

# Značenje alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova receptora RAGE u juvenilnom idiopatskom artritisu

---

**Bobek, Dubravka**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2014**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:002733>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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





## **Središnja medicinska knjižnica**

**Bobek, Dubravka (2014) *Značenje alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova receptora RAGE u juvenilnom idiopatskom artritisu* [The significance of alarmins HMGB1 and S100A12 and their receptor RAGE in juvenile idiopathic arthritis]. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2182>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dubravka Bobek**

**Značenje alarmina HMGB1 i S100A12  
te njihova receptora RAGE u  
juvenilnom idiopatskom artritisu**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2014.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Dubravka Bobek**

**Značenje alarmina HMGB1 i S100A12  
te njihova receptora RAGE u  
juvenilnom idiopatskom artritisu**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2014.**

Klinički dio disertacije izrađen je u Zavodu za kliničku imunologiju, reumatologiju, respiracijske i alergološke bolesti Klinike za pedijatriju, Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu, a laboratorijski u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu).

Voditelj rada: doc.dr.sc. Marija Jelušić-Dražić

Zahvaljujem se prvenstveno doc.dr.sc. Mariji Jelušić-Dražić na podršci i konstruktivnim savjetima bez kojih ne bih uspjela dovršiti ovo djelo. Zahvalna sam prof.dr.sc. Danki Grčević i prof.dr.sc. Nataši Kovačić na svesrdnoj pomoći tijekom izrade ove disertacije. Zahvaljujem se doc.dr.sc. Branku Kolariću na savjetima oko statističke obrade podataka bez koje silan trud oko ovog rada ne bi imao pravo značenje.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj dragoj majci pok. Kati i ocu Martinu koji su svojim životnim trudom postavili dobre temelje u mom životu. Učili su me da je mudrost dragocjenija od biserja i da se s njom nikakve dragocjenosti usporediti ne mogu. Sada vidim da je to, kao i sve drugo što su govorili, istina.

Doktorsku disertaciju posvećujem sinu Martinu koji je nepresušni izvor radosti u mom životu i kome sam, kao i suprugu Benjaminu, uskratila puno lijepih zajedničkih trenutaka dok je nastajalo ovo djelo.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Imunološko prepoznavanje u upalnim reumatskim bolestima .....	1
1.2. Juvenilni idiopatski artritis (JIA).....	4
1.2.1. Kliničke i laboratorijske značajke oligo/poliartikularnog i sistemskog tipa JIA .....	6
1.2.1.1. Oligoartikularni tip JIA .....	7
1.2.1.2. Poliartikularni tip JIA .....	8
1.2.1.3. Sistemski tip JIA .....	9
1.3. Patogeneza JIA.....	10
1.3.1. Patogeneza oligoartikularnog/poliartikularnog tipa JIA .....	11
1.3.2. Patogeneza sistemskog JIA .....	13
1.4. Alarmini .....	17
1.4.1. Uloge alarmina u upalnim reumatskim bolestima .....	20
1.4.1.1. Uloga alarmina u rasvjetljavanju patogeneze autoimunih i kroničnih upalnih bolesti .....	20
1.4.1.2. Uloga alarmina kao pokazatelja aktivnosti i težine autoimunih i kroničnih upalnih bolesti .....	21
1.4.1.3. Uloga alarmina u liječenju autoimunih i kroničnih upalnih bolesti.....	21
1.4.2. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) .....	23
1.4.3. Protein koji veže kalcij S100A12 .....	27
1.4.4. Receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE).....	29
1.4.4.1. Topljivi RAGE (sRAGE).....	31
1.4.4.2. Povratna sprema između RAGE liganada, RAGE i sRAGE .....	32
<b>2. HIPOTEZA .....</b>	<b>35</b>
<b>3. CILJEVI RADA .....</b>	<b>36</b>
3.1. Opći cilj .....	36
3.2. Specifični ciljevi:.....	36
<b>4. ISPITANICI I METODE RADA .....</b>	<b>37</b>
4.1. Ispitanici .....	37
4.2. Metode rada.....	38
4.2.1. Analiza općih i imunskih laboratorijskih pokazatelja.....	38
4.2.2. Analiza alarmina u serumu .....	38

4.2.3. Analiza genskog izražaja alarmina .....	38
4.2.4. Statističke metode .....	40
<b>5. REZULTATI.....</b>	<b>41</b>
5.1. Prikaz osnovnih podataka o ispitanicima .....	41
5.2. Analiza laboratorijskih pokazatelja u djece s JIA i kontrolne skupine .....	42
5.3. Analiza razine proteina i genskog izražaja HMGB1 u bolesnika s oligoartikularnim, poliartikularnim i sistemskim tipom JIA.....	48
5.4. Analiza razine proteina i genskog izražaja S100A12 u bolesnika s oligoartikularnim, poliartikularnim i sistemskim tipom JIA.....	57
5.5. Analiza razine proteina i genskog izražaja sRAGE bolesnika s oligoartikularnim, poliartikularnim i sistemskim tipom JIA.....	65
5.6. Usporedba razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE u ispitanika sa sistemskim tipom JIA i djece kontrolne skupine .....	74
5.7. Usporedba razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE u ispitanika sa sistemskim tipom JIA u odnosu na djecu oboljelu od artikularnih tipova JIA .....	78
5.8. Analiza serumske razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i njihova topljiva receptora sRAGE u djece s JIA neovisno o tipu bolesti .....	86
5.9. Analiza povezanosti između serumske razine i genskog izražaja alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljivog receptora sRAGE u bolesnika s JIA neovisno o tipu bolesti u odnosu na rutinske laboratorijske nalaze za ocjenu upalne aktivnosti bolesti .....	88
5.10. Analiza povezanosti serumske razine i genskog izražaja alarmina HMGB1, S100A12 i sRAGE u djece kontrolne skupine i klasičnih laboratorijskih nalaza.....	89
5.11. Analiza povezanosti serumske razine i genskog izražaja alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljivog receptora sRAGE u bolesnika s JIA ovisno o tipu bolesti u odnosu na rutinske laboratorijske nalaze za ocjenu upalne aktivnosti bolesti .....	90
<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>101</b>
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>130</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>133</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>134</b>

<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>135</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>169</b>



## POPIS OZNAKA I KRATICA

- ACR - Američko reumatološko društvo (*engl. American College of Rheumatology*);
- AGE - krajnji produkt uznapredovale glikozilacije (*engl. advanced glycation end products*);
- ANA - antinuklearno protutijelo;
- APC - antigen predočna stanica (*engl. antigen presenting cell*);
- DAMP - alarmini ili molekule pridružene oštećenju (*engl. damage-associated molecular patterns*);
- DC - dendritičke stanice (*engl. dendritic cells*);
- DMARDs - antireumatski lijekovi koji preinačuju bolest (*engl. disease modifying antirheumatic drugs*);
- ELISA - enzimski imunotest (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay*);
- EN RAGE - izvanstanični novoidentificirani receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (*engl. extracellular newly identified receptor for advanced glycation endproducts binding protein*);
- EULAR - Europska liga za borbu protiv reumatizma (*engl. European League Against Rheumatism*);
- FOX P3 - transkripcijski čimbenik FoxP3 (*engl. transcription factor forkhead box P3*);
- HLA - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (*engl. human leukocyte antigens receptor*);

- HMGB1 - protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (*engl. high mobility group box 1 protein*);
- HSPs - toplinski šok proteini (*engl. heat shock proteins*);
- ICAM - međustanična adhezijska molekula (*engl. intracellular adhesion molecule*);
- IFN - interferoni;
- IL - interleukini;
- IL-1Ra - antagonist receptora za interleukin 1 (*engl. interleukin 1 receptor antagonist*);
- ILAR - Međunarodna liga reumatoloških udruženja (*engl. International League of Association for Rheumatology*);
- JIA - juvenilni idiopatski artritis;
- MHC - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti u miša (*engl. main histocompatibility complex*);
- MMPs - matriks metaloproteinaze (*engl. matrix metalloproteinases*) ;
- NLR - NOD-u sličan receptor (*engl. Node-like receptor*);
- PAMP - molekularni obrazac povezan s patogenima (*engl. pathogen associated molecular pattern*);
- PRP - receptor za prepoznavanje patogena (*engl. patogen-recognition receptors*);
- PRR - receptor za prepoznavanje strukturnih „predložaka“ (*engl. PRR -patern recognition receptor*);
- RT PCR - kvantitativna lančana reakcija polimerazom (*engl. Real-Time polymerase chain reaction*)

- RA - reumatoidni artritis
- RAGE - receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (*engl. receptor for advanced glycation end products*);
- RIG - RIG-u sličan receptor (*engl. Rig-like receptor*);
- ROS - reaktivni metaboliti kisika (*engl. reactive oxygen species*);
- SIRS - traumom induciran sindrom sistemskog upalnog odgovora (*engl. systemic inflammatory response syndrome*);
- S100A12 - protein koji veže kalcij S100A12
- TLR - Tollu-sličan receptor (*engl. Toll-like receptor*);
- Treg - regulacijski T limfociti
- TNF - čimbenik tumorske nekroze (*engl. TNF, tumor necrosis factor*)
- VCAM - vaskularna stanična adhezijska molekula (*engl. vascular cell adhesion molecule antihypertensive drugs*).

## 1. UVOD

### 1.1. Imunološko prepoznavanje u upalnim reumatskim bolestima

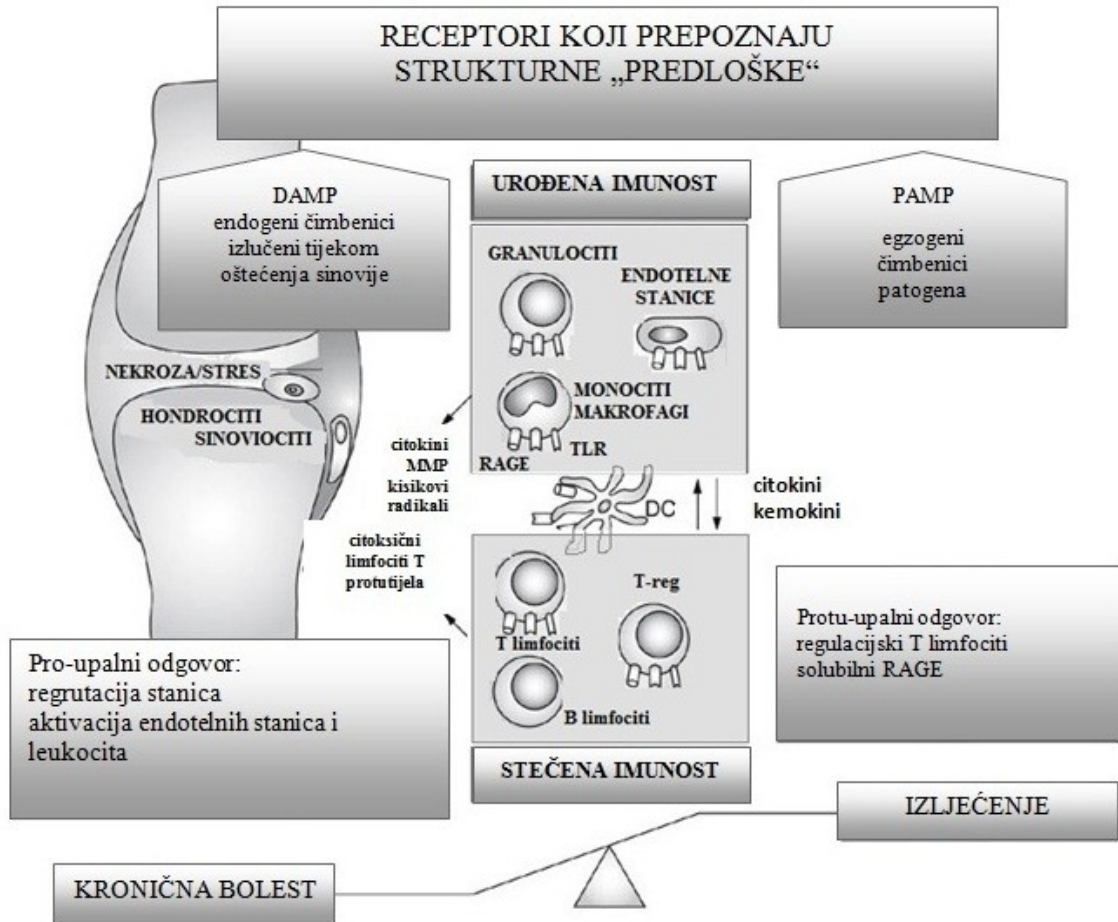
Imunološko prepoznavanje raznovrsnih patogena, aktiviranje izvršnih mehanizama njihovog uništavanja te zaštita od oštećenja vlastitih tkiva predstavljaju temeljne funkcije imunskog sustava. Otkrivanje ključnih načela aktiviranja prirodnog imunskog sustava tj. dokazivanje receptora za prepoznavanje strukturnih „predložaka“ (PRR, engl. *pattern recognition receptors*) izbrisalo je granicu između nespecifične i specifične imunosti i revolucionarno promijenilo postojeće razumijevanje imunskog sustava. Naime, receptorsko prepoznavanje molekularnih obrazaca povezanih s patogenima (PAMP, engl. *pathogen associated molecular patterns*) prethodi aktivaciji efektorskih mehanizama prirodne, a posredno i stečene imunosti. PAMP-ovi su molekule neophodne za preživljavanje patogena koje prepoznaju ograničeni broj receptora za prepoznavanje patogena (PRP, engl. *patogen-recognition receptors*) koji se mogu podijeliti u ekstracelularnu skupinu receptora poput Tollu-sličnih receptora (TLR, engl. *Toll-like receptors*) i intracelularne receptore u koje osim NOD-u sličnih receptora (NLR, engl. *Node like receptors*) uključujemo i receptore za inducirane gene putem retinoidne kiseline (RLR, engl. *Rig like receptors*) (1). Spomenute porodice receptora izražene su prvenstveno na površini i u citoplazmi stanica prirodne imunosti primjerice neutrofila, makrofaga i dendritičkih stanica. Interakcija receptora i ciljnih struktura aktivira imunosne stanice da stvaraju razne citokine i druge medijatore s ciljem uklanjanja patogena. Makrofagi i dendritičke stanice osim što su efektorske stanice prirodne imunosti predstavljaju i predočne stanice jer izražavaju molekule HLA i kostimulacijske molekule koje im omogućuju predočavanje vrlo specifičnih struktura

(antigena) mikroorganizama limfocitima T i B te aktivaciju efektorskih mehanizama stečene imunosti.

Rezultati istraživanja zadnjeg desetljeća sve više ukazuju da imunosni sustav može prepoznati ne samo egzogene čimbenike (PAMP) ili patogene nego i endogene signale opasnosti ili molekule koje se nazivaju alarmini ili molekule pridružene oštećenju (DAMP, engl. *damage-associated molecular patterns*) (2).

Provedena su brojna istraživanja o ulozi navedenih DAMP molekula u razvoju brojnih bolesti među kojima su i upalne reumatske bolesti, no tumačenje rezultata dobivenih istraživanjem seruma, sinovijalne tekućine ili sinovije u laboratorijskih životinja, kompromitirano je vjerodostojnošću ekstrapolacije rezultata na humanu populaciju. Osim toga, većina radova o ulozi alarmina u ljudi obuhvaća relativno mali broj ispitanika i odnosi se većinom na mjerenja koncentracije alarmina u odraslih dok su istraživanja na dječjoj populaciji vrlo rijetka. Postoji tek nekoliko radova u djece koja boluju od JIA čiji rezultati ukazuju da DAMP molekule ili alarmini imaju moguću ulogu u patogenezi te bolesti. Naime, godinama se smatralo da je poremećaj stečene imunosti ključan u patogenezi JIA i istraživanja su bila usmjerena na mrežu citokina koja je uključena u imunosni odgovor, no danas je poznato da je neravnoteža između protuupalnih i proupalnih citokina samo dio složenog imunosnog poremećaja i sve se više naglašava važnost prirodene imunosti.

Noviji radovi ukazuju na to da DAMP ili alarmini, kao medijatori prirodene imunosti (3), doprinose oštećenju sinovijalnog tkiva. Navedene molekule se oslobađaju kao odgovor na oštećenje stanica, infekciju ili upalu te aktiviraju imunosne stanice i vaskularni endotel putem receptora za prepoznavanje strukturnih „predložaka“ (TLR i RAGE) koji integriraju signale DAMP ili PAMP (Slika 1).



Slika 1. Mehanizmi kojima DAMP molekule doprinose oštećenju sinovijalnog tkiva. Kao odgovor na oštećenje stanica, infekciju ili upalu oslobođene DAMP molekule aktiviraju imunostne stanice i vaskularni endotel putem TLR i RAGE koji predstavljaju receptore za prepoznavanje strukturalnih „predložaka“ (PRR, engl. *-pattern recognition receptors*) i integriraju signale DAMP ili PAMP što može objasniti način na koji infekcija doprinosi egzacerbaciji artritisa. PRR su izraženi na fagocitima, antigen predočnim stanicama, T limfocitima, endotelnim stanicama, sinoviocitima, fibroblastima i hondrocitima. Upalnim procesom zahvaćena sinovija obiluje staničnim i proteinskim efektorima prirodnog imunostnog odgovora koji doprinose upali zgloba i destrukciji zglobnih struktura putem oslobađanja MMP-a, ROS ili citokina. Aktivacija PRR i specifična prezentacija antigena T i B limfocitima dovodi do otpuštanja citokina i proizvodnje autoreaktivnih protutijela. Citotoksični T limfociti također doprinose upali. Prirodna i stečena imunost povezani su s mrežom kemokina i citokina koji često djeluju paralelno. Prirodni imunostni mehanizmi mogu pojačavati i smanjivati upalu putem regulacijskih T limfocita. U reumatoidnom artritisu pozitivna povratna petlja koja uključuje DAMP potiče novačenje leukocita, dovodi do rasplamsavanja upale i uzrokuje kronicitet bolesti.

Kratice: DAMP, alarmini ili molekule pridružene oštećenju (engl. *damage-associated molecular patterns*); DC, dendritičke stanice (engl. *dendritic cells*); HSPs, toplinski šok proteini (engl. *heat shock proteins*); MMPs, matriks metaloproteinaze (engl. *matrix metalloproteinases*); PAMP, molekularni obrazac povezan s patogenima (engl. *pathogen associated molecular pattern*); PRR, receptor za prepoznavanje strukturalnih „predložaka“ (engl. *PRR -pattern recognition receptor*); ROS, reaktivni metaboliti kisika (engl. *reactive oxygen species*); TLRs, Toll-slični receptori (engl. *TLR - Toll-like receptors*); RAGE, receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (engl. *receptor for advanced glycation end products*) (prilagođeno prema referenci br. 3).

U skladu s navedenim, analiza alarmina, koji se smatraju medijatorima prirodene imunosti, mogla bi doprinijeti rasvjetljavanju imunskih karakteristika pojedinih tipova JIA što bi doprinjelo optimalnoj klasifikaciji te heterogene bolesti koja se tijekom godina već više puta mijenjala i dopunjavala. Nadalje, različite kliničke i laboratorijske značajke sistemskog JIA usporedno s oligo/poliartikularnim tipom JIA ukazuju na različitost imunskih poremećaja u razvoju bolesti tj. na različitost patogeneze pojedinih tipova JIA.

## **1.2 Juvenilni idiopatski artritis (JIA)**

Juvenilni idiopatski artritis (JIA) je skupina sličnih bolesti koja se javlja prije navršene 16. godine života, a karakterizirana je upalom jednog ili više zglobova u trajanju najmanje 6 tjedana. To je najčešća kronična upalna reumatska bolest u djece i znatno se razlikuje od reumatoidnog artritisa (RA) odraslih. Iako je točna učestalost bolesti nepoznata upravo iz razloga što JIA ne predstavlja jedan entitet, nego više bolesti, danas se smatra da incidencija iznosi 10 na 100 000, godišnje, pri čemu sistemski tip JIA čini 6-20 %. Bolest je dva puta češća u djevojčica, najčešće se javlja u predškolskoj dobi te između prve i treće godine života, a rijetko se javlja prije šestog mjeseca života (4, 5).

Američko reumatološko društvo (ACR, engl. *American College of Rheumatology*) i Europska liga za borbu protiv reumatizma (EULAR, engl. *European League Against Rheumatism*) sedamdesetih godina 20. stoljeća predložili su dvije različite klasifikacije za kronični artritis u dječjoj dobi neovisne o klasifikacijama koje se rabe za odrasle. Naziv „juvenilni reumatoidni artritis“ prihvatilo je godine 1972. ACR, a sama je klasifikacija još nadopunjavana godine 1976. Bolest je definirana upalom jednog ili više

zglobova koja traje najmanje 6 tjedana, a počinje prije navršene 16. godine. Postoje tri glavna tipa bolesti: sistemski, oligoartikularni (ili pauciartrikularni ili monoartikularni) i poliartikularni. Godine 1977. EULAR predlaže novi naziv „juvenilni kronični artritis“ koji se ponajprije rabi u Europi. Za postavljanje dijagnoze upala jednog ili više zglobova mora trajati najmanje 3 mjeseca, a bolest mora početi prije navršene 16. godine života. Klasifikacija EULAR u naziv juvenilni kronični artritis osim tri osnovna tipa artritisa, koji su prema ACR kriterijima definirani kao juvenilni reumatoidni artritis, uključuje još i juvenilni ankilozantni spondilitis te juvenilni psorijatični artritis. Naziv „juvenilni reumatoidni artritis“ odnosi se samo na IgM artritis s pozitivnim nalazom reumatoidnog faktora (RF). Zbog navedenih razlika između klasifikacije ACR i EULAR godine 1994. Međunarodna liga reumatoloških udruženja (ILAR, engl. *International League of Association for Rheumatology*) predlaže naziv „juvenilni idiopatski artritis“ koji obuhvaća sedam bolesti koje počinju prije navršene 16. godine, a upala zgloba traje najmanje 6 tjedana. Kriteriji su nadopunjavani godine 1997. kada je dodana i osma bolest „drugi artritisi“, a odnosi se na bolesnike koji se ne mogu uvrstiti niti u jednu kategoriju ili koji se mogu uvrstiti u više kategorija (6,7,8,9) (Tablica 1).



Tablica 1. Klasifikacije artritisa u dječjoj dobi

ACR	EULAR	ILAR
<b>Juvenilni reumatoidni artritis</b>	Juvenilni kronični artritis	Juvenilni idiopatski artritis
<b>Sistemski Poliartikularni</b>	Sistemski Poliartikularni Juvenilni reumatoidni artritis	Sistemski Poliartikularni tip RF-negativan Poliartikularni tip RF-pozitivan
<b>Oligoartikularni</b>	Oligoartikularni	Oligoartikularni tip Perzistirajući Prošireni
	Juvenilni psorijatični artritis Juvenilni ankilozantni spondilitis	Psorijatični artritis Entezitisu pridruženi artritis Drugi artritisi

ACR (engl. American College of Rheumatology): Američko reumatološko društvo, EULAR (engl. European League Against Rheumatism): Europska liga za borbu protiv reumatizma, ILAR (engl. International League of Associations for Rheumatology): Međunarodna liga reumatoloških udruženja, RF: reumatoidni faktor (prilagođeno prema referenci br. 10).

### 1.2.1. Kliničke i laboratorijske značajke oligo/poliartikularnog i sistemskog tipa JIA

Pojedini tipovi JIA razlikuju se prema broju upalom zahvaćenih zglobova u prvih 6 mjeseci bolesti te prema prisutnosti izvanzglobnih očitovanja bolesti. Tri najčešća tipa JIA su oligoartikularni, poliartikularni tip i sistemski JIA (Tablica 2.)

Tablica 2. Obilježja bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom ovisno o tipu bolesti

	<b>POLIARTIKULARNI TIP</b>	<b>OLIGOARTIKULARNI TIP</b>	<b>SISTEMSKI TIP</b>
<b>Učestalost</b>	20-30%	50-60%	10%
<b>Broj zahvaćenih zglobova</b>	>5	1-4	varijabilan
<b>Dob pri postavljanju dijagnoze</b>	najčešće predškolska i školska dob	vrlo rano u djetinjstvu između 1-3 god	tijekom cijelog djetinjstva
<b>Spol (Ž:M)</b>	3:1	5:1	1:1
<b>Izvanzglobni simptomi</b>	rijetko	nisu prisutni	glavni simptomi bolesti (vrućica, osip, organomegalija, poliserozitis, limfadenopatija)
<b>Pojava kroničnog uveitisa</b>	5%	20%	rijetko
<b>RF +</b>	10% (povećava se s godinama)	negativan	rijetko
<b>ANA +</b>	40-50%	75-85%*	10%

\* češći u djevojčica s uveitisom ANA: antinuklearna protutijela, RF: reumatoidni faktor (prilagođeno prema referenci br. 10)

### 1.2.1.1. Oligoartikularni tip JIA

U oligoartikularnom tipu JIA tijekom prvih šest mjeseci bolesti upalom je zahvaćeno do 4 zglobova. Razlikuju se dvije podskupine: perzistirajući oligoartikularni tip, u kojeg u daljnjem tijeku bolest ostaje ograničena na četiri zglobova (u 90-95% bolesnika) i prošireni oligoartikularni tip, gdje je nakon 6 mjeseci bolesti zahvaćeno pet ili više zglobova (u 5-10% bolesnika). Oligoartikularni tip javlja se vrlo rano, između prve i treće godine života. Najčešće se očituje nesimetričnom upalom velikih zglobova osobito donjih ekstremiteta, pri čemu su obično zahvaćeni koljeno, gležanj ili lakat. U više od polovice djece zahvaćen je samo jedan zglob i to najčešće koljeno. U približno 60 do 80 % djece pozitivna su antinuklearna protutijela (ANA), a oko 20 do 30% bolesnika oboli od kroničnog iridociklitisa kao ekstraartikularne manifestacije bolesti (10).

### **1.2.1.2. Poliartikularni tip JIA**

U poliartikularnom tipu JIA upalom je zahvaćeno 5 ili više zglobova tijekom prvih šest mjeseci bolesti. Približno 20-30% bolesnika s JIA ima poliartikularni tip bolesti. Razlikuju se dva osnovna podtipa: poliartikularni tip s negativnim nalazom reumatoidnog faktora (RF) i poliartikularni tip s pozitivnim nalazom RF, u najmanje dva uzorka seruma uzeta unutar posljednja tri mjeseca trajanja bolesti. Poliartikularni tip s negativnim nalazom RF javlja se najčešće u predškolskoj i školskoj dobi, češće u djevojčica. Klinički se očituje simetričnom upalom velikih zglobova posebice koljena, gležnjeva, laktova i ručnih zglobova. U približno 40% slučajeva prisutna su antinuklearna protutijela (ANA), kronični iridociklitis se javlja u 5-10 % oboljelih, dok su atrofija mišića i kontrakture zahvaćenog zgloba katkada prisutni već pri postavljanju dijagnoze. Karakteristična je i jutarnja ukočenost i slabost mišića koji se tijekom dana mogu smanjiti. Bez liječenja bolest ima progresivan tijek. Poliartikularni tip s pozitivnim nalazom RF javlja se ponajprije u djevojčica i to obično u kasnom djetinjstvu ili adolescenciji. Bolest ima klinička obilježja vrlo slična RF pozitivnom reumatoidnom artritisu odraslih. Tipična je pojava simetričnog poliartritisa s erozivnim sinovitisom koji zahvaća male zglobove šaka i stopala. Veliki zglobovi (uglavnom koljena, gležnjevi, kukovi) također mogu biti zahvaćeni prilikom nastupa bolesti, međutim tada su obično zahvaćeni zajedno s malim zglobovima. Zahvaćenost zgloba kuka javlja se približno u 50% djece. Nerijetko uzrokuje destrukciju ili poremećeni razvoj glave femura i acetabuluma što je glavni uzrok teže ometanosti u bolesnika s JIA. U početku bolesti ili tijekom egzacerbacija mogu biti prisutni i izvanzglobni simptomi kao što su umjereno povišena tjelesna temperatura, hepatosplenomegalija i limfadenopatija. Ovaj tip bolesti je rjeđi od prethodnog, obično je teži i češće je uzrok težoj ometanosti zbog trajnog oštećenja zglobova (10).

### **1.2.1.3. Sistemska tip JIA**

Sistemska tip juvenilnog idiopatskog artritisa javlja se podjednako u djevojčica i dječaka, najčešće između druge i šeste godine života. Od ovog tipa JIA boluje približno 10 na 100 000 djece. Definiran je artritisom koji je udružen ili kojemu prethodi intermitentna vrućica u trajanju od najmanje 2 tjedna te barem jedan od sljedećih simptoma sistemske upale: mrljasti ili makulopapulozni osip, splenomegalija ili hepatomegalija, generalizirana limfadenopatija ili serozitis (pleuritis, perikarditis, peritonitis). Simptomi se intenziviraju s porastom vrućice i nerijetko su toliko izraženi na samom početku bolesti da prikriju simptome artritisa. Približno 10% bolesnika se inicijalno prezentira samo sa sustavnim simptomima, a artritis razvija tek naknadno s intervalom razmaka koji može trajati nekoliko tjedana, mjeseci pa čak i godina. Nadalje, navedeni klinički znaci sistemske JIA udruženi su s promjenama laboratorijskih pokazatelja kao što je granulocitoza, trombocitoza i povišeni reaktanti akutne faze u perifernoj krvi (10).

### 1.3 Patogeneza JIA

Opisane, jasno različite kliničke i laboratorijske značajke oligo/poliartikularnog JIA usporedno sa sistemskim JIA ukazuju na različitost imunskih poremećaja u razvoju bolesti tj. različitost patogeneze pojedinih tipova JIA (11). U skladu s navedenim, danas je sve veći broj dokaza o razlikama u patogenezi oligo/poliartikularnog tipa JIA usporedno sa sistemskim tipom JIA (Tablica 3.)

Tablica 3. Usporedba patogeneze oligo/poliartikularnog i sistemskog JIA

	Oligo/poliartikularni JIA	Sistemski JIA
Autoimunost	Stečena	Prirodna
Patogene stanice	Tlimfociti	Fagociti (monociti, makrofazi, neutrofilii)
Mehanizam	Neravnoteža između autoreaktivnih Th1/Th2 i regulacijskih limfocita Poremećaj tolerancije Tlimfocita na vlastite antigene	Gubitak kontrole alternativnog puta sekrecije Neprimjerena aktivacija fagocita Autoinflamatorna bolest
Medijatori	↑Proupalni citokini IFN- $\gamma$ , IL-17 ↓Protuupalni citokin IL-10	↑ Proupalni citokini IL-1, IL-6, IL-18, prouplni S100 proteini

### 1.3.1. Patogeneza oligoartikularnog/poliartikularnog tipa JIA

Oligoartikularni i poliartikularni tip JIA smatraju se antigenima uzrokovanim, limfocitima posredovanim autoimunim bolestima s poremećajem stečenog imunskog sustava. Naime, smatra se da autoantigeni zglobne hrskavice kao što je agrekan, fibrilin ili matriks-metaloproteinaza 3 (MMP3) aktiviraju autoreaktivne T limfocite uključujući Th1 i Th17 limfocite koji produciraju proupalne citokine IFN- $\gamma$  i IL-17. Smatra se da agrekan kao jedan od glavnih komponenti izvanstaničnog matriksa, čiji se razgradni produkti mogu detektirati u sinovijalnoj tekućini, može biti meta primarne autoreaktivnosti (12). Fibrilin, također predstavlja dio izvanstaničnog matriksa i može se detektirati u sinovijalnoj membrani zdravih i bolesnih zglobova. Matriks-metaloproteinaze su ključni enzimi uključeni u remodeliranje ekstracelularnog matriksa u fiziološkim i patološkim stanjima koji mogu regulirati različita upalna stanja i procese cijeljenja (13). Izraženi su u sinovijalnom tkivu JIA i njihov izražaj korelira sa stupnjem upale (14). U oligo/poliartikularnom JIA navedeni autoantigeni aktiviraju autoreaktivne CD4<sup>+</sup>T limfocite (Th1 i Th17) uzrokujući T limfocitnu proliferaciju i produkciju proupalnih citokina (IFN- $\gamma$  i IL-17) (15). S druge strane, inhibicija regulacijskih T limfocita (Treg) uključujući Foxp3<sup>+</sup> T regulacijske limfocite i proteinima toplinskog šoka inducirane T regulacijske limfocite sa smanjenjem protuupalnog citokina IL-10 rezultira gubitkom imune tolerancije (16,17). Neravnoteža između autoraktivnih Th1/Th17 i regulacijskih T limfocita dovodi do poremećaja tolerancije T limfocita na vlastite antigene što doprinosi upali sinovije u oligo/poliartikularnom JIA. Prema rezultatima novijih studija regulacijski T limfociti kontroliranjem imunskog odgovora na vlastite i strane antigene imaju ključnu ulogu u regulaciji autoimunosti. Regulacijski

T limfociti čine samo mali dio, približno 6-15% ukupnog broja CD4+ T limfocita (18). To su CD4+ limfociti koji na površini imaju receptor za IL-2 (IL-2R) alfa-lanac (CD 25), a za njihov razvoj i djelovanje neophodan je transkripcijski čimbenik Foxp3. Razina regulacijskih T limfocita je smanjena u bolesnika s težim tipovima JIA (prošireni oligoartikularni tip u odnosu na perzistirajući), a poremećena je i njihova funkcija jer značajno slabije suprimiraju proliferaciju ostalih T limfocita u odnosu na zdrave ispitanike (19,20,21). Smatra se da lokalna imunosupresija putem regulacijskih T limfocita utječe na aktivnost bolesti i njezinu daljnju progresiju. Povećanjem broja regulacijskih T limfocita u upalom zahvaćenim zglobovima imunski sustav pokušava regulirati autoimunosnu reakciju i upalu u ciljanim organima.

U patogenezi oligoartikularnog i poliartikularnog tipa JIA važnu ulogu ima genetska predispozicija bolesnika. Heterogena ekspresija bolesti i rezultati prvog skeniranja genoma djece s JIA idu u prilog teoriji da više različitih gena i njima pridruženih genetskih polimorfizama, uključujući barem jedan u HLA regiji, znatno povećavaju predispoziciju za bolest. U klasi II HLA sustava DR8, DR5, DR6, DPB1\*0201 i određeni DQ aleli češći su u djece s oligoartritisom, dok se prisutnost Dw4, DR1 i DR4 dovodi u vezu s povećanim rizikom nastanka poliartritisa. Uočena je i povezanost seropozitivnog poliartritisa s DR4. Danas su osim antigena HLA, utvrđeni i drugi geni u području i izvan područja HLA regije koji su uključeni u patogenezu JIA (22,23,24).

Hipoteza o traumi, stresu, određenim imunodeficijentnim stanjima, virusnim ili bakterijskim infektivnim agensima (citomegalovirus, rubelavirus, Parvo B19, Epstein-Barrov virus, crijevne bakterije) kao mogućim pokretačima kroničnog artritisa u genetski osjetljivog pojedinca vrlo je atraktivna, međutim još uvijek nije dokazana (25-28).

### 1.3.2. Patogeneza sistemskog JIA

Tijekom posljednjih desetljeća sistemski JIA (sJIA) se zajedno s ostalim tipovima JIA ubraja u veliku skupinu autoimunih bolesti iako do danas nisu identificirani niti specifični antigeni, niti autoantitijela ove bolesti. Noviji podaci o patogenezi sJIA naglašavaju važnost neprimjerene kontrole prirođenog imunskog sustava kao važnog mehanizma bolesti i time potvrđuju da je sJIA više autoinflamatorna nego autoimunosna bolest (29). U skladu s navedenim karakteristike kliničke slike sistemskog JIA ukazuju na dominantnu ulogu aktivacije prirođenog imunskog sustava. Većina sistemskih i lokalnih obilježja sJIA kao i sekundarnih komplikacija stalno aktivne upalne bolesti može se objasniti aktivacijom mreže citokina otpuštenih iz aktiviranih fagocita i endotelnih stanica. U usporedbi s oligo/poliartikularnim tipovima JIA u kojima čimbenik tumorske nekroze (TNF, engl. *tumor necrosis factor*) igra središnju ulogu te se specifična blokada ovog proupalnog citokina pokazala učinkovitom u njihovu liječenju, noviji podaci ukazuju na istaknutu ulogu IL-1 u bolesnika sa sJIA te na ograničeni odgovor ovog tipa JIA na anti-TNF terapiju (30,31). Tako, IL-1 kojeg aktivno luči nekoliko tipova upalnih stanica uključujući monocite i makrofage djeluje na koštano srž i stimulira granulocitopoezu rezultirajući neutrofilijom u perifernoj krvi. Nadalje, IL-1 receptori u mozgu aktiviraju termoregulaciju u hipotalamusu i dovode do vrućice. IL-1 $\beta$  također aktivira IL-1 receptore na endotelnim stanicama koje mogu uzrokovati kožni osip u sJIA i rezultirati proizvodnjom IL-6 (30,32). IL-6, s druge strane stimulira stanice jetre i potiče proizvodnju više proteina akutne faze kao što su C-reaktivni protein i serumski amiloid A. Serumske razine IL-6 značajno su povišene u bolesnika sa sJIA i koreliraju sa sistemskim obilježjima te bolesti posebice s periodima vrućice i brojem trombocita kao



i s težinom zahvaćenosti zglobova (33). U sinovijalnoj tekućini bolesnika sa sJIA, koncentracije IL-6 su značajno veće nego u drugim tipovima JIA (34). Zaustavljen rast, povećana osteoklastogeneza i smanjena aktivnost osteoblasta može biti izazvana kronično pojačanom ekspresijom IL-6 što je prikazano na IL-6 transgeničnim miševima koji su pokazali skeletne promjene slične bolesnicima sa sJIA (35).

