nakon taljenja DNA uređaj je ohlađen na 40 °C tijekom 10 s.

Prije početka analize dobivenih krivulja, provjerene su dobivene krivulje umnažanja. Umnažanje je uspješno ako je do 30. ciklusa umnažanja nastala mjerljiva količina produkta. Ako nije uspjelo umnažanje, ponovljena je analiza i po potrebi prilagođena količina kalupa DNA.

Analiza dobivenih rezultata se provedena je pomoću računalnog programa uz korišteni uređaj LightCycler[®] 480 na kojemu je proveden i Q-PCR-MC. Rezultati su očitani za svakog pojedinog ispitanika iz grafičkog prikaza derivacije fluorescencije uzorka ovisne o porastu temperature. Tm sonde prikazan je kao pik za svaki uzorak, na temelju kojih je određen genotip za svaki ispitivani polimorfizam (Slika 1).



Slika 1. Rezultati genotipizacije metodom Q-PCR-MC. Prikazane su krivulje ovisnosti derivacije fluorescencije o temperaturi, odnosno derivirane krivulje taljenja. A – crvenom su bojom prikazani uzorci ispitanika genotipa *ITGA2* 807 CC (jedan fluorescencijski pik odgovara na 61 °C odgovara alelu C), zelenom bojom prikazani su uzorci genotipa TT (jedan fluorescencijski pik na 67 °C odgovara alelu T), a plavom bojom prikazani su uzorci ispitanika genotipa CT (dva fluorescencijska pika na oko 57 °C i 61 °C odgovaraju prisutnosti oba alela); B – crvenom su bojom prikazani uzorci ispitanika genotipa *ITGA2* 873 GG (fluorescencijski pik na 63 °C odgovara alelu G), zelenom bojom prikazani su uzorci genotipa AA (jedan fluorescencijski pik na 57 °C odgovara alelu A), a plavom bojom prikazani su

uzorci ispitanika genotipa GA (dva fluorescencijska pika na oko 57 °C i 61 °C odgovaraju prisutnosti oba alela); C – plavom su bojom prikazani uzorci ispitanika genotipa *GP1BA* (-5) TT (fluorescencijski pik na 60 °C odgovara alelu T), zelenom bojom prikazani su uzorci genotipa CC (jedan fluorescencijski pik na 68 °C odgovara alelu C), a crvenom bojom prikazani su uzorci ispitanika genotipa TC (dva fluorescencijska pika na oko 60 °C i 68 °C odgovaraju prisutnosti oba alela) (9).

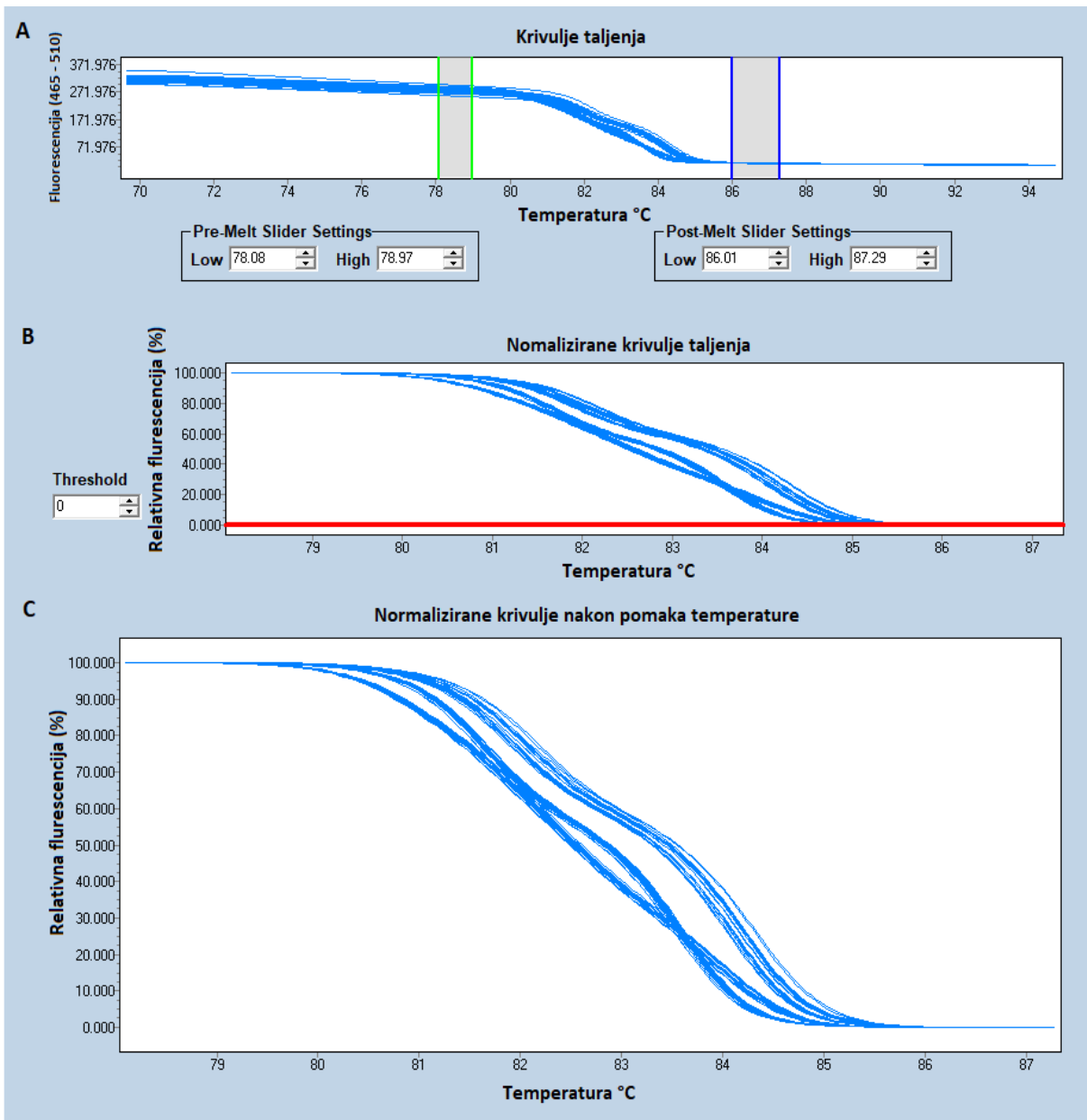
4.2.4. Dokazivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C

Polimorfizmi *SELP* Ser290Asn, Val599Leu, Thr715Pro i *GP6* 13254 T/C određeni su metodom Q-PCR-a uz pomoć specifičnih početnica, a nakon umnažanja specifičnih segmenata učinjena je analiza krivulje taljenja visoke razlučivosti (engl. *high resolution melting*, HRM), Q-PCR-HRM (engl. *quantitative PCR - high resolution melting*). Metoda je dovoljno specifična i osjetljiva da razlikuje nukleinske kiseline na temelju malih razlika u sljedovima i omogućuje genotipizaciju uzoraka.

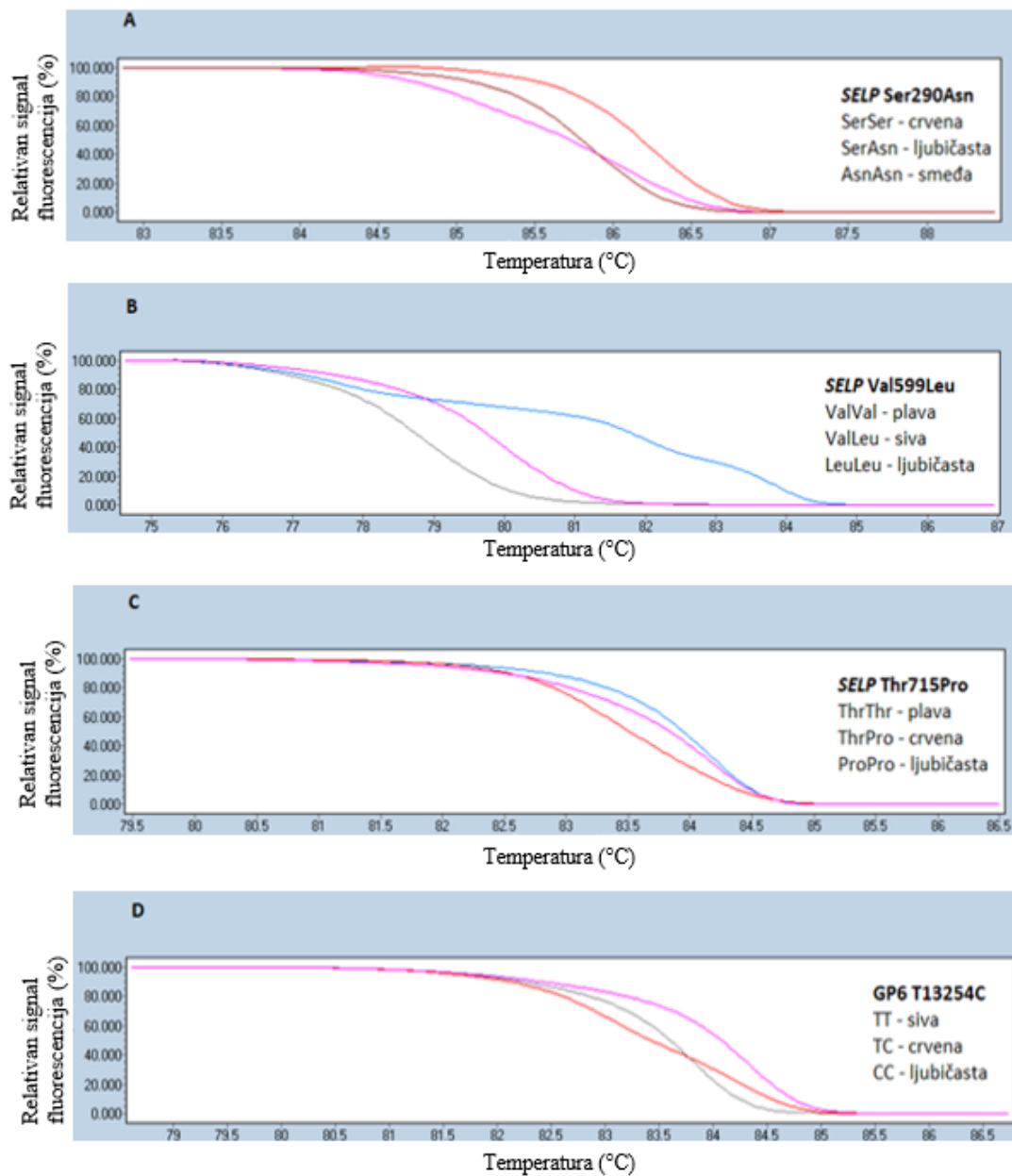
Q-PCR je metoda koja omogućuje umnažanje i kvantifikaciju ciljanih sljedova DNA. Svakim ciklusom dolazi do udvostručenja ciljanih sljedova, a korištenjem slobodnih fluorescentnih boja, koje interkaliraju s dvolančanim molekulama DNA, omogućena je i njihova uzastopna kvantifikacija. Prilikom umnažanja dolazi do tvorbe homodupleksa, dvolančanih produkata PCR-a s potpuno komplementarnim lancima, i heterodupleksa, dvolančanih produkata PCR-a s lancima koji nisu u potpunosti komplementarni. Jačina fluorescencije raste s povećanjem količine produkta PCR-a.