Navedena zapažanja su potvrđena nedavnim iskustvima u liječenju bolesnika s kronično aktivnim sJIA. Liječenje s antagonistom IL-1 receptora smanjuje kliničke i laboratorijske značajke aktivnosti bolesti u bolesnika sa sJIA koji nisu reagirali na konvencionalno liječenje uključujući i blokatore TNF (31). Također, klinička iskustva s liječenjem antitijelima na IL-6 receptor pokazala su učinkovitost u kontroliranju aktivnosti bolesti u sJIA (36).

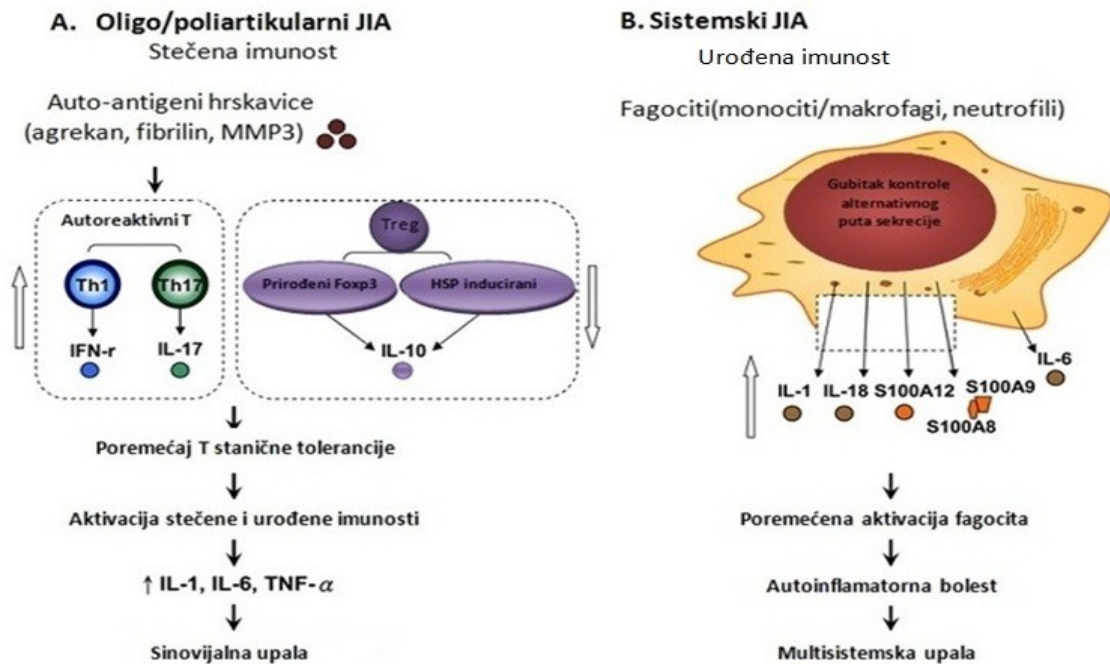
Dominantna uloga prirođenog imunskog sustava u sJIA je, nadalje, naglašena visokim izražajem i serumskom koncentracijom kalcij vezujućih proteina S100A8, S100A9 koji se luče tijekom aktivacije neutrofilnih granulocita i monocita. Visoke serumske koncentracije navedenih alarmina u sJIA su usko povezane s aktivnošću bolesti (37-39). S100A12 čini se da je član novog upalnog signalnog puta koji inducira ekspresiju adhezijskih molekula, kao i proupalnih citokina na endotelnim stanicama.

Osim toga, IL-18 pokazuje visoku koncentraciju u sJIA te visoku specifičnost za taj tip JIA u odnosu na druge tipove JIA (40,41).

Nadalje, sve gore navedene molekule (IL-1, S100A8/S100A9, IL-18) izlučuju se tzv. alternativnim putem, koji se razlikuje od klasičnog unutarstaničnog transportnog mehanizma kojeg koriste drugi citokini (putem endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog kompleksa). Ovaj put uključuje aktivaciju nukleotidnog receptora P2X7 i isticanje kalija iz stanica što rezultira prilivom iona kalcija, aktivacijom fosfolipaza te lizosomskom egzocitozom. Aktivacija IL-1 i IL-18 započinje proteolitičkim cijepanjem

neaktivnih pro-citokina multiproteinskim kompleksom zvanim inflamatom. Nekontrolirano aktiviranje inflamatom i cijepanje pro-IL-1 kaspazom-1 pokazalo se važnim molekularnim mehanizmom u različitim nasljednim autoimunim sindromima što rezultira spontanim nastupima vrućice (42, 43). Za razliku od IL-1 i IL-18, S100-proteini nisu pod utjecajem kaspaza-1 prije otpuštanja (44). Dakle, gubitak kontrole alternativnog puta izlučivanja nizvodno od kaspaza 1 čini se da je uključeno u otpuštanje pro-upalnih proteina dovodeći do upalnog procesa sJIA (Slika 2). U skladu s navedenim, patogeneza sJIA pokazuje više sličnosti s autoinflamatornim bolestima nego s klasičnim antigen vođenim autoimunim bolestima.

Nadalje, s razvojem sJIA povezuje se polimorfizam nukleotida u regulacijskom području gena IL-6 na položaju -174, a polimorfizam nukleotida na položaju -173 unutar promotorskog područja MIP gena dodatno povisuje razinu makrofagnog inflamatornog proteina u sinovijalnoj tekućini te pogoršava tijek i dugoročni funkcionalni ishod bolesti (45-48).



Slika 2. Različita patogeneza oligo/poliartikularnog JIA i sistemskog JIA. Oligoartikularni i poliartikularni tip JIA su antigenom vođene, limfocitima posredovane autoimune bolesti karakterizirane poremećajem stečenog imunskog sustava. Auto-antigeni hrskavice (agrekani, fibrilin, MMP3) aktiviraju autoreaktivne T limfocite uključujući Th1 i Th17 limfocite koji dovode do produkcije proupalnih citokina INF- $\gamma$  i IL-17. S druge strane, inhibicija T regulatornih limfocita (Treg) uključujući Foxp3+ Treg i proteinima toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock protein*) inducirane Treg limfocite sa smanjenjem produkcije protuupalnog citokina IL-10 rezultira gubitkom imune tolerancije. Neravnoteža između autoreaktivnih Th1/Th17 i regulacijskih T limfocita dovodi do poremećaja tolerancije T limfocita na vlastite antigene što doprinosi sinovijalnoj upali oligo/poliartikularnog JIA. Nasuprot tome, sistemski JIA je autoinflamatorna bolest s poremećajem urođenog imunskog sustava. Gubitak kontrole alternativnog puta sekrecije dovodi do poremećaja aktivacije fagocita uključujući monocite, makrofage i neutrofile koji su uključeni u otpuštanje proupalnih citokina IL-1, IL-6, IL18 i proupalnih S100 proteina /alarmina što doprinosi multisistemskoj upali sistemskog JIA (prilagođeno prema referenci br. 11).

Godinama se smatralo da je poremećaj stečene imunosti ključan u patogenezi JIA i istraživanja su bila usmjerena na mrežu citokina uključenu u imunski odgovor (50-56). Međutim, rezultati novijih istraživanja sve više ukazuju da poremećaj prirodne imunosti igra važnu ulogu u patogenezi JIA te da aktivacija stanica prirodne imunosti uvelike ovisi o skupini molekula koja se naziva alarmini ili molekule pridružene oštećenju (*DAMP*, engl. *damage-associated molecular patterns*) (2).

## 1.4. Alarmini

Alarmini su skupina strukturno različitih, multifunkcionalnih, endogenih molekula koji se pasivno otpuštaju iz nekrotičnih stanica nakon infekcije ili oštećenja tkiva ili ih rapidno izlučuju stimulirani leukociti i epitelne stanice. Ukoliko nema oštećenja tkiva ili infekcije alarmini imaju brojne uloge unutar stanice (Tablica 4). Međutim, nakon što su jednom otpušteni u međustanični prostor alarmini djeluju kao citokini i aktiviraju stanice prirodene imunosti te regrutiraju antigen-prezentirajuće stanice putem prepoznavanja receptora za molekularne obrasce primjerice receptora sličnih Toll-u (*TLR, engl. Toll-like receptors*) (1). Ključna sposobnost alarmina je da pojačavanjem prirodnog imunskog odgovora, kroz utjecaj na antigen prezentirajuće stanice, posredno djeluju na stečenu imunost te povezuju prirodni i stečeni krak imunskog odgovora (57). Alarmini su moćni medijatori upale koja čini vitalni dio prirodene obrane domaćina. Upala se događa kao odgovor na infekciju ili neinfektivno oštećenje stanice i uključuje regrutaciju fagocita koji uklanjaju stanični debris i mikroorganizme nakon čega slijedi cijeljenje s regrutacijom drugih tipova stanica, uključujući endotelne stanice, da bi se ponovno uspostavila tkivna homeostaza.

U alarminsku obitelj se ubrajaju brojni članovi uključujući: protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. *high mobility group box 1 protein*), proteine iz skupine S100 koji vežu kalcij (npr. S100A8, S100A9 i S100A12, engl. *calcium-binding proteins*), proteine toplinskog šoka (HSPs, engl. *heat-shock proteins*), neke citokine primjerice IL1- $\alpha$  i IL-33, fibrile amiloida- $\beta$ , hijaluronske fragmente (58).

Tablica 4. Fiziološke i patološke uloge alarmina

Alarmin	Podrijetlo	Unutar-stanična fiziološka uloga	Izvanstanični učinci	Načini oslobađanja	Receptori	Uključene bolesti	Regenerativni potencijal
HMGB1	Sve vrste stanica, uključujući imunostne stanice (ne histonski nuklearni protein)	Regulacija transkripcije DNA	Proupalnih odgovor (kada se veže za druge DAMPs npr. LPS IL- $\beta$ 1, DNA, RNA): kemotaksija, proliferacija i diferencijacija imunostnih i predočnih stanica	(a) Pasivno otpuštanje iz nekrotičnih stanica (b) Tijekom apoptoze, HMGB1 je oksidiran na Cys106, čineći ga tolerogenim više nego proupalnim (c) Aktivno izlučivanje alternativnim putem (ne preko Golgijevog aparata): HMGB1 prolazi kroz nekoliko oblika post-translacijske modifikacije, npr. acetilaciju, fosforilaciju, metilaciju	TLR2, TLR4, RAGE	Akutna trauma i slična stanja: sepsa: ishemijsko oštećenje mozga: / ishemijsko reperfuzijsko oštećenje srca: transplantacija organa  Kronična stanja: artritis, SLE, MS, T1DM, epilepsija, karcinom	Srčana regeneracija, revaskularizacija, cijeljenje rana kože, kosti, mišića, regeneracija živaca
S100A8 / S100A9 S100A12 (nalaze se samo u ljudi, odsutni su u miša)	Epitelne stanice i fagociti	Regulacija kalcija, pokretljivosti stanice	Proupalni odgovor: prijanjanje, migracija, otpuštanje neutrofila iz koštane srži, otpuštanje citokina iz monocita, endotelnih stanica: antibakterijska i antiparazitska aktivnost	(a) Aktivna sekrecija iz epitelih stanica i stanica prirodne imunosti preko alternativnog puta (tj. ne preko klasičnog Golgijevog aparata): (b) Pasivno otpuštanje iz nekrotičnih ili oštećenih stanica	S100A8/A9: TLR4, RAGE S100A12: RAGE	Akutna stanja: sepsa, akutne plućne bolesti, astma  Kronična stanja: artritis, giht, vaskularna upala, gigantocelularnog arteritis, ateroskleroza, bolesti pluća, upalne bolesti mišića, zacjeljivanje kožnih rana  Karcinom	Zacjeljivanje rana kože: regeneracija jetre, mišićno-koštanog sustava
S100B (S71)	Astrociti, oligodendrocit i Shwannove stanice	Regulacija stanične proliferacije i diferencijacije, homeostaze kalcija, enzimске aktivnosti	Proliferacija, diferencijacija	(a) aktivno izlučivanje iz astrocita putem aktivacije mGluR3: (b) aktivno izlučivanje iz Schwannovih stanica putem RAGE aktivacije: (c) Pasivna oslobađanje iz oštećenih stanica npr. u akutnom oštećenju mozga	RAGE	Neuronska smrt, biomarker za traumatsko i ishemijsko oštećenje mozga, neurodegeneracija, shizofrenia	Živčana regeneracija
HSP60 i HSP70	Sve vrste stanica	Molekularni pratioci u slaganju proteinskih struktura i polipeptidnih lanaca	Poticanje imunoregulacijskih putova za suzbijanje upale: također mogu vezati i druge ligande, npr. LPS i regulirati oslobađanje proupalnih citokina	Pasivno otpuštanje iz nekrotičnih stanica	TLR2, TLR4, SPA1	Sepsa	Imunizacija s HSP potiče regulacijske T limfocite u autoimunim bolestima (npr. RA, T1DM) i u transplantaciji tkiva suzbijajući bolest i transplantacijsko odbacivanje
$\beta$ -defensini	Keratinociti i epitelne stanice	N / A	Izravna antimikrobna aktivnost, pojačavanje stečenog imuniteta	Aktivno izlučivanje	GPCRs npr. CCR6	Respiratorne: cistična fibroza, ARDS, infekcije Probavne: IBD	Izravna antimikrobna aktivnost formiranjem pora u stanici mikroorganizma
Katelicidin hCAP18/LL-37	Kao što je gore navedeno + neutrofili, mastociti, monociti / makrofazi	N / A	Izravna antimikrobna aktivnost, pojačavanje stečenog imuniteta	Aktivno izlučivanje ili degranulacija	FPRL1	Respiratorne: cistična fibroza, ARDS, infekcije Probavne: IBD	Izravna antimikrobna aktivnost formiranjem pora u stanici mikroorganizma

FPRL1, formyl peptide receptor – like 1; GPCR, G protein-coupled receptor; IBD, inflammatory bowel disease; mGluR3, metabotropic glutamate receptor 3; T1DM, type 1 diabetes (prilagođeno prema referenci br. 58).

Zajedničke karakteristike alarmina jesu:

- 1) tijekom ozljede tkiva ili infekcije oni se naglo otpuštaju u međustanični prostor iz citoplazme (npr. S100A12) ili jezgre (npr. HMGB1) stanica koje odumiru
- 2) alarmine mogu oslobađati i žive stanice imunskog sustava koristeći posebni sekretorni sustav ili preko endoplazmatskog retikuluma (ER) - Golgijev put sekrecije;
- 2) alarmini aktiviraju stanice prirođene imunosti: neutrofile, makrofage, dendritičke stanice, ali također posredno ili neposredno aktiviraju i stečeni imunski odgovor;
- 3) alarmini sudjeluju u obnavljanju homeostaze tkiva nakon direktne ozljede ili sekundarnih učinaka upalnog procesa na tkivo (59).

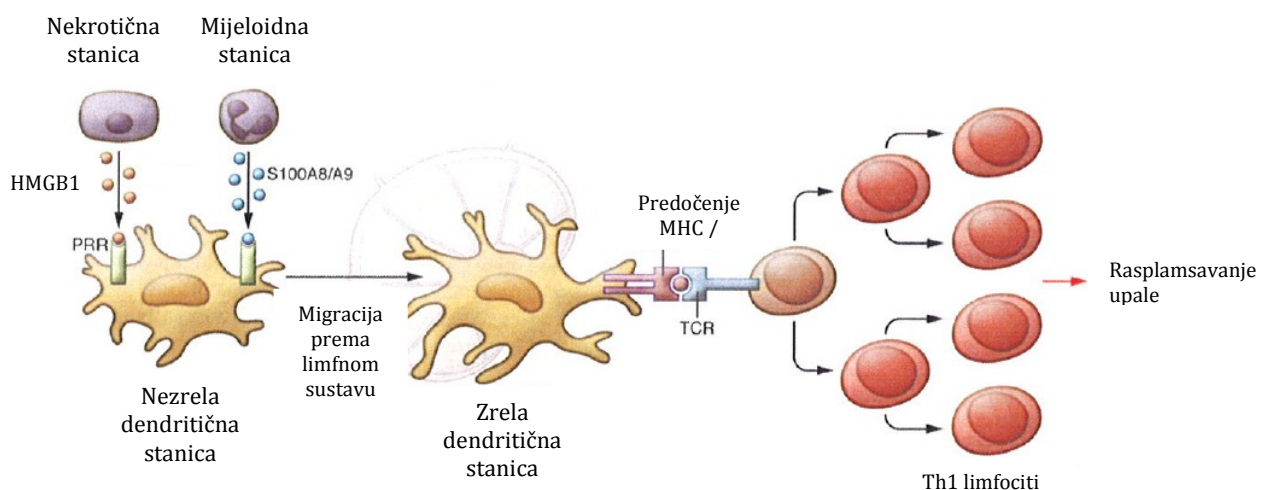
Smatra se da alarmini sudjeluju u imunopatogenezi brojnih upalnih reumatskih bolesti te su opisane povišene razine alarmina u serumu, sinovijalnoj tekućini ili sinoviji u reumatoidnom artritisu (60), sistemskom eritemskom lupusu (61-64), Kawasakijevom vaskulitisu (65), dermatomiozitisu (66) i Sjogrenovom sindromu (67), a također i u sepsi (68), aterosklerozi (69) te u psorijazi (70).

Alarmini svoje učinke ostvaraju preko receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE, engl. *receptor for advanced glycation end products*) te preko receptora sličnih Toll-u (TLR, engl. *Toll-like receptors*) uključujući TLR2, TLR4 i TLR9 (71).

## 1.4.1. Uloge alarmina u upalnim reumtskim bolestima

### 1.4.1.1. Uloga alarmina u rasvjetljavanju patogeneze autoimunih i kroničnih upalnih bolesti

Općenito je prihvaćena uloga alarmina u pojačavanju i održavanju upalnog procesa. Alarmini regrutiraju nezrele dendritične stanice koje prenose antigene do sekundarnih limfnih organa gdje ih prezentiraju naivnim T limfocitima i induciraju stečeni imunوسي odgovor (72-74). Kontinuirano oslobađanje alarmina uzrokuje izražavanje MHC molekula, prezentaciju antigena i nekontroliranu proliferaciju T limfocita što dovodi do rasplamsavanja upale (Slika 3).



Slika 3. Reguliranjem stečenog imunskog odgovora alarmini potiču kroničnu upalu i automunost. Alarmini regrutiraju nezrele dendritične stanice i potiču njihovo funkcionalno sazrijevanje, potičući ih da prihvate antigene i dopreme ih u sekundarne limfne organe gdje će prezentirati antigenske epitope naivnim T limfocitima i poticati njihovu Th1 polarizaciju te izazvati stečeni imunوسي odgovor. Perzistentno oslobađanje alarmina regulira izražavanje MHC molekule tipa 1 i 2 te prezentaciju antigena, kao i nekontroliranu proliferaciju T limfocita dovodeći do rasplamsavanja upale. Kratice: HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1-protein); S100A8/9= proteini koji vežu kalcij S100A8/9 (S100A8/ S100A9, engl. calcium-binding proteins); MHC=glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (MHC, engl. major histocompatibility complex); TCR=receptor T limfocita (TCR, engl. T-Cell Receptor) (prilagođeno prema referenci br. 58).

Dokazan je pojačan izražaj alarmina S100A8, S100A9 na fagocitima upalom zahvaćenih zglobova (75,29,37,60). Alarmini aktiviraju endotelne stanice, regrutiraju i stimuliraju makrofage da produciraju proupalne citokine, primjerice TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , dovodeći do razaranja tkiva (37,76,77).

#### **1.4.1.2. Uloga alarmina kao pokazatelja aktivnosti i težine autoimunih i kroničnih upalnih bolesti**

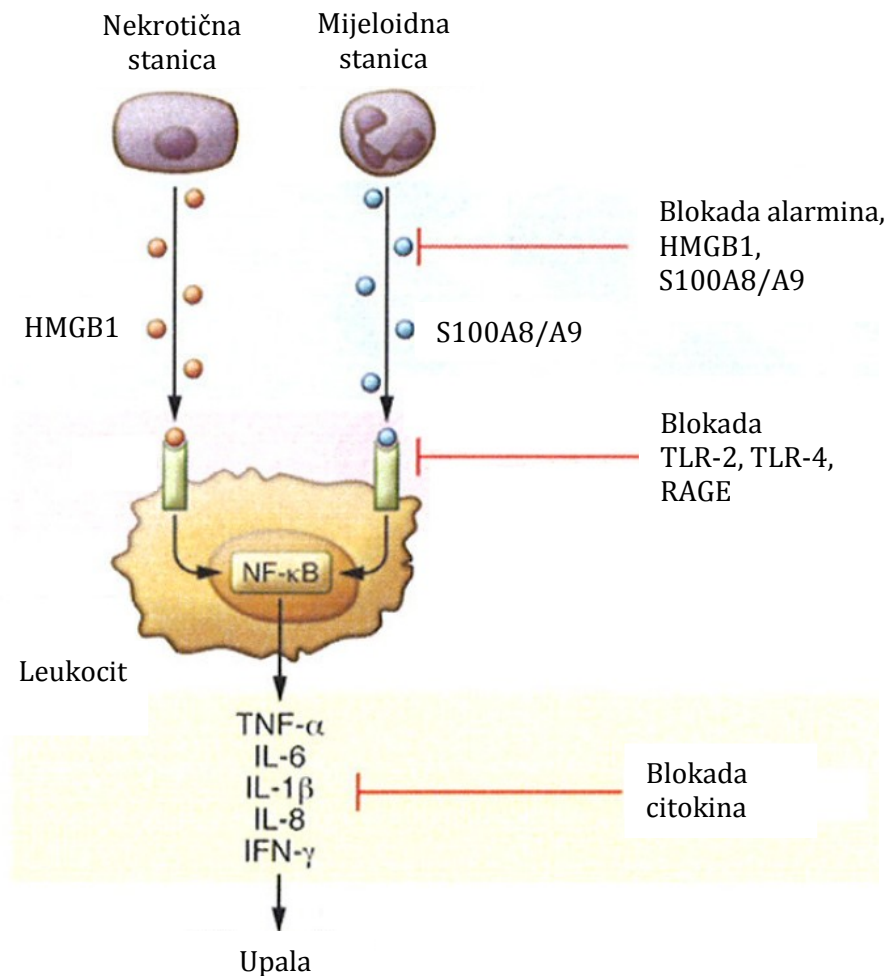
Koncentracija S100 proteina korelira s aktivnošću bolesti u velikom broju upalnih stanja, slično laboratorijskim pokazateljima upale CRP i sedimentacije (SE) (78-80) (Tablica 2). U različitim upalnim artritima pokazalo se da serumske koncentracije alarmina S100A8/S100A9 bolje koreliraju s aktivnošću bolesti i destrukcijom zgloba nego klasični pokazatelji upale, vjerojatno zbog njihovog lokalnog izražavanja i otpuštanja u izravnom odgovoru na oštećenje tkiva (81-83). Osim toga, serumski S100A8/S100A9 proteini mogu precizno prikazati težinu bolesti i odgovora na liječenje (84) te predvidjeti recidiv bolesti, kliničku i radiološku progresiju (85,86) kao što je razvoj erozivne bolesti (87) i progresija oštećenja zglobova (88).

#### **1.4.1.3. Uloga alarmina u liječenju autoimunih i kroničnih upalnih bolesti**

Neregulirana upala je osnova patofizioloških procesa mnogih bolesti. Identifikacija proupalnih citokina posebice TNF- $\alpha$  kao terapijskog cilja 1990-ih godina dovela je do impresivnog napretka u liječenju bolesnika oboljelih od RA (89). Nažalost, blokada citokina se nije pokazala učinkovitom u svih bolesnika (90), primjerice, nije dala očekivane rezultate u liječenju bolesnika s akutnim upalnim bolestima kao što su



traumom induciran sindrom sistemskog upalnog odgovora (SIRS, engl. *systemic inflammatory response syndrome*) ili sepsa (91). Nedavna identifikacija alarmina kao ključnih posrednika upalnih procesa u tim poremećajima i spoznaja da je njihovo oslobađanje popraćeno regulacijom receptora sugerira alarminski signalni put kao alternativni cilj liječenja (Slika 4).



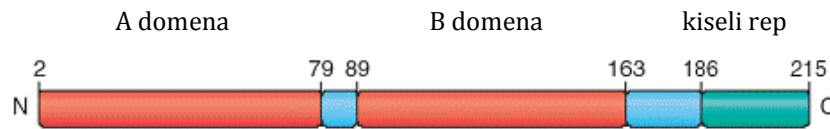
Slika 4. Alarminski put kao potencijalna terapijska meta u upalnoj kaskadi prirodene imunosti. Uzvodni alarminski signalizacijski putevi su potencijalni terapijski ciljevi imunomodulacije u akutnim i kroničnim upalnim bolestima. U životinjskim modelima alarmini su izravno ciljani protutijelima ili kompetitivnim inhibitorima npr., domena A (HMGB1) ili su ciljani receptori koji prepoznaju molekularne obrasce (PRR, engl. *pattern recognition receptors*) s antitijelima ili topljivim "decoy" receptorima. Kratice: HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1-protein); S100A8/9= proteini koji vežu kalcij S100A8/9 (S100A8/ S100A9, engl. calcium-binding proteins); TCR=receptor T limfocita (TCR, engl. T-Cell Receptor); TLR=Tollu-sličan receptor (TLR, engl. Toll-like receptors); RAGE=receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE, engl. receptor for advanced glycation end products); TNF=čimbenik nekroze tumora (TNF, engl. tumor necrosis factor); INF-γ=interferon-γ (prilagođeno prema referenci br. 58).

Kao što je gore navedeno, nizvodna citokinska blokada uključujući TNF- $\alpha$  klinički je korisna u liječenju kroničnih upalnih bolesti (primjerice RA) i upalnih bolesti crijeva, ali nije učinkovita u svih bolesnika. Stoga, strategije koje su usmjerene na proupalna svojstva S100 proteina mogu pružiti novi pristup za imunoterapiju uzvodno od TNF- $\alpha$  i NF-KB aktivacije (92). Međutim, za razliku od S100 proteina, čini se da je djelovanje alarmina HMGB1 neovisno o TNF- $\alpha$  (93). Naime, anti - TNF- $\alpha$  terapija nije pokazala utjecaj na HMGB1 izražaj (94), dok su antitijela protiv HMGB1 i antagonisti A domene molekule HMGB1 uspješno inhibirali razvoj sinovijalnoj upale kao i oteklinu zglobova u životinjskim modelima artritisa (93,95,96). Nadalje, vezanje HMGB1 s drugim endogenim molekulama poput nukleosoma poništava imunosnu toleranciju i doprinosi razvoju autoimune bolesti (61). Stoga su alarmini privlačne mete u liječenju RA i drugih kroničnih upalnih bolesti osobito kod pacijenata koji ne reagiraju na anti-TNF- $\alpha$  terapiju.

Iako trenutno ubrzano raste popis alarmina u literaturi najbolje proučeni u zdravih i bolesnih ljudi su HMGB1 te proteini iz skupine S100 koji vežu kalcij. U ovom radu opisani su alarmini HMGB1 i S100A12 te njihov receptor RAGE jer oni do danas imaju najjasniji i najopipljiviji klinički potencijal.

#### **1.4.2. Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1)**

Protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. *high mobility group box 1-protein*) je mali protein od 215 aminokiselina koji je strukturno organiziran u tri različite domene: dvije HMG domene (A i B) i kiselog C -terminalnog repa dugog 30 aminokiselina. Strukturne jedinice HMG čine tri alfa-uzvojnice koje su konfigurirane u obliku slova L (97) (Slika 5).



Slika 5. Struktura HMGB1. HMGB1 je organiziran u tri različite domene, dvije HMG domene (A i B) i kiselog C-terminalnog repa (prilagođeno prema referenci br. 97)

HMGB1 u jezgri predstavlja DNA-vežući nehistonski protein koji pospješuje stvaranje nukleoproteinskih kompleksa (98). Jedinstvena konfiguracija A i B domene igra važnu ulogu u načinu na koji su te domene u interakciji s kromatinom (99). Za razliku od A i B domene koje su detaljno proučavane za kiseli C-terminalni rep još se uvijek ne zna prava funkcija. Novija istraživanja upućuju na to da C-terminalni rep regulira interakciju HMGB1 s DNA (100,101).

HMGB1 djeluje kao citokin tek nakon što dospije u međustanični prostor. Aktivno ili pasivno mogu ga otpuštati brojne oštećene ili nekrotične stanice. Godine 1999. Wang i suradnici su prvi opisali otpuštanje HMGB1 iz stanica koje su stimulirane citokinima (102). Nakon toga, 2002. godine Scaffidi i kolege su prikazali kako HMGB1 otpuštaju nekrotične stanice, ali ne i apoptotične stanice jer je HMGB1 tijesno vezan za kromatin (103). Međutim, Bell i suradnici 2006. godine pokazuju da HMGB1 može biti oslobođen i iz apoptotičnih stanica (104,105) kada pokazuje više karakteristike tolerancije nego li proupalne aktivnosti (106).

HMGB1 može biti aktivno oslobođen nakon stimulacije egzogenim patogenim molekulama, endogenim citokinima ili zbog ishemije (107,108), a pasivno može biti otpušten tijekom oštećenja stanice (103). Aktivna sekrecija HMGB1 potaknuta interakcijom receptora stanične membrane s izvanstaničnim molekulama ili s hipoksijom javlja se postepeno (108,109), dok se pasivno oslobađanje potaknuto nekrozom javlja više-manje odmah. Nadalje, aktivno izlučivanje HMGB1

podrazumijeva otpuštanje iz jezgre u citosol ili sprečavanje ulaska u jezgru novosintetiziranog HMGB1. Nekoliko oblika poslije-translacijske modifikacije, kao što je fosforilacija, metilacija i acetilacija rezultira nakupljanjem HMGB1 u citosolu (110-112). Različite vrste stanica kao što su monociti, makrofagi, dendritičke stanice, endotelne stanice, sinovijalni fibroblasti, trombociti, astrociti i tumorske stanice mogu aktivno izlučivati HMGB1, a mehanizmi se mogu razlikovati između pojedinih tipova stanica. Do danas je najbolje opisano otpuštanje HMGB1 iz aktiviranih monocita. Ovo izlučivanje se pojavljuje zajedno s premještanjem HMGB1 iz jezgre u citoplazmu sekretornih lizosoma, organela koje se također koriste za oslobađanje IL-1 $\beta$ . Aktivacija monocita s LP, TNF, IL-1 ili IFN- $\gamma$  dovodi do acetilacije i fosforilacije HMGB1, koji se potom nakuplja u citoplazmi jer je njegov ponovni ulazak u jezgru blokiran (111,112). Citoplazmatski HMGB1 dolazi u sekretorne lizosome hematopoetskih stanica mehanizmima koji su još uvijek nepoznati. Lizosomi koji sadrže HMGB1 zatim se spajaju sa staničnom membranom. Egzocitoza citoplazmatskih organela koje sadrže HMGB1 aktivira se lisofosfatidilholinom (109). Novije studije pokazuju da se većina HMGB1 otpušta tijekom prvih 18 sati nakon aktivacije, dok je naknadno otpuštanje HMGB1 rezultat sinteze novih proteina (102). Nedavne in vitro studije ukazuju da stanična hipoksija potiče više aktivno nego pasivno izlučivanje HMGB1 neovisno o tipu stanica, iako mehanizmi još trebaju biti razjašnjeni. Veza između ishemije i translokacije HMGB1 u izvanstanični prostor dodatno je potkrijepljena time što se u sinovitisu područja s maksimalnim patološkim pojavljivanjem HMGB1 poklapaju s hipoksičnim područjima (108). Nekroza bilo kojeg tipa stanica dovodi do pasivnog otpuštanja HMGB1, dok primarna apoptoza minimalno ili nikako ne doprinosi oslobađanju HMGB1 u izvanstanični prostor. Znatna količina nuklearnog HMGB1 čvrsto je vezana za hipoacetilirani kromatin, koji se generira tijekom programirane

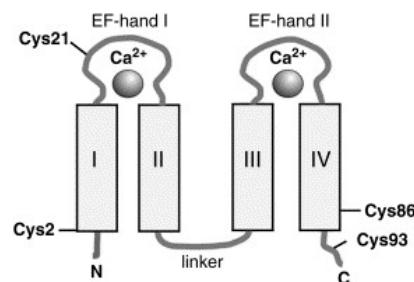
stanične smrti (103). Međutim, apoptotične stanice koje nisu ispravno eliminirane mogu proći sekundarnu nekrozu, što dovodi do kasnog otpuštanja HMGB1 (105). Stoga miševi kojima nedostaje funkcionalna lizosomska DNA-za tipa II, koja je presudna za probavljanje DNA u makrofazima apoptotičkih stanica, razviju kronični poliarthritis s brojnim obilježjima reumatoidnog artritisa (113).

Učinci HMGB1 su brojni i ponajviše vezani za prirođenu granu imunskog odgovora. On aktivira neutrofile i makrofage te potiče njihovo izlučivanje proupalnih citokina kao što su IL-1, IL-6 i TNF-a (114-116). Nadalje, HMGB1 stimulira adheziju i migratorna svojstva tih stanica (117,118). Zauzvrat, TNF, interferon, IFN- $\gamma$  i IL-1 stimuliraju makrofage da izlučuju HMGB1 (119) tako stvarajući pozitivnu povratnu informacijsku petlju. Osim djelovanja na neutrofile i makrofage HMGB1 stimulira dendritične stanice i potiče njihovo sazrijevanje (120,121).

Navedene učinke izvanstanični HMGB1 iskazuje kroz brojne receptore. Prvi opisan receptor za HMGB1 bio je RAGE (122). HMGB1 se također može vezati za tri člana iz obitelji Tollu-sličnih receptora i to TLR2, TLR4 i TLR9 (123,124).

### 1.4.3. Protein koji veže kalcij S100A12

S100A12 u ljudi je jedan od 25 članova obitelji S100 proteina koji vežu kalcij, a niske su molekularne težine (9-14 kDa) (125). Ime S100 je izvedeno iz činjenice da su ti proteini 100% topivi u amonijak sulfatu. Prvi S100 protein identificirao je Moore 1965. godine (126) nakon čega su identificirani ostali članovi ove obitelji. Većina tih proteina kodirana je genima unutar usko definiranog područja 1q21 (127). Svi S100 proteini sadrže dva EF-hand motiva odvojena spajajućom regijom (127) (Slika 6).



Slika 6. Struktura S100A proteina. S100 protein sadrži dva EF-hand motiva odvojena spajajućom regijom (prilagođeno prema referenci br. 59 ).

Vežanjem kalcija na ovaj dio proteina dolazi do promjena konformacije S100 proteina koje rezultiraju konkavnom hidrofobnom površinom u C-terminalnoj domeni što omogućuje selektivne interakcije s brojnim proteinima ili peptidima. S100 proteini se nalaze u različitim oblicima, uključujući homodimere, heterodimere i tetramere koji imaju utjecaj na njihovu funkciju. Na primjer, heterodimer kojeg čine molekule S100A8 i S100A9 (poznat kao kalprotektin) ima drugačije aktivnosti nego svaki pojedini protein (126). Većina S100 proteina ima funkcije unutar stanice. Međutim, za S100A12 (zajedno s članovima obitelji S100A8 i S100A9) prepoznate su i aktivnosti izvan stanice.

S100A12, također poznat kao Calgranulin C ili izvanstanični novoidentificirani receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (EN RAGE, engl. *extracellular newly identified receptor for advanced glycation endproducts*) je kalcij-vezujući proupalni protein kojeg uglavnom izlučuju granulociti (128). Guignard i kolege su ga prvi puta opisali u ljudi 1995. godine (129), a naknadno je identificiran i u drugih sisavaca uključujući svinje, pse i krave (130,132).