Nakon umnažanja dolazi do provođenja HRM analize koja se temelji na taljenju što je ujedno temeljno svojstvo DNA. Spiralna struktura dvolančane molekule DNA se taljenjem gubi i dolazi do odvajanja lanaca, odnosno, denaturacije. Ako je regija dupleksa kratka, kao za većinu sintetiziranih sonda, taljenje se odvija u jednom prijelazu (sve ili ništa). T_m je definirana kao temperatura pri kojoj se polovica dupleksa denaturira. Sljed DNA, odnosno broj GC i AT parova u strukturi direktno su ovisni o vrijednosti T_m -a. T_m je proporcionalan broju GC parova. Uređaj LightCycler® 480 postupno povećava temperaturu, što dovodi do postupnog taljenja dvolančane DNA, disocijacije fluorescentne boje i smanjenja fluorescencije koja se kontinuirano mjeri. Uređaj koristi visoko osjetljivi optički sustav koji uočava i najmanje promjene u fluorescenciji. Softver stvara krivulje taljenja za svaki pojedini uzorak, te provodi

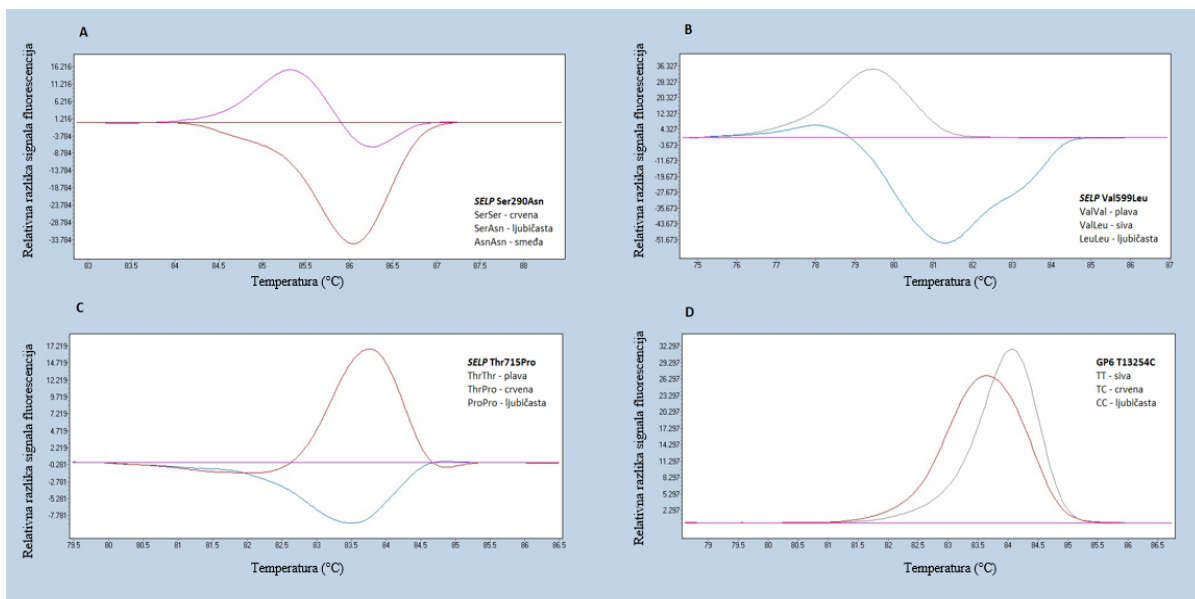
normalizaciju krivulje taljenja i temperaturni pomak (Slika 2). Normalizacija omogućuje uklanjanje početnih signala koji nisu povezani s genetičkim razlikama, čime se osigurava precizna usporedba između uzoraka. Normalizacija uključuje prilagodbu fluorescencijskih vrijednosti tako da linearni dijelovi krivulje prije i nakon taljenja budu poravnati između različitih uzoraka. Lijevi graničnik se postavlja na dijelu krivulje prije početka taljenja (mjesto označava stabilnu dvolančanu DNA, odnosno, mjesto maksimalne fluorescencije), a desni na mjestu potpune denaturacije (mjesto najmanje fluorescencije). Temperaturni pomak (engl. *temperature shift*) omogućuje dodatno uklanjanje pozadinskih signala i poboljšanje preciznosti (Slika 3). Uzorci se grupiraju prema sličnostima u krivuljama taljenja, omogućujući identifikaciju različitih genotipova ili prisutnost mutacija (Slika 4) (21–23).



Slika 2. Prikaz normalizacije i pomaka temperature unutar HRM analize na primjeru genotipizacije *SELP* Val599Leu. A – prikaz normalizacije dobivenih krivulja taljenja; B – prikaz pomaka temperature dobivenih normaliziranih krivulja taljenja; C – prikaz dobivenih krivulja taljenja nakon Q – PCR-a, normalizacije i pomaka temperature (9).



Slika 3. Grafički prikaz krivulja taljenja nakon Q-PCR-a, normalizacije i pomaka temperature, a prije HRM analize u svrhu genotipizacije *SELP* Ser290Asn (A), *SELP* Val599Leu (B), *SELP* Thr715Pro (C) i *GP6* T13254C (D).



Slika 4. Grafički prikaz rezultata HRM analize u svrhu genotipizacije *SELP* Ser290Asn (A), *SELP* Val599Leu (B), *SELP* Thr715Pro (C) i *GP6* T13254C (D). Prikazane su krivulje, nakon normalizacije i pomaka temperature, ovisnosti relativne razlike signala fluorescencije o temperaturi.

Ova metoda se najviše koristi za nespecifično ispitivanje prisutnosti polimorfizama unutar umnoženih sljedova (engl. *gene scanning*). Razlog tomu je smanjena specifičnost metode zbog ne korištenja specifičnih fluorescentno obilježenih sonda koje su komplementarne određenom genotipu. Metodu karakterizira visoka osjetljivost, pa je odlična za dokazivanje SNP-ova, ali je važno pravilno optimizirati sve čimbenike koji bi mogli utjecati na HRM analizu i koristiti kontrolne uzorke za sva tri moguća genotipa.

4.2.4.1. Genotipizacija metodom Q-PCR-HRM

Korištene su prethodno dizajnirane početnice za Q-PCR-HRM (9,24,25).

Korišteni materijali

- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 μ L i 0,1 – 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1,0 mL, 10 – 200 μ L i 0,1 – 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna miješalica (Clever Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)

- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- LightCycler® 480 Multiwell pločice s 96 reakcijskih jažica i adhezivnom folijom (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)
- rashladna centrifuga 5810R i pripadajući njihajući rotor s adapterima za pločice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- uređaj za Q-PCR LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) i LightCycler® 480 Software, verzija 1.5.1.62 (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska)GP
- LightCycler® 480 HRM Master Mix (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), pohranjen na -20 °C, zaštićen od svjetla, a sastoji se od:
 - Master Mix, 2 × koncentriran, sastoji se od:
 - DNA-polimeraza FastStart Taq
 - reakcijskog pufera
 - dNTP-ova (dATP, dCTP, dGTP i dUTP)
 - fluorescirajuće boje LightCycler® 480 ResoLight
 - otopina MgCl₂, 25 mM
- otopine oligonukleotidnih početnica, 4 μM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD), pohranjene na -20 °C
 - *SELP* Thr715Pro -F 5'- ATG AAC TGC TCC AAC CTC TG -3'
 - *SELP* Thr715Pro -R 5'- CCC ACA TGA AAA TTG TAC CTT -3'
- otopine oligonukleotidnih početnica, 4 μM (Metabion International AG, Planegg, Njemačka), pohranjene na -20°C
 - *SELP* Ser290Asn -F 5'- CCT TGG TTA TTC TCT CCA GCT GTG C -3'
 - *SELP* Ser290Asn -R 5'- AGC CGG GCT GGC ACT CAA AT -3'
 - *SELP* Val599Leu -F 5'- TTG CAG GAG CCT CCC TTG TTA TGAA -3'
 - *SELP* Val599Leu -R 5'- GGT TCC CTG CCC AGG AGT GGT -3'
 - *GP6* 13254 T/C -F 5'- ACA GCG ACA GAG CAC AGA TT -3'
 - *GP6* 13254 T/C -R 5'- GAC CCT GCA GAA CCT ACC TG -3'
- destilirana sterilna voda

- pufer TE, pH 7,5, pohranjen na +4 °C, sljedećeg sastava: 10 mM Tris (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), 1 mM Na₂EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), pH prilagođen uz pomoć 37 % HCl i 1M NaOH

Postupak

Reakcijska smjesa za svaki pojedini uzorak i polimorfizam pripravljena je na ledu, miješanjem odgovarajuće količina genomske DNA, prethodno razrijeđene sterilnom destiliranom vodom do koncentracije 10 µg/mL, otopina F, R, LightCycler® 480 HRM Master otopine, otopine MgCl₂ i destilirane sterilne vode do ukupnog volumena 20 µL, prema protokolu iz Tablice 7. Svi sastojci su prije pipetiranja promiješani na vrtložnoj miješalici i spuštenu na dno centrifugiranjem pomoću male stolne centrifuge, osim LightCycler® 480 HRM Master otopine koja je lagano promiješana prevrtanjem umjesto miješanja na vrtložnoj miješalici. Za svaku seriju uzoraka za svaki polimorfizam korištene su slijepa proba i tri referentne pozitivne kontrole, po jedna za svaki genotip. Negativna kontrola pripravljena je dodavanjem destilirane sterilne vode umjesto genomske DNA, u istom volumenu. Reakcijske smjese su pipetirane na pločicu s 96 reakcijskih jažica, u svaku jažicu po jedan uzorak, a nakon toga pločica je prekrivena adhezivnom folijom i centrifugirana na brzini od 1000 × g tijekom 1 min na temperaturi od 4 °C. Na taj način se osigurava da je sav sadržaj reakcijske smjese spušten na dno jažice, te da u jažicama ne postoje mjehurići zraka.

Tablica 7. Protokol za izradu Q-PCR-HRM smjese za dokazivanje polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Val599Leu i Thr715Pro te *GP6* 13254 T/C.

Reagencija	V (µL)	C
LightCycler® 480 HRM Master Mix	10,0	1 ×
otopina MgCl ₂	2,0	2,5 mM
početnica F	1,0	0,2 µM
početnica R	1,0	0,2 µM
destilirana sterilna voda	5,0	/
genomska DNA	1,0	0,5 µg/mL

*V – volumen; C – konačna koncentracija u PCR smjesi; HRM – krivulja taljenja visoke razlučivosti; F – uzvodna početnica; R – nizvodna početnica; DNA – deoksiribonukleinska kiselina.

Uvjeti provođenja PCR-a u uređaju za Q-PCR uz pripadajući računalni program su:

- početna denaturacija na 95 °C tijekom 10 min,
- 45 ciklusa umnažanja koji uključuju:
 - denaturacija na 95 °C tijekom 10 s,
 - sljepljivanje početnica na 60 °C tijekom 15 s,
 - produljenje početnica na 72 °C tijekom 25 s kada je provedeno i mjerenje fluorescencije u svrhu praćenja količine umnoženih produkata.

Po završetku PCR-a provedeno je taljenje umnoženih produkata na istom uređaju pri sljedećim uvjetima:

- denaturacija na 95 °C tijekom 1 min,
- renaturacija i vezanje hibridizacijskih sonda na 40 °C tijekom 1 min,
- postupno zagrijavanje od 70 °C do 95 °C brzinom 0,02 °C/s uz kontinuirano mjerenje fluorescencije,
- nakon taljenja DNA uređaj je ohlađen na 40 °C tijekom 10 s.

Prije početka analize dobivenih krivulja, potrebno je provjeriti dobivene krivulje umnažanja. Umnažanje je uspješno ako je do 30. ciklusa umnažanja nastala mjerljiva količina produkta. Ako nije uspjelo umnažanje, potrebno je ponoviti analizu i po potrebi prilagoditi količinu kalupa DNA.

HRM analiza dobivenih krivulja taljenja provedena je pomoću računalnog programa dobivenog uz uređaj na kojem je proveden Q-PCR. Nakon normalizacije krivulje i pomaka temperature, uređaj automatski grupira krivulje i potrebno je postaviti krivulju taljenja za referentni genotip, za *SELP* Ser290Asn korišten je genotip Asn/Asn, za *SELP* Val599Leu korišten je genotip Leu/Leu, a za *SELP* Thr715Pro genotip Pro/Pro, a za *GP6* 13254 T/C genotip CC.

Za svaki pojedini uzorak određen je genotip za sve ispitivane polimorfizme očitavanjem iz grafičkog prikaza krivulje taljenja dobivene na temelju promjene signala ovisno o promjeni temperature. Prilikom očitavanja rezultata, krivulje su uspoređivane s krivuljama kontrolnih referentnih uzoraka za sve moguće genotipove.

4.2.5. Dokazivanje polimorfizma *SELP* Asn562Asp

Dokazivanje polimorfizma *SELP* Asn562Asp provedeno je metodom alel-specifičnog PCR-a uz pomoć početnica specifičnoga slijeda (engl. *sequence specific primer*, PCR-SSP), a umnoženi produkti su analizirani elektroforezom na 3 %-tnom agaroznom gelu.