S100A12 gen je oko 4,1 kbp dug i sastoji se od tri eksona koji su podijeljeni s dva introna od 900 i 400 bp. Prvi ekson obuhvaća 48 nukleotida. Klasična TATA box (TATAAA) nalazi se 30 nukleotida uzvodno od mjesta inicijacije transkripcije. Protein je kodiran sekvencom u eksonu 2 (138 nukleotida) i 3 (138 nukleotida). Ilg i njegovi suradnici su 1996. godine sekvencionirali strukturu amino-kiselina S100A12 (133). Pojavnost S100A12 gena u ljudi gotovo je potpuno ograničena na neutrofilne granulocite, iako je prikazana pojavnost S100A12 gena i na monocitima (129). U zdravih osoba, S100A12 se mogu naći u tkivima i organima gdje su neutrofilni i monociti / makrofagi uobičajni, primjerice u slezeni i plućima. S100A12 se nalazi pretežno u citosolu granulocita, dok se translokacija na membranu i citoskeletnu komponentu događa nakon interakcije s kalcijem. Kada je izlučena u izvanstanični prostor S100A12 molekula pridonosi prirodnom imunosnom odgovoru. Tijekom posljednjih 15 godina sve se više ispituje funkcija ovog proteina. Pokazalo se da djelovanje alarmina S100A12 uključuje kemotaksiju i aktivaciju unutarstanične kaskade signala koji vode do produkcije citokina i indukcije oksidativnog stresa (134,135). Rezultati nedavnih radova pokazuju važnost S100A12 u različitim kroničnim upalnim bolestima kao što je Behcetova bolest (136), obiteljska mediteranska vrućica (MEFV, engl. *Familial Mediterranean fever*) (137), Kawasakijev vaskulitis (65,84,138), glomerulonefritisi (139), upalne bolesti crijeva (140-142), reumatoidni i psorijatični

artritis (143). Objavljeno je nekoliko radova u kojima je opisana važnost S100A12 u JIA, ali su potrebna dodatna klinička istraživanja koja bi u potpunosti spoznaju o ulozi S100A12 u navedenim stanjima.

#### S100A12 i RAGE

Najpoznatiji receptor S100A12 je RAGE (RAGE, engl. *receptor for advanced glycation endproducts*) (144). Vežanjem S100A12 sa RAGE aktivira se unutarstanična kaskada signala (kao što je MAP-kinaza i nuklearni faktor (NF) -  $\kappa$ B) dovodeći do proizvodnje proupalnih citokina (uključujući čimbenik nekroze tumora (TNF)- $\alpha$  i interleukin (IL)-1 $\beta$ ) i povećane pojavnosti adhezijskih molekula kao što su međustanična adhezijska molekula (ICAM, engl. *intracellular adhesion molecule*) i vaskularna stanična adhezijska molekula (engl. *vascular cell adhesion molecule*, VCAM). Konačni učinak svih tih odgovora je posredovanje proupalnih učinaka na limfocitima, endotelnim stanicama, neutrofilima i mononuklearnim fagocitima (134).

#### **1.4.4. Receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE)**

U skladu s rastućim brojem dokaza iz svjetske znanstvene literature, RAGE (engl. *receptor for advanced glycation end – products*) je još jedan član u alarminskoj obitelji koji može imati važnu ulogu u upalnim reumatskim bolestima (145-150).

RAGE je multi-ligandni receptor, član imunoglobulinske obitelji koji se sastoji od 404 aminokiseline, molekularne mase 55 kDa (151,152). Gen humanog RAGE-a nalazi se na kromosomu 6 u MHC klasa III regiji (153). RAGE čini unutar stanična domena, kratka transmembranska domena i izvanstanična domena koja se sastoji od tri



imunoglobulinima slične regije, jednog „V“ tipa kojeg slijede dva „C“ tipa. „V“ tip je neophodan za vezivanje liganada (154).

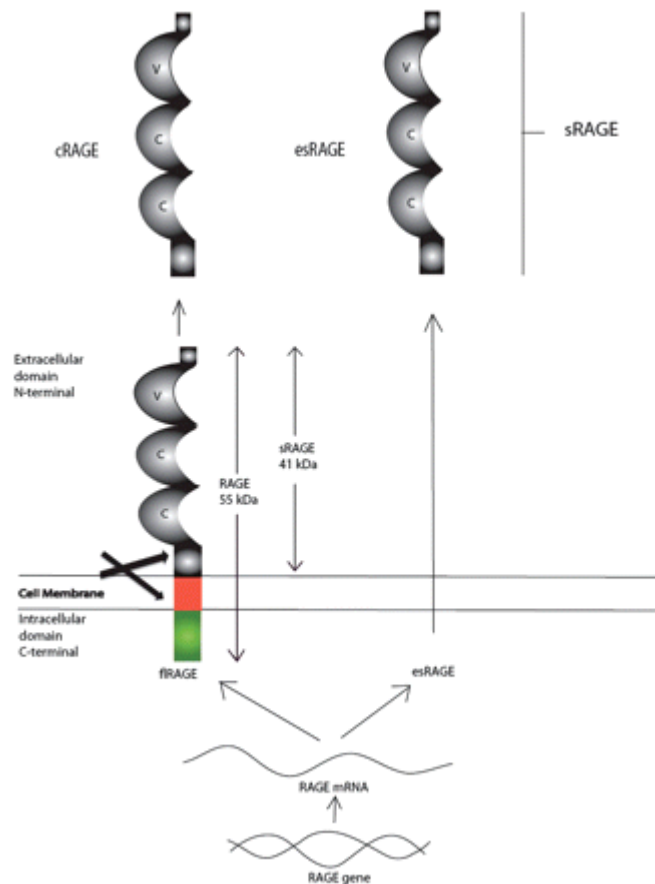
Najbolje opisan RAGE ligand je krajnji produkt uznapredovale glikozilacije (AGE, engl. *advanced glycation end products*) koji nastaje kao rezultat ne-enzimske reakcije između šećera i slobodnih amino kiselina. Povećano stvaranje i nakupljanje AGE zabilježeno je u nekoliko patofizioloških stanja kao što su dijabetes, zatajenje bubrega, Alzheimerova bolest, starenje i upala (155,156). Razinu AGE-a in vivo odražava ne samo njihovo endogeno stvaranje nego i njihovo nakupljanje iz egzogenih izvora uključujući konzumiranje hrane bogate AGE-om i pušenje (157).

U posljednje vrijeme identificirani su, osim AGE ostali RAGE ligandi: brojni članovi S100/kalgranulinske obitelji, citokinima slični proupalni medijatori, protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1/amfoterin) i vlakna amiloida. Zajedničko obilježje tih liganada je njihova povezanost i ko-akumulacija s RAGE u upalnim stanjima (158). U normalnim tkivima i krvnim žilama izražena je niska razina RAGE dok je viša razina RAGE prisutna u mjestima gdje su akumulirani njegovi proupalni ligandi (154). RAGE je izražen na membrani različitih stanica (magrofaga, leukocita, endotela), a također se nalazi i u topljivom obliku (sRAGE) kada djeluje kao „mamac“ receptor sa zaštitnom ulogom (159,160). Nakon vezivanja liganada, RAGE dovodi do aktivacije transkripcijskog faktora zvanog nuklearni faktor (NF)-kapa B te do proizvodnje upalnih citokina (161). RAGE djeluje i kao adhezivna molekula (162), mobilizira dendritičke stanice k limfnim čvorovima (163), a posreduje aktivaciju dendritičkih stanica i B limfocita (124). Nadalje, RAGE je uključen u sazrijevanje T limfocita (164) i promovira aktivaciju T limfocita i Th1+ polarizaciju (165).

#### 1.4.4.1. Topljivi RAGE (sRAGE)

Utvrđeno je da topljivi tip RAGE-a (sRAGE) postoji u cirkulaciji ljudi i odgovara izvanstaničnoj domeni RAGE-a (bez unutarstanične i transmembranske domene membranskog RAGE-a). Topljivi sRAGE ima istu specifičnost za vezanje liganada kao RAGE (sadrži N-terminalni „V“ dio izvanstanične domene) te može djelovati kao „mamac“ vežući proupalne liganade i sprječavajući njihovo vezivanje na membranski RAGE. Postoji niz mehanizama proizvodnje sRAGE koji uključuju alternativno spajanje i uklanjanje transmembranske regije proteolitičkim cijepanjem s površine stanice. Smatra se da je primarni mehanizam proizvodnje sRAGE alternativno spajanje introna 9/egzona 10 RAGE gena. Ova varijanta nazvana „RAGE\_v1“ bila je utvrđena kao varijanta primarne proizvodnje sRAGE i ranije se nazivala endogeno izlučen RAGE (esRAGE, engl. *endogenous secretory RAGE*) (156-157). Drugi mehanizam odgovoran za proizvodnju cirkulirajućeg sRAGE je proteolitičko odvajanje membranski vezanog RAGE (flRAGE engl. *full-length RAGE*). Ovaj izvanstanični oblik RAGE nazvan je cRAGE (cRAGE, engl. *cleaved RAGE*). Oba esRAGE i cRAGE su funkcionalno ekvivalentna i u interakciji su s istim RAGE ligandima (Slika 7). Pokazalo se da odvajanje RAGE može biti inhibirano s metaloproteaza inhibitorima što promovira HMGB1, jedan od RAGE liganada (152).

Razine sRAGE su smanjene u različitim autoimunim bolestima, kao što su sistemski lupus (SLE) i Kawasaki bolest (159,65). Nasuprot tome, sRAGE je povišen u jednoj studiji bolesnika s upalnom bolesti crijeva (160).

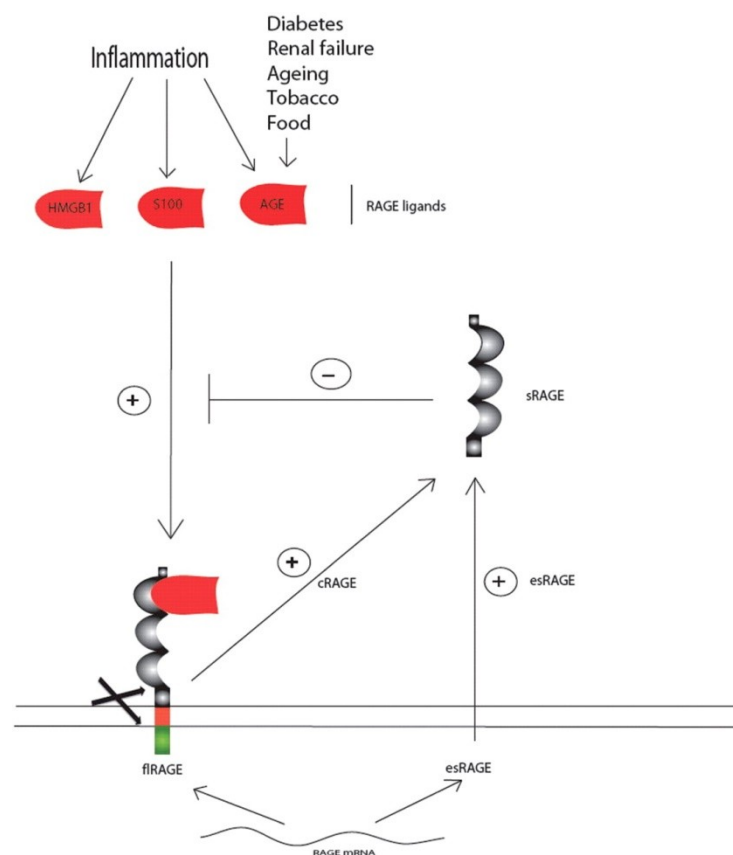


Slika 7. Mehanizam proizvodnje topljiva receptora sRAGE. Membranski RAGE se sastoji od unutarstanične domene, kratke transmembranske domene i izvanstanične domene koja sadrži tri imunoglobulinu slične regije (jedne varijabilne „V“ regije koju slijede dvije konstantne „C“ regije). „V“ regija je neophodna za vezivanje liganda. Topljivi sRAGE odgovara izvanstaničnoj domeni RAGE (nedostaje mu unutarstanična i transmembranska domena). sRAGE može biti proizveden alternativnim spajanjem RAGE mRNA (esRAGE/RAGEv1) ili proteolitičkim cijepanjem RAGE s površine stanice (cRAGE). Kratice: esRAGE=endogeno izlučen RAGE (esRAGE, engl. endogenous secretory RAGE); cRAGE=RAGE nastao proteolitičkim cijepanjem (cRAGE, engl. cleaved RAGE);sRAGE= topljivi RAGE (sRAGE, engl. soluble RAGE) (prilagođeno prema referenci br. 158).

#### 1.4.4.2. Povratna sprega između RAGE liganada, RAGE i sRAGE

Ravnoteža između razina RAGE liganada, RAGE i sRAGE predstavlja dinamičan sustav. Dokazano je da brojna patofiziološka stanja, uključujući šećernu bolest, zatajenje bubrega, starenje i pušenje pospješuju izražavanje RAGE i njegovih liganada. Upala povećava proizvodnju i akumulaciju AGE, HMGB1, S100 proteina i depozita amiloidnih vlakana (151,154,155), a potom dovodi do povećane aktivacije RAGE (161). Odnos između regulacije RAGE / RAGE liganada i razine „zaštitnog“ sRAGE je

od velikog kliničkog značenja. Slično tome, pozitivna korelacija između serumskog AGE i razine sRAGE u ispitanika bez šećerne bolesti sugerira da interakcija RAGE i njegovih liganada pospješuje sintezu sRAGE (162). Međutim, pokazala se negativna povratna veza između sRAGE i interakcije RAGE i njegovih liganada. Stoga se čini da su sRAGE, RAGE i njegovi ligandi tri elementa u ravnoteži s pozitivnim i negativnim povratnim vezama koje bi mogle biti izmijenjene patofizioloških situacijama (Slika 8).



Slika 8. Mehanizam povratne sprege RAGE liganada / RAGE / sRAGE sustava

Upala i druga patofiziološka stanja pospješuju izražavanje RAGE i njegovih liganada, što rezultira povećanim stvaranjem sRAGE kao negativne povratne sprege s RAGE ligandima. Kratice: esRAGE=endogeno izlučen RAGE (esRAGE, engl. endogenous secretory RAGE); cRAGE=RAGE nastao proteolitičkim cjepanjem (cRAGE, engl. cleaved RAGE); sRAGE= topljivi RAGE (sRAGE, engl. soluble RAGE) (prilagođeno prema referenci br. 158); flRAGE=RAGE nastao proteolitičkim odvajanjem membranski vezanog RAGE (flRAGE engl. full-length RAGE); AGE= (AGE, engl. advanced glycation end product); HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1-protein); S100A= proteini koji vežu kalcij (S100, engl. calcium-binding proteins); RAGE=receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE, engl. receptor for advanced glycation end products);

(prilagođeno prema referenci br. 158).

Točni mehanizmi odgovorni za finu ravnotežu između RAGE vezanog na površini stanice i njegovog izlučenog/odcjepljenog topivog oblika su za sada nepoznati i njihovo daljnje razjašnjenje predstavlja važno biološko pitanje.

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ovog rada jest da visoka razina HMGB1 i S100A12 te niska razina sRAGE u bolesnika s juvenilnim idiopatskim artritisom označava aktivnu bolest.

## 3. CILJEVI RADA

### 3.1. Opći cilj

Ispitati genski izražaj i razinu HMGB1, S100A12 i RAGE u serumu djece s JIA neovisno o tipu bolesti i usporediti je s nalazom u kontrolnoj skupini.

### 3.2. Specifični ciljevi:

1. ispitati genski izražaj i razinu proteina HMGB1, S100A12 i RAGE u serumu bolesnika s oligoartikularnim, poliartikularnim i sistemskim tipom JIA (ovisno o tipu bolesti) i usporediti s kontrolnom skupinom;
2. usporediti genski izražaj i razinu proteina HMGB1, S100A12 i RAGE u serumu ispitanika sa sistemskim tipom JIA u odnosu na artikularne tipove JIA (oligoartikularni, poliartikularni);
3. ispitati odnos serumske razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE u bolesnika s JIA neovisno o tipu bolesti u odnosu na rutinske laboratorijske nalaze za ocjenu upalne aktivnosti bolesti (SE, CRP, anemiju, leukocitozu, trombocitozu i disproteinemiju);
4. ispitati odnos serumske razine i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE u bolesnika s JIA ovisno o tipu bolesti u odnosu na rutinske laboratorijske nalaze za ocjenu upalne aktivnosti bolesti (SE, CRP, anemiju, leukocitozu, trombocitozu i disproteinemiju).

## 4. ISPITANICI I METODE RADA

### 4.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 112 djece oboljele od JIA koja su bila podjeljena u 4 skupine. Dijagnoza juvenilnog idiopatskog artritisa je postavljena na temelju revidiranih ILAR kriterija (International League of Associations for Rheumatology) (8).

**Bolesnici** - djeca pri postavljanju dijagnoze JIA (prije započetog medikamentoznog liječenja), podjeljena u tri skupine ovisno o tri najčešća tipa juvenilnog idiopatskog artritisa:

- 1) oligoartikularni tip JIA (artritis do 4 zglobova)
- 2) poliartikularni tip JIA (artritis 5 ili više zglobova)
- 3) sistemski tip JIA (artritis kombiniran s dnevnim fazama vrućice tijekom najmanje dva tjedna i praćen s jednim/više sljedećih simptoma: makulopapuloznim osipom na koži, generaliziranom limfadenopatijom, hepatomegalijom, splenomegalijom ili serozitizom)

**Kontrolna skupina** – djeca koja nisu imala kliničko-laboratorijskih znakove upale, a kojima se zbog drugih (ne-upalnih) bolesti uzela venska krv, po dobi i spolu se nisu razlikovala od djece s JIA.

U sve djece bilo je uzeto 6 ml periferne venske krvi pri postavljanju dijagnoze te je bila učinjena analiza razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE.

Klinički dio rada provoden je u Zavodu za kliničku imunologiju, reumatologiju, respiracijske i alergološke bolesti Klinike za pedijatriju, Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu (doc.dr.sc. Marija Jelušić-Dražić), a laboratorijski dio proveden je u Laboratoriju za molekularnu imunologiju, Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (prof.dr.sc. Danka Grčević, doc.dr.sc. Nataša Kovačić).



## **4.2. Metode rada**

### **4.2.1. Analiza općih i imunosnih laboratorijskih pokazatelja**

U svih bolesnika uzeta je venska krv pri postavljanju dijagnoze i analizirani su sljedeći laboratorijski pokazatelji: brzina sedimentacije eritrocita, hematokrit, hemoglobin, broj trombocita i leukocita u perifernoj krvi, elektroforeza serumskih proteina, serumska razina imunoglobulinskih razreda (IgG, IgA i IgM), serumska razina C-reaktivnog proteina (turbidimetrijski), serumska razina reumatoidnog faktora (turbidimetrijski), titar anti-nuklearnih protutijela (ANA) (indirektnom imunofluorescencijom), te genski izražaj alarmina i njihova koncentracija u serumu.

### **4.2.2. Analiza alarmina u serumu**

Venska krv vađena je u epruvete za vađenje krvi (vacutainere) koje su kao antikoagulans sadržavale natrijev EDTA, uvijek između 9 i 10 sati prije podne. Alikovot periferne krvi bio je centrifugiran na 3500 okretaja u minuti tijekom 5 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je nadtalog (plazma) aspiriran i pohranjen u kriotube (Nunc, Danska) za pohranu na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Koncentracije alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova receptora RAGE u uzorcima plazme izmjerene su pomoću enzimskog imunotesta (ELISA): RAGE (tvrtka R&D Systems, Minneapolis (MN), USA); S100A12/EN-RAGE (tvrtka CycLex Co., Nagano, Japan); HMGB1 (tvrtka Shino-Test Corporation, Tokyo, Japan). Osjetljivost testa ELISA za HMGB1 bila je 1 ng/ml, za S100 56 pg/ml, a za RAGE 4.12 pg/ml.

### **4.2.3. Analiza genskog izražaja alarmina**

Izražaj gena je određen u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika i kontrolnih ispitanika, izdvojenim na gradijentu fikola (Histopaque-1077, Sigma, St.Louis, SAD), koje su 2 x isprane medijem RPMI1640 (centrifugiranjem/5 min na 500xg) te konačno resuspendirane u kompletan medij RPMI1640 (10% FCS, 100 U/mL penicilina i 0,1 mg/mL streptomocina) (Sigma). Ukratko, nakon dodavanja otopine za

izolaciju RNA (TRI-Reagent; Molecular Research Center, Cincinnati (OH), SAD, uzorci su se inkubirali na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta i potom centrifugirali brzinom od 12000 g tijekom 30 minuta na +4 °C. Potom se na uzorke dodalo 0,2 mL kloroforma, inkubiralo 2 minute na +4 °C i centrifugiralo na 10000 g tijekom 15 minuta na +4 °C. Gornja, vodena faza prenešena je u novu epruvetu, na nju je dodano 0,5 mL izopropanola i inkubiralo tijekom 60 minuta na –20 °C. Ponovnim centrifugiranjem 12000 g tijekom 15 minuta na +4 °C dobiven je precipitat na dnu epruvete, koji je potom opran 75%-tnim etanolom i centrifugiran brzinom od 7500 rpm tijekom 5 minuta na +4 °C. Talog je otopljen u destiliranoj vodi, a koncentracija i čistoća izolirane RNA provjerena je pomoću UV-VIS spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (*NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington (DE), SAD) mjerenjem apsorbancija pri 260 nm i 280 nm te određivanjem njihovog omjera.

Izoliranu staničnu RNA potom se umnožilo postupkom RT-PCR. Najprije je 2 µg izolirane RNA po uzorku prepisano u cDNA postupkom reverzne transkripcije upotrebom seta kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, u svaki uzorak RNA (u ukupnom volumenu 9 µl) dodano je 10 µl 2X RT pufera i 1 µl 20X mješavine enzima reverzne transkriptaze i inkubirano na 37 °C kroz 60 minuta. Reakcija je zaustavljena grijanjem tijekom 5 minuta na 95 °C. Dobivena cDNA kvantitativno je umnožena postupkom qRT-PCR pomoću uređaja ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Analiziran je izražaj gena za HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora (sRAGE) s pomoću komercijalnog seta kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih začetnika i probe koja na 5' kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM, a na 3' kraju hvatač fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*). Svaka reakcija odvijala se u duplikatu, u reakcijskom volumenu 25 µL. Smjesa je sadržavala: 0,25 µL cDNA; 0,25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied Biosystems); po 200 nM začetnika 5' i začetnika 3'; 250 nM TaqMan probe i 0.625 U DNA polimeraze (AmpliAq Gold DNA polymerase). Uzorci su prvo bili inkubirani tijekom 2 minute na +50 °C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza, a potom 10 minuta na +95 °C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA polimeraza. Potom je uslijedilo 40 ciklusa tijekom kojih su uzorci inkubirani na: +95 °C 15 s i 60 °C 60 s. Za svaki uzorak

izračunala se relativna količina cDNA uporabom standardne krivulje. Standardna krivulja oblikovala se na temelju 5 serijskih razrjeđenja uzorka za kalibraciju (cDNA mononukleara periferne krvi kontrolnog ispitanika).

#### **4.2.4. Statističke metode**

Veličina uzorka određena je temeljem analize snage testa za jednosmjernu analizu varijance razlika između 4 ispitivane skupine pri čemu je procijenjena najmanja veličina ukupnog uzorka 112 ispitanika (minimalno 28 ispitanika po skupini) (snaga testa od 0,90,  $\alpha$  razina značajnosti od 0,05, učinak veličine od 0,3). Usporedba grupi numeričkih varijabli rađena je pomoću Mann-Whitney testa. Korekcije P vrijednosti učinjene su prema metodi Bonferonni. Korelacije su procijenjene Spearmanovim koeficijentom korelacije. Distribucije su prikazane tablično i grafički. Razina statističke značajnosti izabrana je na  $\alpha=0.05$ . Za obradu podataka korišten je programski paket STATA/IC ver. 11.02.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Prikaz osnovnih podataka o ispitanicima

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 130 djece, 85 djevojčica i 45 dječaka prosječne dobi 12,5 godina. Skupinu ispitanika činilo je 102 djece (55 djevojčica i 47 dječaka) prosječne dobi 13 godina u inicijalnoj fazi JIA koja su bila podijeljena u 3 skupine prema najčešćim tipovima JIA: 28 djece (28/102, 27,45%) imalo je sistemski tip, 39 oligoartikularni tip (39/102, 38,24%) i 35 poliartikularni tip JIA (35/102, 34,31%). Kontrolnu skupinu činilo je 28 djece (8 dječaka i 20 djevojčica), prosječne dobi 9 godina bez znakova upale (Tablica 5).

Tablica 5. Osnovni podaci u 102 djece s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) ovisno o tipu JIA te u 28 djece kontrolne skupine

	JIA			Kontrolna skupina (n=28)
	sistemski (n=28)	oligoartikularni (n=39)	poliartikularni (n=35)	
Spol (M/Ž)	21 / 7	8 / 31	8 / 27	8 / 20
Dob (godine)	15 (7 – 16)	6 (2 – 16)	13 (1 – 16)	9 (3 – 16)

Podaci su prikazani medijanom i rasponom.

Dijagnoza juvenilnog idiopatskog artritisa u svih bolesnika postavljena je u Zavodu za kliničku imunologiju, reumatologiju, respiracijske i alergološke bolesti Klinike za pedijatriju, Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu na temelju revidiranih ILAR kriterija (International League of Associations for Rheumatology) (8). U svih bolesnika radilo se o novonastalom i prethodno neliječenom juvenilnom idiopatskom artritisu što znači da niti jedno bolesno dijete nije liječeno bolest modificirajućim lijekovima

(DMARDs, engl. *disease-modifying antirheumatic drugs*) niti imunosupresivnom terapijom. Bila je dopuštena jedino primjena nesteroidnih antireumatika (NSAR).

## 5.2. Analiza laboratorijskih pokazatelja u djece s JIA i kontrolne skupine

Usporedbom brzine sedimentacije eritrocita u djece sa sistemskim, oligoartikularnim i poliartikularnim JIA prema djeci kontrolne skupine pokazalo se da je sedimentacija eritrocita bila statistički značajno ubrzana ( $p < 0.05$ ) u djece sa sistemskim i poliartikularnim tipom JIA (Tablica 6, Slike 9,10 i 11).

U djece sa sistemskim tipom JIA nađena je statistički značajno viša razina serumskog C-reaktivnog proteina (prosječna vrijednost iznosila je 106,95 mg/L; medijan 91, uz raspon od 6,9 do 227) te  $\alpha$ -2 globulina (prosječno 15.92 g/L; medijan 15.45, raspon od 11,20 do 22,30) prema djeci kontrolne skupine ( $P < 0.05$ ). U skupini bolesnika nađen je statistički značajno viši ( $P < 0.05$ ) broj trombocita (prosječna vrijednost iznosila je  $385,89 \times 10^{12}$ ; medijan 406,50, raspon od 125 do 563) i snižena razina hemoglobina (prosječna vrijednost hemoglobina iznosila je 110, 54 g/L; medijan 111,50, raspon od 93 do 128) u odnosu na djecu kontrolne skupine.

Prosječna vrijednost C-reaktivnog proteina u poliartikularnom tipu bila je statistički značajno viša ( $P < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu i iznosila je 43,52 (medijan 23,50 raspon od 0,10 do 156), dok je u oligoartikularnom tipu iznosila tek 6,48 (medijan 2.40, raspon od 0,20 do 46) i nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na djecu kontrolne skupine. U djece kontrolne skupine razina C-reaktivnog proteina bila je unutar referentnog intervala što govori da su djeca bila bez upalne aktivnosti.

Blago povišene vrijednosti  $\alpha$ -2 globulina u serumu djece oligoartikularnog tipa JIA (prosječno 10,50 g/L; medijan 10,30, raspon od 5,20 do 16,90) i poliartikularnog tipa JIA (prosječno 12,93 g/L; medijan 13,50, raspon od 5,40 do 19,20) ukazale su na poznate

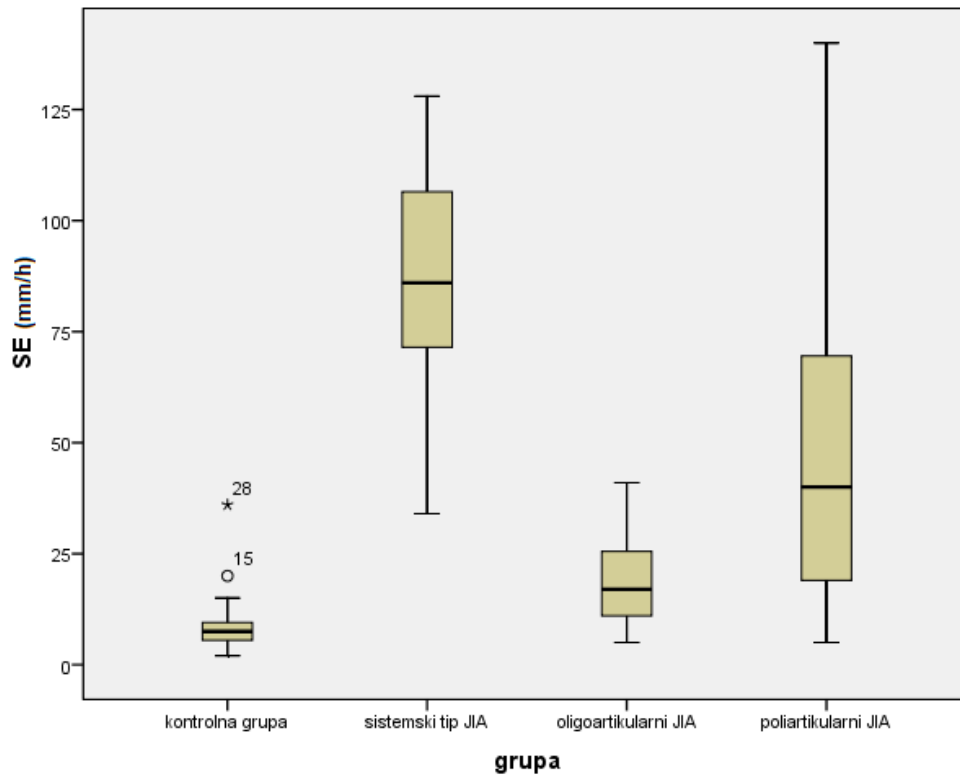
laboratorijske karakteristike pojedinih skupina JIA-a. Za kontrolnu skupinu  $\alpha$ -2 globulin prosječno je iznosio 7,72 g/L (medijan 7.15, raspon od 4,90 do 14,30) (Tablica 6, Slike 9,10 i 11).

U 102 djece oboljele od JIA (neovisno o tipu bolesti) nađena je ubrzana sedimentacija eritrocita (prosječno 48,29 mm/h; medijan 35 raspon od 5 do 140), viša razina C- reaktivnog proteina (prosječno 46.77 mg/L; medijan 18,25 raspon od 0,10 do 227) te viša razina  $\alpha$ -2 globulina (prosječno 12,82 g/L; medijan 13,40 raspon od 5,20 do 22,30) u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su razina hemoglobina i broj eritrocita bili niži u odnosu na kontrolnu skupinu, ali bez statističke značajnosti (Tablica 6, Slike 9,10 i 11).

Tablica 6. Osnovna laboratorijska obilježja u djece sa sistemskim, oligoartikularnim i poliartikularnim tipom JIA i u kontrolnoj skupini

	JIA			Svi bolesnici s JIA (n=102)	Kontrolna skupina (n=28)
	sistemski (n=28)	oligoartikularni (n=39)	poliartikularni (n=35)		
Sedimentacija mm/h	86,0* (34,0 – 128,0)	17,0 (5,0 – 41,0)	40,0* (5,0 – 140,0)	35,00 (5,0 – 140,0)	7,5 (2,0 – 36,0)
C-reaktivni protein mg/L	91,0* (6,9 – 227,0)	2,4 (1,2 – 46,0)	23,5* (1,2 – 156,0)	18,25 (0,1 – 227,0)	2,5 (0,1 – 31,0)
Hemoglobin g/L	111,5* (93,0 – 128,0)	123,0 (99,0 – 144,0)	115,0 (75,0 – 140,0)	115,50 (75,0 – 144,0)	124,0 (110,0 – 145,0)
Trombociti x10 <sup>12</sup> /L	406,5* (125,0 – 563,0)	375,0 (180,0 – 651,0)	363,0 (131,0 – 1038,0)	350 (240 – 560)	321,5 (176,0 – 414,0)
Eritrociti x10 <sup>12</sup> /L	4,2 (3,7 – 5,0)	4,5 (3,5 – 5,3)	4,3 (3,6 – 5,9)	4,1 (3,6 – 4,8)	4,6 (4,1 – 5,2)
Leukociti x10 <sup>9</sup> /L	9,7 (6,4 – 29,9)	8,5 (4,0 – 17,1)	8,5 (3,5 – 27,0)	4,41 (3,54 – 5,88)	7,4 (2,5 – 9,7)
γ globulin g/L	17,2 (7,8 – 39,0)	14,1 (7,9 – 21,5)	21,8 (10,0 – 32,1)	8,80 (3,50 – 29,93)	13,9 (6,8 – 19,2)
α-2 globulin g/L	15,5* (11,2 – 22,3)	10,3 (5,2 – 16,9)	13,5 (5,4 – 19,2)	16,85 (7,8 – 39,0)	7,2 (4,9 – 14,3)

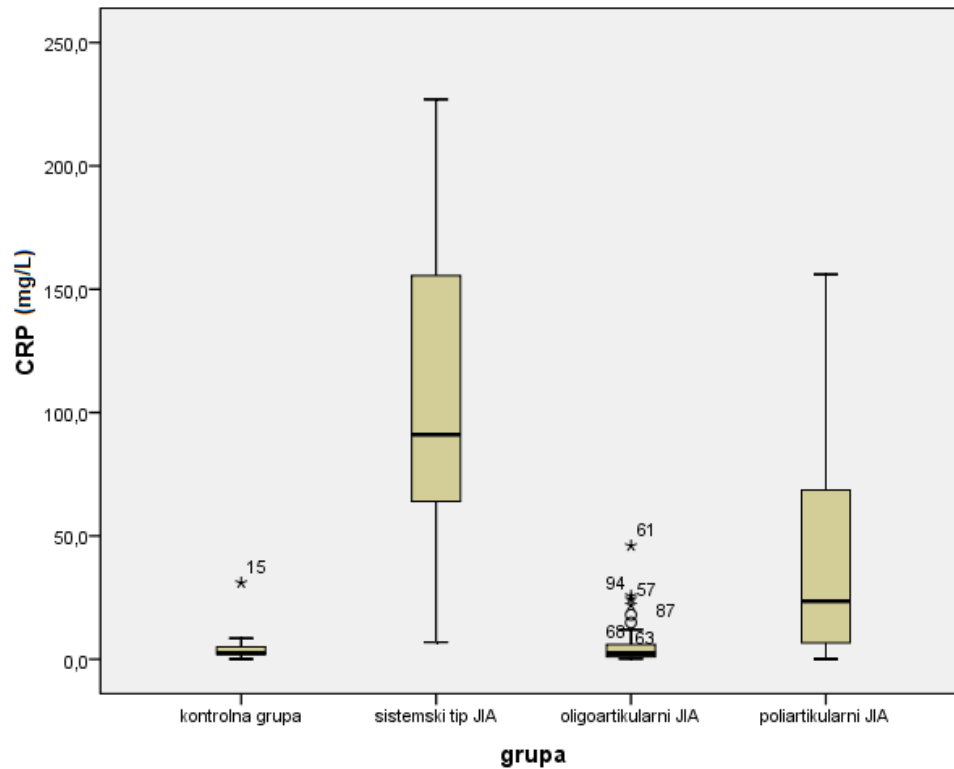
Rezultati su izraženi medijanom i rasponom, P < 0,05, \*=statistički značajne vrijednosti.