Metoda zahtjeva pripremu dvije reakcijske smjese za isti uzorak, u obje reakcijske smjese se dodana ista uzvodna početnica, u jedinu reakcijsku smjesu dodana je nizvodna početnica komplementarna slijedu DNA jednoga alela (divljeg tipa), a u drugu reakcijsku smjesu dodana je nizvodna početnica komplementarna slijedu DNA drugog alela (mutacija ili polimorfizam). U svaku reakcijsku smjesu je dodan i par početnica za gen *β-globulin* koji se koristi kao interna kontrola umnažanja, odnosno, ako on nije umnožen potrebno je ponoviti metodu i po potrebi prilagoditi količinu genomske DNA. Očitavanje rezultata provedeno je nakon elektroforeze na agaroznom gelu koja se provodi nakon PCR reakcije umnažanja određenog slijeda DNA. Razdvajanjem PCR produkata moguće je razlikovati homozigota za alel umnožen samo početnicama iz prve reakcijske smjese, homozigot za alel umnožen samo početnicama iz druge reakcijske smjese i heterozigot gdje su prisutni umnoženi produkti obje reakcijske smjese za obje početnice.

Korišteni materijali

- otopine oligonukleotidnih početnica, 100 μM, pohranjene na -20 °C (TIB Mollbiol, Berlin, Njemačka)
 - Asn562Asp-F 5'- AAG TAG AAC TGT CTT AGC AAG TAC -3'
 - 562Asn-R 5'- CTC CAC CTG YCA TTT CTC TTG TA -3'
 - 562Asn-R 5'- CTC CAC CTG YCA TTT CTC TTG TG -3'
- otopine oligonukleotidnih početnica za kontrolni gen *β-globulin*, 10 μM, pohranjene na -20 °C (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka)
 - β-glob-F 5'- GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG G -3'
 - β-glob-R 5'- GCT CAC TCA GTG TGG CAA AG -3'
- DNA-polimeraza Taq™ Hot Start Version aktivnosti 5 U/μL, pohranjena na -20 °C (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)
- 10 × PCR pufer (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)
- otopina dNTP-ova, 10 mM (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)

- destilirana sterilna voda
- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL i 0,2 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 μ L i 0,1 – 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 mL, 10 – 200 μ L i 0,1 – 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- vrtložna miješalica (Cleave Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- termoblok za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

Postupak

Za svakog ispitanika pripremljene su dvije reakcijske smjese, u jednu reakcijsku smjesu dodana je početnica za umnažanje alela *SELP* 562Asn, a u drugu reakcijsku smjesu dodana je početnica za umnažanje alela *SELP* 562Asp. Potrebno je promiješati odgovarajuću količinu genomske DNA prethodno razrijeđene na koncentraciju 150 – 200 μ g/mL, DNA-polimeraze, 10 \times PCR pufera, otopine dNTP-ova, otopina početnice za kontrolni gen, otopine početnice za Asn562Asp-F, otopine alel-specifične početnice 562Asn-R ili 562Asp-R, te destilirane sterilne vode do ukupnog volumena od 10 μ L prema protokolu iz Tablice 8. Svi sastojci reakcijske smjese dobro su promiješani pomoću vrtložne miješalice i sadržaj je spušten na dno pomoću male stolne centrifuge, osim DNA-polimeraze koja je samo spuštena na dno pomoću male stolne centrifuge. U svakoj seriji uzoraka korištena je negativna kontrola u koju je pipetirana destilirana sterilna voda umjesto uzorka genomske DNA u jednakom volumenu.

Tablica 8. Protokol za izradu PCR smjese za dokazivanje polimorfizma *SELP* Asn562Asp.

Reagensija	V (μ L)	C
10 \times PCR pufer	1,0	1 \times
otopina dNTP-ova	0,8	0,2 mM
DNA-polimeraza Taq	0,1	0,05 U/ μ L
početnica β -globin-F	0,2	0,2 μ M
početnica β -globin-R	0,2	0,2 μ M
početnica Asn562Asp-F	0,1	1,0 μ M
početnica 562Asn-R ili 562Asp-R	0,1	1,0 μ M
destilirana sterilna voda	6,5	/
genomska DNA	1,0	15 – 20 μ g/mL

*V – volumen; C – konačna koncentracija u PCR smjesi; PCR – lančana reakcija polimeraze; dNTP – deoksinukleozid-trifosfati; DNA – deoksiribonukleinska kiselina; F – uzvodna početnica; R – nizvodna početnica.

Uvjeti provođenja PCR-a na termobloku su sljedeći:

- početna denaturacija na 95 °C tijekom 2 min,
- 10 ciklusa umnažanja koji uključuju:
 - denaturacija na 95 °C tijekom 10 s,
 - sljepljivanje početnica na 65 °C tijekom 1 min,
- 20 ciklusa umnažanja koji uključuju:
 - denaturacija na 95 °C tijekom 10 s,
 - sljepljivanje početnica na 61 °C tijekom 1 min,
 - produljenja početnica na 72 °C tijekom 20 s,
- konačno produljenje početnica na 72 °C tijekom 10 min,
- hlađenje na 4 °C.

Elektroforeza DNA na 3 %-tnom agaroznom gelu

Elektroforezom nabijene molekule migriraju unutar agaroznog gela pod utjecajem električnog polja. Molekule unutar gela putuju brzinom obrnuto proporcionalnoj veličini molekula. Metoda je korištena s ciljem utvrđivanja uspješnosti umnažanja produkata PCR-a u ovoj, ali i u drugim korištenim metodama. Paralelno uz uzorke korištena je pozitivna, negativna kontrola i molekularni biljeg. Uočavanje produkata PCR-a omogućuje fluorescentna boja koja veže lance DNA. Uzorci su u jažice gela nanoseni pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka. Nakon provedene elektroforeze gel je obasjan UV-svjetlom što omogućava uočavanje fluorescirajućih produkata PCR-a.

Korišteni materijali

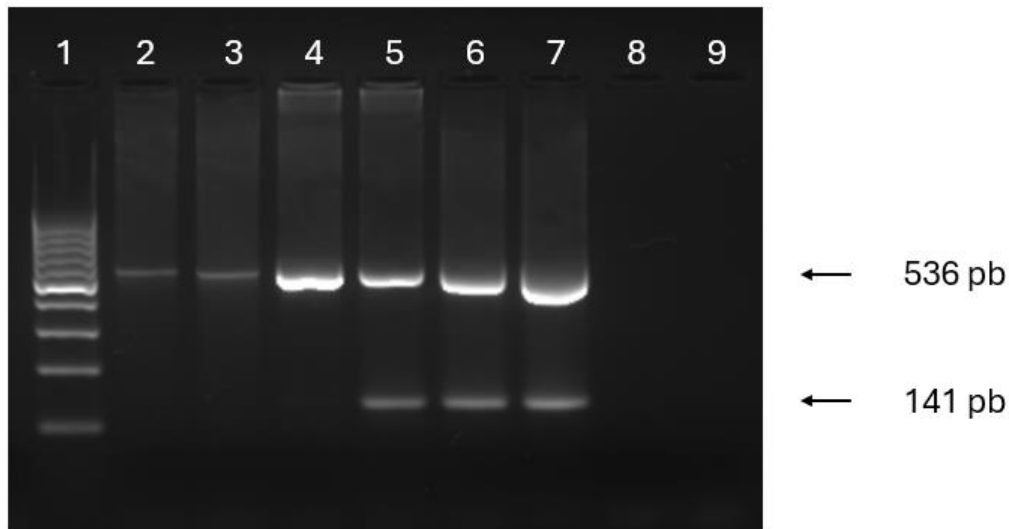
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1,0 mL, 10 – 200 μ L, 0,1 – 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 -1,0 mL, 10 – 200 μ L, 0,1 - 10 μ L (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- pufer TBE koji se sastoji od 100 mM Tris-a (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD), 100 mM H_3BO_4 (Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD) i 2,5 mM Na_2EDTA (Kemika, Zagreb, Hrvatska), 10 \times koncentriran, a prije korištenja razrijeđen na 1 \times pomoću destilirane sterilne vode
- agaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- otopina fluorescentne boje Olerup[®] SSP GelRed[™] (CareDx AB, Stockholm, Švedska)
- plamenik
- pufer za nanošenje uzoraka, pohranjen na +4 °C:
 - 30 % agaroz
 - 0,25 % bromfenol plavilo
 - 0,25 % ksilen cijanol FF
- biljeg molekularne mase od po 100 bp (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), pripremljen miješanjem 1 μ L biljega, 1 μ L pufera za nanošenje uzorka i 4 μ L destilirane sterilne vode, alikvotiran i pohranjen na -20 °C

- sustav za horizontalnu elektroforezu koji uključuje plastični kalup za izlivanje gela i pripadajući nosač, češljice za stvaranje jažica, kadicu, poklopac s elektrodama i ispravljač (BioRad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- UV kamera Amersham AI600 (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD)
- parafilm

Postupak

1. Izvagano je 1,6 g agaroze, pomiješano sa 60 mL 1 × koncentriranog pufera TBE, te je smjesa zagrijavana na plameniku uz miješanje do vrenja dok smjesa nije postala prozirna, što označava da se agarozu u potpunosti otopila.
2. Smjesa je malo ohlađena pod mlazom hladne vode, a nakon toga je u nju dodana jedna kap otopine fluorescentne boje GelRed. Smjesa je kratko promiješana kako bi se homogenizirala.
3. Plastični kalup za izlivanje gela učvršćen je na pripadajući nosač, izlivena je pripremljena smjesa agaroze i umetnut je češljic u predviđeno mjesto.
4. Svi postojeći mjehurići ako su nastali prilikom izlivanja su odmah uklonjeni.
5. Nakon otprilike 30 min agarozu se polimerizirala i nastao je gel. Pažljivo je izvađen češljic za stvaranje jažica i plastični kalup zajedno s gelom je prebačen u kadicu za elektroforezu.
6. Kadica je napunjena 1 × koncentriranim TBE puferom tako da je gel u potpunosti uronjen u pufer.
7. Za svaki produkt PCR-a na parafilm je pipetirano po 3 μ L pufera za nanošenje uzoraka i pomiješano je nekoliko puta pipetom s 10 μ L PCR produkata PCR-a.
8. U jažice gela za elektroforezu je pipetirano 10 μ L tako priređenog uzorka, odnosno, 3 μ L prethodno pripremljenog biljega molekularne mase.
9. Kadica je poklopljena i elektrode su spojene na ispravljač.
10. Elektroforeza se provodila 40 min pri naponu od 100 V, a po potrebi i dulje.
11. Rezultati elektroforeze su vizualizirani pomoću UV kamere.

Elektroforezom u 3 %-tnom agaroznom gelu dobiveni se razdvojeni umnoženi produkti ispitanika, a pomoću UV kamere i pripadajućeg računalnog programa očitani se rezultati. Genotip ispitanika je utvrđen na temelju prisutnosti umnoženog produkta veličine 141 bp u pojedinoj PCR reakciji. Rezultate je moguće očitati samo ako je vidljiv uspješno umnoženi fragment unutarnjeg kontrolnog gena *β-globulin*, a ako to nije tako, analizu je potrebno ponoviti (Slika 5).



Slika 5. Rezultati elektroforetskog razdvajanja umnoženih produkata metodom PCR-SSP s ciljem genotipizacije polimorfizma *SELP* Asn562Asp. Elektroforetsko razdvajanje se provodilo pri naponu od 100 V tijekom 30 min. Genotip *SELP* Asn562Asp određuje se na temelju umnoženog produkta veličine 141 pb u pojedinoj reakcijskoj smjesi, a prisutnost umnoženog produkta 536 pb u svakoj reakcijskoj smjesi označava uspješno umnožen dio gena kao unutarnja kontrola uspješnosti umnažanja. 1 – biljeg molekularne mase od po 100 pb; 2 i 3 – umnožen je produkt 536 pb kao unutarnja kontrola uspješnosti umnažanja, ali nažalost u ovom uzorku nije uspješno umnožen produkt na 141 pb pa analizu treba ponoviti uz optimizaciju količine kalupa DNA; 4 i 5 – uzorak genotipa AspAsp; 6 i 7 – uzorak genotipa AsnAsp; 8 i 9 – slijepa proba.

4.2.6. Dokazivanje polimorfizama *GPIBA* VNTR

Dokazivanje polimorfizma *GPIBA* VNTR provedeno je umnažanjem specifičnih segmenata genomske DNA metodom PCR-a sa specifičnim početnicama, a umnoženi produkti su razdvojeni elektroforezom na 3 %-tnom agaroznom gelu, nakon što je provedena genotipizacija ispitanika.

Ovom metodom su umnožene specifične regije genomske DNA bogate GC parovima, a za to je korišten posebno prilagođen komplet reagensija GC-RICH PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska). Genomska DNA umnožena je PCR-om, a rezultati su očitani nakon elektroforetskog razdvajanja umnoženih produkata u agaroznom gelu. Razlikovanje genotipa temelji se na razlici u veličini nastalih PCR produkata ovisno o broju ponavljanja niza od 39 bp u odnosu na slijed najučestalijega genotipa CC.

Korišteni materijali

- otopine oligonukleotidnih početnica, 5 μ M, pohranjene na -20 °C (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD)
 - VNTR-F 5'- ACA CTT CAC ATG GAA TCC AT -3'
 - VNTR-R 5'- GGG TCA TTT CTG GAG CTC TC -3'
- GC-RICH PCR System (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska), pohranjena na -20 °C, sastoji se od:
 - enzimska mješavina termostabilnih DNA-polimeraza Taq i Tgo koja posjeduje 3'-5' egzonukleaznu aktivnost, 2 U/ μ L
 - pufer za PCR, 5 \times koncentriran, sadrži 7,5 mM MgCl₂ i DMSO
 - rezolucijska otopina (engl. *resolution solution*), 5 M
- otopina dNTP-ova, 10 mM (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)
- destilirana sterilna voda
- plastične jednokratne sterilne epruvete bez DNaza i RNaza volumena 1,5 mL i 0,2 mL
- plastični jednokratni sterilni nastavci bez DNaza i RNaza volumena 0,1 – 1 ml, 10 – 200 μ l i 0,1 – 10 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- automatske pipete volumena 0,1 – 1 ml, 10 – 200 μ l i 0,1 – 10 μ l (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

- vrtložna miješalica (Cleaver Scientific, Rugby, Ujedinjeno kraljevstvo)
- mala stolna centrifuga MiniSpin (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- termoblok za PCR GeneAmp PCR System 2720 (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- sustav za horizontalnu elektroforezu koji se sastoji od plastičnog kalupa za izlivanje gela i pripadajućeg nosača, češljica za tvorbu jažica, kadice, poklopca s elektrodama i ispravljača (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD)
- pufer TBE, 10 × koncentriran, prije korištenja razrijeđen na 1 × uz pomoć destilirane sterilne vode
- agaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- otopina fluorescentne boje Olerup[®] SSP GelRed[™] (CareDx AB, Stockholm, Švedska)
- plamenik
- pufer za nanošenje uzorka, alikvotiran i pohranjen na +4°C
- biljeg molekularne mase od po 100 bp (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), pripremljen miješanjem 1 µL biljega, 1 µL pufera za nanošenje uzorka i 4 µL destilirane sterilne vode, alikvotiran i pohranjen na -20 °C
- UV kamera Amersham AI600 (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD)

Postupak

Uzorak je po potrebi razrijeđen destiliranom vodom do ciljane koncentracije 50 – 200 µg/mL, a zatim je pipetirana reakcijska smjesa koja osim genomske DNA uključuje enzimsku mješavinu, rezolucijsku otopinu, pufer za PCR, otopine početnica VNTR-F i VNTR-R, otopinu dNTP-ova i destiliranu sterilnu vodu prema protokolu iz Tablice 9. do ukupnog volumena od 25 µL. Svi sastojci reakcijske smjese su dobro promiješani pomoću vrtložne miješalice i spušteni na dno pomoću male stolne centrifuge, osim enzimske mješavine DNA-polimeraza koja je samo spuštena na dno pomoću male stolne centrifuge. U svakoj seriji uzoraka korištena je negativna kontrola koja je pripremljena na način da je umjesto genomske DNA uzorka dodana destilirana sterilna voda.

Tablica 9. Protokol za izradu PCR smjese za dokazivanje polimorfizma *GPIBA* VNTR.

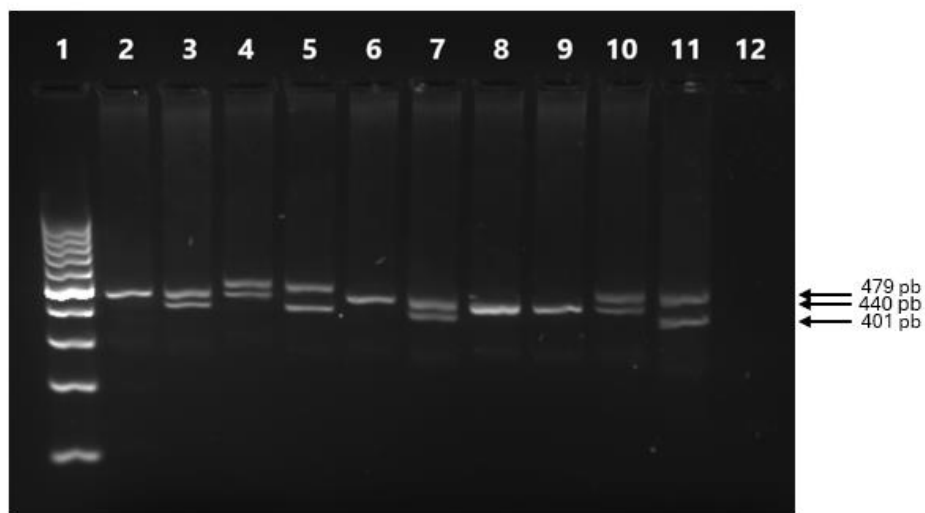
Reagencija	V (μ L)	C
rezolucijska otopina	2,5	0,5 M
otopina dNTP-ova	2,0	0,8 mM
početnica VNTR-F	1,0	0,2 μ M
početnica VNTR-R	1,0	0,2 μ M
puffer za PCR	5,0	1 \times
enzimska mješavina	0,5	0,04 U/ μ L
destilirana sterilna voda	10,5	/
genomska DNA	2,5	0,4 – 25 μ g/mL

*V – volumen; C – konačna koncentracija u PCR smjesi; PCR – lančana reakcija polimeraze; dNTP – deoksinukleozid-trifosfati; DNA – deoksiribonukleinska kiselina; F – uzvodna početnica; R – nizvodna početnica.

Umnažanje je provedeno u termobloku za PCR pri sljedećim uvjetima:

- početna denaturacija na 95 °C tijekom 3 min,
- 35 ciklusa umnažanja koji uključuju:
 - denaturacija na 94 °C tijekom 15 s,
 - sljepljivanje početnica na 58 °C tijekom 30 s,
 - produljenje početnica na 72 °C tijekom 45 s,
- konačno produljenje početnica na 72 °C tijekom 7 min i hlađenje na 4 °C.

Elektroforezom u 3 %-tnom agaroznom gelu s fluorescentnom bojom GelRed dobiveni su razdvojeni umnoženi produkti ispitanika, a pomoću UV kamere i pripadajućeg računalnog programa očitani su rezultati. Razlikuju se alel B veličine 479 bp, alel C veličine 440 bp i alel D veličine 401 bp. Ovisno o prisutnosti umnoženih produkata očitani su genotip *GPIBA* VNTR ispitanika (Slika 6).



Slika 6. Rezultati elektroforeze umnoženih produkata PCR metodom u svrhu genotipizacije polimorfizma *GPIBA* VNTR. Elektroforeza je provedena pri naponu 100 V tijekom 40 min. 1 – biljeg molekularne mase od po 100 pb; 2, 6, 8 i 9 – uzorci genotipa CC (440 pb); 3 i 7 – uzorci genotipa CD (440 i 401 pb); 4 i 10 – uzorci genotipa BC (479 i 440 pb); 5 i 11 – uzorci genotipa BD (479 i 401 pb); 12 – negativna kontrola.

4.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je pomoću statističkog programa MedCalc, verzija 22.032 (MedCalc Software, Ostend, Belgija). Razlike u zastupljenosti pojave HMU-a između dječaka i djevojčica u skupini ispitanika s HMU-om ispitane su pomoću testa usporedbe proporcija. Mann-Whitneyev test korišten je za ispitivanje razlike između dječaka i djevojčica u dobi, a izražene kao medijan i raspon, u skupini ispitanika s HMU-om.

Učestalost pojedinih alela i genotipova za sve ispitane polimorfizme prikazan je kao relativna frekvencija i broj. Deskriptivna analiza, ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže (razlika između dobivenih i očekivanih genotipova) i asocijacijska analiza genotipova za sve polimorfizme osim za *GPIBA* VNTR provedena je pomoću programa za statističku analizu asocijacijskih studija SNPStats (Katalonski institut za onkologiju, Barcelona, Španjolska) koji analizira pojedinačne SNP-ove prema višestrukim modelima i haplotipove na temelju

univarijantne logističke regresije uz pomoć korekcije za kovarijablu dobi koja može utjecati na rezultate statističkih analiza (26,27).

Kako bi se u statističkom programu SNPStats odabrao najprikladniji model pojedinog genotipa za univarijantnu logističku regresiju, koristi se parametar koji procjenjuje prediktivnu mogućnost pogreške i kvalitetu modela (engl. *Akaike information criterion*, AIC). Kao najbolji model najčešće se pokazao dominantni (uspoređuje heterozigotne i homozigotne varijante s homozigotnim divljim tipom), a kod nižih vrijednosti AIC-a dodatno su prikazani i drugi modeli: recesivan model (uspoređuje homozigotne varijante s heterozigotnom varijantom i homozigotnim divljim tipom) i/ili prekodominantan model (usporedba heterozigotne varijante s obje homozigotne varijante).

Fisherov egzaktni test u ovom istraživanju se koristio s ciljem određivanja povezanosti pojavnosti bolesti i ispitivanih polimorfizama. Obzirom da *GPIBA* VNTR ima više od tri različita genotipa koje ispitanik može imati, statistički program SNPStats nema mogućnost asocijalne analize alela genskih varijacija s više od tri moguća genotipa kao što je *GPIBA* VNTR te se asocijacijska analiza provodi korištenjem logističke regresije pomoću statističkog programa MedCalc, verzija 22.032 (MedCalc Software, Ostend, Belgija). χ^2 test koristi se za procjenu odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže za polimorfizam *GPIBA* VNTR.

Za polimorfizam *GPIBA* VNTR ispitivani su sljedeći predloženi modeli: kodominantni za svaki mogući genotip, model u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnog u odnosu na referentni (BB + BD + CD + BC vs. CC) te dva modela u kojima su s referentnim genotipom uspoređeni grupirani genotipovi koji sadrže pojedini rijetki alel (BB + BD + BC vs. CC i BD + CD vs. CC).

Polimorfizmi su kombinirani prema kromosomskoj lokalizaciji te su ispitani potencijalni haplotipovi sastavljeni od sljedećih kombinacija polimorfizama:

- I. Haplotip *SELP* Ser290Asn/Asn562Asp/Val599Leu/Thr715Pro na 1. kromosomu ,
- II. Haplotip *ITGA2* 807C/T /873 G/A na 5. kromosomu.

Analiza haplotipova provedena je pomoću programa za statističku analizu asocijacijskih studija SNPStats (Katalonski institut za onkologiju, Barcelona, Španjolska) uz korekciju za dob. Neravnoteža povezivanja (engl. *linkage disequilibrium*, LD; statistička korelacija između

polimorfizama koji se nalaze na istom kromosom koja opisuje vjerojatnost zajedničkog nasljeđivanja u populaciji) različitih polimorfizama prisutnih na istom kromosomu ispitana je i prikazana pomoću parametra koji predstavlja statističku vrijednost mjere neravnoteže veza D' . Kao kriterij uključivanja najmanje dva polimorfizma u daljnju analizu haplotipova najčešće korištene vrijednosti u literaturi su $D' > 0,800$. Analiza haplotipova provedena je s ciljem procjene povezanosti pojedinih haplotipova s pojavom HMU-a u djece modelom logističke regresije u odnosu na kontrolnu skupinu.

Povezanost svakog pojedinog alela, genotipa i haplotipa u univariјantnoj logističkoj regresiji s rizikom od nastanka bolesti izražena je kao omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR) s odgovarajućim 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (engl. *confidence intervals*, CI). OR predstavlja statističku mjeru za kvantifikaciju snage udruživanja dvije kategorijske varijable, u ovom slučaju su to polimorfizmi i pojava HMU-a u djece. Primjerice, ako je OR veći od 1 postoji mogućnost pozitivnog udruženja genotipa, odnosno ako je OR manji od 1 postoji mogućnost negativnog udruženja genotipa s pojavom bolesti. Prikazane su i P vrijednosti prije i nakon Benjamini-Hochbergove korekcije s ciljem uklanjanja utjecaja višestrukog testiranja koji može utjecati na rezultate genetičkih asocijacijskih studija, a vrijednosti $P < 0,050$ su se smatrale statistički značajnima.

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike skupina ispitanika s dijagnozom HMU-a s obzirom na dob i spol

Karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje, rezultati ispitivanja razlike u zastupljenosti dječaka i djevojčica, te ispitivanja razlika u dobi dijagnoze između dječaka i djevojčica prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Karakteristike skupina ispitanika.