Slika 9. Prikaz vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita (SE) u djece pojedinih skupina JIA usporedno prema djeci kontrolne skupine

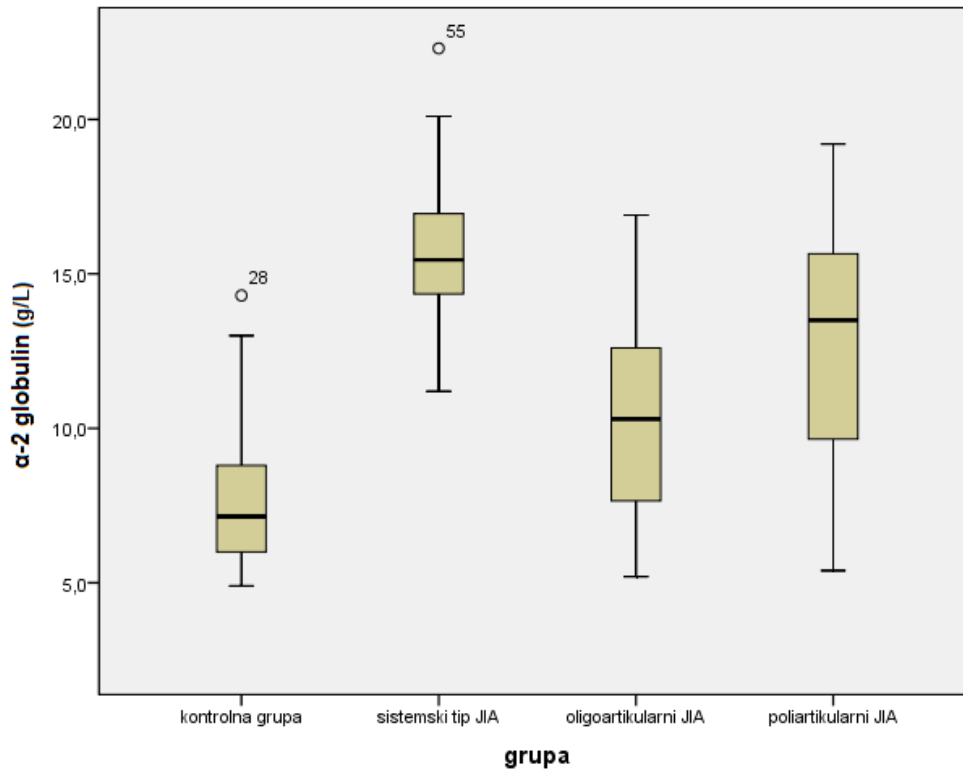
Na slici 9. prikazane su usporedbe distribucija sedimentacije u djece sa sistemskim, oligoartikularnim i poliartikularnim tipom JIA u odnosu na djecu kontrolne skupine. Vidljiva je ubrzana sedimentacija eritrocita u svim skupinama bolesne djece, a posebice u djece sa sistemskim tipom JIA u odnosu prema djeci kontrolne skupine; razlika je bila statistički značajna ( $P < 0,05$ ) za sistemski i poliartikularni tip JIA.





Slika 10. Prikaz vrijednosti C-reaktivnog proteina (CRP) u djece pojedinih skupina JIA usporedno s djecom kontrolne skupne

Na slici 10. vidljivo je da prosječna vrijednost C-reaktivnog proteina za sistemski tip JIA iznosi 106,95 mg/L (medijan 91, raspon 6,9-227), što upućuje na visoku aktivnost bolesti, dok za oligoartikularni tip JIA prosječna vrijednost C-reaktivnog proteina iznosi 6,48 mg/L (medijan 2,4, raspon 0,2-46), a za poliartikularni tip JIA 43,5 (medijan 23,5, raspon 0,1-156). Usporedbom sistemskog i artikularnih tipova JIA u odnosu na kontrolnu skupinu statistički značajno viša razina C-reaktivnog proteina bila je u djece sa sistemskim i poliartikularnim tipom JIA ( $P < 0,05$ ).



Slika 11. Vrijednosti  $\alpha$ -2 globulina u djece pojedinih skupina JIA usporedno s djecom kontrolne skupne

Za sistemski tip JIA vrijednost  $\alpha$ -2 globulina prosječno je iznosila 15,92 g/L (medijan 15,45, raspon 11,2-22,3), dok je za oligoartikularni tip JIA prosječna vrijednost  $\alpha$ -2 globulina iznosila 10,5 g/L (medijan 10,3, raspon 5,2-16,9), a za poliartikularni tip JIA 12,9 g/L (medijan 13,5, raspon 5,4-19,2) što ukazuje na poznate laboratorijske karakteristike pojedinih skupina JIA. Usporedbom sistemskog i artikularnih tipova JIA prema kontrolnoj skupini statistički značajno viša razina  $\alpha$ -2 globulina bila je u djece sa sistemskim tipom JIA ( $P < 0,05$ ).

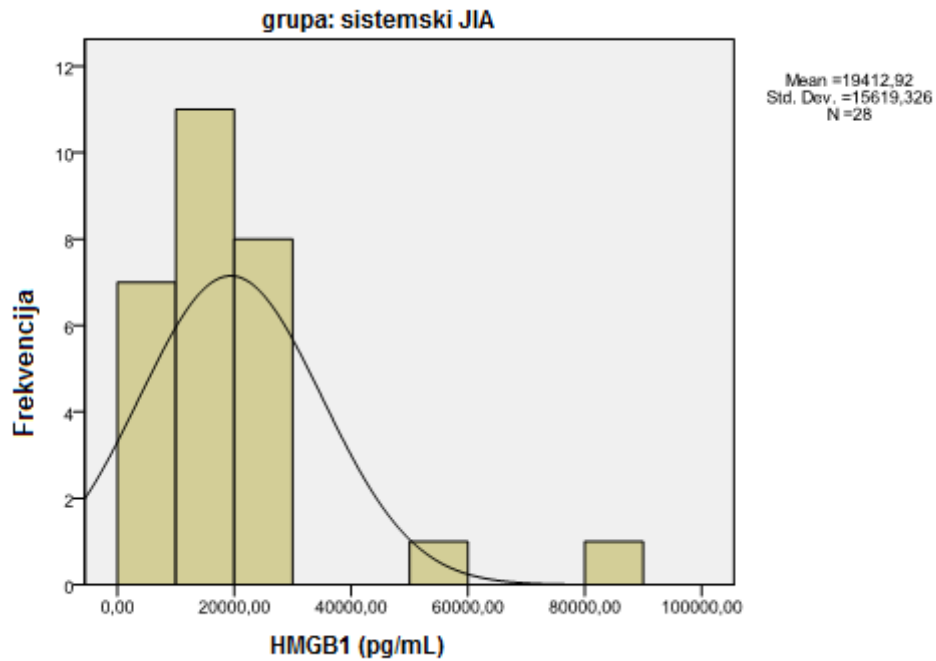
### 5.3. Analiza razine proteina i genskog izražaja HMGB1 u bolesnika s oligoartikularnim, poliartrikularnim i sistemskim tipom JIA

U sistemskom tipu JIA utvrđene su statistički značajno više serumske razine HMGB1 u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,032$ ), dok razina istog alarmina u serumu bolesnika s oligoartikularnim i poliartrikularnim tipom JIA nije bila statistički značajno povišena u odnosu na djecu kontrolne skupine. Nije nađena statistički značajna razlika genskog izražaja analiziranih tipova JIA prema kontrolnoj skupini (Tablica 7, Slike 12-19).

Tablica 7. Serumska razina proteina HMGB1 i genski izražaj HMGB1 u mononuklearima periferne krvi u djece s pojedinim tipovima JIA i u djece kontrolne skupine

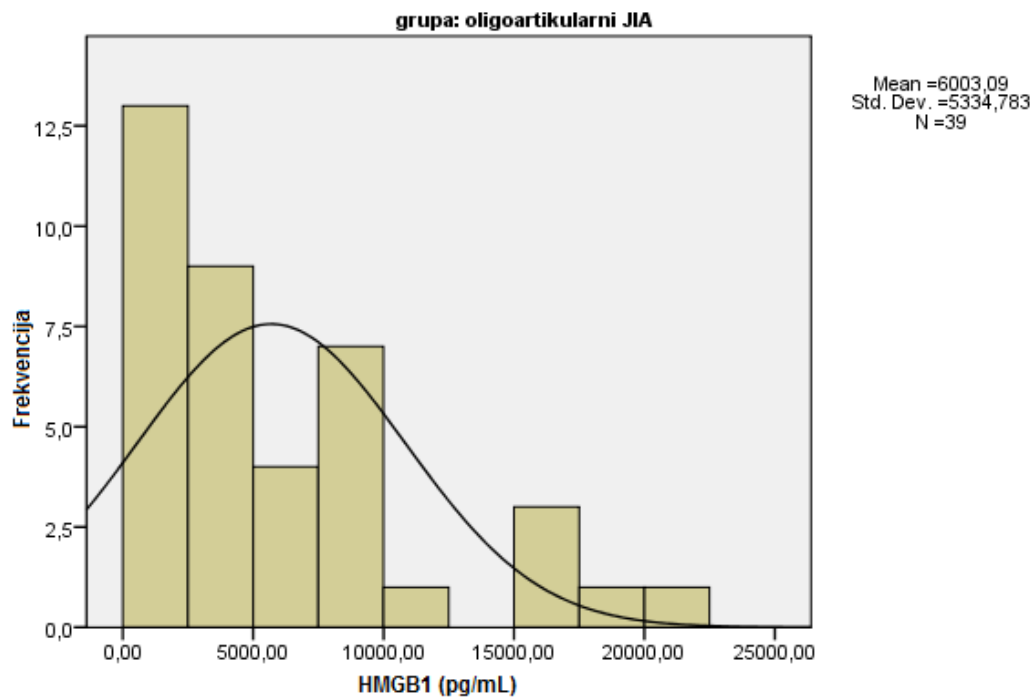
Skupine	HMGB1	
	Protein u serumu [pg/mL]	Genski izražaj u MNK (arbitrarne jedinice)
Kontrolna skupina (n=28)	12171,87 108,89 – 42374,54	121,00 25,44 – 463,67
Oligoartikularni tip JIA (n=39)	4326,56 108,89 – 20047,52	131,88 38,20 – 1323,68
Poliartikularni tip JIA (n=5)	4374,04 273,50 – 93493,88	75,23 0,00 – 543,40
Sistemski tip JIA (n=28)	16253,70* 4449,38 – 80844,98	47,68 10,25 – 161,8

\* $P < 0,05$  (Mann-Whitney test); HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; MNK=mononukleari. Podaci su izraženi medijanom i rasponom.



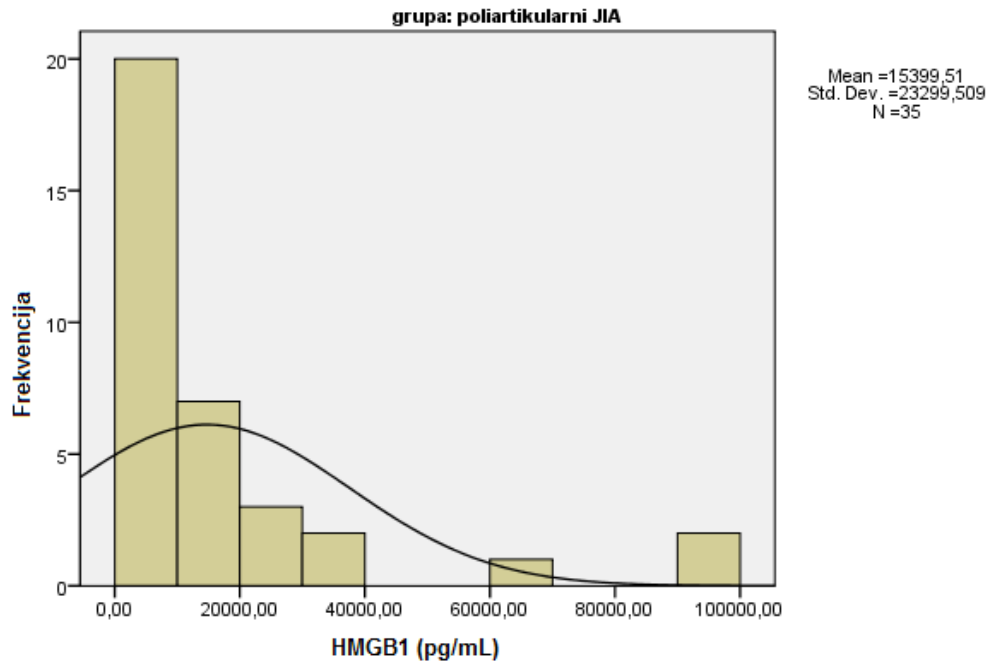
Slika 12. Prikaz serumske razine proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) u djece sa sistemskim tipom JIA (n=28)

Prosječna vrijednost HMGB1 u djece sa sistemskim tipom JIA iznosila je 19412,92 pg/mL (medijan 16253,70, raspon od 4449,38 do 80844,98) (Tablica 7).



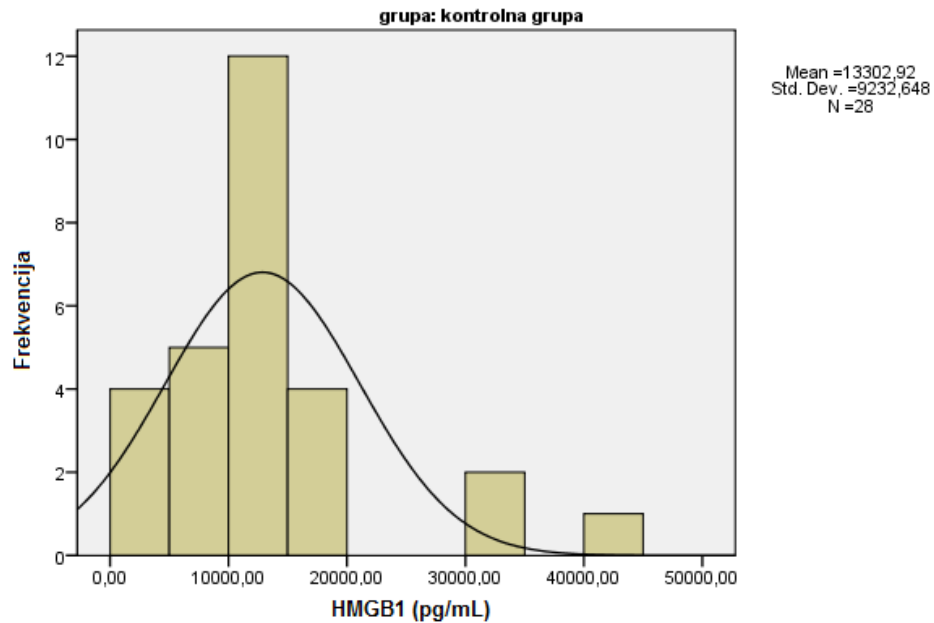
Slika 13. Prikaz serumske razine proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) u djece s oligoartikularnim tipom JIA (n=39)

Prosječna vrijednost HMGB1 u djece s JIA iznosila je 6003,09 pg/mL (medijan 4326,56, raspon od 108,89 do 20047,52) (Tablica 7).



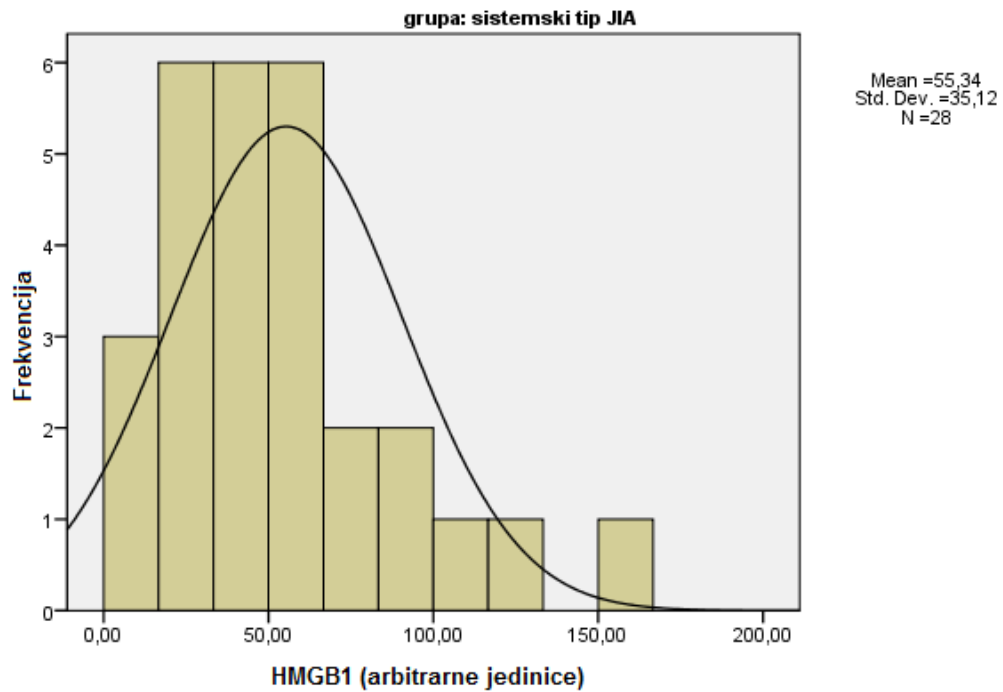
Slika 14. Prikaz serumske razine proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) u djece s poliartikularnim tipom JIA (n=35)

Prosječna vrijednost HMGB1 u djece s poliartikularnim tipom JIA iznosila je 15399,51 pg/mL (medijan 4374,04, raspon od 273,5 do 93493,88) (Tablica 7).



Slika 15. Serumske razine proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) u djece kontrolne skupine (n=28)

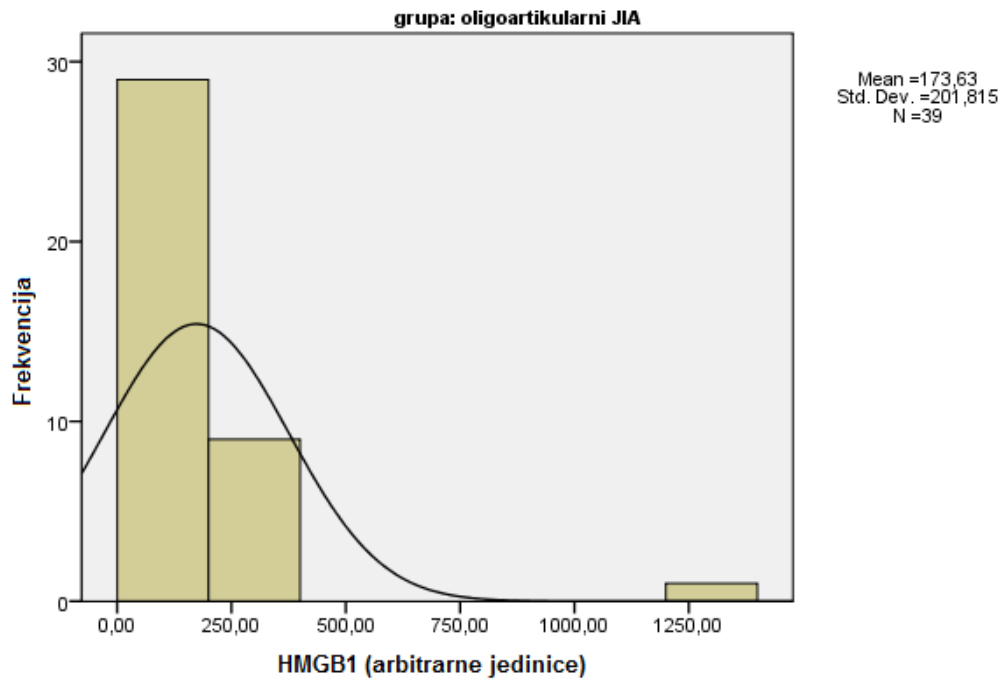
Prosječna vrijednost HMGB1 u djece kontrolne skupine iznosila je 13302.92 pg/mL (medijan 12171,87, raspon od 108,89 do 42374,54) (Tablica 7).



Slika 16. Prikaz genskog izražaja HMGB1 u mononuklearnim stanicama krvi djece sa sistemskim JIA (n=28)

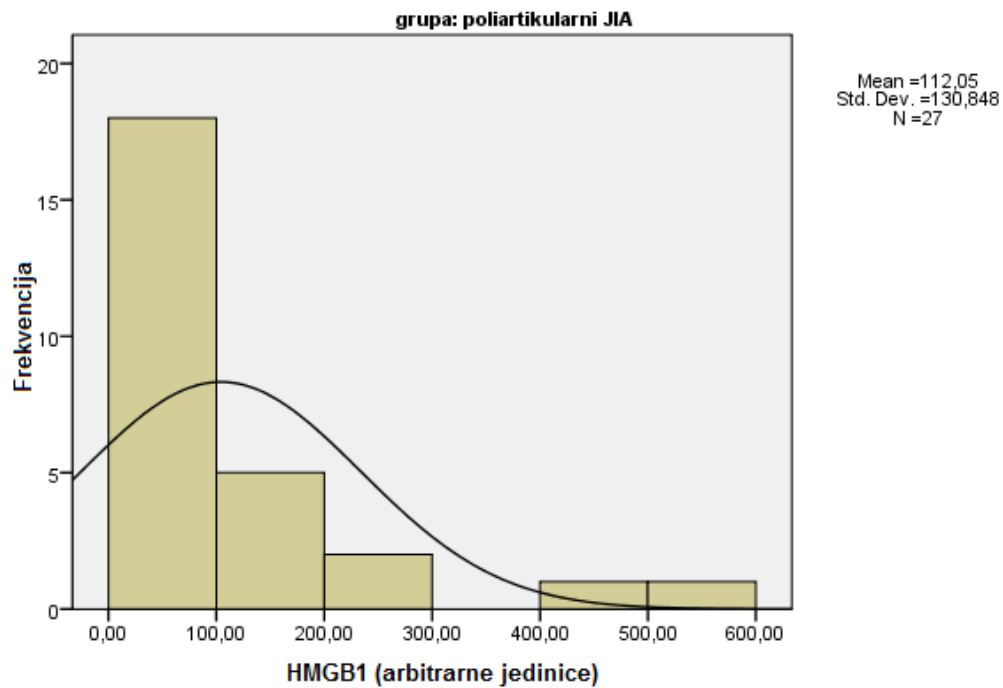
Prosječna vrijednost izražaja gena HMGB1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece sa sistemskim JIA iznosila je 55,34 arbitrarnih jedinica (medijan 47,68, raspon od 10,25 do 161,85) (Tablica 7).





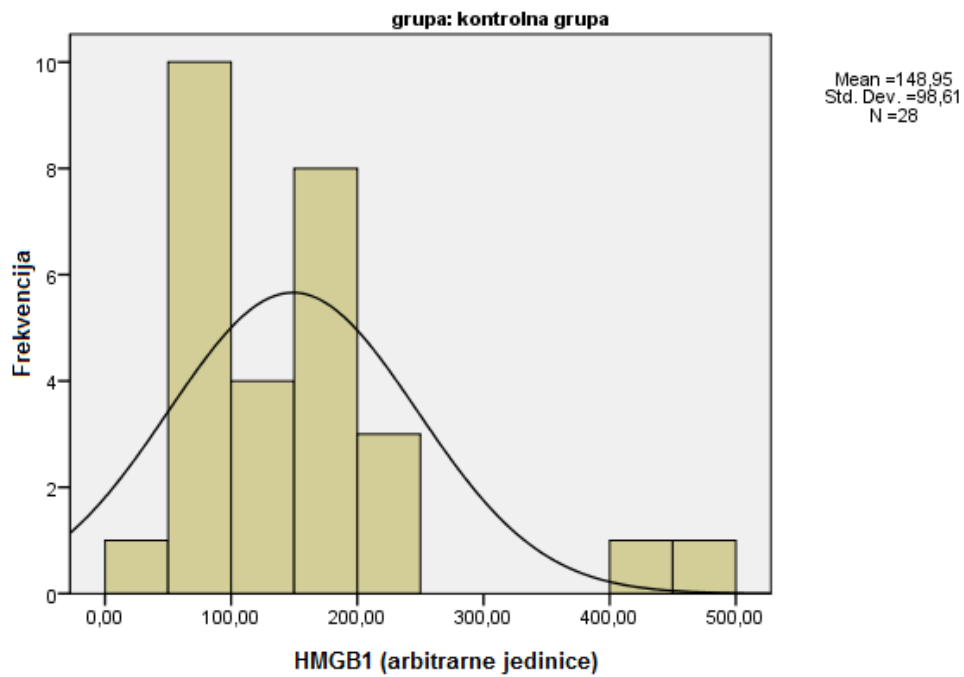
Slika 17. Prikaz genskog izražaja HMGB1 u mononuklearnim stanicama krvi u serumu djece s oligoartikularnim tipom JIA (n=39)

Prosječna vrijednost izražaja gena HMGB1 u djece s JIA iznosila je 173,63 arbitrarnih jedinica (medijan 131,88, raspon od 38,20 do 1323,68) (Tablica 7).



Slika 18. Prikaz genskog izražaja HMGB1 u mononuklearnim stanicama krvi djece s poliartikularnim tipom JIA (n=35)

Prosječna vrijednost izražaja gena HMGB1 u djece s JIA iznosila je 112,05 arbitrarnih jedinica (medijan 75,23, raspon od 0,00 do 543,40) (Tablica 7).



Slika 19. Izražaj gena HMGB1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi u kontrolnih ispitanika (n=28)

Vidljivo je da je genski izražaj HMGB1 u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolne skupine iznosio 148,95 arbitrarnih jedinica (medijan 121, raspon od 25,44 do 463,67) (Tablica 7).

#### 5.4. Analiza razine proteina i genskog izražaja S100A12 u bolesnika s oligoartikularnim, poliartikularnim i sistemskim tipom JIA

U sistemskom tipu JIA utvrđen je statistički značajno viši genski izražaj S100A12 prema kontrolnoj skupini ( $P < 0,001$ ), dok je serumska razina proteina S100A12 u navedenim skupinama bila podjednaka.

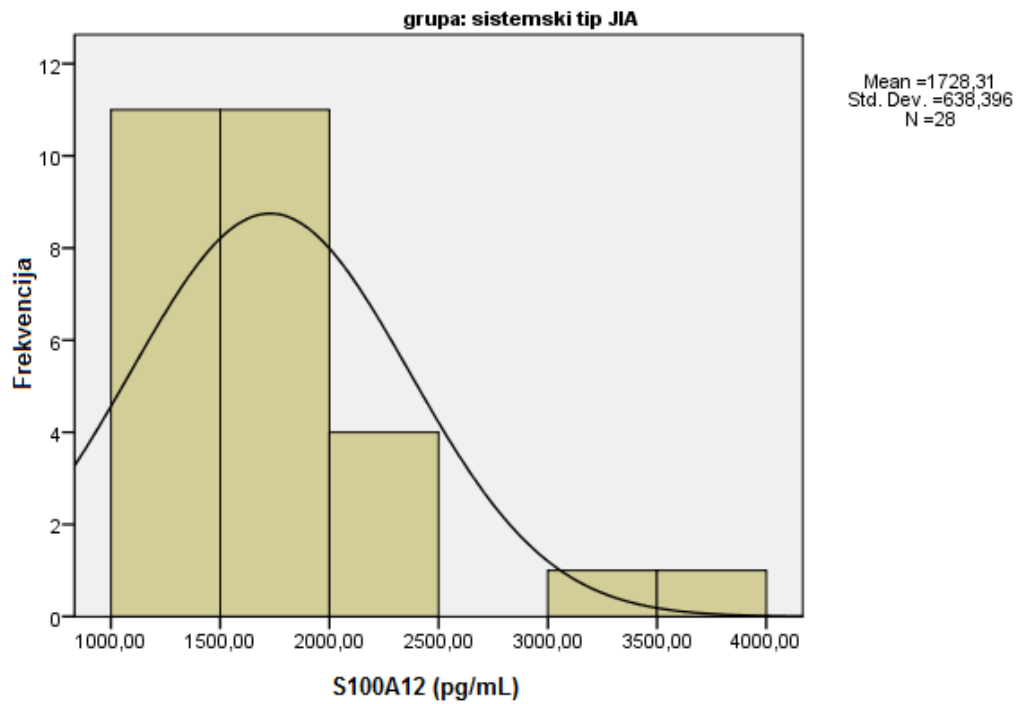
Uspoređujući razinu proteina S100A12 u kontrolnoj skupini i u oligoartikularnom te poliartikularnom tipu JIA povišena razina proteina S100A12 bila je dokazana u poliartikularnom JIA ( $P < 0,002$ ).

Genski izražaj S100A12 u djece oboljele od poliartikularnog tipa JIA bilo je statistički značajno viši u odnosu na djecu kontrolne skupine ( $P < 0,002$ ) (Tablica 8, Slike 20-26).

Tablica 8. Serumska razina i genski izražaj S100A12 u djece s JIA i djece kontrolne skupine

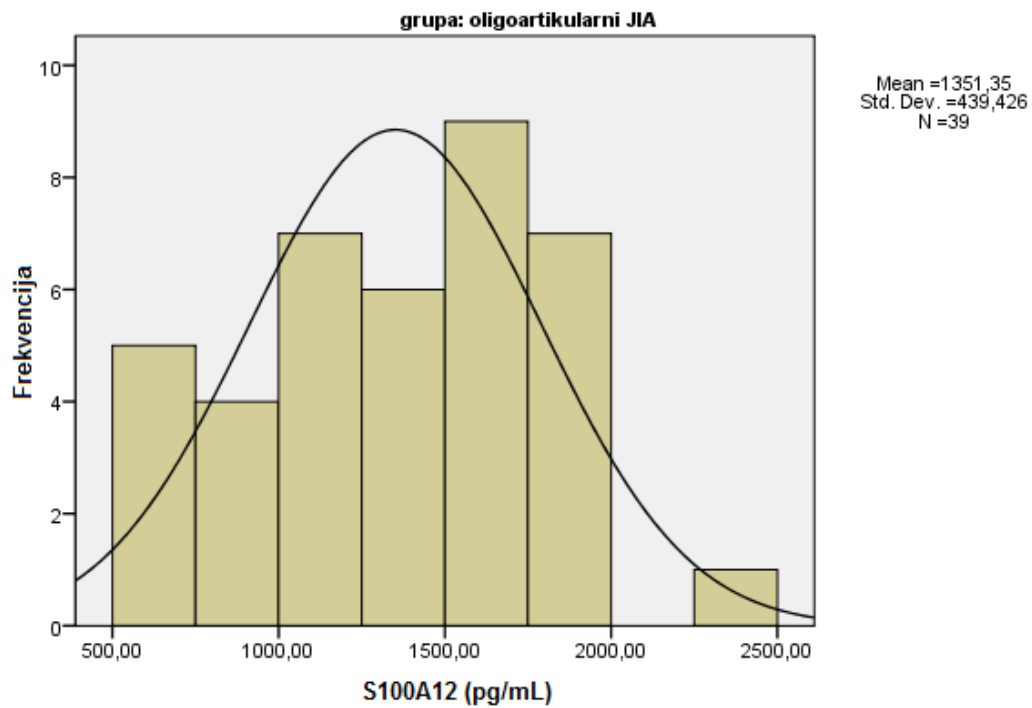
Skupine	S100A12	
	Protein u serumu [pg/mL]	Genski izražaj u MNK (arbitrarne jedinice)
Kontrolna skupina (n=28)	1643,27 732,13 – 2774,12	79,58 21,91 – 854,73
Oligoartikularni tip JIA (n=39)	1445,22 556,70 – 2379,94	157,73* 62,51 – 778,72
Poliartikularni tip JIA (n=35)	2412,25* 1105,97 – 18793,42	182,35* 0,00 – 6793,62
Sistemski tip JIA (n=28)	1610,48 1034,88 – 3820,97	203,29* 58,02 – 2260,62

\* $P < 0,05$  (Mann-Whitney test); S100A12 = protein koji veže kalcij S100A12; MNK = mononukleari. Podaci su izraženi medijanom i rasponom.



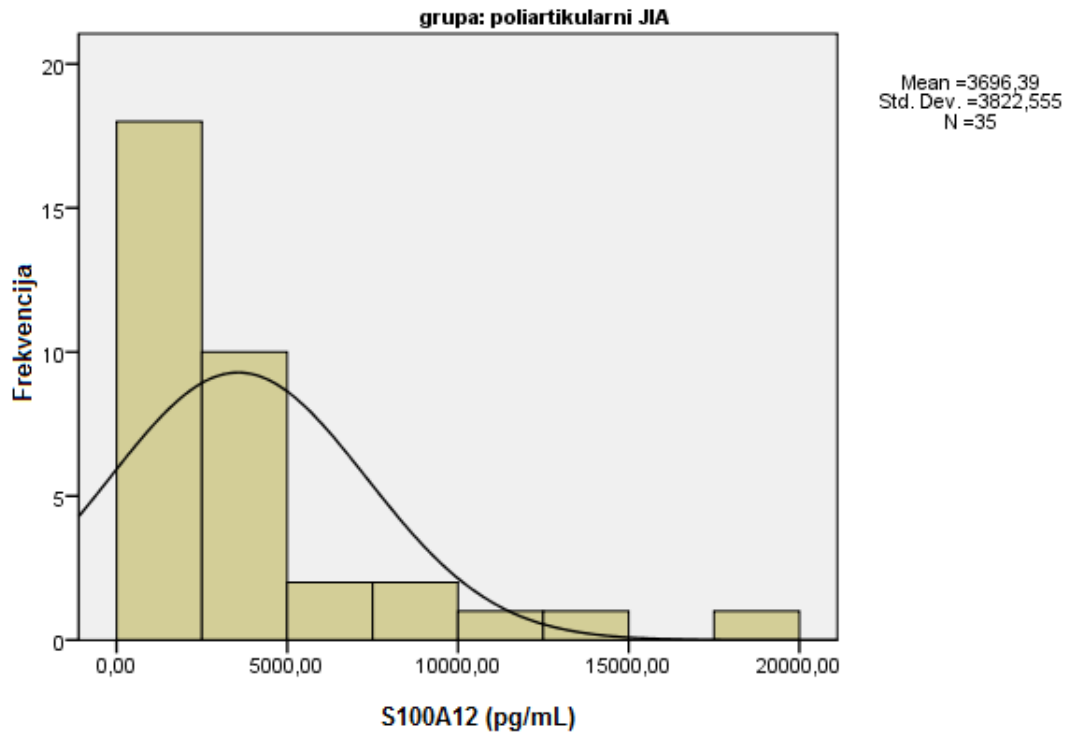
Slika 20. Vrijednosti serumske razine proteina S100A12 koji veže kalcij u djece kontrolne skupine (n=28)

Prosječna vrijednost serumske razine proteina S100A12 u djece sistemskog tipa JIA iznosila je 1728,31 pg/mL (medijan 1610,48, raspon od 1034,88 do 3820,97) (Tablica 8).



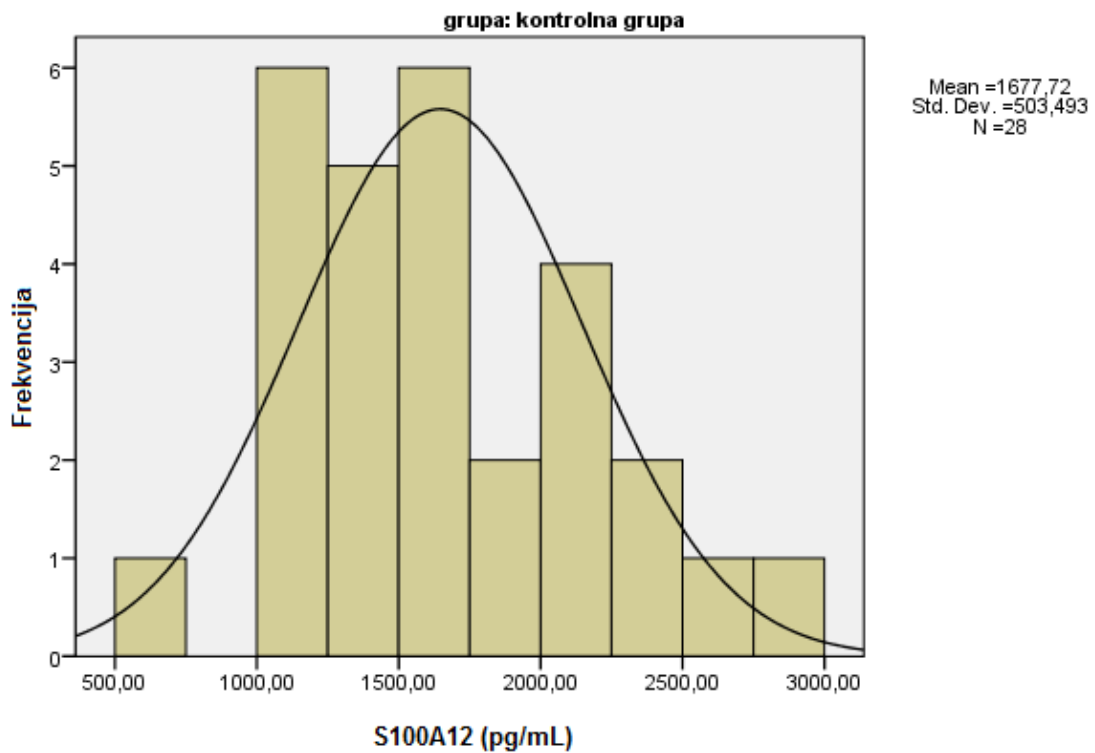
Slika 21. Vrijednosti serumske razine proteina S100A12 koji veže kalcij u serumu djece s oligoartikularnim tipom JIA (n=39)

Prosječna vrijednost serumske razine proteina S100A12 u djece s oligoartikularnim tipom JIA iznosila je 1351,35 pg/mL (medijan 1445,22, raspon od 556,70 do 2379,94) (Tablica 8).



Slika 22. Vrijednosti serumske razine proteina S100A12 koji veže kalcij u serumu djece s poliartikularnim tipom JIA (n=35)

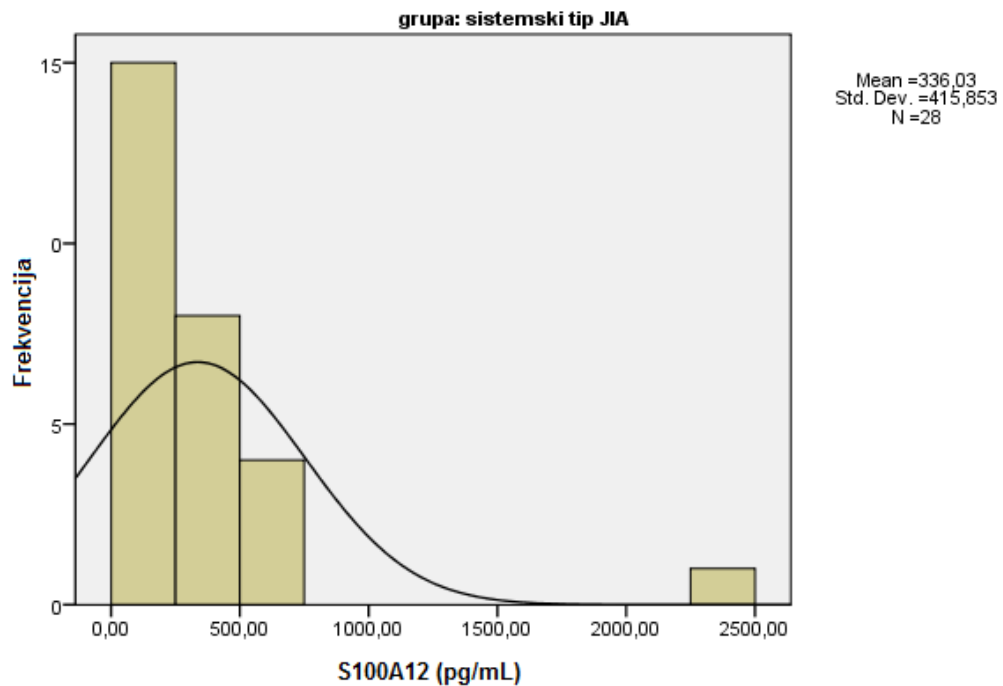
Prosječna vrijednost serumske razine proteina S100A12 u djece s poliartikularnim tipom JIA iznosila je 3696,39 pg/mL (medijan 2412,25, raspon od 1105,97 do 18793,42) (Tablica 8).



Slika 23. Vrijednosti serumske razine proteina S100A12 koji veže kalcij u serumu djece kontrolne skupine (n=28)

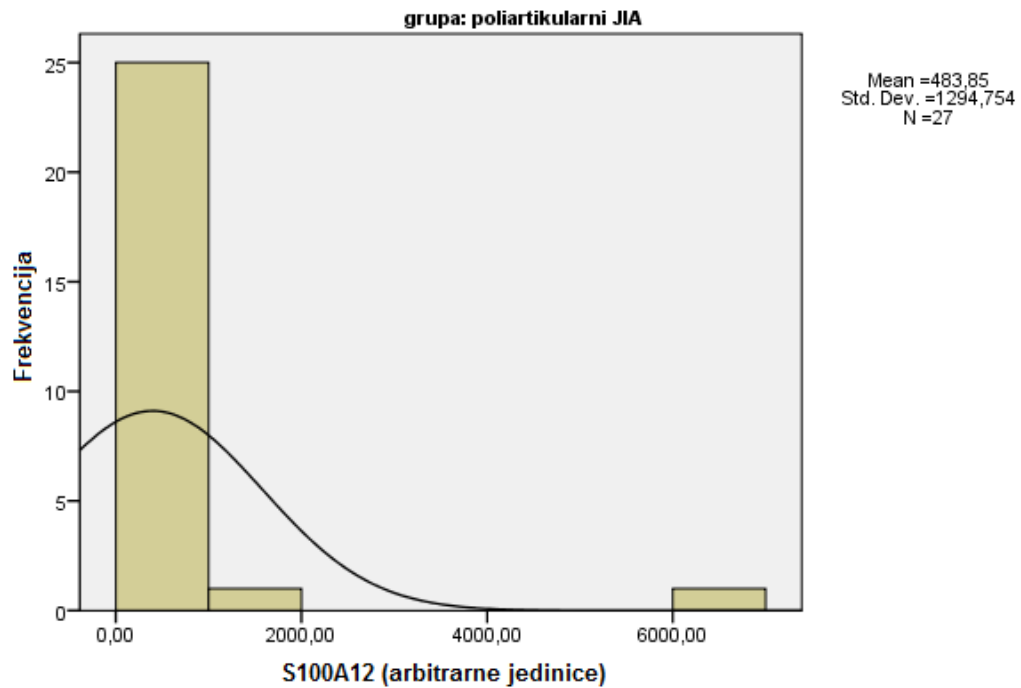
Prosječna vrijednost serumske razine proteina S100A12 u djece kontrolne skupine iznosila je 1677,72 pg/mL (medijan 1643,27, raspon od 732,13 do 2774,12) (Tablica 8).





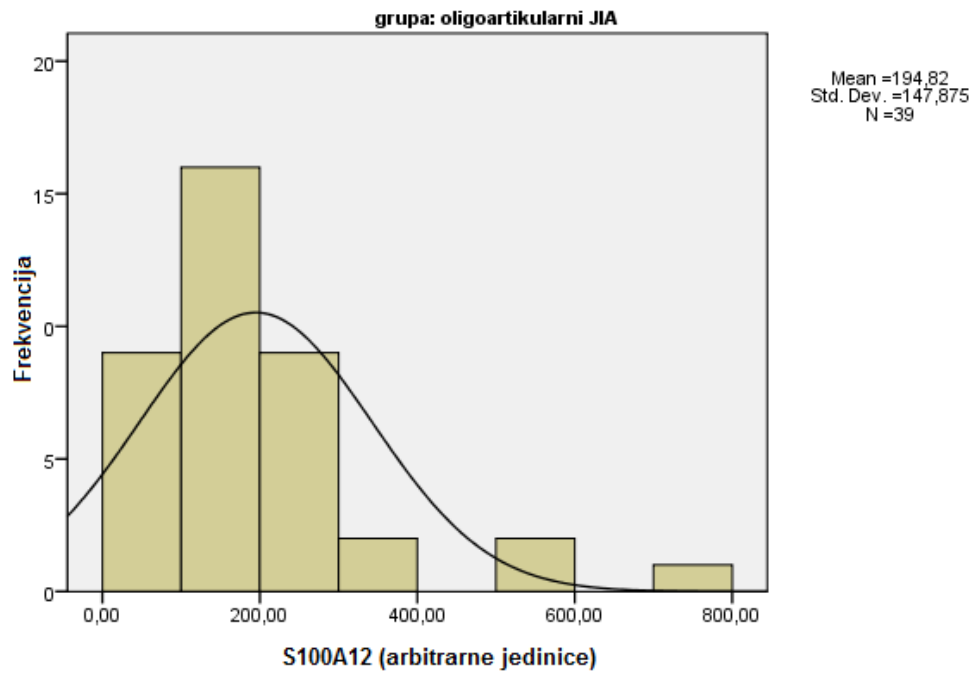
Slika 24. Genski izražaj alarmina S100A12 koji veže kalcij u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece sa sistemskim JIA (n=28)

Prosječna vrijednost izražaja gena S100A12 u djece sa sistemskim JIA iznosila je 336,03 arbitrarnih jedinica (medijan 203,29, raspon od 58,02 do 2260,62) (Tablica 8).



Slika 25. Genski izražaj alarmina S100A12 koji veže kalcij u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece s poliartikularnim tipom JIA (n=35)

Prosječna vrijednost gena S100A12 u djece s JIA iznosila je 483,85 arbitralnih jedinica (medijan 182,35 uz raspon od 0,00 do 6793,62) (Tablica 8).



Slika 26. Genski izražaj alarmina S100A12 koji veže kalcij u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece s oligoartikularnim tipom JIA (n=39)

Prosječna vrijednost izražaja gena S100A12 u djece s oligoartikularnim JIA iznosila je 194,82 arbitralnih jedinica (medijan 157,73, raspon od 62,51 do 778,72) (Tablica 8).

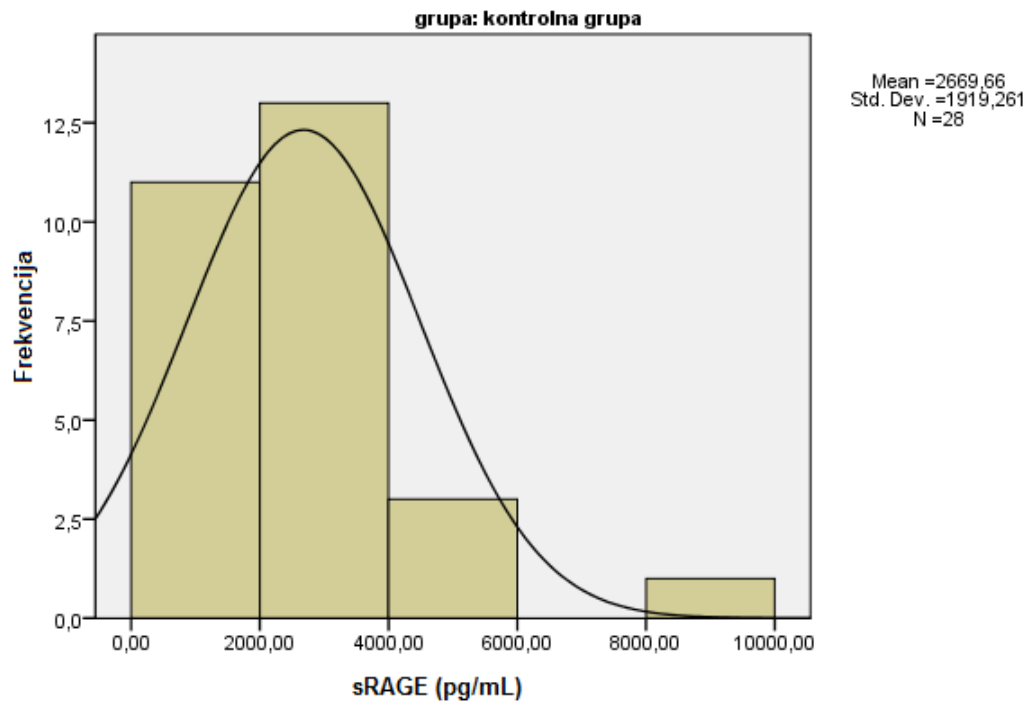
### 5.5. Analiza razine proteina i genskog izražaja sRAGE bolesnika s oligoartikularnim, poliartrikularnim i sistemskim tipom JIA

Usporedbom serumske razine sRAGE djece oboljele od sistemskog tipa JIA i kontrolne skupine nađena je statistički značajno niža razina proteina ( $P < 0,036$ ) kao i niži genski izražaj sRAGE ( $P < 0,007$ ) u bolesne djece. U djece s poliartrikularim tipom JIA serumske razine proteina ( $P < 0,50$ ) i genski izražaj sRAGE ( $P < 0,024$ ) bile su niže u odnosu na djecu kontrolne skupine pri čemu su rezultati bili statistički značajni. Također, razine topljiva sRAGE u djece oboljele od oligoartikularnog tipa JIA ( $P < 0,306$ ) te izražaj gena za RAGE ( $P < 0,914$ ) bili su sniženi u odnosu na kontrolnu skupinu, ali podaci nisu bili statistički značajni (Tablica 9, Slike 27-34).

Tablica 9. Serumska razina te genski izražaj sRAGE u djece s JIA te u djece kontrolne skupine

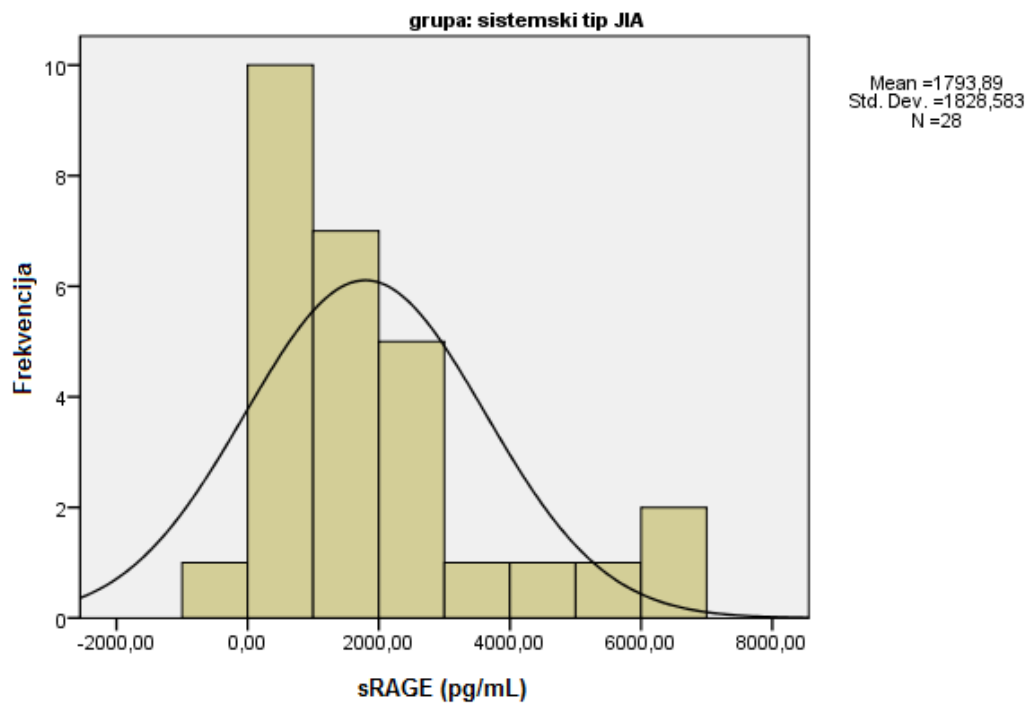
Skupine	sRAGE	
	Protein u serumu [pg/mL]	Genski izražaj u MNK (arbitrarne jedinice)
Kontrolna skupina (n=28)	2275,80 162,37 – 9206,38	47,26 0,00 – 397,13
Oligoartikularni tip JIA (n=39)	1885,44 225,60 – 5137,92	41,49 0,00 – 2589,15
Poliartikularni tip JIA (n=35)	1757,76* 230,40 – 4730,88	19,80* 0,00 – 298,70
Sistemski tip JIA (n=28)	1290,24* 90,61 – 6634,42	19,84* 1,15 – 161,86

\* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test); sRAGE topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; MNK mononukleari. Podaci su izraženi medijanom i rasponom.



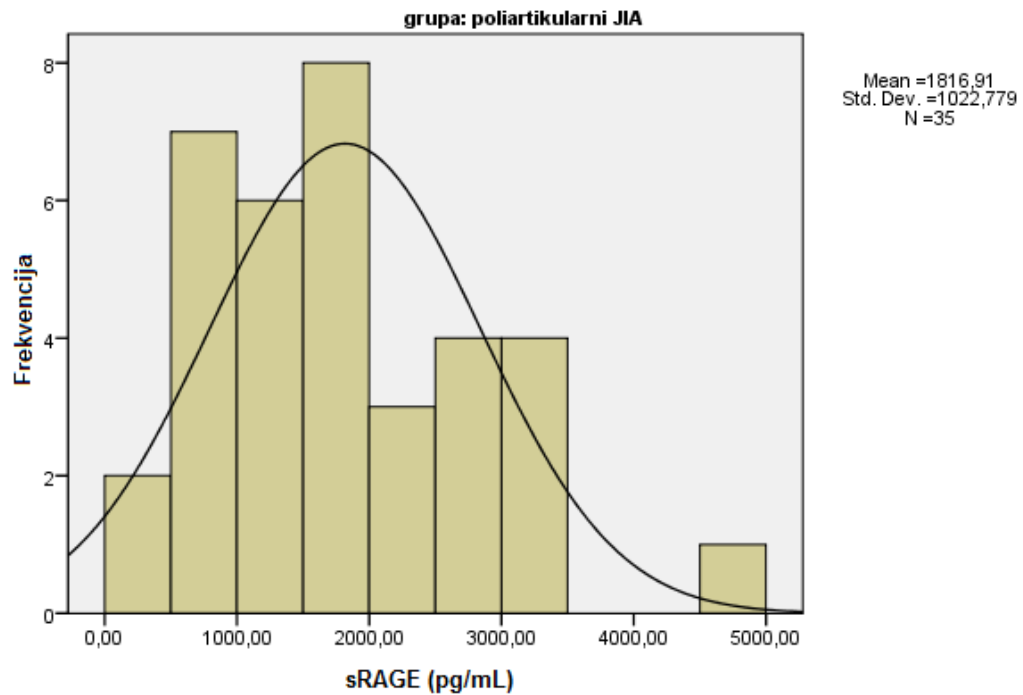
Slika 27. Vrijednosti serumske razine receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (sRAGE) u djece kontrolne skupine (n=28)

Prosječna vrijednost sRAGE u serumu djece kontrolne skupine iznosila je 2669,66 pg/mL (medijan 2275,80, raspon od 162,37 do 9206,38) (Tablica 9).



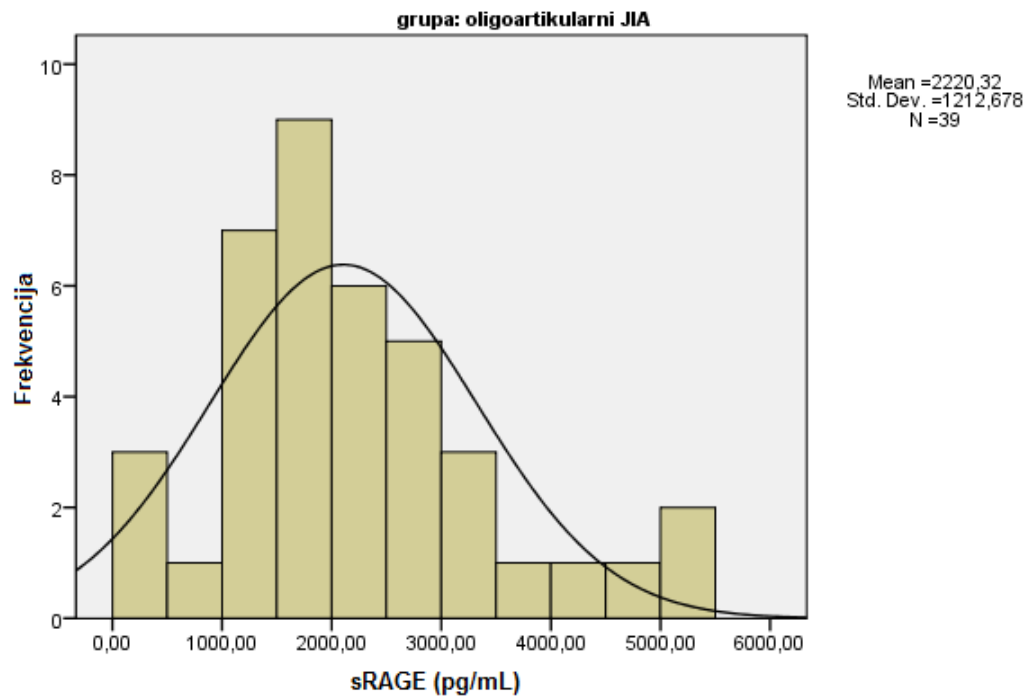
Slika 28. Vrijednosti serumske razine receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (sRAGE) u serumu djece sa sistemskim tipom JIA (n=28)

Prosječna vrijednost sRAGE u serumu djece sa sistemskim tipom JIA iznosila je 1793,89 pg/mL (medijan 1290,24, raspon od 90,61 do 6634,42 ) (Tablica 9).



Slika 29. Vrijednosti serumske razine receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (sRAGE) u serumu djece s poliartikularnim tipom JIA (n=35)

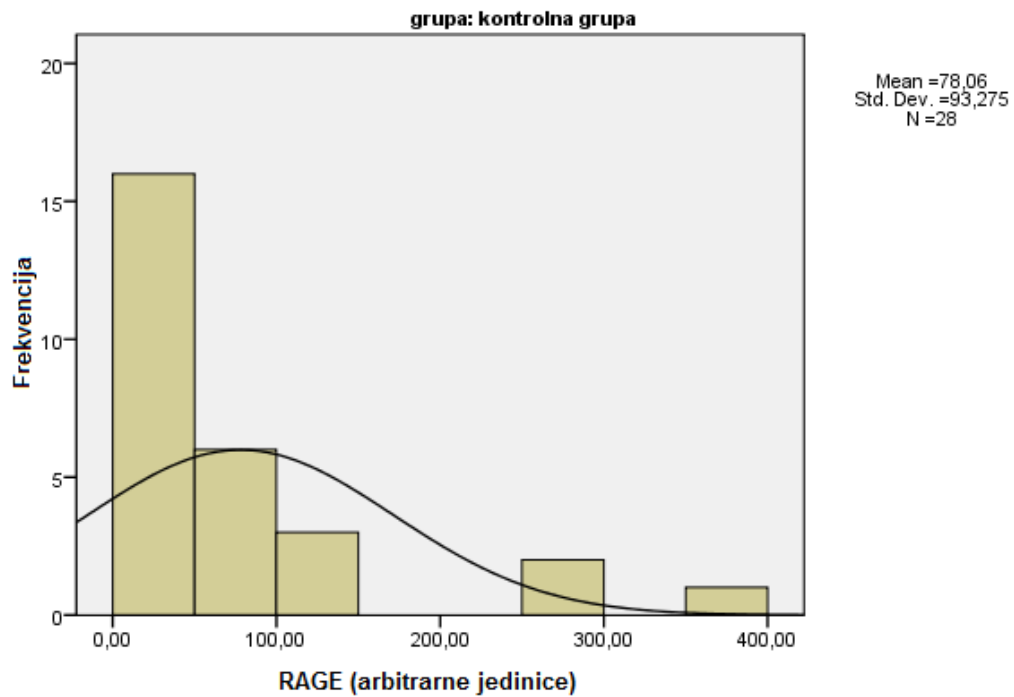
Prosječna vrijednost sRAGE u djece s poliartikularnim JIA iznosila je 1816,91 pg/mL (medijan 1757,76, raspon od 230,40 do 4730,88) (Tablica 9).



Slika 30. Vrijednosti serumske razine receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (sRAGE) u serumu djece s oligoartikularnim tipom JIA (n=39)

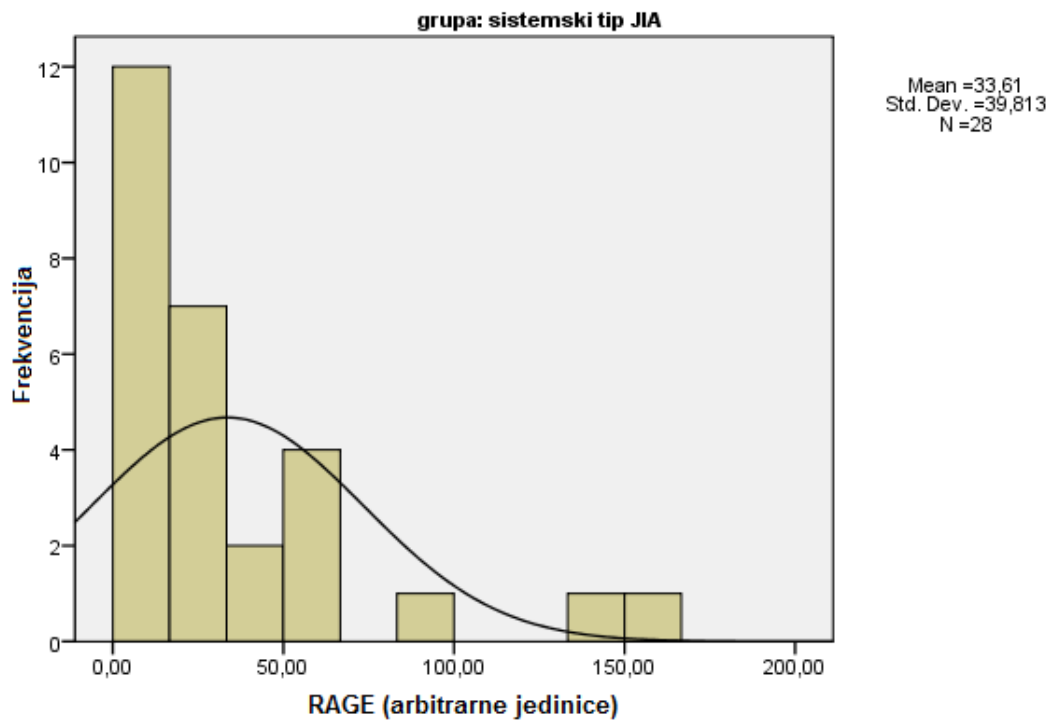
Prosječna vrijednost sRAGE u djece s oligoartikularnim tipom JIA iznosila je 2220,32 pg/mL (medijan 1885,44, raspon od 225,60 do 5137,92) (Tablica 9).





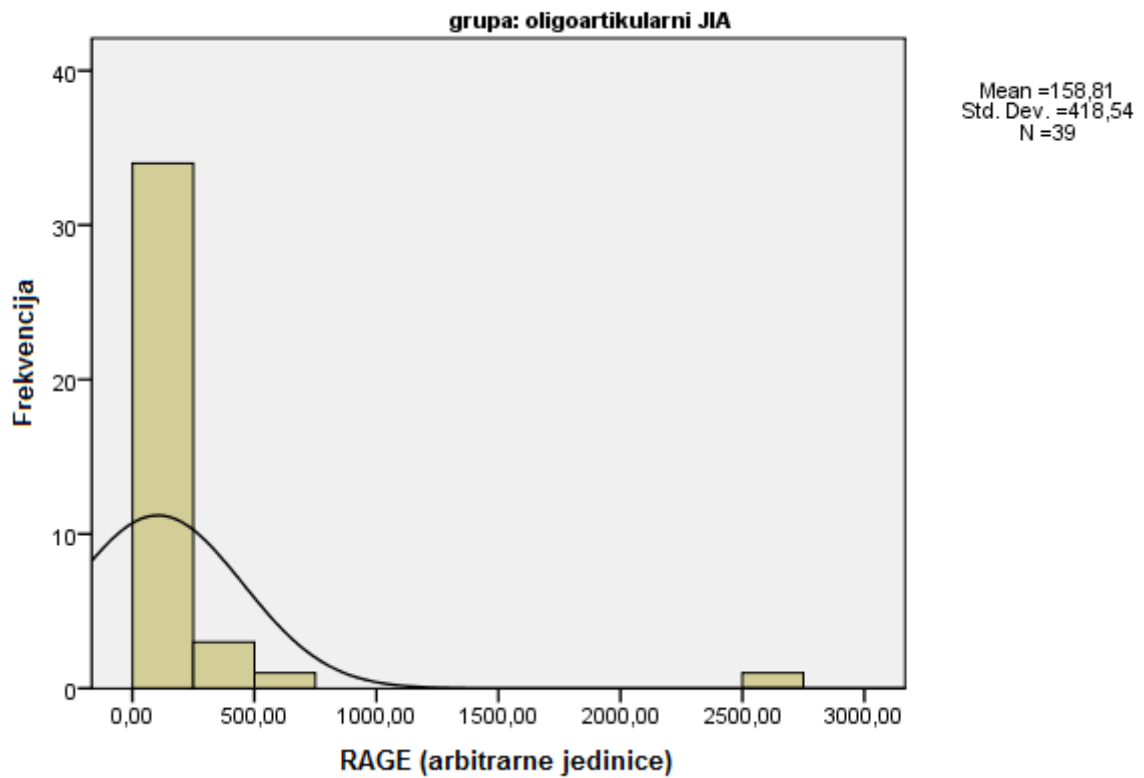
Slika 31. Izražaj gena RAGE (arbitrarne jedinice) u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika (n=28)

Genski izražaj RAGE u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolne skupine iznosio je 78,06 arbitralnih jedinica (medijan 47,26, raspon od 0,00 do 397,13) (Tablica 9).



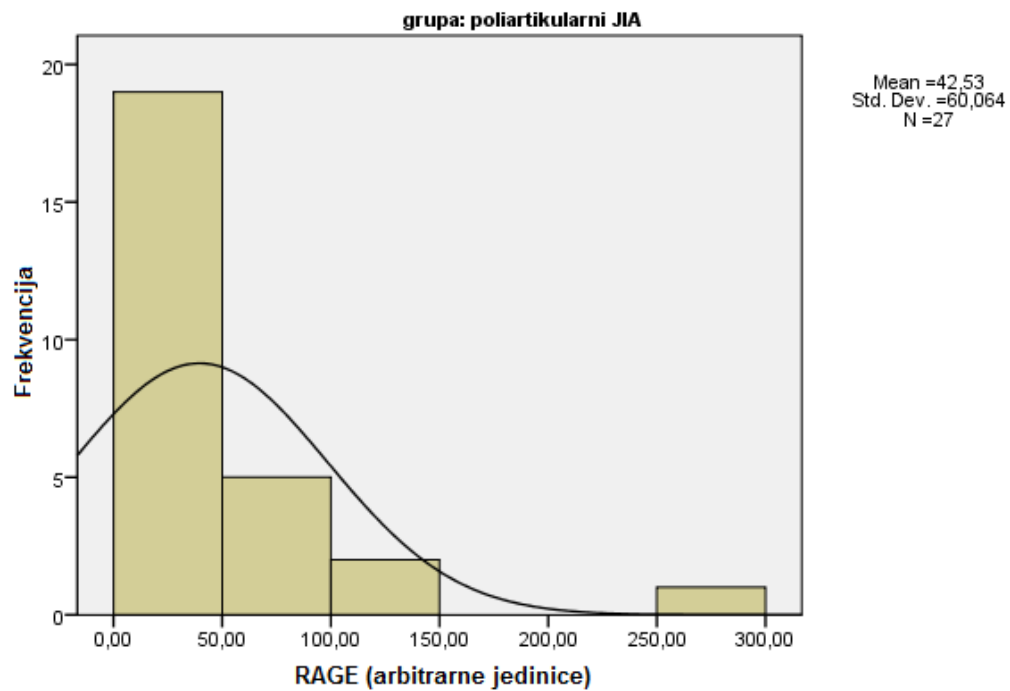
Slika 32. Izražaj gena RAGE (arbitrarne jedinice) u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece sa sistemskim JIA (n=28)

Prosječna vrijednost genskog izražaja RAGE u djece sa sistemskim JIA iznosi 33,61 arbitrarnih jedinica (medijan 19,84, raspon od 1,15 do 161,86 ) (Tablica 9).



Slika 33. Izražaj gena RAGE (arbitrarne jedinice) u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece s oligoartikularnim tipom JIA (n=39)

Prosječna vrijednost genskog izražaja RAGE u djece s oligoartikularnim JIA iznosila je 158,81 arbitrarnih jedinica (medijan 41,49, raspon od 0,00 do 2589,15) (Tablica 9).



Slika 34. Izražaj gena RAGE (arbitrarne jedinice) u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece s poliartikularnim tipom JIA (n=35)

Prosječna vrijednost genskog izražaja RAGE u djece s poliartikularnim tipom JIA iznosila je 42,53 arbitrarnih jedinica (medijan 19,80, raspon od 0,00 do 298,70) (Tablica 9).

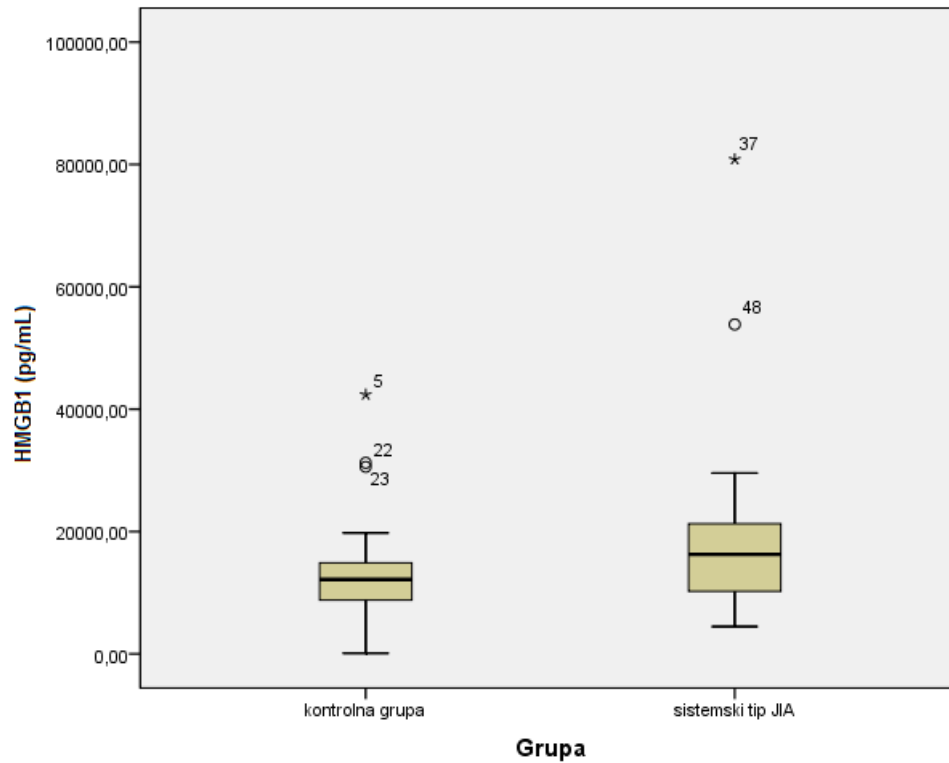
## 5.6. Usporedba razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE u ispitanika sa sistemskim tipom JIA i djece kontrolne skupine

U sistemskom tipu JIA serumska razina kao i genski izražaj proupalnog alarmina HMGB1 bile su statistički značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su za alarmin S100A12 dobivene statistički značajne razlike samo u povišenoj razini genskog izražaja. Serumska razina, genski izražaj sRAGE bili su statistički značajno sniženi u sistemskom tipu JIA (Tablica 10, Slike 35-37).

Tablica 10. Usporedba serumskih vrijednosti alarmina i njihova genskog izražaja između kontrolne skupine i djece sa sistemskim JIA

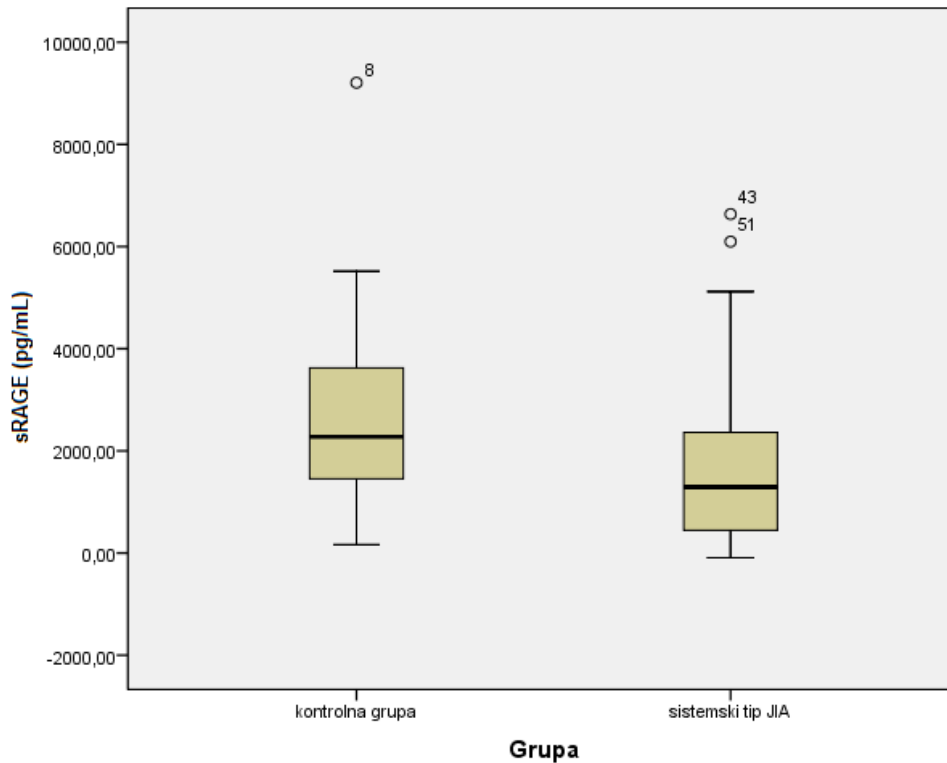
	Med (Kontrola)	Med (sistemski JIA)	Mann-Whitney test	P vrijednost
<b>HMGB1 (pg/mL)</b>	12171,87	16253,70*	261,0	0,032
<b>S100A12 (pg/mL)</b>	1643,27	1610,48	387,5	0,941
<b>sRAGE (pg/mL)</b>	2275,80	1290,24*	264,0	0,036
<b>HMGB1 (arb. jed.)</b>	47,68	121,00	93,0	0,001
<b>S100A12 (arb. jed.)</b>	79,58	203,29*	134,0	0,001
<b>sRAGE (arb. jed.)</b>	47,26	19,84*	227,0	0,007

\*P < 0.05 (Mann-Whitney test); Med=medijan; HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12=protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE=topljiv receptori za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb.jed.=genski izražaj u arbitrarnim jednicama.