Skupina ispitanika		Kontrolna skupina	HMU
Djevojčice	N	19	19
	Dob	9 g (1 g 6 m – 18 g)	5 g 4 m (0 d – 17 g)
Dječaci	N	13	13
	Dob	1 g 7 m (3 m – 12 g)	8 m (4 d – 12 g 6 m)
	P ^a	/	0,160
	P ^b	/	0,020*

*Dob je prikazana kao medijan i raspon, a izražena je u godinama (g), mjesecima (m), odnosno danima (d). Zbog nedostatka podataka o dobi dijagnoze HMU-a, prikazani su prikupljeni podaci za 19 djevojčica i 13 dječaka s HMU-om. ^a – ispitivanje postojanja razlike u zastupljenosti dječaka i djevojčica u skupini ispitanika s HMU (korišten je test usporedbe proporcija), ^b – ispitivanje postojanja razlike u dobi dijagnoze između dječaka i djevojčica u skupini ispitanika s HMU (korišten je Mann-Whitneyjev test), / – nije primjenjivo, HMU – hemoragijski moždani udar, * – statistički značajan rezultat.

Utvrđen je omjer pojavnosti HMU-a u djevojčica u odnosu na dječake u omjeru od 1,46:1, no dobiveni rezultat nije statistički značajan. Dobivena je statistički značajna razlika u dobi dijagnoze između dječaka i djevojčica ($P = 0,020$). U ovome istraživanju HMU je u prosjeku ranije dijagnosticiran u dječaka, nego kod djevojčica. Odabrana kontrolna skupina je nešto starija po dobi, ali to nije klinički značajno zbog čega nije ni statistički obrađivano, ali je uzeto u obzir prilikom asocijacijske analize kako bi se uklonio potencijalni utjecaj na rezultate.

5.2. Povezanost ispitivanih polimorfizama s dijagnozom HMU-a u djece

S ciljem osiguranja kvalitete kontrolne skupine, prije samog ispitivanja povezanosti odabranih polimorfizama s pojavom bolesti, odnosno HMU-om, ispitana je Hardy-Weinbergova ravnoteža u kontrolnoj skupini zasebno za svaki polimorfizam. Povezanost svih pojedinačnih polimorfizama ispitana je modelima univarijantne logističke regresije uz korištenje uobičajenih modela analize. Korišteni su kodominantni, dominantni, recesivni i prekodominantni modeli.

5.2.1. Ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini

Rezultati ispitivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini za sve ispitivane polimorfizme prikazano je u Tablici 11. zajedno s učestalosti pojedinih genotipova i alela u kontrolnoj skupini. Ispitivanje Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini se provodi s ciljem osiguravanja pouzdanost i valjanost rezultata analize povezanosti polimorfizama s bolešću. Za polimorfizam *SELP* Ser290Asn dobiveno je odstupanje u ispitivanju Hardy-Weinbergove ravnoteže prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije. Međutim, napravljeno je devet ispitivanja pa je vjerojatnost da će biti uočeno odstupanje kao rezultat slučajnosti velika, te vjerojatnost dobivena binomnim testom za najmanje jednim odstupanjem u ovom ispitivanju iznosi 0,370 (28). S ciljem uklanjanja utjecaja višestrukog testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija svih dobivenih vrijednosti te je nastavljeno provođenje korekcije u daljnjoj statističkoj obradi. Nakon korekcije odbačeno je prethodno odstupanje te je polimorfizam *SELP* Asn562Asp uključen u daljnju statističku obradu.

Tablica 11. Rezultati ispitivanja Hardy-Weinbergove ravnoteže za ispitivane polimorfizme u kontrolnoj skupini.

Polimorfizam	Genotip	Frekvencija genotipa (N)	P ^a	P ^b
<i>ITGA2</i> 807 C/T	CC	0,34 (11)	1,000	1,000
	CT	0,50 (16)		
	TT	0,16 (5)		
<i>ITGA2</i> 873 G/A	GG	0,34 (11)	1,000	1,000
	GA	0,50 (16)		
	AA	0,16 (5)		
<i>GP1BA</i> (-5) T/C	TT	0,66 (21)	0,580	1,000
	TC	0,28 (9)		
	CC	0,06 (2)		
<i>GP1BA</i> VNTR	CC	0,67 (22)	0,805	1,000
	CB	0,15 (5)		
	CD	0,14 (4)		
	BD	0,02 (0)		
	BB	0,01 (0)		
<i>GP6</i> 13254 T/C	TT	0,78 (25)	1,000	1,000
	TC	0,22 (7)		
	CC	0,00 (0)		
<i>SELP</i> Ser290Asn	GG	0,59 (19)	0,036*	0,324
	GA	0,25 (8)		
	AA	0,16 (5)		
<i>SELP</i> Asn562Asp	GG	0,09 (3)	0,079	0,356
	GA	0,66 (21)		
	AA	0,25 (8)		
<i>SELP</i> Val599Leu	GG	0,81 (26)	1,000	1,000
	GT	0,06 (6)		
	TT	0,00 (0)		
<i>SELP</i> Thr715Pro	AA	0,97 (31)	1,000	1,000
	AC	0,03 (1)		
	CC	0,00 (0)		

*Za sve polimorfizme je korišten Fisherov egzaktni test, osim za *GPIBA* VNTR gdje je korišten χ^2 test. S ciljem uklanjanja utjecaja višestrukoga testiranja provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija dobivenih P vrijednosti. ^a – P vrijednost dobivena prije Benjamini-Hochbergove korekcije, ^b – P vrijednost dobivena nakon Benjamini-Hochbergove korekcije.

5.2.2. Pojedinačni polimorfizmi i HMU u djece

Raspodjela genotipova i alela svih ispitanih polimorfizama svih ispitanika s HMU-om i u kontrolnoj skupini te rezultati univarijantne logističke regresije u skupini djece s HMU-om prikazani su u Tablici 12.

Tablica 12. Raspodjela genotipova i alela pojedinačnih polimorfizama u djece s HMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti genotipova i alela s pojavom HMU-a.

Polimorfizam	Genotip	Raspodjela genotipova, relativna frekvencija (N)		OR (95 % CI)	P ^a	P ^b
		Raspodjela alela, Relativna frekvencija (N)				
	Alel	Djeca s HMU-om	Kontrolna skupina			
<i>ITGA2 807</i> C/T	CC	0,25 (8)	0,34 (11)	1,59 (0,51 – 4,99) 2,10 (0,56 – 7,90) ^c	0,420 0,270 ^c	0,632 0,611 ^c
	CT	0,50 (16)	0,50 (16)			
	TT	0,25 (8)	0,16 (5)			
	C	0,50 (32)	0,59 (38)	1,46 (0,73 – 2,94)	0,288	0,567
	T	0,50 (32)	0,41 (26)			
<i>ITGA2 873</i> G/A	GG	0,25 (8)	0,34 (11)	1,59 (0,51 – 4,99) 2,10 (0,56 – 7,90) ^c	0,420 0,270 ^c	0,632 0,611 ^c
	GA	0,50 (16)	0,50 (16)			
	AA	0,25 (8)	0,16 (5)			
	G	0,50 (32)	0,59 (38)	1,46 (0,73 – 2,94)	0,288	0,567
	A	0,50 (32)	0,41 (26)			

<i>GP1BA (-5)</i> T/C	TT	0,75 (24)	0,66 (21)	0,71 (0,22 – 2,23) n. r. ^c 0,87 (0,27 – 2,85) ^d	0,550 0,120 ^c 0,280 ^d	0,695 0,576 ^c 0,611 ^d
	TC	0,25 (8)	0,28 (9)			
	CC	0,00 (0)	0,06 (2)			
	T	0,88 (56)	0,80 (51)	0,56 (0,21 – 1,46)	0,237	0,567
	C	0,12 (8)	0,20 (13)			
<i>GP1BA</i> VNTR	CC	0,75 (24)	0,69 (22)	0,55 (0,12 – 2,575) ^d 0,92 (0,20 – 4,12) ^d	0,448 ^d 0,910 ^d	0,632 ^d 0,910 ^d
	CB	0,09 (3)	0,16 (5)			
	CD	0,13 (4)	0,13 (4)	n. r. ^d n. r. ^d	n. r. ^d n. r. ^d	n. r. ^d n. r. ^d
	BD	0,03 (1)	0,00 (0)			
	BB	0,00 (0)	0,03 (1)	0,73 (0,25 – 2,19) ^f 0,61 (0,15 – 2,46) ^g 1,15 (0,27 – 4,82) ^h	0,579 ^f 0,488 ^g 0,853 ^h	0,695 ^f 0,651 ^g 0,890 ^h
	C	0,86 (55)	0,83 (53)	0,55 (0,15 – 1,99) 1,20 (0,31 – 4,73)	0,363 0,790	0,567 0,878
	B	0,06 (4)	0,11 (7)			
	D	0,08 (5)	0,06 (4)			
<i>GP6 13254</i> T/C	TT	0,81 (25)	0,78 (25)	0,54 (0,13 – 2,17) n. r. ^c 0,40 (0,09 – 1,79) ^e	0,380 0,270 ^c 0,220 ^e	0,651 0,640 ^c 0,640 ^e
	TC	0,16 (5)	0,22 (7)			
	CC	0,03 (1)	0,00 (0)			
	T	0,89 (55)	0,89 (57)	1,04 (0,34 – 3,15)	0,950	0,950
	C	0,11 (7)	0,11 (7)			
<i>SELP</i> Ser290Asn	GG	0,62 (20)	0,59 (19)	0,86 (0,30 – 2,51) n. r. ^c 1,41 (0,45 – 4,47) ^d n. r. ^d 1,78 (0,57 – 5,54) ^e	0,790 0,011^{c*} 0,034 ^d 0,034^{d*} 0,320 ^e	0,862 0,264 ^c 0,408 ^d 0,408 ^d 0,640 ^e
	GA	0,38 (12)	0,25 (8)			
	AA	0,00 (0)	0,16 (5)			
	G	0,81 (52)	0,72 (46)	0,59 (0,26 – 1,35)	0,213	0,567
	A	0,19 (12)	0,28 (18)			

SELP Asn562Asp	GG	0,15 (4)	0,09 (3)	0,46 (0,09 – 2,36)	0,350	0,646
	GA	0,70 (19)	0,66 (21)			
	AA	0,15 (4)	0,25 (8)			
	G	0,50 (27)	0,42 (27)	0,36 (0,09 – 1,69) ^c	0,190 ^c	0,697 ^c
	A	0,50 (27)	0,58 (37)			
SELP Val599Leu	GG	0,88 (28)	0,81 (26)	0,69 (0,17 – 2,81)	0,610	0,697
	GT	0,12 (4)	0,19 (6)			
	TT	0,00 (0)	0,00 (0)			
	G	0,94 (60)	0,91 (58)	0,64 (0,17 – 2,40)	0,513	0,641
	T	0,06 (4)	0,09 (6)			
SELP Thr715Pro	AA	0,81 (26)	0,97 (31)	5,90 (0,63 – 55,11)	0,075	0,450
	AC	0,19 (6)	0,03 (1)			
	CC	0,00 (0)	0,00 (0)			
	A	0,91 (58)	0,98 (63)	6,52 (0,76 – 55,78)	0,087	0,870
	C	0,09 (6)	0,02 (1)			

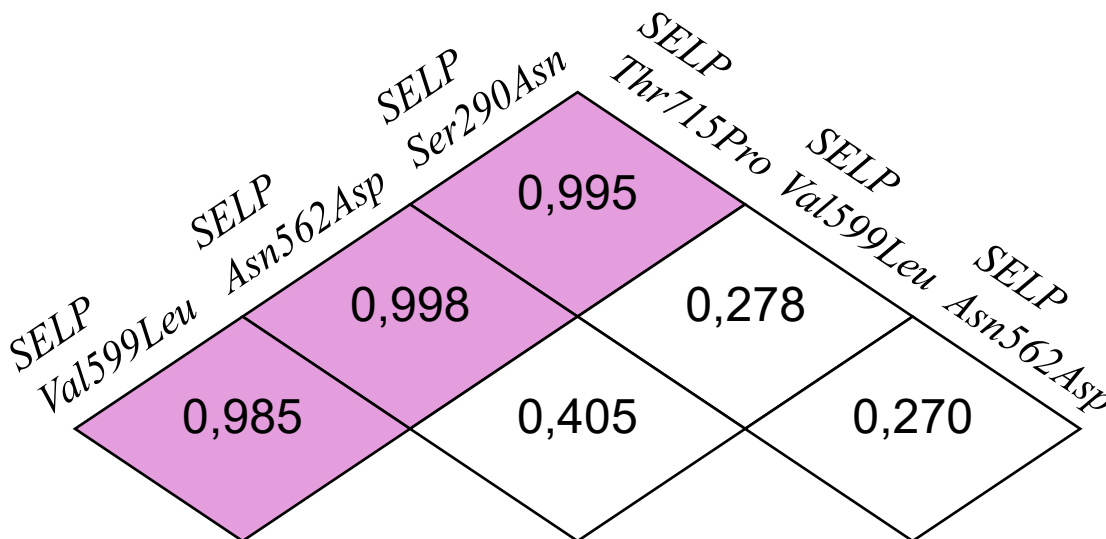
*Analiza povezanosti genotipova i bolesti je ispitana logističkom regresijom prema dominantnom modelu u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob za sve SNP-ove, a analiza genotipova za polimorfizam *GPIBA* VNTR i analize alela su ispitani u programu MedCalc bez korekcije za dob i spol. Benjamini-Hochbergova korekcija svih P vrijednosti provedena je zbog višestrukog testiranja. ^a – P vrijednost dobivene prije Benjamini-Hochbergove korekcije, ^b – P vrijednost dobivene nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, ^c – prikazan je rezultat logističke regresije prema recesivnom modelu, ^d – prikazan je rezultat logističke regresije prema kodominantnom modelu, ^e – prikazan je rezultat logističke regresije prema prekodominantnom modelu, ^f – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi različiti od referentnoga u odnosu na referentni genotip, ^g – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel B u odnosu na referentni genotip (BC + BD + BB vs. CC), ^h – prikazan je rezultat modela u kojem su uspoređeni svi genotipovi koji sadrže barem jedan alel D u odnosu na referentni genotip (CD + BD vs. CC), HMU – hemoragijski moždani udar, OR – omjer rizika, CI – interval pouzdanosti, * – statistički značajan rezultat, n. r. – nije moguće izračunati.

5.3. Povezanost odabranih haplotipova s HMU-om u djece

Ispitana je moguća udruženost različitih polimorfizama prisutnih na pojedinom kromosomima u zasebnim haplotipovima s ciljem određivanja neravnoteže povezanosti polimorfizama. U slučaju uočavanja neravnoteže povezanosti dvaju ili više polimorfizama, napravljena je daljnja analiza haplotipova u odnosu na referentni najčešći haplotip. Logističkom regresijom je ispitana potencijalna povezanost pojedinog haplotipa i nastanka HMU-a u djece u odnosu na kontrolnu skupinu.

5.3.1. Ispitivanje neravnoteže povezanosti polimorfizama

Rezultati analize neravnoteže povezanosti, ključni za pravilan odabir polimorfizama prisutnih na 1. kromosomu, a koji će se kasnije zajedno analizirati kao predloženi haplotip, prikazani su na Slici 7. Dokazana je neravnoteža povezanosti polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Asn562Asp, Val599Leu i Thr715Pro smještenih na 1. kromosomu, te je analizirana njihova povezanost kao haplotipa s HMU-om u djece.



Slika 7. Rezultat ispitivanja neravnoteže povezanosti polimorfizama *SELP* Ser290Asn, Asn562Asp, Val599Leu i Thr715Pro smještenih na 1. kromosomu. Prikazane su D' vrijednost za svaki par polimorfizama.

Rezultati analize neravnoteže povezanosti, ključni za pravilan odabir polimorfizama prisutnih na 5. kromosomu, a koji će se kasnije zajedno analizirati kao predloženi haplotip, prikazani na Slici 8. Dokazana je neravnoteža povezanosti *ITGA2* 807 T/C i 873 G/A

polimorfizama smještenih na 5. kromosomu, te je analizirana njihova povezanost kao haplotipa s HMU-om u djece.



Slika 8. Rezultat ispitivanja neravnoteže povezanosti polimorfizama *ITGA2* 807 T/C i 873 G/A smještenih na 5. kromosomu. Prikazana je D' vrijednost za polimorfizme.

5.3.2. Haplotip *SELP* Ser290Asn/Asn562ASP/Val599Leu/Thr715Pro na kromosomu 1 i HMU u djece

Učestalost haplotipa *SELP* Ser290Asn/Asn562Asp/Val599Leu/Thr715Pro smještenog na 1. kromosomu u skupini djece s HMU-om i u kontrolnoj skupini uz rezultate logističke regresije kojom je ispitana moguća povezanost haplotipa s pojavom HMU-a u djece u odnosu na kontrolnu skupinu prikazana je u Tablici 13.

Tablica 13. Raspodjela haplotipova sačinjenih od polimorfizama *SELP* Ser290Asn/Asn562Asp/Val599Leu/Thr715Pro smještenih na 1. kromosomu u skupini djece s HMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti haplotipa s pojavom HMU-a.

Haplotip <i>SELP</i> Ser290Asn/Asn562Asp/ Val599Leu/Thr715Pro	Skupina	Ukupni ispitanici			
		Učestalost haplotipa	OR (95 % CI)	P ^a	P ^b
1. Ser/Asp/Val/Thr	HMU	0,284	1,00 (Ref.)	Ref.	Ref.
	kontrolna skupina	0,466	/	/	/
2. Ser/Asn/Val/Thr	HMU	0,415	3,77 (0,96 – 14,48)	0,063	0,154
	kontrolna skupina	0,180	/	/	/
3. Asn/Asn/Val/Thr	HMU	0,081	0,55 (0,07 – 4,02)	0,560	0,680
	kontrolna skupina	0,158	/	/	/
4. Asn/Asp/Val/Thr	HMU	0,064	1,79 (0,19 – 17,21)	0,620	0,680
	kontrolna skupina	0,087	/	/	/
5. Ser/Asn/Val/Pro	HMU	0,000	10,08 (0,82 – 123,85)	0,077	0,154
	kontrolna skupina	0,016	/	/	/
6. Ser/Asn/Leu/Thr	HMU	0,000	0,58 (0,05 – 7,49)	0,680	0,680
	kontrolna skupina	0,058	/	/	/
7. Asn/Asp/Leu/Thr	HMU	0,043	n. r.	<0,001*	0,006*
	kontrolna skupina	0,026	/	/	/
8. Asn/Asn/Leu/Thr	HMU	0,000	n. r.	n. r.	n. r.
	kontrolna skupina	0,011	/	/	/

*Analiza haplotipova izrađena u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob. Provedena je Benjamini-Hochbergova korekcija dobivenih P vrijednosti s ciljem uklanjanja utjecaja višestrukog testiranja. ^a – P vrijednost dobivene prije Benjamini-Hochbergove korekcije, ^b – P vrijednost dobivene

nakon Benjamini-Hochbergove korekcije, OR – omjer rizika, CI – interval pouzdanosti, HMU – hemoragijski moždani udar, Ref. – referentni haplotip, / – nije primjenjivo, n. r. – nije moguće izračunati, * – statistički značajan rezultat.

Logističkom regresijom dobiven je statistički značajan rezultat za rijetki haplotip *SELP* Asn/Asp/Leu/Thr (7. u Tablici 13.) koji je češće uočen u skupini djece s HMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Nije moguće pouzdano izračunati OR i 95 %-tni interval pouzdanosti zbog malog broja ispitanika.

5.3.3. Haplotip *ITGA2* C807T/G873A na kromosomu 5 i HMU u djece

Raspodjela haplotipova *ITGA2* C807T/G873A smještenih na 5. kromosomu u skupini djece s HMU-om i u kontrolnoj skupini uz rezultate logističke regresije kojom je ispitana potencijalna povezanost haplotipa s pojavom HMU-a u djece u odnosu na kontrolnu skupinu prikazana je u Tablici 14.

Tablica 14. Raspodjela haplotipova sačinjenih od polimorfizama *ITGA2* C807T/G873A smještenih na 5. kromosomu u skupini djece s HMU-om i u kontrolnoj skupini te ispitivanje povezanosti haplotipa s pojavom HMU-a.

Haplotip <i>ITGA2</i> C807T/G873A	Skupina	Ukupni ispitanici		
		Učestalost haplotipa	OR (95 % CI)	P
1. C/G	HMU	0,500	1,00 (Ref.)	Ref.
	kontrolna skupina	0,594	/	/
2. T/A	HMU	0,500	1,56 (0,73 – 3,32)	0,260
	kontrolna skupina	0,406	/	/

*Analiza haplotipova izrađena u statističkom programu SNPStats uz korekciju za dob. OR – omjer rizika, CI – interval pouzdanosti, HMU – hemoragijski moždani udar, Ref. – referentni haplotip, / – nije primjenjivo.

Analizom je utvrđeno osam haplotipova u kontrolnoj skupini i 5 haplotipova u skupini djece s HMU-om, što nisu značajne razlike u raspodjeli haplotipa između djece s HMU-om i kontrolne skupine te logističkom regresijom nije dokazana povezanost haplotipa *ITGA2* C807T/G873A smještenog na 5. kromosomu s pojavom bolesti.

6. RASPRAVA

U ovo istraživanje je bilo uključeno 32 djece s dijagnozom HMU-a u dobi do 18 godina. Djeca su zaprimljena na Neurološkom odjelu Klinike za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i na Neuropedijatrijskom odjelu Klinike za dječje bolesti Zagreb. Hemoragijski moždani udar koji nastaje uslijed rupture krvne žile ima prevalenciju 6,2 prema 100 000 živorođene djece (3). S obzirom na složenu i nejasnu etiologiju, uzrokovanu brojnim nasljednim i stečenim poremećajima (1–3), ovim istraživanjem se nastojala istražiti povezanost polimorfizama u genima za glikoproteine trombocitne membrane s pojavom HMU-a u djece u Hrvatskoj.

Istraživanjem je genotipizirano devet polimorfizama u četiri gena (*ITGA2* 807 C/T, *ITGA2* 873 G/A, *GP1BA* (-5) T/C, *GP1BA* VNTR, *GP6* 13254 T/C, *SELP* Ser290Asn, *SELP* Asn562Asp, *SELP* Val599Leu, *SELP* Thr715Pro) za GP-e trombocitne membrane u skupini djece s HMU-om i kontrolnoj skupini. Povezanost pojedinih genskih varijacija uključenih u ovo istraživanje do sada nije istraženo u sklopu pojedinačnih i zajedničkih genskih čimbenika u razvoju HMU-a u djece, a prvo je istraživanje na populaciji djece iz Hrvatske. Pojava MU-a u dječjoj dobi označava veću vjerojatnost ponavljanja u odrasloj dobi, a utvrđivanje etiologije je ključno za prevenciju i liječenje stanja. Liječenje je većinom usmjereno k stabilizaciji sistemskih čimbenika i tretiranju temeljnih uzroka (29).

Istraživanja su pokazala da je najveća incidencija HMU-a u djece starosti do 1. godine života, a nakon toga incidencija opada i ponovno raste u adolescentnoj dobi (30). U odrasloj populaciji muškarci su skloniji nastanku MU-a, istraživanja na dječjoj populaciji su pokazala različite rezultate. Samo u jednoj studiji je utvrđena veća zastupljenost djevojčica u odnosu na dječake (omjer 1:0,8), dok su ostale studije su utvrdile omjer djevojčica i dječaka u iznosu od 1:1,15 do 1:4,0 (2,31). U ovom istraživanju je utvrđen omjer pojavnosti HMU-a u djevojčica i dječaka 1,46:1, odnosno, veću pojavnost HMU-a u djevojčica iako rezultat nije bio statistički značajan. Nadalje, utvrđena je statistički značajna nešto ranija pojavnost HMU-a u dječaka nego djevojčica. Dobiveni rezultati nisu u skladu s prethodno objavljenim rezultatima za ukupnu pojavnost svih tipova MU-a, iako nema odvojenih podataka za pojavnost HMU-a. Dobiveni rezultati se mogu pripisati drukčijom patofiziološkom pozadinom HMU-a u odnosu

na ishemijski MU, a također mogu predstavljati geografski ograničen rezultat, a svakako trebaju biti potvrđeni istraživanjem na većoj populaciji (3).

Genske varijacije glikoproteina trombocitne membrane imaju učinak na funkciju trombocita, mijenjaju osnovne funkcije trombocita, mijenjaju ekspresiju ili aktivnost receptora trombocita ili utječu na nizvodne puteve signalizacije receptora (32).