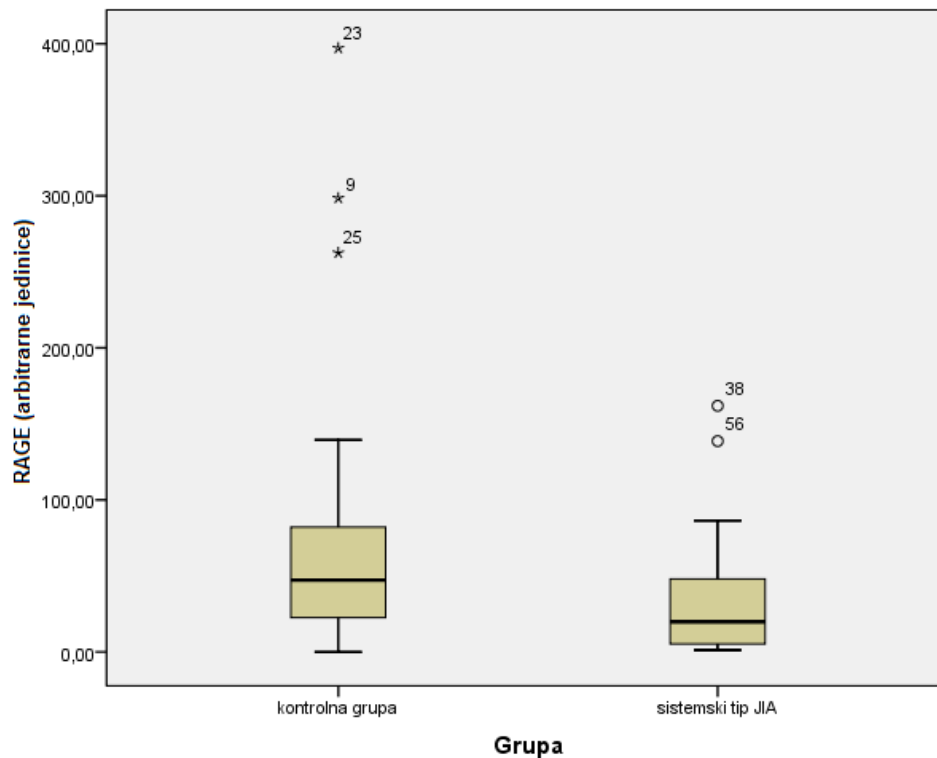
Slika 35. Serumska razina proteina HMGB1 u djece sa sistemskim tipom JIA u odnosu na djecu kontrolne skupine

Na slici 35. su prikazane usporedbe distribucija serumskog proteina HMGB1 u djece sa sistemskim JIA u odnosu na djecu kontrolne skupine. Vidljivo je da je serumska razina alarmina HMGB1 viša u djece sa sistemskim JIA (medijan 16253,70 pg/mL) u odnosu na djecu kontrolne skupine (medijan 12171,87 pg/mL). Rezultati su bili statistički značajni ( $P < 0,032$ ) (Tablica 10).



Slika 36. Prikaz serumske razine topljiva receptora za produkte uznapredovale glikozilacije (sRAGE) u djece sa sistemskim JIA u odnosu na djecu kontrolne skupine

Serumska razina topljivog receptora sRAGE statistički značajno je bila niža u djece oboljele od sistemskog JIA usporedno s kontrolnom skupinom ( $P < 0,036$ ). Medijan vrijednosti serumske razine topljiva receptora za produkte uznapredovale glikozilacije sRAGE u djece sa sistemskim JIA iznosio je 1290,24 pg/mL, dok je u kontrolnoj skupini iznosio 2275,80 pg/mL (Tablica 10).



**Slika 37.** Prikaz razine genskog izražaja receptora za produkte uznapredovale glikozilacije (RAGE) u mononuklearnim stanicama periferne krvi djece sa sistemskim tipom JIA i u kontrolnih ispitanika

Na slici 37. je prikazana usporedba distribucija genskog izražaja RAGE u djece sa sistemskim JIA prema djeci kontrolne skupine. Vidljivo je da je genski izražaj niži u djece sa sistemskim JIA (medijan 19,84 arbitrarnih jedinica) u odnosu na kontrolnu skupinu (medijan 47,26 arbitrarnih jedinica) ( $P < 0,007$ ) (Tablica 10).



### 5.7. Usporedba razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i RAGE u ispitanika sa sistemskim tipom JIA u odnosu na djecu oboljelu od artikularnih tipova JIA

Uspoređujući razine alarmina HMGB1 i S100A12 u serumu ispitanika sa sistemskim tipom JIA u odnosu na razinu alarmina u djece s artikularnim tipovima JIA, pokazalo se da su razine proteina HMGB1 ( $P < 0,001$ ) i S100A12 ( $P < 0,024$ ) bile statistički značajno više u sistemskom nego u oligoartikularnom tipu JIA (Tablica 11, Slike 38 i 39). Za njihov topljivi receptor sRAGE dokazana je snižena serumska razina u djece sa sistemskim tipom JIA u odnosu na djecu s oligoartikularnim JIA što se također pokazalo statistički značajnim ( $P < 0,023$ ) (Tablica 11, Slika 40). Genski izražaj RAGE bio je značajno niži u sistemskom u odnosu prema oligoartikularnom tipu JIA ( $P < 0,013$ ), dok statistički značajna razlika genskog izražaja za alarmine HMGB1 te S100A12 između navedenih skupina nije nađena (Tablica 11, Slika 43).

Tablica 11. Serumska razina i genska ekspresija HMGB1, S100A12 i sRAGE u djece sa sistemskim i oligoartikularnim JIA

Alarmin	Serumska razina [pg/mL]		Genski izražaj u MNK [arbitrarne jedinice]	
	Sistemski JIA (n=28)	Oligoartikularni JIA (n=39)	Sistemski JIA	Oligoartikularni JIA
<b>HMGB1</b>	16253,70* 4449,38 – 80844,98	4326,56 108,89 – 20047,52	47,68 10,25 – 161,85	131,88 38,20 – 1323,68
<b>S100A12</b>	1610,48* 1034,88 – 3820,97	1445,22 556,70 – 2379,94	203,29 58,02 – 2260,62	157,73 62,51 – 778,72
<b>sRAGE</b>	1290,24* -90,61 – 6634,42	1885,44 225,60 – 5137,92	19,84* 1,15 – 161,86	41,49 0,00 – 2589,15

\* $P < 0.05$  (Mann-Whitney test); HMGB1 protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12 protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; MNK monoonukleari. Podaci su izraženi medijanom i rasponom.

Usporedbom vrijednosti alarmina između djece sa sistemskim i poliartikularnim tipom JIA utvrđene su statistički značajne razlike u serumskoj razini proteina HMGB1 i S100A12 pri čemu je u sistemskom tipu bila povišena razina HMGB1 alarmina ( $P < 0,002$ ), dok se u poliartikularnom tipu ( $P < 0,003$ ) pokazala povišena razina alarmina S100A12 (Tablica 12, Slika 41).

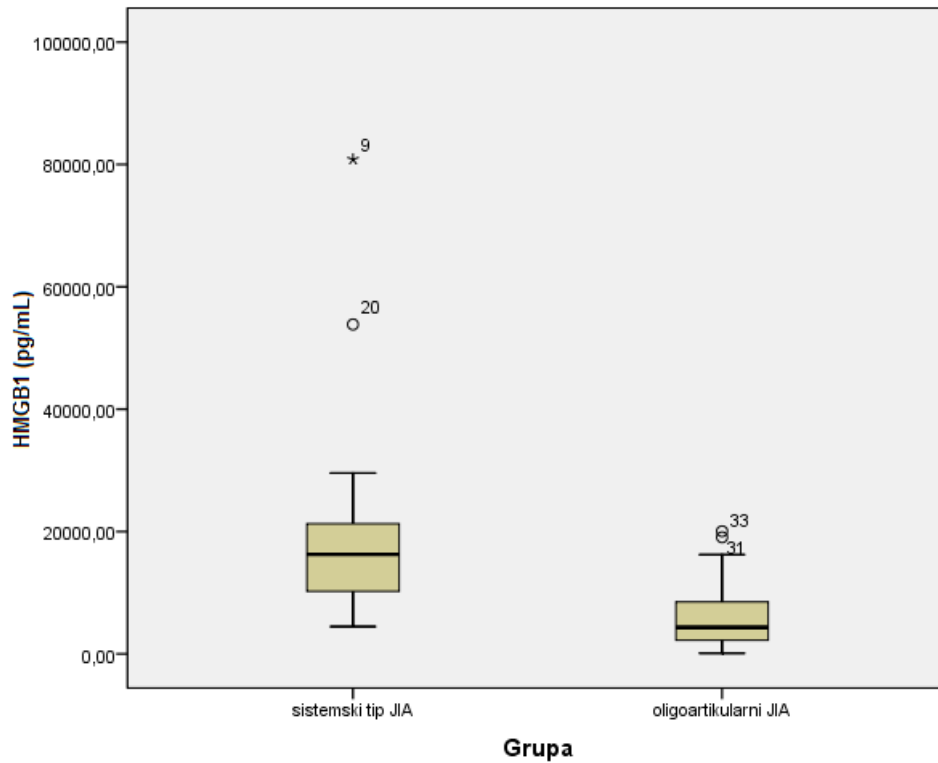
Serumska razina proteina sRAGE bila je niža u sistemskom tipu u odnosu na poliartikularni tip JIA, ali bez statističke značajnosti ( $P < 0,213$ ) (Tablica 12, Slika 42).

Nije dokazana statistički značajna razlika genskog izražaja alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora sRAGE između sistemskog i poliartikularnog tipa JIA (Tablica 12, Slika 43).

Tablica 12. Serumska razina i genski izražaj alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora sRAGE u djece sa sistemskim i djece s poliartikularnim tipom JIA u inicijalnoj fazi bolesti

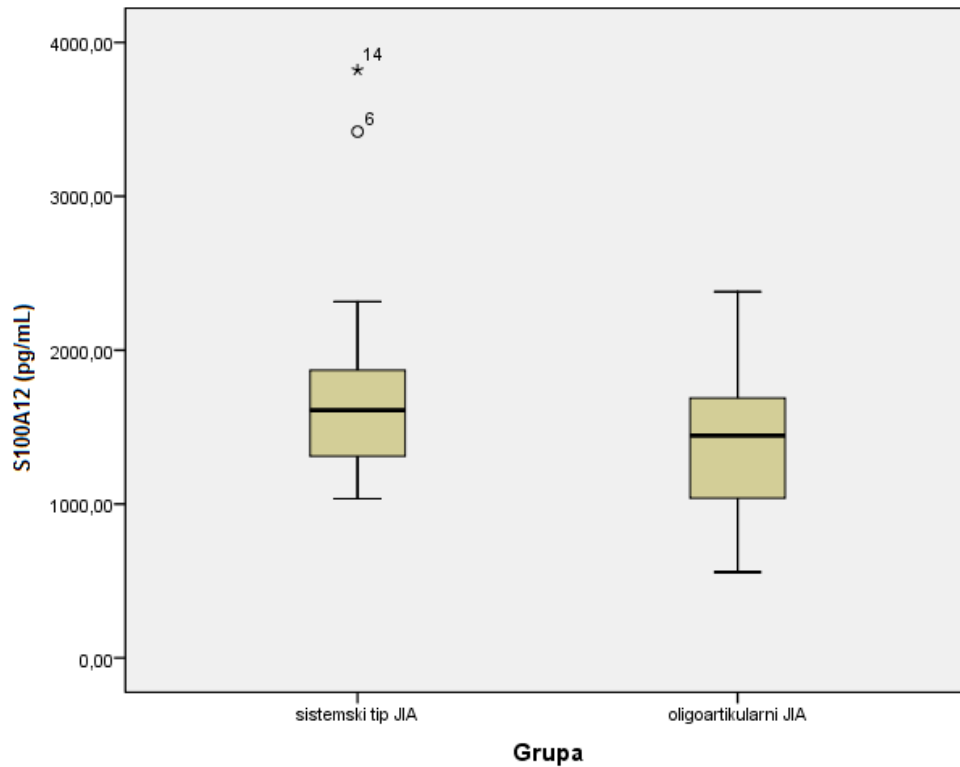
Alarmin	Serumska razina [pg/mL]		Genski izražaj na MNK [arbitrarne jedinice]	
	Sistemski JIA (n=28)	Poliartikularnim JIA (n=35)	Sistemski JIA	Poliartikularnim JIA
<b>HMGB1</b>	16253,70* 4449,38 – 80844,98	4374,04 273,50 – 93493,88	47,68 10,25 – 161,85	75,23 0,00 – 543,40
<b>S100A12</b>	1610,48 1034,88 – 3820,97	2412,25* 1105,97 – 18793,42	203,29 58,02 – 2260,62	182,35 0,00 – 6793,62
<b>RAGE</b>	1290,24 -90,61 – 6634,42	1757,76 230,40 – 4730,88	19,84 1,15 – 161,86	19,80 0,00 – 298,70

\* $P < 0,05$  (Mann-Whitney test) HMGB1= protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12 = protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE = topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; MNK = mononukleari. Podaci su izraženi medijanom i rasponom.



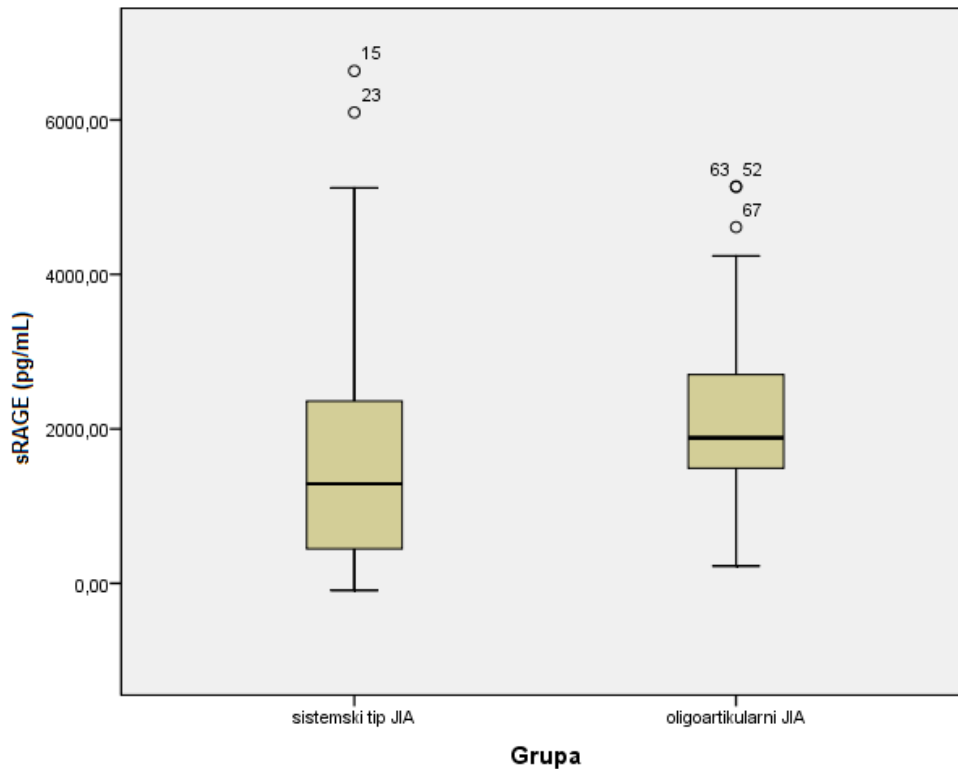
Slika 38. Prikaz serumske razine proteina HMGB1 u djece sa sistemskim tipom JIA u odnosu na serumsku razinu proteina HMGB1 u djece s oligoartikularnim tipom JIA

Na slici 38. prikazane su usporedbe distribucija HMGB1 u djece sa sistemskim tipom JIA i djece s oligoartikularnim tipom JIA. Vidljivo je da je razina alarmina HMGB1 viša u serumu djece sa sistemskim JIA (medijan 16253,70 pg/mL) u onosu na djecu oboljelu od oligoartikularnog tipa JIA (medijan 4326,56 pg/mL). ( $P < 0,000$ ) (Tablica 11).



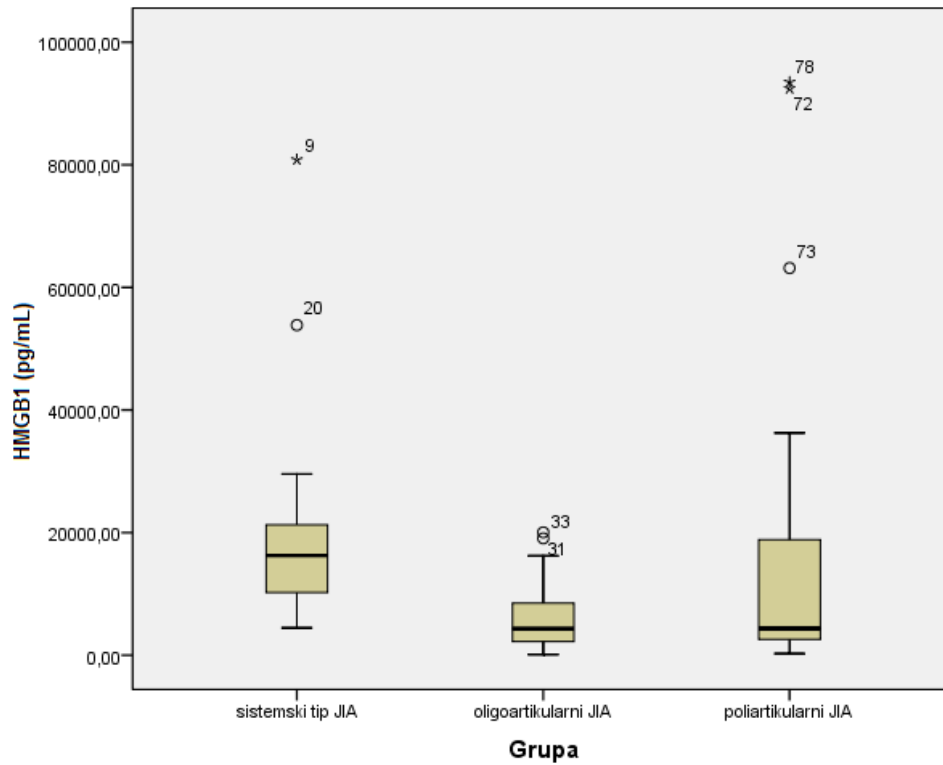
Slika 39. Vrijednosti razine proteina S100A12 u serumu djece sa sistemskim JIA u odnosu na skupinu djece oboljele od oligoartikularnog tipa JIA

Na slici 39. prikazane su usporedbe distribucija S100A12 u djece sa sistemskim tipom JIA i djece s oligoartikularnim tipom JIA. Serumska razina alarmina S100A12 viša je u djece oboljele od sistemskog JIA (medijan 1610,48 pg/mL) u odnosu na djecu s oligoartikularnim tipom JIA (medijan 1445,22 pg/mL) ( $P < 0,024$ ) (Tablica 11).



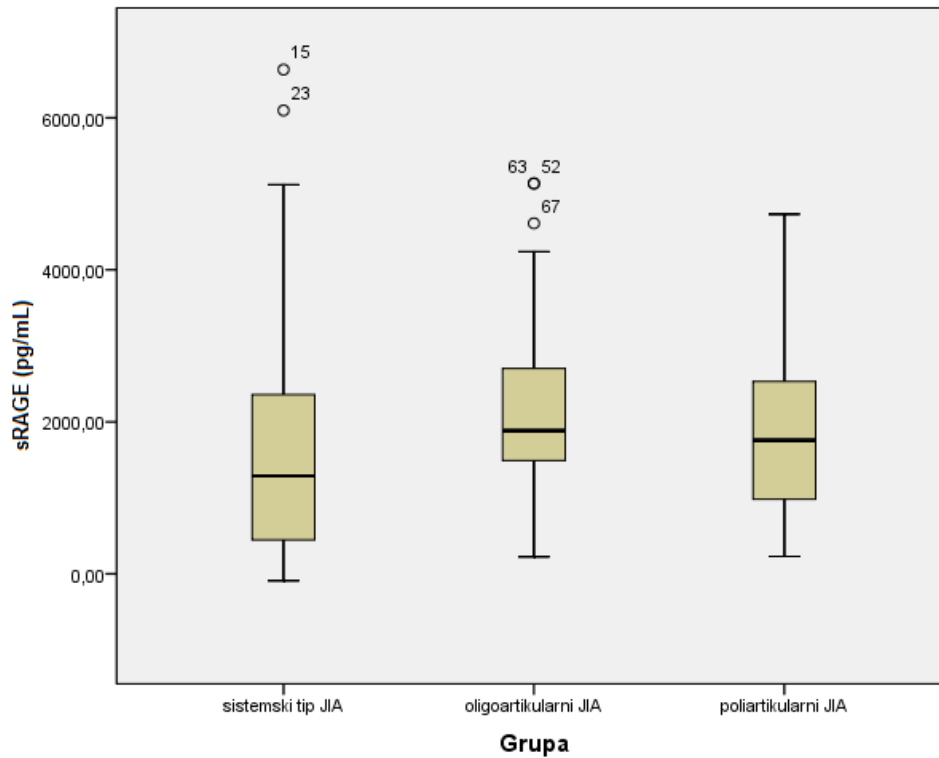
Slika 40. Prikaz serumske razine topljiva receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije (sRAGE) u djece sa sistemskim JIA u odnosu na djecu s oligoartikularnim tipom bolesti

Iz slike 40. vidljivo je da je razina topljivog sRAGE u serumu djece sa sistemskim JIA niža (medijan 1290,24 pg/mL) u odnosu na djecu s oligoartikularnim tipom JIA (medijan 1885,44 pg/mL). ( $P < 0,023$ ) (Tablica 11).



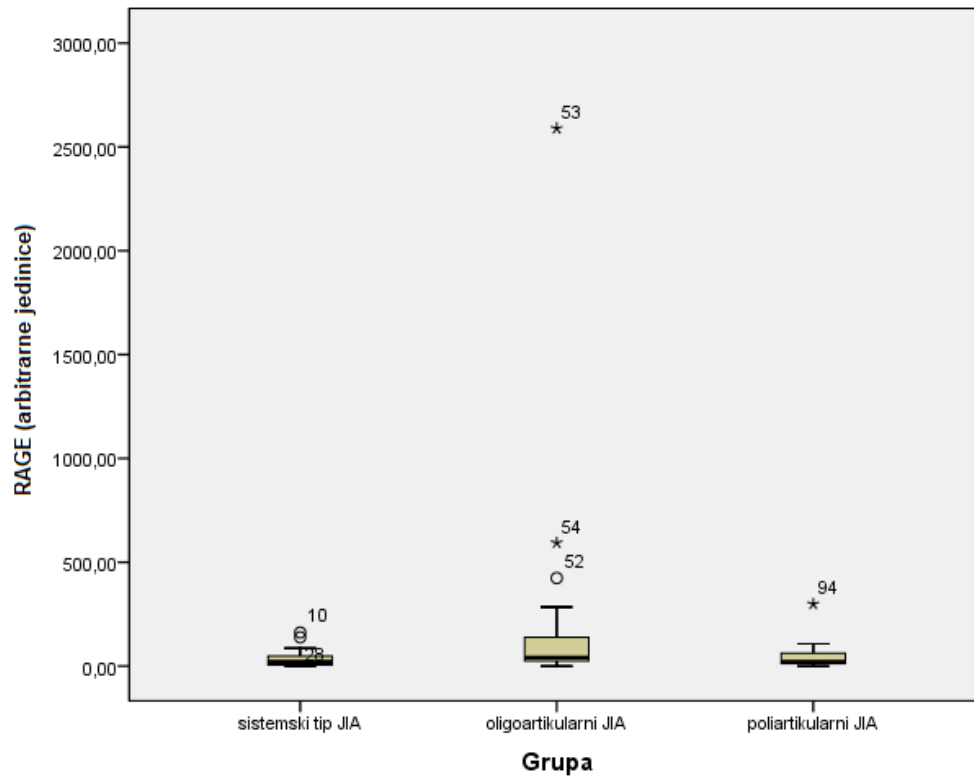
Slika 41. Usporedba sistemskog, oligoartikularnog i poliartikularnog tipa JIA prema razini proteina HMGB1

Iz slike 41. je vidljivo da je viša razina proteina HMGB1 bila prisutna u krvi bolesnika sa sistemskim JIA (medijan 16253,70 pg/mL) u odnosu na skupinu djece s oligoartikularnim tipom JIA (medijan 4326,56 pg/mL) i djece s poliartikularnim tipom JIA (medijan 4374,04 pg/mL) (Tablica 11 i 12).



Slika 42. Usporedba sistemskog, oligoartikularnog i poliartikularnog tipa JIA prema serumskoj razini receptora za produkte uznapredovale glikozilacije (sRAGE)

Iz slike 42. je vidljivo da je najniža serumska razina topljiva receptora sRAGE bila u serumu bolesnika sa sistemskim JIA. Medijan vrijednosti sRAGE u djece sa sistemskim JIA iznosio je 1290,24 pg/mL, u djece s poliartikularnim tipom JIA 1757,76 pg/mL ( $P < 0,05$ ), dok je u skupini djece s oligoartikularnim tipom JIA iznosio 1885,44 pg/mL (Tablica 11 i 12).



Slika 43. Usporedba sistemskog, oligoartikularnog i poliartikularnog tipa JIA prema genskom izražaju za topljivi receptor sRAGE

Iz slike 43. vidljivo je da je pojavnost gena za topljivi receptor sRAGE, bila najniža u djece sa sistemskim tipom JIA (medijan 19,84 arbitrarnih jedinica), potom u djece s poliartikularnim tipom JIA (medijan 19,80 arbitrarnih jedinica) te u serumu djece s oligoartikularnim tipom JIA (medijan 41,49 arbitrarnih jedinica) (Tablice 11 i 12).



### 5.8. Analiza serumske razine proteina i genskog izražaja HMGB1, S100A12 i njihova topljiva receptora sRAGE u djece s JIA neovisno o tipu bolesti

U skupini ispitanika s JIA bilo je 55 ispitanika ženskog i 47 ispitanika muškog spola. Medijan dobi bio je 13 godina (minimum 1, maksimum 16 godina).

U kontrolnoj skupini bilo je 20 ispitanika ženskog i 8 ispitanika muškog spola. Medijan dobi bio je 9 godina (minimum 3, maksimum 16 godina).

Nasuprot različitoj razini alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova receptora sRAGE u pojedinim tipovima JIA u odnosu na kontrolnu skupinu, nije dokazana značajna razlika u serumskoj razini navedenih alarmina te njihova topljiva receptora između JIA bolesnika neovisno o tipu bolesti i kontrolne skupine (Tablica 13).

Tablica 13. Serumska razina i genski izražaj alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora sRAGE u djece kontrolne skupine

	$\bar{x}$	Med	SD	Min	Max	25%	75%
HMGB1 (pg/mL)	13302,92	12171,87	9232,65	108,89	42374,54	8712,91	15293,38
S100A12 (pg/mL)	1677,72	1643,27	503,49	732,13	2774,12	1245,86	2047,15
sRAGE (pg/mL)	2669,66	2275,80	1919,26	162,37	9206,38	1262,63	3675,09
HMGB1 (arb. jed.)	148,95	121,00	98,61	25,44	463,67	85,68	171,29
S100A12 (arb. jed.)	133,34	79,58	206,32	21,91	854,73	54,22	111,11
RAGE (arb. jed.)	78,06	47,26	93,28	0,00	397,13	22,28	85,19

$\bar{x}$  - aritmetička sredina; Med–medijan; SD–standardna devijacija; Min–minimum; Max–maksimum; 25% - donji kvartil; 75%-gornji kvartil; HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12=protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE=topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb. jed.=genski izražaj u arbitrarnim jednicama.

Tablica 14. Serumska razina alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora sRAGE u kontrolne skupine neovisno o tipovima JIA

	$\bar{x}$	Med	SD	Min	Max	25%	75%
HMGB1 (pg/mL)	12908,48	7888,34	17057,70	108,89	93493,88	3006,25	16643,22
S100A12 (pg/mL)	2259,50	1618,08	2492,51	556,70	18793,42	1250,47	2090,77
sRAGE (pg/mL)	1964,84	1736,32	1356,54	-90,61	6634,42	1047,45	2616,85
HMGB1 (arb. jed.)	120,71	85,61	155,79	0,00	1323,68	43,22	147,20
S100A12 (arb. jed.)	319,91	176,83	736,38	0,00	6793,62	112,99	308,82
RAGE (arb. jed.)	88,12	29,07	276,84	0,00	2589,15	13,06	66,45

$\bar{x}$  - aritmetička sredina; Med-medijan; SD-standardna devijacija; Min- minimum; Max- maksimum; 25%-donji kvartil; 75%-gornji kvartil; HMGB1= protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12=protein koji veže kalcij; sRAGE=topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb. jed.=genski izražaj u arbitramim jednicama.

### 5.9. Analiza povezanosti između serumske razine i genskog izražaja alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljivog receptora sRAGE u bolesnika s JIA neovisno o tipu bolesti u odnosu na rutinske laboratorijske nalaze za ocjenu upalne aktivnosti bolesti

U ovom radu nije nađena povezanost između serumske razine i genskog izražaja alarmina HMGB1, S100A12 i njihova receptora sRAGE s reaktantima akutne faze te razinom hemoglobina,  $\gamma$ -globulina, brojem trombocita, eritrocita i leukocita, osim statistički značajne povezanosti koja je utvrđena između serumske razine proteina HMGB1 i razine hematokrita (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,48;  $P < 0,011$ ) (Tablica 15).

Tablica 15. Korelacije rutinskih laboratorijskih pokazatelja aktivnosti bolesti i alarmina u bolesnika s JIA

		HMGB1 (pg/mL)	S100A12 (pg/mL)	sRAGE (pg/mL)	HMGB1 (arb. jed.)	S100A12 (arb. jed.)	RAGE (arb. jed.)
SE	Koef.korelacije	-,146	-,206	-,269	-,178	,108	-,094
	P vrijednost	,459	,294	,167	,366	,586	,634
CRP	Koef.korelacije	,012	,046	,002	-,38*	,094	-,031
	P vrijednost	,951	,816	,992	,044	,636	,876
Hb	Koef.korelacije	,245	,210	,190	,354	-,015	-,003
	P vrijednost	,208	,283	,333	,064	,941	,989
Htc	Koef.korelacije	,476*	,102	,083	,204	-,177	,071
	P vrijednost	,011	,606	,674	,298	,368	,721
Trc	Koef.korelacije	-,087	-,220	-,067	-,079	-,178	-,012
	P vrijednost	,659	,262	,736	,691	,364	,953
E	Koef.korelacije	,303	,178	,284	,204	-,004	-,088
	P vrijednost	,117	,366	,143	,297	,985	,657
L	Koef.korelacije	,007	,234	-,138	,109	-,037	-,100
	P vrijednost	,972	,231	,485	,583	,851	,614
$\gamma$ -globulin g/L	Koef.korelacije	-,205	,039	-,121	-,048	-,195	,089
	P vrijednost	,294	,845	,540	,808	,321	,651
$\alpha$ -2globulin g/L	Koef.korelacije	-,100	-,068	-,296	,012	,284	,339
	P vrijednost	,613	,732	,127	,950	,143	,078

\* statistički značajne korelacije procijenjene Spearmanovim koeficijentom korelacije; SE=Sedimentacija mm/h; CRP=C-reaktivni protein mg/L; Hb=Hemoglobin g/L; Htc=Hematokrit; Trc=Trombociti  $\times 10^{12}/l$ ; E =Eritrociti  $\times 10^{12}/L$ ; L=Leukociti  $\times 10^9/L$ ; HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine1; S100A12=protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE=topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb. jed.=genski izražaj u arbitrarnim jednicama.

### 5.10. Analiza povezanosti serumske razine i genskog izražaja alarmina HMGB1, S100A12 i sRAGE u djece kontrolne skupine i klasičnih laboratorijskih nalaza

Ispitivanjem povezanosti između serumske razine proteina i genskog izražaja alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora sRAGE u djece kontrolne skupine i klasičnih laboratorijskih nalaza za praćenje aktivnosti bolesti (brzine sedimentacije eritrocita, razine C-reaktivnog proteina, anemije, trombocitoze, disproteinemije s povišenom razinom  $\alpha$ -globulina i  $\alpha$ -2 globulina) nađena je samo povezanost proteina HMGB1 i razine  $\alpha$ -2 globulina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,38;  $P < 0,045$ ) te povezanost genskog izražaja za S100A12 i razine hemoglobina (Spearmanov koeficijent korelacije;  $r = 0,52$ ;  $P < 0,005$ ) (Tablica 16).

Tablica 16. Korelacije između rutinskih laboratorijskih pokazatelja aktivnosti bolesti i alarmina u djece kontrolne skupine

		HMGB1 (pg/mL)	S100A12 (pg/mL)	sRAGE (pg/mL)	HMGB1 (arb. jed.)	S100A12 (arb. jed.)	RAGE (arb. jed.)
<b>SE</b>	Koef.korelacije	-,288	-,119	,142	-,252	-,292	,232
	P vrijednost	,137	,547	,471	,196	,132	,235
<b>CRP</b>	Koef.korelacije	,052	,008	,124	,062	,238	,116
	P vrijednost	,793	,967	,530	,756	,222	,558
<b>Hb</b>	Koef.korelacije	-,224	,066	-,003	-,138	,515*	-,224
	P vrijednost	,251	,740	,987	,483	,005	,253
<b>Htc</b>	Koef.korelacije	-,016	-,182	,191	-,125	,258	-,026
	P vrijednost	,935	,353	,329	,525	,185	,894
<b>Trc</b>	Koef.korelacije	,133	,255	,024	,190	,203	,166
	P vrijednost	,500	,191	,903	,332	,301	,399
<b>E</b>	Koef.korelacije	,337	,103	,338	,109	,102	-,047
	P vrijednost	,079	,601	,078	,582	,604	,811
<b>L</b>	Koef.korelacije	,110	-,179	-,223	-,024	,350	-,044
	P vrijednost	,578	,361	,255	,903	,068	,824
<b><math>\gamma</math>-globulin g/L</b>	Koef.korelacije	,219	-,121	,002	,003	,070	,281
	P vrijednost	,264	,541	,990	,987	,724	,148
<b><math>\alpha</math>-2 globulin g/L</b>	Koef.korelacije	-,38*	-,163	-,219	-,228	-,256	-,154
	P vrijednost	,045	,406	,263	,244	,189	,435

\* statistički značajne korelacije procijenjene Spearmanovim koeficijentom korelacije; SE=Sedimentacija mm/h; CRP=C-reaktivni protein mg/L; Hb=Hemoglobin g/L; Htc=Hematokrit; Trc =Trombociti  $\times 10^{12}/L$ ; E=Eritrociti  $\times 10^{12}/L$ ; L=Leukociti  $\times 10^9/L$ ; HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine1; S100A12=protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE=topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb. jed.=genski izražaj u arbitrarnim jednicama.

### **5.11. Analiza povezanosti serumske razine i genskog izražaja alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljivog receptora sRAGE u bolesnika s JIA ovisno o tipu bolesti u odnosu na rutinske laboratorijske nalaze za ocjenu upalne aktivnosti bolesti**

#### **Skupina bolesnika sa sistemskim tipom JIA**

Razina proteina HMGB1 u serumu bolesnika sa sistemskim tipom JIA bila je proporcionalna brzini sedimentacije eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,51;  $P < 0,001$ ), razini C-reaktivnog proteina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,52;  $P < 0,000$ ), broju eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,23;  $P < 0,02$ ) i razini  $\alpha$ -2 globulina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,50;  $P < 0,001$ ) (Slike 44-46), dok je bila obrnuto proporcionalna koncentraciji hemoglobina (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,30;  $P < 0,002$ ) i koncentraciji hematokrita (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,27;  $P = 0,006$ ) (Tablica 17).