Kompleks GPIa/IIa ostvaruje čvrste veze s kolagenom, što je ključno u adheziji i aktivaciji trombocita. Polimorfizmi *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A utječu na stabilnost mRNA, odnosno na ekspresiju kompleksa GPIa/IIa (9,10). Postoje tri različita genotipa polimorfizma *ITGA2* 807 C/T koji su vezani uz različitu ekspresiju kompleksa GPIa/IIa na membrani trombocita, genotip TT karakterizira ekspresija najvećeg broja membranskih receptora, a najmanji broj receptora uz CC genotip. Razlika u gustoći receptora izravno je vezano uz brzinu vezanja trombocita i kolagena tipa I (33). U ovom istraživanju udio ispitanika koji su heterozigoti za oba polimorfizma, *ITGA2* 807 C/T i *ITGA2* 873 G/A, čini 50 % i u kontrolnoj skupini i u skupini ispitanika, a homozigoti su podjednako zastupljeni. Pregledom dostupne literature nije pronađeno istraživanje koje istražuje povezanost HMU-a i polimorfizama *ITGA2* 807 C/T i 873 G/A. Ranije je objavljeno da nositelji alela *ITGA2* 873G pokazuju nižu ekspresiju kompleksa GPIa/IIa na površini trombocita (9).

Kompleks GPIb/IX/V ključan je u tvorbi interakcija s VWF-om, igra ključnu ulogu u adheziji trombocita na ozlijeđenom vaskularnom subendotelu. Polimorfizam koji utječe na strukturu receptora je VNTR iz promijenjenog broja (jedan do četiri) tandemskih ponavljanja 13 aminokiselinskih ostataka u proteinu zbog čega se razlikuju aleli A, B, C i D (34,35). Smatra se da povećan broj tandemskih ponavljanja rezultira povećanjem duljine izvanstaničnog dijela GPIb s povećanjem ponavljanja motiva, a time dolazi do povećanja veznog mjesta za VWF (34).

Drugi polimorfizam je *GP1BA* (-5) T/C (Kozak). Afshar-Khargan i sur. proveli su studiju i zaključili da postoji povezanost C alela polimorfizma Kozak i povećane ekspresije kompleksa GPIb/IX/V na površini trombocita. Gustoća kompleksa može utjecati na sposobnost adhezije trombocita (35). U ovom istraživanju utvrđen je genotip TT kod 24/32 djece s HMU-om, dok genotip CC uopće nije utvrđen. Ne postoje prethodno objavljeni rezultati genotipizacije ovoga polimorfizma u skupini djece s HMU-om, dok je u sklopu istraživanja provedenog u mladim

žena s HMU-om utvrđena prisutnost genotipa TT u gotovo 76 % ispitanica (36) što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Provedena su istraživanja *GP6* 13254 T/C polimorfizma u kontekstu ishemijskog MU-a, trombofilija i akutnog infarkta miokarda (37), ali ne i u stanju kao što je HMU. Prisutnost genotipa CC utječe na zamjenu aminokiseline serin u prolin u izvanstaničnoj regiji GPVI-a, odnosno promjene potencijalnog mjesta za O-glikozilaciju, konformaciju GPVI-a i nizvodne signalizacije (16). U ovom istraživanju uočena je slična raspodjela genotipova između kontrolne skupine i skupine djece s HMU-om, gdje je najveći broj ispitanika imao genotip TT. Genotip CC uočen je u skupini djece s HMU-om, ali ne i u kontrolnoj skupini. Međutim, nije dobiven statistički značajan rezultat, vjerojatno zbog malog broja ispitanika. Ovaj polimorfizam je u pojedinim istraživanjima vezan uz stanja povećanog krvarenja zbog čega je uključen i u ovo istraživanje (15,16).

Istraživanje provedeno na Hrvatskoj populaciji djece i odraslih utvrdilo je da se frekvencije genotipova polimorfizama *SELP* (Asn562Asp, Val599Leu, Thr715Pro) između djece i odraslih ne razlikuju, te nije utvrđena razlika pojavnosti ni usporedbom spolova ispitanika. Utvrđeno je da je pojavnost divljeg tipa *SELP* Ser290Asn (SerSer) značajno veća kod muškaraca nego kod žena, te ovaj genotip ima češću pojavnost i kod dječaka (38).

Polimorfizam *SELP* Thr715Pro se povezuje uz promjenu u brzini transporta P-selektina unutar stanice, a posljedično dolazi do smanjenog broja interakcija s drugim stanicama, dok su polimorfizmi *SELP* Val599Leu, Asn562Asp i Ser290Asn povezani uz patološka stanja tromboze (9). Polimorfizmi *SELP* istraženi u ovom radu prvi put su istraživani u djece s HMU-om. Ispitivanjem polimorfizma *SELP* Ser290Asn uočeno je da niti jedan ispitanik s HMU nema genotip AA (AsnAsn), dok je u kontrolnoj skupini naveden genotip bio prisutan u 5/32 ispitanika. Osim toga, za polimorfizam *SELP* Thr715Pro ni jedan ispitanik kontrolne skupine ni ispitne skupine nije bio nositelj genotipa CC (ProPro), ali je zabilježena veća pojavnost genotipa AC (6/32, ThrPro) u skupini djece s HMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu (1/32), odnosno, veća pojavnost alela C. Ispitivanjem logističke regresije povezanosti *SELP* Thr715Pro s HMU-om prema dominantnom modelu dobivena je P vrijednost od 0,075 što ipak nije statistički značajan rezultat, a moguće zbog maloga broja ispitanika. Međutim, ispitivanjem logističke regresije uočena je statistička značajnost jedino za genotip *SELP* 290

AA (AsnAsn) prema recesivnom i kodominantnom modelu te se može zaključiti da nositelji ovog genotipa imaju niži rizik od razvoja HMU-a. Genotip AA (AsnAsn) uočen je samo u kontrolnoj skupini te postoji mogućnost njegovog protektivnog djelovanja u odnosu na nositelje genotipa GG (SerSer) i GA (SerAsn). Statističkom obradom nije bilo moguće utvrditi omjer rizika i 95 %-tni interval pouzdanosti zbog malog broja ispitanika te je dobiveni rezultat statističke obrade izgubio statističku značajnost nakon provedene Benjamini-Hochbergove korekcije što ukazuje da rezultate genetičkih asocijacijskih ispitivanja treba tumačiti s posebnim oprezom u slučaju višestrukog testiranja i malog broja ispitanika, odnosno, trebalo bi ih potvrditi istraživanjem na većem broju ispitanika. Pretraživanjem literature nisu pronađeni znanstveni radovi koji govore o povezanosti *SELP* polimorfizama i HMU-a, zbog čega su rezultati dobiveni ovim istraživanjem od posebnoga značaja.

S obzirom da su ispitivani polimorfizmi *SELP* smješteni na 1. kromosomu, te polimorfizmi *ITGA2* 807 T/C i 873 G/A smješteni na 5. kromosomu pokazali neravnotežu povezanosti statističkom obradom, ispitana je povezanost pojedinih haplotipova i nastanka HMU-a. Pregledom literature, nisu pronađeni znanstveni radovi u kojima je određivana povezanost ispitivanih haplotipova. Analizom nije utvrđena različita raspodjela *ITGA2* haplotipova i nije utvrđena statistička značajnost rezultata. Analizom je primijećena različita raspodjela pojedinih haplotipova *SELP* između skupine djece s HMU u odnosu na kontrolnu skupinu. Potvrđena je manja učestalost referentnog haplotipa *SELP* Ser/Asp/Val/Thr (9/32), a veća učestalost 2. najčešćeg haplotipa *SELP* Ser/Asn/Val/Thr (13/32) u skupini djece s HMU-om u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, rijetki haplotipovi *SELP* Ser/Asn/Val/Pro i Ser/Asn/Leu/Thr nisu uočeni u skupini djece s HMU-om. Dobiveni rezultati imaju značajan znanstveni doprinos, iako nije uočena statistička značajnost istih, vjerojatno zbog malog broja ispitanika. Analizom je uočena statistička značajnost rijetkog haplotipa *SELP* Asn/Asp/Leu/Thr ($P = 0,001$) češće prisutnog u skupini djece s HMU-om, iako statističkom obradom također nije bilo moguće utvrditi omjer rizika i 95 %-tni interval pouzdanosti zbog malog broja ispitanika. Kako je nakon Benjamini-Hochbergove korekcije dobiveni rezultat zadržao statističku značajnost ($P = 0,006$), može se zaključiti da prisutnost ovog haplotipa može povećati rizik za nastanak HMU-a u djece, iako bi dobivene rezultate trebalo provjeriti na većoj skupini ispitanika.

Glavno ograničenje ovog istraživanja jest mali broj uključenih ispitanika zbog niske incidencije HMU-a u djece. Iz tog razloga nije napravljena odvojena analiza rezultata s obzirom na spol jer bi to dodatno utjecalo na višestruku rascjepkanost i pouzdanost dobivenih rezultata nakon statističke obrade. Rezultate je stoga potrebno oprezno tumačiti, ali i zbog nedostatne literature i prethodnih istraživanja s kojima bi se dobiveni rezultati mogli usporediti.

Ispitivani genski polimorfizmi utječu na ekspresiju trombocitnih receptora, mijenjaju osnovne funkcije trombocita, ekspresiju ili aktivnost receptora trombocita ili utječu na nizvodne puteve signalizacije receptora. HMU je stanje nejasne etiologije, uključujući genetičke čimbenike, s većom vjerojatnosti i težim ishodom ukoliko su uključeni fetalni stres i hemostatske abnormalnosti (1). Ovim istraživanjem je po prvi put ispitana uloga pojedinačnih devet polimorfizama u četiri gena kandidata te potencijal njihovog udruženog učinka kao haplotipova na pojavu HMU-a u djece u Hrvatskoj populaciji. Ishod i posljedice HMU-a ovise o volumenu krvarenja (4), a funkcija trombocita ima ključnu ulogu u formiranju ugruška koji sprječava istjecanje krvi u moždani parenhim. Daljnjim studijama na većem broju ispitanika i uključivanjem analize više polimorfizama ili cijelih gena, primjerice, primjenom metoda sekvenciranja sljedeće generacije, moći će se detaljnije istražiti povezanost različitih genetičkih čimbenika vezanih uz glikoproteinske receptore na membrani trombocita s volumenom krvarenja i težinom ishoda, odnosno, pojavom HMU-a u djece.

7. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem ispitana je hipoteza da su polimorfizmi u genima za glikoproteine trombocitne membrane povezani s pojavom HMU-a u djece u Hrvatskoj. Uključeno je 32 djece s dijagnozom HMU-a u dobi do 18 godina i isti broj zdrave populacije podudarne po dobi i spolu. U sve djece genotipizirano je devet polimorfizama u četiri gena kandidata molekularno-genetičkim metodama. Ispitan je potencijal pojedinačnih polimorfizama i udruženih polimorfizama (haplotipova) kao mogućih rizičnih čimbenika za nastanak bolesti.

- U ovom istraživanju je utvrđen veći broj djevojčica nego dječaka s HMU-om, s omjerom 1,46:1, iako rezultat nije bio statistički značajan.
- Dobivena je statistički značajna razlika ($P = 0,020$) u dobi dijagnoze HMU-a između dječaka i djevojčica te je HMU u prosjeku ranije dijagnosticiran u dječaka, nego kod djevojčica.
- Rezultati statističke obrade pokazali su podjednaku distribuciju genotipova za većinu pojedinačnih polimorfizama (*ITGA2* 807C/T, *ITGA2* 873 G/A, *GP1BA* (-5) T/C, *GP1BA* VNTR, *GP6* 13254 T/C, *SELP* Asn562Asp, *SELP* Val599Leu, *SELP* Thr715Pro) u djece s HMU-om i u kontrolnoj skupini, zbog čega nije utvrđena statistička značajnost dobivenih rezultata.
- Jedino je za *SELP* Ser290Asn pokazano da nositelji genotipa AA (AsnAsn) imaju niži rizik pojave HMU-a (rezultati logističke regresije prema: recesivnom modelu $P = 0,011$; kodominantnom modelu $P = 0,034$), te navedeni genotip uopće nije utvrđen u skupini djece s HMU-om. Međutim, rezultat nije zadržao statističku značajnost nakon provedene Benjamini-Hochbergove korekcije (rezultati logističke regresije prema: recesivnom modelu $P = 0,264$; kodominantnom modelu $P = 0,408$).
- Uočena je statistički značajno veća učestalost rijetkog haplotipa *SELP* Asn/Asp/Leu/Thr u skupini djece s HMU u odnosu na referentni haplotip *SELP* Ser/Asp/Val/Thr pa se prisutnost navedenog haplotipa može smatrati rizikom za pojavu HMU-a u djece ($P = 0,001$ prije provedene Benjamini-Hochbergove korekcije, $P = 0,006$ nakon provedene Benjamini-Hochbergove korekcije).
- S obzirom na relativno malen broj uključenih slučajeva HMU-a u djece, dobivene rezultate bi trebalo potvrditi istraživanjem na većoj skupini ispitanika.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem mentoricama dr. sc. Andrei Čeri, mag. med. biochem. i doc. dr. sc. Jasni Leniček Krleži, spec. med. biokemije, kao i doc. dr. sc. Désirée Coen Herak, spec. med. biokemije na ukazanom povjerenju, strpljenju i pruženoj prilici. Zahvaljujem im na uloženom trudu, razumijevanju i pomoći pri pisanju ovoga znanstvenog rada. Zahvaljujem na brojnim stručnim savjetima te velikom prenesenom znanju i vještinama.