Genski izražaj HMGB1 bio je proporcionalan s brzinom sedimentacije eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,43;  $P < 0,000$ ), koncentracijom hemoglobina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,38;  $P < 0,001$ ), hematokritom (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,31;  $P < 0,002$ ), brojem eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,31;  $P < 0,003$ ), a obrnuto proporcionalan s razinom C-reaktivnog proteina (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,49;  $P < 0,000$ ) te s razinom  $\alpha$ -2 globulina (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,25;  $P < 0,013$ ) (Tablica 17).

Nije nađena povezanost između razine HMGB1 i razine  $\gamma$ -globulina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,10;  $P = 0,340$ ), broja trombocita (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,12;  $P < 0,145$ ), i broja leukocita (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,11;  $P < 0,284$ ) (Tablica 17).

Za protein S100A12 utvrđena je statistički značajna povezanost s  $\alpha$ -2 globulinom (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,25;  $P < 0,011$ ).

Za protein RAGE nađen je obrnuto proporcionalni odnos s brzinom sedimentacije eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,31;  $P < 0,002$ ), razinom C-reaktivnog proteina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,27;  $P < 0,006$ ), i razinom  $\alpha$ -2 globulina (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,24;  $P < 0,012$ ) (Slike 47-49).

Za genski izražaj S100A12 nađen je proporcionalni odnos s razinom  $\alpha$ -2 globulina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,23;  $P < 0,028$ ), dok je obrnuto proporcionalan bio odnos s hematokritom (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,23;  $P < 0,023$ ).

Genski izražaj topljiva sRAGE bio je proporcionalan s hemoglobinom (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,26;  $P < 0,010$ ) i hematokritom (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,30;  $P < 0,003$ ), a obrnuto proporcionalan s brzinom sedimentacije eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,26;  $P < 0,010$ ). i razinom C-reaktivnog proteina (Spearmanov koeficijent korelacije = -0,26;  $P < 0,010$ ) (Tablica 17)

.

Tablica 17. Povezanost vrijednosti rutinskih laboratorijskih pokazatelja aktivnosti JIA i alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora sRAGE u bolesnika sa sistemskim tipom JIA

		HMGB1 (pg/mL)	S100A12 (pg/mL)	sRAGE (pg/mL)	HMGB1 (arb. jed.)	S100A12 (arb. jed.)	RAGE (arb. jed.)
<b>SE</b>	Koef.korelacije	,512*	,175	-,31*	-,43*	,171	-,264*
	P vrijednost	,001	,079	,002	,000	,099	,010
<b>CRP</b>	Koef.korelacije	,518*	,177	-,27*	-,49*	,180	-,26*
	P vrijednost	,000	,075	,006	,000	,083	,010
<b>Hb</b>	Koef.korelacije	-,30*	-,057	,153	,337*	-,165	,264*
	P vrijednost	,002	,571	,124	,001	,111	,010
<b>Htc</b>	Koef.korelacije	-,27*	-,054	,131	,313*	-,23*	,302*
	P vrijednost	,006	,588	,190	,002	,023	,003
<b>Trc</b>	Koef.korelacije	,145	,018	-,151	-,115	-,028	-,178
	P vrijednost	,145	,854	,129	,270	,792	,086
<b>E</b>	Koef.korelacije	,232*	-,131	,007	,307*	-,134	,190
	P vrijednost	,019	,188	,941	,003	,198	,066
<b>L</b>	Koef.korelacije	,107	,126	-,091	-,145	-,028	-,106
	P vrijednost	,284	,206	,364	,164	,792	,310
<b>γ-globulin g/L</b>	Koef.korelacije	,095	,163	-,080	-,184	,049	-,147
	P vrijednost	,340	,102	,426	,076	,636	,157
<b>α-2globulin g/L</b>	Koef.korelacije	,500*	,252*	-,24*	-,25*	,226*	-,065
	P vrijednost	,001	,011	,012	,013	,028	,533

\* statistički značajne korelacije procijenjene Spearmanovim koeficijentom; SE= Sedimentacija mm/h; CRP=C-reaktivni protein mg/L; Hb=Hemoglobin g/L; Htc=Hematokrit; Trc=Trombociti x1012/L; E=Eritrociti x1012/L; L=Leukociti x109/L; HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12=protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE=opljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb. jed.=genski izražaj u arbitrarnim jedinicama.

## Skupina bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA

Serumska razina topljiva receptora sRAGE u bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA bila je obrnuto proporcionalna s brzinom sedimentacije eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = -39;  $P < 0,014$ ), kao što je i za genski izražaj istog receptora sRAGE dokazana negativna korelacija s trombocitima (Spearmanov koeficijent korelacije = -429;  $P < 0,006$ ). Ostali alarmini nisu pokazali povezanost s reaktantima akutne faze oligoartikularnog tipa JIA (Tablica 18).

Tablica 18. Korelacije vrijednosti rutinskih laboratorijskih pokazatelja aktivnosti bolesti i alarmina u svih bolesnika s oligoartikularnim tipom JIA

		HMGB1 (pg/mL)	S100A12 (pg/mL)	sRAGE (pg/mL)	HMGB1 (arb. jed.)	S100A12 (arb. jed.)	RAGE (arb. jed.)
SE	Koef.korelacije	,122	,086	-,39*	,046	-,267	-,303
	P vrijednost	,458	,602	,014	,780	,100	,061
CRP	Koef.korelacije	,053	-,200	-,131	-,175	-,194	-,289
	P vrijednost	,750	,222	,426	,287	,236	,075
Hb	Koef.korelacije	-,110	-,024	,200	,160	,016	,262
	P vrijednost	,503	,886	,221	,330	,921	,107
Htc	Koef.korelacije	-,198	,053	,264	,269	,013	,300
	P vrijednost	,227	,747	,104	,098	,939	,064
Trc	Koef.korelacije	,026	,099	-,179	-,302	-,198	-,429*
	P vrijednost	,876	,548	,275	,061	,228	,006
E	Koef.korelacije	-,138	-,123	-,238	,104	-,006	,247
	P vrijednost	,402	,458	,144	,530	,972	,129
L	Koef.korelacije	-,027	,018	-,157	-,080	-,227	-,133
	P vrijednost	,871	,913	,338	,628	,165	,420
$\gamma$ -globulin g/L	Koef.korelacije	,138	-,167	,071	,192	-,065	-,186
	P vrijednost	,401	,308	,667	,242	,696	,256
$\alpha$ -2globulin g/L	Koef.korelacije	,316	,378*	-,255	,049	-,274	-,316*
	P vrijednost	,050	,018	,118	,766	,091	,050

\* statistički značajne korelacije procijenjene Spearmanovim koeficijentom; SE= Sedimentacija mm/h; CRP=C-reaktivni protein mg/L; Hb=Hemoglobin g/L; Htc=Hematokrit; Trc=Trombociti  $\times 10^{12}/L$ ; E= Eritrociti  $\times 10^{12}/L$ ; L=Leukociti  $\times 10^9/l$ ; HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12= protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE=opljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb. jed.=genski izražaj u arbitrarnim jednicama.



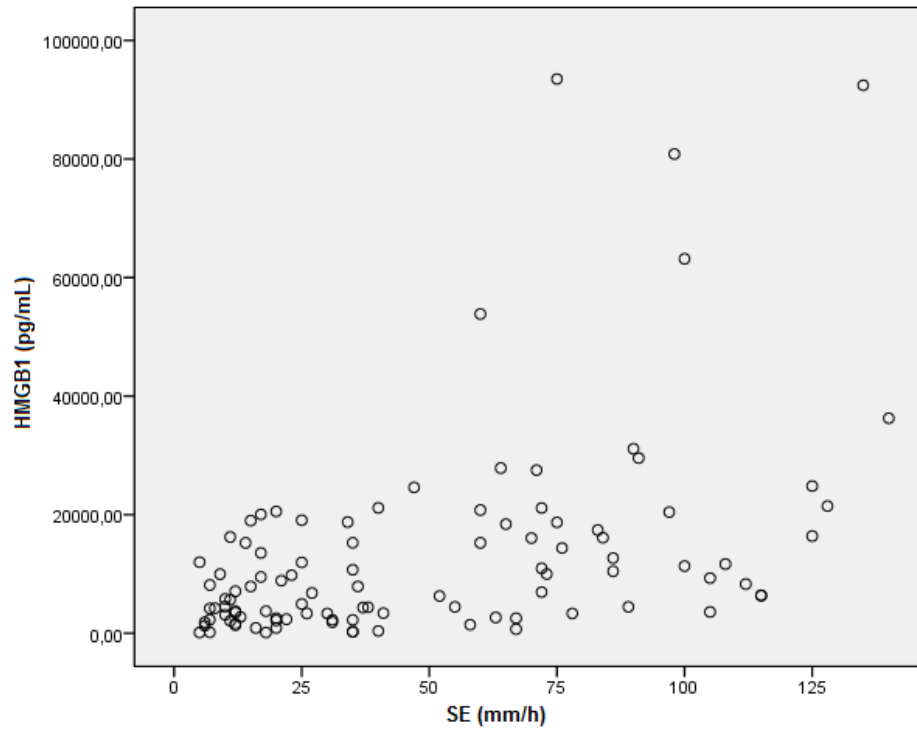
## Skupina bolesnika s poliartikularnim tipom JIA

Razina proteina HMGB1 u serumu bolesnika bila je proporcionalna brzini sedimentacije eritrocita (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,35;  $P < 0,038$ ), razini C-reaktivnog proteina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,38;  $P < 0,025$ ) i razini  $\alpha$ -2 globulina (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,34;  $P < 0,044$ ). Genski izražaji za S100A12 (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,55;  $P < 0,003$ ) i sRAGE (Spearmanov koeficijent korelacije = 0,34;  $P < 0,039$ ) bili su povezani s razinom  $\alpha$ -2 globulina (Tablica 19).

Tablica 19. Povezanost između vrijednosti rutinskih laboratorijskih pokazatelja aktivnosti bolesti i alarmina u bolesnika s poliartikularnim tipom JIA

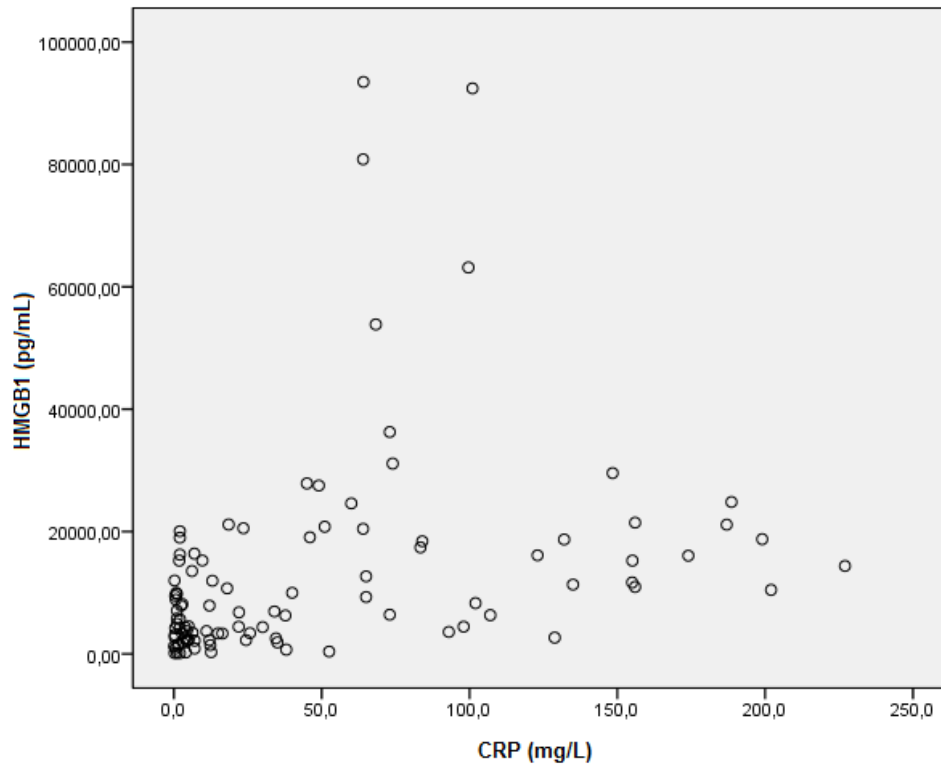
		HMGB1 (pg/mL)	S100A12 (pg/mL)	sRAGE (pg/mL)	HMGB1 (arb. jed.)	S100A12 (arb. jed.)	RAGE (arb. jed.)
SE	Koef.korelacije	,352*	-,091	-,139	-,090	,267	,094
	P vrijednost	,038	,603	,425	,656	,179	,642
CRP	Koef.korelacije	,379*	-,002	-,239	,009	,215	,219
	P vrijednost	,025	,990	,167	,965	,282	,272
Hb	Koef.korelacije	-,299	,025	,001	,139	-,283	,236
	P vrijednost	,081	,885	,994	,489	,152	,236
Htc	Koef.korelacije	-,323	-,064	-,038	,133	-,296	,281
	P vrijednost	,058	,717	,829	,507	,133	,156
Trc	Koef.korelacije	,211	-,032	-,113	,066	,239	,029
	P vrijednost	,224	,855	,517	,744	,229	,885
E	Koef.korelacije	-,290	-,046	-,210	,072	-,225	,080
	P vrijednost	,091	,794	,226	,720	,260	,690
L	Koef.korelacije	,004	,291	,203	-,040	-,016	,034
	P vrijednost	,982	,090	,243	,844	,937	,865
$\gamma$ -globulin g/L	Koef.korelacije	-,143	-,300	,043	-,076	,242	,143
	P vrijednost	,414	,079	,808	,706	,224	,478
$\alpha$ -2globulin g/L	Koef.korelacije	,343*	,055	-,048	,144	,545**	,399*
	P vrijednost	,044	,755	,782	,474	,003	,039

\* statistički značajne korelacije procijenjene Spearmanovim koeficijentom korelacije; SE= Sedimentacija mm/h; CRP=C-reaktivni protein mg/L; Hb = Hemoglobin g/L; Htc= Hematokrit; Trc=Trombociti  $\times 10^{12}/L$ ; E=Eritrociti  $\times 10^{12}/L$ ; L=Leukociti  $\times 10^9/L$ ; HMGB1=protein visoke pokretljivosti iz skupine 1; S100A12=protein koji veže kalcij S100A12; sRAGE = topljivi receptor za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije; arb. jed.=genski izražaj u arbitrarnim jedinicama.



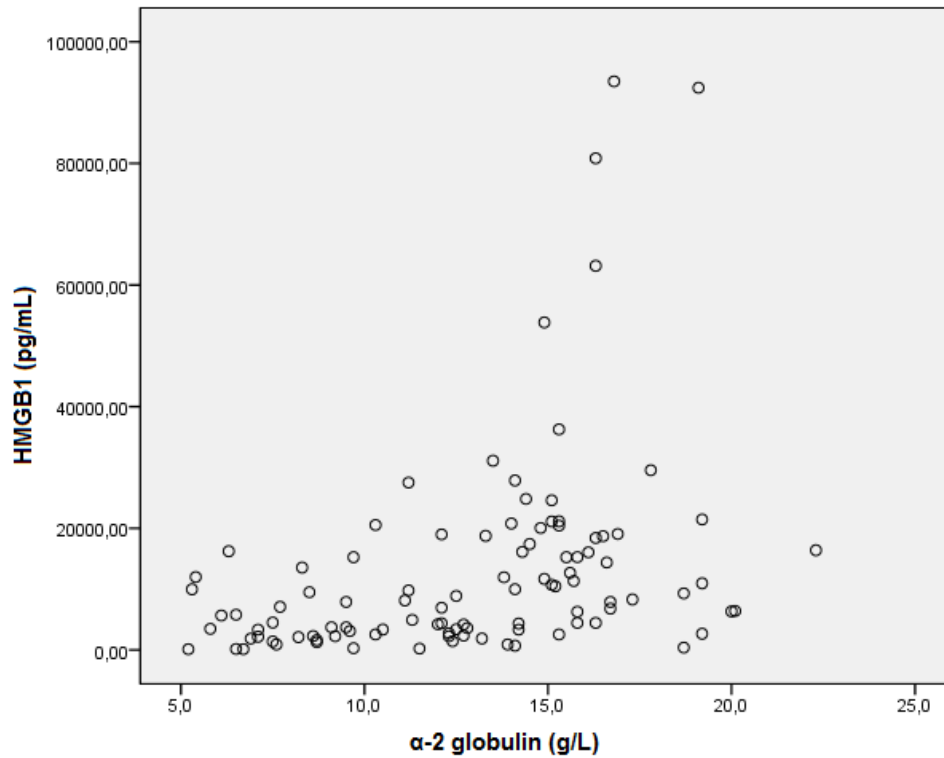
Slika 44. Povezanost serumske vrijednosti proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) i brzine sedimentacije eritrocita (SE) u bolesnika sa sistemskim tipom JIA

Utvrđena je pozitivna i statistički značajna podudarnost između serumske razine HMGB1 i brzine sedimentacije eritrocita što ukazuje na vrijednost oba laboratorijska nalaza u utvrđivanju i praćenju aktivnosti JIA. Podudarnost je procijenjena Spearmanovim koeficijentom korelacije koji je iznosio 0,512 (Slika 44).



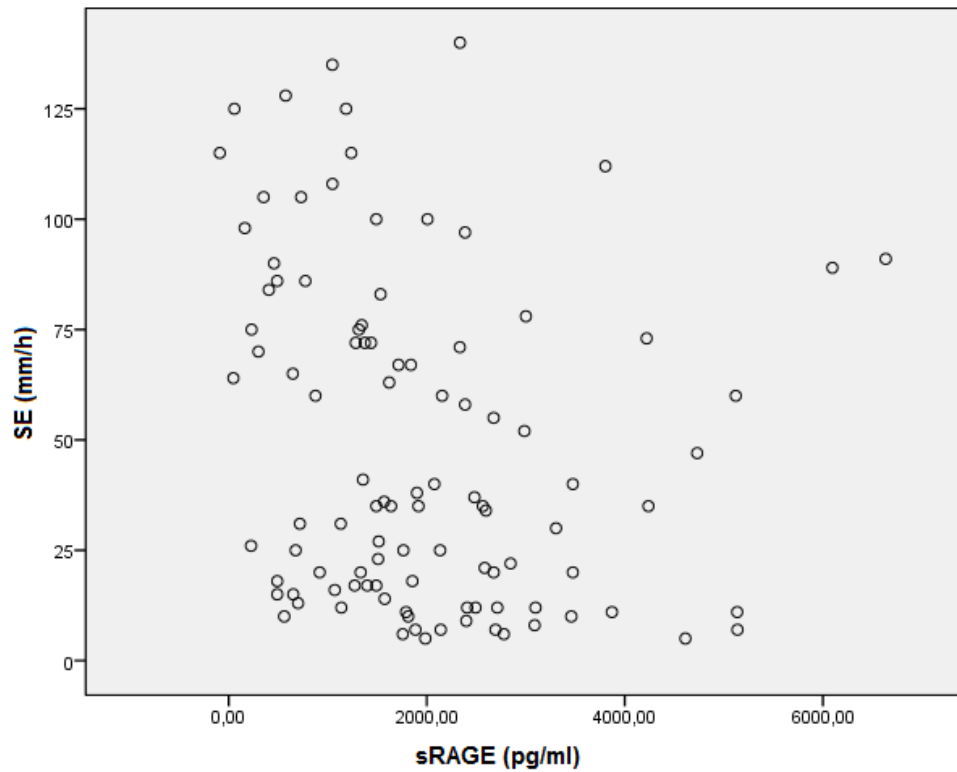
Slika 45. Povezanost serumske vrijednosti proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) i C reaktivnog proteina (CRP) u bolesnika sa sistemskim tipom JIA

Utvrđena je pozitivna i statistički značajna povezanost između razina HMGB1 i C reaktivnog proteina što ukazuje na vrijednost oba laboratorijska nalaza u utvrđivanju i praćenju aktivnosti JIA. Korelacija je procijenjena Spearmanovim koeficijentom koji je iznosio 0,518 (Slika 45).



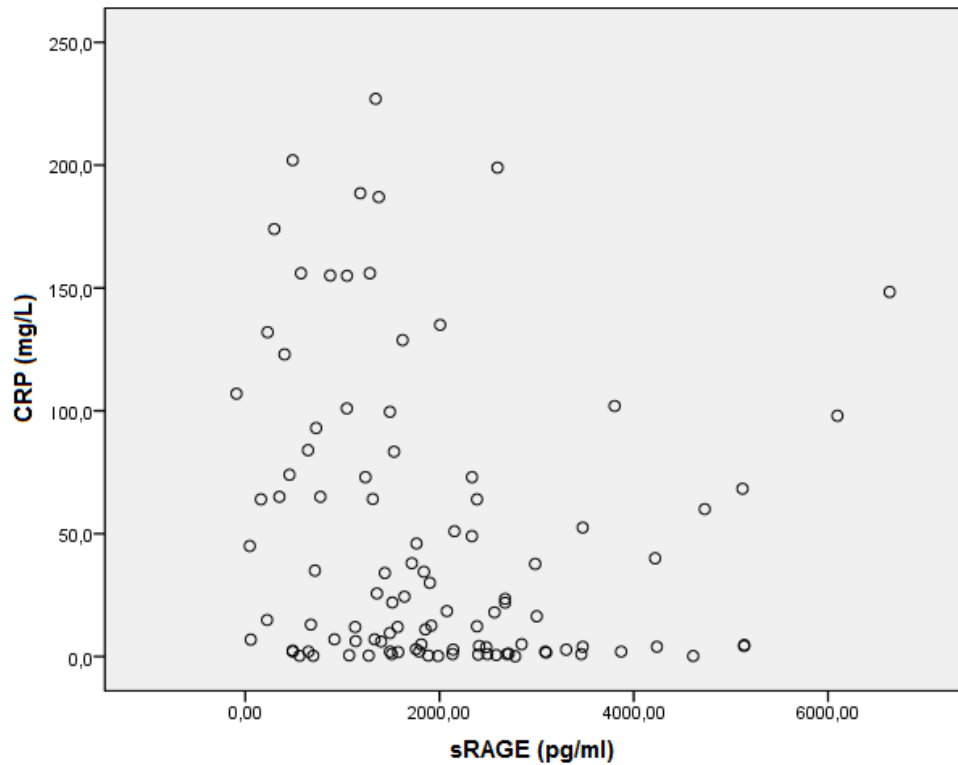
Slika 46. Povezanost vrijednosti proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1) i  $\alpha$ -2 globulina u bolesnika sa sistemskim tipom JIA

Utvrđena je pozitivna i statistički značajna povezanost između HMGB1 i  $\alpha$ -2 globulina što ukazuje na vrijednost oba laboratorijska nalaza u utvrđivanju i praćenju aktivnosti JIA. Korelacija je procijenjena Spearmanovim koeficijentom koji je iznosio 0,500 (Slika 46).



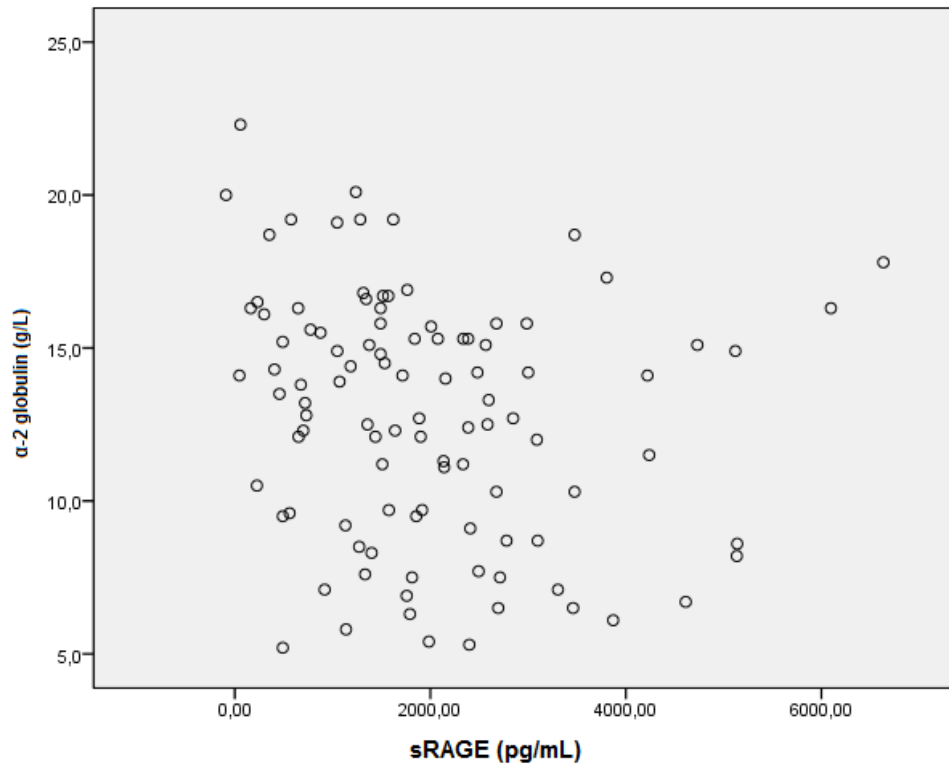
Slika 47. Povezanost između serumske vrijednosti receptora produkta uznapredovale glikozilacije (sRAGE) i brzine sedimentacije eritrocita (SE) u bolesnika sa sistemskim tipom JIA

Utvrđena je statistički značajna negativna povezanost između serumske razine sRAGE i brzine sedimentacije eritrocita što ukazuje da je aktivnost bolesti to veća što je veća vrijednost brzine sedimentacije eritrocita i manja razina sRAGE. Korelacija je procijenjena Spearmanovim koeficijentom koji je iznosio -0,31 (Slika 47).



Slika 48. Povezanost između serumske razine topiva receptora produkta uznapredovale glikozilacije (sRAGE) i C reaktivnog proteina (CRP) u bolesnika sa sistemskim tipom JIA

Utvrđena je statistički značajna negativna povezanost između serumske razine sRAGE i C reaktivnog proteina što ukazuje na vrijednost oba laboratorijska nalaza u utvrđivanju i praćenju aktivnosti JIA. Negativna korelacija znači da je aktivnost bolesti to veća što je veća vrijednost C-reaktivnog proteina i niža vrijednost receptora sRAGE. Korelacija je procijenjena Spearmanovim koeficijentom koji je iznosio -0,27 (Slika 48).



Slika 49. Povezanost serumske razine topiva receptora produkta uznapredovale glikozilacije (sRAGE) i  $\alpha$ -2 globulina u bolesnika sa sistemskim tipom JIA

Utvrđena je statistički značajna negativna korelacija između serumske razine sRAGE i  $\alpha$ -2 globulina što ukazuje na vrijednost oba laboratorijska nalaza u utvrđivanju i praćenju aktivnosti JIA. Negativna korelacija znači da je aktivnost bolesti to veća što je veća vrijednost  $\alpha$ -2 globulina i niža vrijednost receptora sRAGE. Korelacija je procijenjena Spearmanovim koeficijentom koji je iznosio -0,24 (Slika 49).

## 6. RASPRAVA

Juvenilni idiopatski artritis (JIA) je bolest ili skupina sličnih bolesti karakterizirana upalom jednog ili više zglobova čija imunopatogeneza još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Godinama se smatralo da je poremećaj stečene imunosti ključan u imunopatogenezi JIA i istraživanja su bila usmjerena na mrežu citokina koja je uključena u stečeni imunski odgovor (50,51,34,52-56). Međutim, rezultati novijih istraživanja sve više ukazuju da poremećaj prirodne imunosti igra važnu ulogu u patogenezi juvenilnog idiopatskog artritisa te da aktivacija stanica prirodne imunosti uvelike ovisi o alarminima ili molekulama pridruženim oštećenju iz čega proizlazi da bi isti mogli sudjelovati u imunopatogenezi bolesti te ujedno koristiti i kao njihovi biljezi (29,2,163).

U ovo istraživanje bilo je uvršteno ukupno 130 ispitanika od kojih 102 djece s JIA prilikom postavljanja dijagnoze, a prije započetog medikamentoznog liječenja. Bolesnici su bili podijeljeni u tri skupine prema najčešćim oblicima JIA – oligoartikularnim (39 djece), poliartikularnim (35 djece) i sistemskim tipom (28 djece). Kontrolnu skupinu činilo je 28 djece iste dobne i spolne strukture, ali bez znakova upale. Svim ispitanicima određena je serumska razina alarmina HMGB1 i S100A12 te njihovog topljivog receptora sRAGE testom ELISA, dok su izražaji gena za navedene alarminu i receptor određeni u mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom kvantitativnog PCR-a.

Prema dobivenim rezultatima, utvrđena je značajno viša serumska razina proteina HMGB1 u djece sa sistemskim tipom JIA u odnosu na oligoartikularni i poliartikularni tip JIA i u odnosu na kontrolnu skupinu. Nije nađena viša razina alarmina HMGB1 u bolesnika s oligoartikularnim i poliartikularnim tipom JIA u odnosu na kontrolnu skupinu. U skladu s navedenim, različita razina alarmina u sistemskom u odnosu na



ostale oblike JIA može ukazivati na različitost patogeneze pojedinih tipova JIA, odnosno, sve navedeno dokazuje da proupalni alarmin HMGB1 kao medijator prirodnog imunskog odgovora može biti uključen u imunopatogenezu sistemskog tipa JIA u kojem je prema rezultatima ovog rada dokazana povišena serumska razina navedenog alarmina u odnosu na artikularne tipove JIA. Na taj način dobiveni rezultati doprinose gledištu da prirodni imunski sustav ima dominantnu ulogu u imunopatogenetskom mehanizmu sistemskog JIA te da se navedeni tip JIA može smatrati više autoinflamatornim nego autoimunim poremećajem (30).

Naime, danas je sve veći broj dokaza o različitoj imunopatogenezi sistemskog tipa JIA u odnosu na oligoartikularni i poliartikularni tip JIA. Općenito je prihvaćeno da poremećaj stečenog imunskog sustava dovodi do razvoja oligoartikularnog i poliartikularnog tipa JIA gdje je osnova bolesti autoimuna reakcija potaknuta čimbenicima okoliša u genetski predisponirane osobe (165-170). Nasuprot tome, smatra se da do razvoja sistemskog JIA može dovesti poremećaj prirodne imunosti gdje do sada nepoznati „trigger“- faktori (okidači) i signalni mehanizmi aktiviraju stanice prirodnog imunskog sustava-fagocite (monocite, makrofage i neutrofile). Dominantnu ulogu aktivacije prirodnog imunog sustava u sistemskom JIA potvrđuju značajke kliničke slike navedenog tipa JIA. Većina sistemskih i lokalnih obilježja sistemskog JIA kao i sekundarnih komplikacija stalno aktivne upalne bolesti može se objasniti aktivacijom mreže citokina otpuštenih iz aktiviranih fagocita i endotelnih stanica, posebice IL1, IL1 $\beta$ , IL6 i IL18. Ta zapažanja su potvrđena nedavnim iskustvima u liječenju bolesnika s kronično aktivnim sistemskim tipom JIA. Liječenje s antagonistom IL-1 receptora smanjuje kliničke i laboratorijske znakove aktivnosti bolesti u bolesnika sa sistemskim JIA koji nisu reagirali na konvencionalno liječenje, uključujući i blokatore TNF (23). Također, klinička iskustva s liječenjem antitijelima na

IL-6 receptor pokazala su učinkovitost u kontroliranju aktivnosti bolesti u sistemskom JIA (171,36).

Osim što upućuju na različitost imunopatogeneze među tipovima JIA, iz rezultata ovog rada može se zaključiti da se u sistemskom tipu juvenilnog idiopatskog artritisa HMGB1 proizvodi sustavno, a ne u upalom zahvaćenom zglobu.

Sistemsku ulogu tog alarmina naglasili su i Goldstein i njegovog tim (2007) koji su dokazali značajno povišenu razinu HMGB1 u serumu bolesnika s reumatoidnim artritisom u usporedbi s kontrolnom skupinom (172). Za razliku od navedenog, druga skupina autora dokazala je višu razinu HMGB1 u sinovijalnoj tekućini bolesnika s reumatoidnim artritisom u odnosu na razinu istog alarmina u sinovijalnoj tekućini bolesnika s osteoartritisom, dok su razine HMGB1 u plazmi bile usporedive u obje skupine ukazujući na njegovu lokalnu ulogu (173).

Značajan doprinos potvrđivanju uloge HMGB1 u upalnim reumatskim bolestima postignut je nedavnim istraživanjem čiji su rezultati pokazali da je HMGB1 uključen u patogenezu sistemskog eritemskog lupusa (SLE) te da bi navedeni alarmin mogao predstavljati biljeg ove bolesti i novu metu u liječenju iste (174,175,61,176-180). Naime pogoršanje simptoma bolesti u SLE karakterizirano je snažnom aktivacijom imunskog sustava i ekstenzivnim odumiranjem stanica što izaziva oslobađanje HMGB1 u izvanstanični prostor. Povišena razina HMGB1 u izvanstaničnom prostoru dovodi do povišene sistemske razine proteina HMGB1 za koji se smatra da je u skladu s aktivnošću bolesti. Međutim, pokazalo se da konvencionalni način određivanja razine alarmina ELISA testom može dati lažno negativne rezultate u SLE bolesnika zbog stvaranja brojnih protutijela u sklopu osnovne bolesti (181,182) te Andersson i Rauvala u svom recentnom radu predlažu određivanje HMGB1 tehnikom ELISA i western blot tehnikom (183).

Nadalje, još uvijek nije jasno djeluju li HMGB1 protutijela zaštitno ili štetno za bolesnika koji boluju od SLE. Naime, većina stanica odumire zbog primarne nekroze, dok stanice koje odumiru programiranom smrću prolaze kroz sekundarnu nekrozu i tako oslobađaju nuklearni HMGB1. Nadalje, Urbonaviciute i Voll u svom recentnom radu opisali su kako HMGB1-nukleosom kompleks inhibira toleranciju na nuklearne komponente uključujući dsDNA u bolesnika sa SLE, dok Yanai i suradnici HMGB1 smatraju direktno uključenim u regulaciju produkcije INF- $\alpha$  koji se smatra centralnim citokinom u patogenezi SLE (174,61,186). Treba napomenuti da se većina autora slaže kako je proupalna aktivnost HMGB1 u SLE uvjetovana redoks - statusom aminokiseline cisteina na poziciji 106 dok će oksidacija istog eliminirati proupalni učinak HMGB1 što je ključna tema novih istraživanja (106,187,188).

S druge strane, iako već postoje brojni radovi o ulozi HMGB1 u imunopatogenezi upalnih reumatskih bolesti, posebice iz istraživanja na životinjama, izvještaji o HMGB1 u djece s JIA su još uvijek izuzetno rijetki i odnose se na analizu protutijela protiv molekule HMG1 čija uloga nije razjašnjena (189-192). U skladu s navedenim je rad Wittemanna i suradnika iz 1990. godine u kojem su dokazana anti HMG1 protutijela klase IgG u serumu 49 od 126 bolesnika s juvenilnim reumatoidnim artritisom (JRA), (kako je u to vrijeme JIA bio nazivan), koji su bili ANA-pozitivni. Bolesnici su klasificirani prema kliničkoj dijagnozi u dvije glavne skupine i to 105 bolesnika s oligoartikularnim-nastupom JRA i 21 s poliartrikularnim-nastupom JRA. Anti-HMG-1 i/ili anti-HMG-2 antitijela su pronađena u 8 od 32 JRA bolesnika s oligoartikularnim - nastupom i s uveitisom i kod 34 od 73 bolesnika bez uveitisa, dok su anti-HMG-1 i/ili anti-HMG-2 antitijela pronađena u četiri od 17 djece s poliartrikularnim-nastupom JRA bez uveitisa. Među 53 seruma ANA-negativnih bolesnika s JRA, 3 bolesnika je bilo pozitivno na anti-HMG-1 i/ili anti-HMG-2 protutijela, dok je nereagiranje na protein

HMG-1 ili HMG-2 zabilježeno u 48 djece podudarne dobi s ne reumatskom bolesti (190). U radu Junga i njegovog tima iz 1997. godine također je dokazana prisutnost protutijela na HMG molekulu u djece sa JIA (191). Nadalje, Rosenberg i suradnici su 2000. godine usporedili učestalost pojavnosti antitijela na proteine visoke mobilnosti skupina 1 i 2 (HMG-1, HMG-2) u serumu 60 dječaka i djevojčica s juvenilnim idiopatskim artritisom (JIA) koji su bili ANA-pozitivni te utvrdili češće pojavljivanje navedenih protutijela u djevojčica (189). Zajedničko je za sva 3 prethodno navedena istraživanja da su ciljnu skupinu činila djeca oboljela od JIA, proučavana su protutijela protiv nuklearnog HMG 1 i 2 no njihova uloga nije istraživana niti definirana. Drugim riječima, njihova potencijalno neutralizirajuća uloga ili uloga u patogenezi nije bila razjašnjena. Jedan od razloga što dokazana protutijela nisu definirana je da navedeni radovi datiraju iz vremena kada još nije bila poznata uloga izvanstaničnog HMGB1.