9. LITERATURA

1. Tan AP, Svrckova P, Cowan F, Chong WK, Mankad K. Intracranial hemorrhage in neonates: A review of etiologies, patterns and predicted clinical outcomes. *European Journal of Paediatric Neurology* 2018;22(4):690–717.
2. Herak DC. Polimorfizmi u genima za koagulacijske čimbenike i enzime metabolizma homocisteina u djece s moždanim udarom. Zagreb 2013;1-13.
3. Ferriero DM, Fullerton HJ, Bernard TJ, Billingham L, Daniels SR, DeBaun MR, i ostali. Management of Stroke in Neonates and Children: A Scientific Statement From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2019;50(3):E51–96.
4. Boulouis G, Blauwblomme T, Hak JF, Benichi S, Kirton A, Meyer P, i ostali. Nontraumatic Pediatric Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 2019;50(12):3654–61.
5. Grubiša I. Intrakranijalna krvarenja u novorođenčadi liječene u Zavodu za intenzivnu pedijatriju KBC-a Split od 2008. do 2017. godine. Split 2018;11-12.
6. Lo WD. Childhood Hemorrhagic Stroke. *J Child Neurol* 2011;26(9):1174–85.
7. Deppermann C. Platelets and vascular integrity. *Platelets* 2018;29(6):549–55.
8. De Queiroz MR, de Sousa BB, da Cunha Pereira DF, Mamede CCN, Matias MS, de Morais NCG, i ostali. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon* 2017;133:33–47.
9. Čeri A. Polimorfizmi u genima za čimbenike zgrušavanja i fibrinolize, glikoproteine trombocitne membrane i intermedijarne rizične čimbenike u djece s ishemijskim moždanim udarom. Zagreb 2022;26-150.
10. Di Paola J, Jugessur A, Goldman T, Reiland J, Tallman D, Sayago C, i ostali. Platelet glycoprotein Iba and integrin $\alpha 2\beta 1$ polymorphisms: gene frequencies and linkage disequilibrium in a population diversity panel. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3(7):1511–21.
11. NCBI - SNP [Internet]. [citirano 11. srpanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>
12. ClinVar. [Internet]. [citirano 11. srpanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
13. Sequence Variant Nomenclature. [Internet]. [citirano 11. srpanj 2024.]. Dostupno na: <http://varnomen.hgvs.org/recommendations/DNA/>
14. Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC. Glycoprotein Ib–IX–V. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(8):1170–4.
15. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 2004;114(4):221–33.

16. Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol* 2007;139(3):363–72.
17. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol* 2004;126(3):298–306.
18. Yao Y, Liu F, Gu Z, Wang J, Xu L, Yu Y, i ostali. Emerging diagnostic markers and therapeutic targets in post-stroke hemorrhagic transformation and brain edema. *Front Mol Neurosci* 2023;16:1286351.
19. Pryor RJ, Wittwer CT. *Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Curve Analysis. U: Clinical Applications of PCR*. New Jersey: Humana Press; str. 19–32.
20. Technology Report 92 [Internet]. [citirano 11. srpanj 2024.]. Dostupno na: www.future-drugs.com
21. Erali M, Wittwer CT. High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods* 2010;50(4):250–61.
22. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat* 2009;30(6):857–9.
23. Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nat Protoc* 2007;2(1):59–66.
24. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012;13(1):134.
25. Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, Pryor RJ, Chen J, Wittwer CT. Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. *Clin Chem* 2003;49(3):396–406.
26. SNPStats. [Internet]. [citirano 12. srpanj 2024.]; Dostupno na: <https://www.snpstats.net/>
27. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22(15):1928–9.
28. Easy Binomial Test Calculator [Internet]. [citirano 17. srpanj 2024.]. Dostupno na: <https://www.socscistatistics.com/tests/binomial/default2.aspx>
29. Gulati S, Kalra V. Stroke in children. *The Indian Journal of Pediatrics* 2003;70(8):639–48.
30. Fullerton HJ, Wu YW, Zhao S, Johnston SC. Risk of stroke in children. *Neurology* 2003;61(2):189–94.
31. Mallick AA, O’Callaghan FJK. The epidemiology of childhood stroke. *European Journal of Paediatric Neurology* 2010;14(3):197–205.
32. Kunicki TJ, Williams SA, Nugent DJ. Genetic variants that affect platelet function. *Curr Opin Hematol* 2012;19(5):371–9.

33. Postuła M. Common Polymorphisms within Genes Encoding Platelet Receptors: Still a Way to Go? *Cardiology* 2016;133(1):54–5.
34. Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Platelet GP IIIa Pl A and GP Ib Variable Number Tandem Repeat Polymorphisms and Markers of Platelet Activation in Acute Stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(7):1124-31.
35. Frank MB, Reiner AP, Schwartz SM, Kumar PN, Pearce RM, Arbogast PG, i ostali. The Kozak sequence polymorphism of platelet glycoprotein Ib and risk of nonfatal myocardial infarction and nonfatal stroke in young women 2001;97(4):875-9.
36. Liu H, Wang Y, Zheng J, Li G, Chen T, Lei J, i ostali. Platelet glycoprotein gene Ia C807T, HPA-3, and Iba VNTR polymorphisms are associated with increased ischemic stroke risk: Evidence from a comprehensive meta-analysis. *International Journal of Stroke* 2017;12(1):46–70.
37. Dostálová G, Bělohávek J, Hlubocká Z, Bayerová K, Bobčiková P, Kvasnička T, i ostali. Multiple thrombophilia mutations as a possible cause of premature myocardial infarction. *Wien Klin Wochenschr* 2017;129(13–14):503–8.
38. Pavic M, Herak DC, Antolic MR, Ceri A, Krleza JL, Topic RZ, i ostali. Allele and haplotype frequencies of P-selectin gene in Croatian population and review of literature. *Human Gene* 2022;33:201056.

10. SAŽETAK

Nikolina Damašek

POLIMORFIZMI U GENIMA ZA GLIKOPROTEINE TROMBOCITNE MEMBRANE U DJECE S HEMORAGIJSKIM MOŽDANIM UDAROM

Hemoragijski moždani udar (HMU), koji nastaje uslijed ruptуре krvne žile, stanje je vrlo kompleksne i djelomično nejasne etiologije, uzrokovano brojnim nasljednim i stečenim poremećajima. HMU je kod djece većinom teško uočen i prekasno dijagnosticiran, a predstavlja stanje sa smrtnim ishodom ili teškim neurološkim posljedicama. Promjene u strukturi i funkciji proteina trombocitne membrane mogu utjecati na promjene u staničnoj signalizaciji, a posljedično i funkciji trombocita. Povezanost pojedinih genskih varijacija uključenih u ovo istraživanje do sada nije istražena u sklopu pojedinačnih i zajedničkih genskih čimbenika u razvoju HMU-a u djece, a prvo je istraživanje na populaciji djece iz Hrvatske. U istraživanje je uključeno 32 djece s dijagnozom HMU-a u dobi do 18 godina i isti broj zdrave djece podudarne po dobi i spolu. U sve djece genotipizirano je devet polimorfizama u četiri gena kandidata (*ITGA2* 807C/T i 873 G/A, *GPIBA* (-5) T/C i VNTR, *GP6* 13254 T/C, *SELP* Ser290Asn, Asn562Asp, Val599Leu i Thr715Pro) molekularno-genetičkim metodama te je ispitan potencijal njihove pojedinačne i udružene povezanosti s pojavom HMU-a u djece. U ispitivanju su se koristili uzorci genomske deoksiribonukleinske kiseline (DNA) svih ispitanika izdvojeni iz preostalih uzorka periferne krvi koji su korišteni za rutinske laboratorijske analize. Rezultati ovoga istraživanja nisu pokazali statistički značajnu povezanost ispitivanih polimorfizama i haplotipova s pojavom HMU-a u djece, osim za genotip *SELP* 290 AsnAsn koji bi mogao smanjivati rizik pojave HMU-a u djece i rijetki haplotip *SELP* Asn/Asp/Leu/Thr koji bi mogao povećavati rizik pojave HMU-a u djece. Za preostalih osam ispitivanih pojedinačnih polimorfizama i za raspodjelu haplotipova *ITGA2* C807T/G873A nisu dobiveni statistički značajni rezultati. Daljnjim studijama na većem broju ispitanika i uključivanjem analize više polimorfizama ili cijelih gena, primjerice, primjenom metoda sekvenciranja sljedeće generacije, moći će se detaljnije istražiti povezanost glikoproteinskih receptora na membrani trombocita s volumenom krvarenja i težinom ishoda, odnosno, pojavom HMU-a u djece.

Ključne riječi: hemoragijski moždani udar, djeca, glikoproteini trombocitne membrane, genske varijacije, polimorfizmi.

11. SUMMARY

Nikolina Damašek

POLYMORPHISMS IN GLYCOPROTEINS OF PLATELETE MEMBRANE IN CHILDREN WITH HAEMORRHAGIC STROKE

Haemorrhagic stroke which occurs due to the rupture of a blood vessel, is a condition with a very complex and partly unclear aetiology, caused by numerous hereditary and acquired disorders. In children, haemorrhagic stroke is often difficult to detect and diagnosed too late and it represents a condition with either a fatal outcome or severe neurological consequences. Changes in the structure and function of platelet membrane proteins can influence alterations in cellular signalling, and consequently, platelet function. The connection between certain genetic variations investigated in this study has not yet been explored in the context of individual and combined genetic factors in the development of haemorrhagic stroke in children. It is the first study conducted on a population of children in Croatia. The study included 32 children diagnosed with haemorrhagic stroke up to the age of 18 and an equal number of healthy children matched by age and sex. In all children, nine polymorphisms in four candidate genes (*ITGA2* 807 C/T and 873 G/A, *GP1BA* (-5) T/C and VNTR, *GP6* 13254 T/C, *SELP* Ser290Asn, Asn562Asp, Val599Leu, and Thr715Pro) were genotyped using molecular-genetic methods. The potential of their individual and combined association with the occurrence of haemorrhagic stroke in children was examined. The study used samples of genomic deoxyribonucleic acid (DNA) from all participants extracted from residual peripheral blood samples that had been used for routine laboratory analyses. The results of this study did not show a statistically significant association between the examined polymorphisms and haplotypes with the occurrence of haemorrhagic stroke in children, except for the *SELP* 290 AsnAsn genotype, which could reduce the risk of haemorrhagic stroke in children, and the rare *SELP* Asn/Asp/Leu/Thr haplotype, which could increase the risk of the disease occurrence. For the remaining eight examined individual polymorphisms and for the distribution of *ITGA2* C807T/G873A haplotypes, no statistically significant results were obtained. Further studies with a larger number of participants and the inclusion of analyses of more polymorphisms or entire genes, for example, using next-generation sequencing methods, could offer detailed investigation of the association between glycoprotein receptors on the platelet membrane and the volume of bleeding, the severity of outcomes and the occurrence of haemorrhagic stroke in children.

Keywords: haemorrhagic stroke, children, glycoproteins of platelet membrane, genetic variations, polymorphisms

12. ŽIVOTOPIS

Nikolina Damašek rođena 3. 10. 2000. u Osijeku. Završila je III. gimnaziju u Osijeku 2019. godine, kada je maturirala s odličnim uspjehom. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovala je na natjecanjima iz kemije. 2019. godine upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Trenutno je studentica 5. godine Studija medicinska biokemija i laboratorijska medicina. Trenutno obavlja Stručno osposobljavanje za magistre medicinske biokemije u KBC-u Osijek do kraja akademske godine 2023./2024. Motivaciju za izradu ovog znanstvenog rada pronašla je u znatiželji o hemoragijskim moždanim udarima kod djece, kojeg je imala u najranijoj dobi. Oduvijek se željela okušati u izradi znanstvenog rada, a ovim radom je nastojala pridonijeti u znanosti i laboratorijskoj medicini.