Istraživanja novijeg datuma, uglavnom u različitim eksperimentalnim modelima upalnih stanja, prikazuju izvanstanični HMGB1 moćnim inicijatorom upalnog procesa, a najbolji dokaz ove tvrdnje temelji se na tri različita anti-HMGB1 monoklonska protutijela koja su terapijski učinkovita u predkliničkim modelima sepse, moždanog udara ili acetaminofenom inducirane nekroze jetre (193-195). Nadalje, poliklonska HMGB1-protutijela, kao što je HMGB1 A domena, djeluju kao HMGB1-specifični antagonisti (196) posredujući korisne učinke u eksperimentalnom artritisu, sepsi, moždanom udaru, ishemijsko-reperfuzijskoj ozljedi, pankreatitisu i respiratornim bolestima (95,108,196-209). Međutim, još uvijek nije u potpunosti razjašnjeno kako HMGB1 vrši svoju izvanstaničnu ulogu. Pitanje je može li HMGB1 posredovati upalu samostalno (102,210) ili mora biti u kompleksu s drugim proupalnim molekulama (211). Više radova ukazuje na to da je uvjet proupalnog djelovanja HMGB1 stvaranje kompleksa navedene molekule HMGB1 s drugim molekulama (61,124,212-214).

Naime, danas je dobro utvrđena činjenica da HMGB1 ima vrlo izraženu sposobnost stvaranja kompleksa s drugim proupalnim molekulama, a time i mogućnost poticanja upalne reakcije na sinergistički način (211). Do sada, najbolje proučeni primjeri u vezi tih molekularnih suradnji odnose se na složene HMGB1 komplekse s egzogenim čimbenicima kao što su LPS ili bakterijske DNK (124,213,215) i s endogenim čimbenicima poput kemokina CXCL12, citokina IL-1 $\beta$  ili nukleosoma (214,216). Argumenti za ispitivanje izravne proupalne uloge proizvedenog čistog HMGB1 temelje se na najnovijim istraživanjima vrlo pročišćenog rekombinantnog ili nativnog HMGB1 koji samostalno ne može potaknuti makrofage na produkciju citokina. Naime, dokazano je da je HMGB1 vrlo osjetljiv na brojne posttranslacijske modifikacije (111-113) tako primjerice oksidacija cisteinskog ostatka u poziciji 106 smanjuje njegovu sposobnost indukcije citokina (106), a dokazano je i da vrlo pročišćeni HMGB1 preparati u testovima odražavaju RAGE-posredovane aktivnosti kao što su motilitet stanice, proliferacija i kemotaksija, ali ne indukcija sinteze citokina. Nadalje, razlike u aktivnosti HMGB1 koje se navode u literaturi mogu se objasniti i time da se HMGB1-posredovane funkcije provode kroz više receptora (kao što su RAGE i nekoliko članova obitelji TLR) (122,212,217) te se smatra se da se vezanje na različite receptore odvija preko odvojenih sekvenci HMGB1 molekule (124,218-221), a da opsežne in vitro manipulacije s HMGB1 mogu selektivno oštetiti domene HMGB1 molekule potrebne za određene, ali ne i sve interakcije s receptorom.

Naime, iako je razina alarmina HMGB1 u našem radu bila značajno viša u sistemskom tipu JIA, ipak je izmjerena manja razina istog alarmina u oligoartikularnom i u poliartikularnom tipu JIA što ukazuje da se HMGB1 može izlučivati ne samo sustavno nego i lokalno, na razini ciljnog organa, tj. upalom zahvaćenog zgloba.

Navedena hipoteza može se potkrijepiti brojnim radovima na eksperimentalnim životinjama koje su pokazale povezanost HMGB1 s razvojem artritisa. Primjerice, Rendon-Mitchell i sur. (2003.) pokazali su da HMGB1 intraartikularno apliciran zdravim miševima uzrokuje artritis (122). Druga ključna zapažanja koja povezuju HMGB1 s artritisom su da se HMGB1 oslobađa unutar upalom zahvaćenog zgloba (108,173,222) te da blokiranje HMGB1 spriječava progresiju artritisa u životinja (24,95,108,223).

Prototip modela za eksperimentalni artritis koji se koristi u proučavanju novih terapijskih pristupa je artritis potaknut kolagenom tipa II (CIA, engl. *collagen type II induced arthritis*) u glodavaca. Imunohistokemijsko bojenje CIA sinovitisom zahvaćenog tkiva pokazuje značajno povišen izražaj HMGB1 kako u izvanstaničnom prostoru tako i u citoplazmi makrofaga, sinoviocita, fibroblasta i vaskularnih endotelnih stanica. Ovaj obrazac se znatno razlikuje od strogo nuklearnog HMGB1 proučavanog u zglobovima zdravih ispitanika, što može biti objašnjenje povišene razine navedenog alarmina u zdravih ispitanika u ovom istraživanju i zahtjeva dodatna istraživanja za dokazivanje istog. S druge strane, HMGB1, TNF i IL-1 $\beta$  su dokazani u izobilju u regijama s destrukcijom tkiva gdje proliferacijsko sinovijalno tkivo (panus) oštećuje hrskavicu i kost (224). Smatra se da pojačano pojavljivanje izvanstaničnog HMGB1 u panusu može biti uzrokovano tkivnom ishemijom, aktiviranim komplementom i proupalnim čimbenicima kao što su TNF i IL-1 te imunohistokemijske studije CIA sinovitisa pokazuju hipoksiju tkiva kao istaknuti uzrok oslobađanja HMGB1 (108). Izvanstanični HMGB1 u panusu može eventualno biti mehanički uključen u procese razaranja hrskavice i kosti, budući da protein poboljšava aktivnost aktivatora tkivnog plazminogena i metaloproteinaza (225). Također je nedavno pokazano da HMGB1 igra važnu ulogu u osteoklastogenezi i kapacitetu tih stanica da proizvode TNF (226-230). U

prilog navedenom govore rezultati novijih radova koji su pokazali kako izravna intraartikularna mikroinjekcija proteina HMGB1 u koljena miša uzrokuje upalnu reakciju i sinovitis koji traje najmanje 4 tjedna. Incidencija i ozbiljnost zglobne upale variraju između različitih sojeva miševa. Upalni odgovor induciran s HMGB1 pojavljuje se zajedno s regrutacijom i aktivacijom makrofaga i T limfocita. Artritis induciran s HMGB1 ovisi o aktivnosti IL-1 receptora, te se isti artritis ne razvija nakon mikroinjekcije HMGB1 u zglobove životinja koji su lišeni funkcionalnih IL-1 receptora genetskom tehnikom izbacivanja gena („knock-out“) (231). Kao što je već spomenuto, objavljene studije pokazuju da IL-1 $\beta$  formira komplekse s HMGB1 te navedeni kompleksi sinergistički pojačavaju upalu oba faktora (214,215). Rezultati recentnih radova pokazuju da HMGB1/IL-1 $\beta$  kompleksi generiraju metaloproteinaze i citokine u kulturama humanih sinovijalnih fibroblasta bolesnika s RA, dok HMGB1 ili IL-1 $\beta$  dodani odvojeno nisu imali navedene učinke.

Noviji radovi ukazuju da alarmini ili DAMP molekule, kao medijatori prirodene imunosti, nakon što se oslobode kao odgovor na oštećenje stanica, infekciju ili upalu aktiviraju imunostne stanice i vaskularni endotel putem receptora za prepoznavanje strukturnih „predložaka“ (TLR i RAGE) koji integriraju signale DAMP ili PAMP (Slika 1). Otkrivanje ključnih načela aktiviranja prirodnog imunostnog sustava tj. dokazivanje receptora za prepoznavanje strukturnih „predložaka“ (PRR, engl. - *pattern recognition receptors*), među kojima se najviše istražuju Tollu, NOD-u i RIG-u slični receptori (TLR, NLR, RLR) izbrisalo je granicu između nespecifične i specifične imunosti i u potpunosti promijenilo postojeće razumijevanje imunostnog sustava (1).

Poznato je da HMGB1 posreduje upalne reakcije putem vrlo konzerviranih receptora uključujući TLR2, TLR4, TLR9, RAGE i  $\beta$ 2 - integrin Mac -1 (118,122,124,212,217, 232). To su multiligandni receptori sposobni reagirati s egzogenim i endogenim

molekulama. RAGE ligandi kao što HMGB1 će aktivirati različite puteve unutarstanične kaskade signala. Jedan put će uključivanjem mDia-1 aktivirati Rac-1 i Cdc42 te tako regulirati staničnu migraciju. Drugi put ovisi o MAP-kinazama koji posreduju NF -  $\kappa$ B aktivaciju (233). HMGB1 posredovano signaliziranje putem TLR2, TLR4 ili TLR9 odvija se preko MyD88 ovisnog puta uključujući MAP kinaze i NF -  $\kappa$ B aktivaciju što rezultira produkcijom citokina (217,234). U literaturi se ističe postojanje djelomičnog preklapanja između RAGE i TLR2/TLR4 signalnih putova (235). TLR4 signalizacija se također može odvijati preko MyD88 - neovisnog puta, ali relevantnost ovog puta u vezi HMGB1 biologije danas se ne zna.

Zbog svega navedenog tj. sve većeg broja radova koji ukazuju na postojanje i važnost određenog broja receptora u prirođenoj imunosti smatrali smo važnim istovremeno s određivanjem pojedinih alarmina istražiti pojavnost tj razinu jednog od njihovih receptora. U ovom radu je dokazana značajno snižena razina topljivog receptora sRAGE u serumu djece oboljele od sistemskog, poliartikularnog i oligoartikularnog tipa JIA u odnosu na kontrolnu skupinu. Navedeni rezultati u skladu su s dosadašnjim istraživanjima koja opisuju sniženu razinu navedenog oblika sRAGE u drugim upalnim reumatskim bolestima. Tako je primjerice nekoliko radova dokazalo pojavnost navedenog alarmina i njegovog receptora RAGE u bolesnika s reumatoidnim artritisom (222,231,236,237). Reumatoidni artritis predstavlja kronični upalni sinovitis te je na mnogim stanicama koje sudjeluju u razvoju upale sinovije u navedenih bolesnika dokazana pojavnost membranskog RAGE (236). Jedan od upalnih liganda membranskog RAGE koji snažno povećava razinu pro-upalnih citokina u sinoviji bolesnika s reumatoidnim artritisom je HMGB1 (222). Rezultati istraživanja Pulleritisa i njegovog tima pokazali su da bolesnici s reumatoidnim artritisom imaju značajno nižu serumsku razinu topljivog sRAGE u usporedbi s kontrolnom skupinom i bolesnicima s



neupalnim bolestima zglobova. U istom radu autori navode da niska razina sRAGE može, barem djelomično, objasniti artritis zbog nedostatka blokade HMGB1-RAGE interakcije od strane sRAGE (237). Osim toga, serumska razina topljivog sRAGE u bolesnika s navedenom dijagnozom bila je dva puta manja nego u odgovarajućim uzorcima kontrolne krvi. Usporedbom neliječenih i liječenih bolesnika s RA, razina sRAGE u sinoviji bolesnika s RA koji su liječeni metotreksatom bila je viša. Razina sRAGE u krvi i sinoviji bolesnika s RA nije povezana s dobi, trajanjem bolesti, erozivnom bolesti ili razinom CRP-a. Sveukupno, navedeni podaci ukazuju na to da bolesnici s RA imaju nižu razinu sRAGE u krvi i sinoviji od kontrolne skupine i da metotreksat može povisiti razinu sRAGE. Nije utvrđeno je li niska razina sRAGE posljedica ili dodatni čimbenik koji doprinosi razvoju reumatoidnog artritisa (158).

Postojanje obrnute veze između aktivacije RAGE-a i stupnja zahvaćenosti upale zgloba pokazao je Tarkowski i njegov tim (237). Bolesnici oboljeli od reumatoidnog artritisa imaju značajno nižu razinu sRAGE-a u serumu i zglobovima u usporedbi s bolesnicima s neupalnim bolestima zglobova i kontrolnom skupinom (237). Nadalje, prisutnost protutijela anti-RAGE u zglobovima bolesnika s reumatoidnim artritisom bilo je povezano s manje agresivnim, ne-erozivnim oblikom artritisa (238). U oba slučaja aktivacije puta RAGE-a bila je zakočena: u prvom sa sekvencijom RAGE-liganada od strane sRAGE, a u drugom s direktnom blokadom receptora. Nadalje, niža razina sRAGE utvrđena je u bolesnika sa sistemskom sklerozom (SS), kroničnom upalnom autoimunom bolesti koju karakterizira limfocitna infiltracija suznih žlijezda i slinovnica (239). Pojavnost RAGE je dokazana u žlijezdama slinovnicama bolesnika sa SS i u zdravih ljudi, ali čini se da je izraženiji u tkivu bolesnika sa SS (240). Razina sRAGE u uzorcima krvi bolesnika s primarnim i sekundarnim SS i u bolesnika s pozitivnim ANA-titrom (241) pokazuje niže vrijednosti u skupini bolesnika s primarnim SS u

usporedbi s druge dvije skupine, bez ikakve razlike između zadnje dvije skupine. Na temelju tih podataka autori zaključuju da sustav RAGE može biti uključen u patogenezu primarnog SS. Zanimljivo je navesti i istraživanje Nienhuisovog tima koji su, da bi utvrdili utjecaj AGE i sRAGE u sistemskom eritemskom lupusu, u istraživanje uključili uzorke seruma i kože 10 bolesnika sa SLE u mirnoj i aktivnoj fazi bolesti (159) i usporedili s nalazom u 10 zdravih po dobi i spolu podudarnih kontrola. Autori su utvrdili povišenu razinu akumuliranog AGE u koži te podjednaku razinu iste molekule u serumu SLE bolesnika. Nadalje, pokazali su povišenu razinu sRAGE u SLE bolesnika u usporedbi s kontrolnom skupinom. U usporedbi s mirnom fazom SLE, serumska razina sRAGE značajno se povećala tijekom aktivne bolesti. Iz navedenog je postavljena hipoteza da povećana razina sRAGE u SLE ima zaštitnu ulogu. Rezultati ovog rada su u suprotnosti s ranijim studijama koje pokazuju da su niske razine sRAGE povezane s aktivnim upalnim bolestima poput RA, SS ili KD. Sve navedeno ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjima zbog rasvjetljavanja uloge navedenih molekula u bolesnika sa SLE, posebice zbog malog broja ispitanika uključenih u istraživanja. S druge strane, rezultati navedenih studija pokazuju da je niska serumska razina sRAGE povezana s aterosklerozom koja se smatra upalnom bolešću te budući da se RAGE izražava u velikoj mjeri na monocitima/makrofazima i endotelnim stanicama smatra se da je osovina RAGE-ligand uključena u preuranjenu aterosklerozu kakva se može vidjeti u klasičnim upalnim stanjima poput SLE ili RA. Međutim, iako je objavljen niz studija o ulozi sRAGE u aterosklerozi u različitim životinjskim modelima (242), biološka važnost sRAGE unutar osovine RAGE-ligand još uvijek u ljudi nije jasna.

U zaključku, serumska razina sRAGE snižena je u bolesnika s kroničnim upalnim bolestima, uključujući aterosklerozu u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Izuzetak je nedavno istraživanje u kojem su u 10 bolesnika sa SLE pronađene više razine sRAGE u

usporedbi s kontrolnom skupinom (159). Međutim, potrebno je napomenuti da su neki od SLE bolesnika u toj studiji (3/10) koristili ACE-inhibitor koji povećava razinu sRAGE.

Pored analize serumske razine topljivog sRAGE proteina, u ovom je radu utvrđen snižen genski izražaj za istu molekulu u sistemskom, oligoartikularnom i poliartikularnom tipu JIA u odnosu na kontrolnu skupinu. Nadalje, uspoređujući razinu topljivog sRAGE u sistemskom tipu JIA u odnosu na oligoartikularni i poliartikularni tip bolesti, utvrđena je niža razina sRAGE u sistemskom tipu. Dokazana snižena serumska razina topljivog receptora RAGE može biti posljedica „trošenja“ budući da membranski RAGE i topljivi sRAGE imaju istu specifičnost za vezivanje liganada te sRAGE djeluje kao „mamac“ blokirajući interakciju membranskog RAGE i njegovih pro-upalnih liganada kao što je proupalni HMGB1 čija je razina u ovom radu bila povišena. Naime, dokazano je da sRAGE nastaje ili alternativnim spajanjem (esRAGE) ili proteolitičkim razdvajanjem pomoću metaloproteinaze od fRAGE vezanog na membranu (cRAGE) (243). RAGE i sRAGE imaju istu specifičnost za vezivanje liganada što je razlog da sRAGE djeluje kao mamac blokirajući interakciju membranskog fRAGE i njegovih pro-upalnih liganada.

Međutim, iako rezultati novijih radova potvrđuju da topljivi sRAGE može djelovati kao receptor „mamac“ i spriječiti interakciju membranskog RAGE s proinflamatornim ligandima, nije jasno jesu li niske razine sRAGE povezane s visokom osjetljivošću na pro-upalne učinke HMGB1 ili je povišena razina HMGB1 povezana sa smanjenjem sRAGE eliminacijom sRAGE-HMGB1 kompleksa. Još uvijek su nerazjašnjena i neka druga pitanja vezana za sRAGE. Na primjer, ostaje nejasno postoji li individualna varijabilnost sRAGE razine tijekom dužeg razdoblja? Jeli razina sRAGE pod utjecajem prehrane, infekcije, stresa ili umora? Konačno, ako RAGE-ligandi, RAGE i sRAGE

predstavljaju dinamički sustav s pozitivnom i negativnom povratnom spregom, treba li u obzir uzeti omjere sRAGE: RAGE ili RAGE ligande više nego samo izdvojenu razinu sRAGE? Iz svega navedenog proizlazi da specifična uloga razine topljivog sRAGE u upalnim bolestima tek treba biti razjašnjena.

Jedno od mišljenja jest da u nekih pojedinaca postoji prirođeno niska razina sRAGE. Tako su primjerce mjerene razine sRAGE u zdravih stogodišnjaka, zatim u bolesnika mlađih od 40 godina koji su doživjeli akutni infarkt miokarda (AIM), a nisu bolovali od dijabetesa kao i u zdravih osoba mlađih od 40 godina (244). Zdravi stogodišnjaci imali su znatno višu razinu sRAGE nego zdravi ispitanici mlađi od 40 godina, dok su ispitanici koji su preboljeli AIM imali nižu razinu sRAGE nego zdrave osobe mlađe od 40 godina. Kako se smatra da se razina sRAGE smanjuje s dobi (245), navedeni rezultati sugeriraju da zdravi stogodišnjaci imaju 'urođeno' visoku razinu sRAGE. To ujedno sugerira da bi sRAGE mogao biti faktor dugovječnosti, a niska razina sRAGE u plazmi mogla bi biti faktor rizika za upalne bolesti i AIM. Međutim, trenutni dokazi djelotvornosti osovine RAGE-ligand značajniji su u aterosklerozi ili vaskularnim komplikacijama nego u klasičnim upalnim bolestima poput RA ili SLE. Da bi se potvrdilo je li niska razina sRAGE čimbenik koji doprinosi razvoju upalnih bolesti bilo bi potrebno provesti prospektivna istraživanja. Ako se utvrdi da je niska razina sRAGE faktor rizika za upalu, biti će zanimljivo definirati populaciju visokog rizika zbog mogućnosti dugoročnog povećanja razine sRAGE specifičnim tretmanima. Postoji nekoliko mogućnosti za moduliranje RAGE-ligand/RAGE /sRAGE sustava, kao što su anti-RAGE antitijela koja bi mogla blokirati interakciju između RAGE i njegovih liganada, a time i razvoj upale.

Budući da je u ovom radu analizirana uloga proupalnog proteina HMGB1 koji se smatra jednim od liganada receptora RAGE, istraživanje je krenulo u smjeru daljnjeg

razjašnjenja uloge sRAGE i HMGB1 kao pokazatelja aktivnosti bolesti pri čemu su razine navedenog alarmina i njegova receptora uspoređene s razinama klasičnih laboratorijskih pokazatelja aktivnosti JIA.

Prema rezultatima ovog istraživanja utvrđena je pozitivna i statistički značajna povezanost, između serumske razine proteina HMGB1 i klasičnih laboratorijskih pokazatelja akutne bolesti tj. ubrzane sedimentacije eritrocita, povišene razine C-reaktivnog proteina, povišene razinom  $\alpha$ -2 globulina u svih bolesnika s JIA neovisno o tipu bolesti. Što može značiti da analiza alarmina HMGB1 u bolesnika s JIA može biti koristan pokazatelj aktivnosti bolesti, a time i važan prognostički čimbenik. Značajna, ali negativna povezanost utvrđena je između serumske razine proteina HMGB1 i anemije.

Nadalje, utvrđena je statički značajna povezanost između genskog izražaja alarmina HMGB1 i ubrzane sedimentacije eritrocita, povišene razine C-reaktivnog proteina, povišene razine  $\alpha$ -2 globulina, hemoglobina, hematokrita te broja eritrocita. u svih bolesnika s JIA neovisno o tipu bolesti. Također je dokazana statistički značajna, ali negativna korelacija između serumske razine proteina topljivog sRAGE i ubrzane sedimentacije eritrocita, povišene razine C-reaktivnog proteina te povišene razine  $\alpha$ -2 globulina u svih bolesnika s JIA neovisno o tipu bolesti. To ukazuje da je aktivnost bolesti to veća što je ubrzanija sedimentacija eritrocita, viša razina C-reaktivnog proteina te viša razina  $\alpha$ -2 globulina, a niža razina serumskog sRAGE. Statistički značajna i negativna povezanost utvrđena je između genskog izražaja za sRAGE i ubrzane sedimentacije eritrocita, povišene razine C-reaktivnog proteina te pozitivna korelacija s razinom hemoglobina i hematokrita.

Iz navedenih rezultata ovog rada može se zaključiti da je određivanje razine HMGB1 može biti korisno u postavljanju dijagnoze i posebice diferencijalne dijagnoze između sistemskog JIA i ozbiljnih sistemskih infekcija i drugih upala ili malignih bolesti koje u

inicijalnoj fazi imaju povišene klasične pokazatelje upale. Ipak, navedeni zaključak svakako bi trebalo potvrditi daljnjim istraživanjima. To je posebice važno, za sistemski tip JIA kao prototipa autoinflamatorne bolesti, za kojeg još uvijek nema specifičnog laboratorijskog nalaza niti kliničkog znaka koji bi bio patognomoničan za dijagnozu. Obično se sistemski JIA inicijalno prezentira nalazom povišenih vrijednosti reaktanata akutne faze i kliničkim tijekom koji nalikuje sepsi, dok se artritis često razvije tek kasnije u tijeku bolesti. Time se izgubi vrijeme na inicijalnu dijagnostičku obradu što onemogućuje rano započinjanje odgovarajućeg protuupalnog liječenja. Zbog navedenog bi postojanje biljega za prepoznavanje sistemskog JIA, u ovom slučaju serumskog HMGB1 u navedenu svrhu bilo vrlo korisno.

S druge strane, unatoč brojnim istraživanjima uloge HMGB1 u razvoju upalnih reumatskih bolesti, razumijevanje i usvajanje rezultata ovih istraživanja praćeno je objektivnim ograničenjima. Tumačenje rezultata dobivenih ispitivanjem seruma, sinovijalne tekućine ili sinovije u laboratorijskih životinja kompromitirano je vjerodostojnošću ekstrapolacije rezultata na humanu populaciju (118-120,247,248). Većina radova koja proučava ulogu HMGB1 u ljudi obuhvaća relativno mali broj ispitanika i većinom se odnosi na mjerenja koncentracije HMGB1 u odraslih, dok su istraživanja na dječjoj populaciji malobrojna (37,38,189,246). Dodatni razlog nedovoljnog razumijevanja odnosa ekspresije HMGB1 na tijek upalnih reumatskih bolesti, a posebice JIA, proizlazi iz malog broja studija koje uključuju usporedno istraživanje pojedinih tipova JIA. U skladu s navedenim, u ovom je radu osim analize alarmina HMGB1, analizirana i razina S100A12 u pojedinim tipovima JIA te se na taj način pokušalo doprinijeti rasvjetljavanju i potpunijem razumijevanju ove složene pedijatrijsko-reumatološke problematike u pogledu utvrđivanja i praćenja aktivnosti bolesti te mogućnosti liječenja.

Utvrđen je značajno viši genski izražaj S100A12 u djece sa sistemskim tipom JIA U odnosu na zdravu kontrolu te podjednaka serumska razina proteina S100A12 među navedenim skupinama. Uspoređujući razinu proteina S100A12 u kontrolne skupine i u oligoartikularnom i poliartikularnom tipu JIA, povišena razina S100A12 proteina bila je dokazana u poliartikularnom JIA, dok je genski izražaj bio povišen u oba tipa JIA u odnosu na kontrolu. Uspoređujući razine alarmina među pojedinim tipovima JIA pokazalo se da je razina proteina S100A12 viša u sistemskom nego u oligoartikularnom tipu JIA, dok je obrnut odnos pokazan između sistemskog i poliartikularnog tipa JIA. Nadalje, u bolesnika sa sistemskim tipom JIA utvrđena je pozitivna i statistički značajna korelacija između HMGB1 i SE, CRP-a te  $\alpha$ -2 globulina. Istovremeno, korelacija između sRAGE i navedenih laboratorijskih parametara bila je statistički značajna, ali negativna u istoj skupini.

Navedeni rezultati povišenog genskog izražaja S100A12 alarmina u sistemskom tipu JIA govore u prilog rezultata istraživanja prema kojima je dominantna uloga prirođenog imunskog sustava u sistemskom JIA naglašena visokim izražajem i serumskom koncentracijom proteina koji vezuju kalcij S100A8 i S100A9. Navedeni proteini spadaju u skupinu alarmina, moćnih medijatora upale koji primarno doprinose aktivaciji prirođenog imunskog sustava, a luče se tijekom aktivacije neutrofilnih granulocita i monocita. Nedavni radovi pokazuju usku povezanost između visoke serumske koncentracije alarmina u sistemskom JIA i aktivnosti te bolesti (37-39). Osim toga, S100A8 i S100A9 pokazuju proupalne učinke na leukocitima i endotelnim stanicama te su stoga vjerojatno izravno uključeni u upalni proces sistemskog JIA (253,255). S100A12 se čini članom novog upalnog signalnog puta koji uključuje RAGE, receptor transdukcijских proupalnih signala endotelnih stanica i fagocita (249-256). Djelovanje S100A12 na endotel in vitro rezultira povećanom pojavnošću mRNA za VCAM-1,

ICAM-1 te IL-8 u humanim mikrovaskularnim endotelnim stanicama (257). Osim toga, upalni odgovor u mišjim modelima upale može biti blokiran s anti-S100A12 ili anti-RAGE antitijelima (249). Međutim, još uvijek nije jasno je li izlučivanje IL-1 $\beta$ , IL-6 i S100-proteina primarni ili sekundarni korak uzročno-posljedičnog lanca u sistemskom JIA.

U nedavnim istraživanjima opisana je povišena serumska koncentracija i genski izražaj proteina koji veže kalcij S100A12 u mononuklearima periferne krvi bolesnika s reumatoidnim artritisom (146,258,259,260,261). Osim studija koje dokazuju sistemsku ulogu proteina S100A12, imunohistokemijske analize pokazale su povećanje sinovijalnog izražaja proteina S100A12 u zglobovima pogođenim reumatoidnim ili psorijatičnim artritisom (146,261). U suprotnosti prema relativno zakašnjelom otpuštanju HMGB1, rana prisutnost proteina S100 na upalnim mjestima objašnjava njihovu uključenost u ranim upalnim događajima (173,260,262). Razina istog alarmina, osim u RA i PsA određivana je u upalnim crijevnim bolestima, vaskulitisa i nađena je povišena u odnosu na zdravu kontrolu (140,142,143).

Jedno od istraživanja alarmina S100A12 u dječjoj populaciji proveli su 2008. godine Wittkowski i suradnici evaluirajući vrijednost navedenog alarmina kao molekularnog biljega u postavljanju diferencijalne dijagnoze između sistemskog JIA i drugih uzroka vrućice nepoznatog podrijetla (FUO, engl. *fever of unknown origin*) (263). Diferencijalna dijagnoza FUO uključuje sistemski JIA, autoinflamatorni sindrom udružen s aktivacijom fagocitnih stanica, sistemske infekcije te maligne bolesti. Cilj studije bio je istražiti može li određivanje serumske koncentracije fagocitnog proupalnog proteina S100A12 pomoći u izboru lijeka za bolesnike s FUO, trebalo bi liječiti antibioticima ili imunosupresivima.



Rezultati studije pokazali su vrlo visoku razinu alarmina S100A12 u bolesnika sa sistemskim JIA u odnosu na druge dijagnoze (autoinflamatorne bolesti, leukemiju i infekcije), kao i kontrolnu skupinu. U istom radu podjednaku razinu S100A12 imala je skupina od 17 djece s obiteljskom mediteranskom vrućicom pa je razlikovanje navedenih bolesti putem S100A12 bilo nemoguće. Međutim, niti nije neophodno koristiti ovaj biljeg za postavljanje dijagnoze obiteljske mediteranske vrućice jer se ista može dijagnosticirati temeljem genskog testiranja i pozitivne obiteljske anamneze. Ipak, prisutnost visoke razine S100A12 alarmina ukazuje na zajednički mehanizam patogeneze sJIA i FMF koji nije prisutan u drugih autoinflamatornih bolesti. Istraživanje je prošireno mjerenjem razine S100A12 u djece s akutnom leukemijom u kojih je kao i u gore navedenim bolestima utvrđena značajno niža razina nego u bolesnika sa sistemskim JIA. Iz navedenih rezultata autori su zaključili da određivanje razine S100A12 može koristiti u postavljanju dijagnoze, tj. diferencijalne dijagnoze između sJIA i sistemskih infekcija i drugih upala ili malignih bolesti koje u inicijalnoj fazi imaju povišene klasične pokazatelje upale kao što su SE, CRP i alfa-globulin.

Razina S100A12 u serumu bolesnika s JIA u istom radu bila je puno viša u odnosu na izmjerenu razinu u ovom radu. Ipak, iako je razlika u serumskoj razini S100A12 proteina velika, mora se imati na umu da dobna struktura između različitih skupina nije homogena, posebice zbog uključenja određenog broja odraslih ispitanika. S druge strane, u navedenoj je studiji bio uključen veći broj ispitanika sa sistemskim JIA, a poznato je da je analiziranje skupina bolesnika s rijetkim bolestima (sistemski JIA je najrjeđi oblik JIA) povezano s ograničenjima u svezi s tumačenjem podataka zbog relativno niskog broja bolesnika.

Nadalje, za razliku od citiranog rada u kojem nije određivan genski izražaj za S100A12, nego je razina proteina S100A12 korištena kao serumski biljeg razlikovanja sistemskog

JIA od drugih bolesti, u ovom istraživanju je prikazana razlika pojedinih tipova JIA određivanjem genskog izražaja. Dokazana je značajno viša razina genskog izražaja S100A12 u djece sa sistemskim JIA u odnosu na zdravu kontrolu (203,29 pg/ml prema 79,58 pg/ml). Također, pokazalo se da je izražaj gena S100A12, osim u sistemskom tipu, značajno povišen i u poliarтикуlarnom tipu JIA (182,35 pg/ml prema 79,58 pg/ml) usporedno s kontrolnom skupinom. Također, razina gena S100A12 bila je povišena u sistemskom tipu JIA u odnosu na poliarтикуlarni (203 pg/ml prema 182 pg/ml) i oligoarтикуlarni (79,58 pg/ml prema 157,73 pg/ml) tip JIA.

Gene izražene u mononuklearima periferne krvi u bolesnika sa sistemskim JIA pokazali su 2007. godine Ogilvie i suradnici iz čega se mogla uvidjeti specifična regulacija genske transkripcije. Prema njoj se razlikuju bolesnici s aktivnim sistemskim JIA od onih s inaktivnom bolesti i drugim upalnim stanjima, pri čemu je gen S100A12 bio među ostalim genima znatno dobro reguliran (264). Allantaz i suradnici su koristeći istu tehniku prikazali 12 bolesnika sa sistemskim JIA usporedno s drugim febrilnim stanjima uključujući infekcije (265).

Ipak, prednosti određivanja razine proteina pojedinog alarmina u odnosu na određivanje pojavnosti gena su bolja dostupnost, niži troškovi i praktičnost uzimanja uzoraka.

Također, u ovom radu su uspoređene serumske razine proteina S100A12 između pojedinih tipova JIA. Razina serumskog proteina S100A12 pokazala se višom u novootkrivenom sistemskom tipu JIA (1610,48 pg/ml) u odnosu na razinu istog alarmina u oligoarтикуlarnom tipu (1445,22 pg/ml), ali ne i u poliarтикуlarnom tipu JIA (2412,25 pg/ml), što ukazuje na dodatni izvor alarmina iz upalom zahvaćenih zglobova. Navedeno je u skladu s nedavnim istraživanjem u bolesnika s RA u kojih je imunohistokemijski dokazano povećanje sinovijalnog izražaja S100A12 u zglobovima pogođenim reumatoidnim ili psorijatičnim artritisom (146,261). U serumu bolesnika s

RA također je dokazana povećana razina proteina S100A12 te pojačan izražaj gena S100A12 u mononuklearima periferne krvi (258). Nadalje, u istom je radu utvrđena visoka razlika u senzitivnosti i specifičnosti S100A12 između sistemskog JIA i infekcije te je istraživana specifičnost i senzitivnost S100A12 alarmina usporedno s C-reaktivnim proteinom.

Za razliku od citiranog rada u ovom istraživanju proučavano je više laboratorijskih parametara kao i više alarmina istovremeno zajedno s njihovim topljivim receptorom sRAGE. Utvrđena je statistički značajna pozitivna korelacija između reaktanata akutne faze upale (SE, CRP, alfa2-globulina) i alarmina HMGB1 te statistički značajna, ali negativna korelacija navedenih klasičnih pokazatelja upale i sRAGE, što ukazuje na vrijednost oba laboratorijska nalaza u utvrđivanju i praćenju aktivnosti JIA.

Slični rezultati povišene razine alarmina i snižene razine solubilnog receptora RAGE dobiveni su u istraživanju odnosa S100A12 i RAGE u djece s Kawasakijskom bolesti (65). Kawasakijska bolest (KD) je sistemski vaskulitis malih i srednje velikih arterija koja se javlja u djetinjstvu. Etiologija i patogeneza bolesti nije poznata, ali rezultati istraživanja pokazuju da je S100A12 uključen u upalni proces u KD (266). Kako bi se ispitao odnos između S100A12 i sRAGE, uspoređene su razine S100A12 i sRAGE u djece s KD (model akutne upale), s djece s JIA (jedni sa sistemskim nastupom JIA kao tipom akutne upale i drugi sa zglobnim nastupom JIA kao tipom kronične upale) i zdrave kontrole (65). U usporedbi s kontrolnom skupinom, uočeno je da su razine sRAGE niže u KD i sistemskom JIA i više u zglobnom tipu JIA. Razine S100A12 su veće u KD i JIA nego u kontrolama i omjer S100A12/sRAGE značajno viši u djece s KD ili JIA. Nakon liječenja, u bolesnika s KD, omjer S100A12/sRAGE bio je u istom rasponu kao u kontrole. Ovi rezultati naglašavaju da je razina sRAGE smanjena u akutnoj upali, ali može biti povećana u kroničnoj upali, moguće kao rezultat

protuupalnog povratnog mehanizma. Povišeni omjer S100A12/sRAGE omjera može biti normaliziran nakon rješavanja upale, što sugerira da je praćenje ovog omjera korisnije od praćenja pojedinih parametara.

Na posljetku, ostaje nejasno jesu li niske razine sRAGE povezane s visokom osjetljivošću na proupalne učinke S100A12 ili je povišena razina S100A12 povezana sa smanjenjem sRAGE eliminacijom kompleksa sRAGE-S100A12. Navedenu dilemu pokušala je riješiti skupina autora koji su određivali razinu S100A12 i sRAGE u serumu te sluznici crijeva u djece s novodijagnosticiranom upalnom bolesti crijeva (IBD, engl. *inflammatory bowel diseases*) poput Crohnove bolesti (CB) i ulceroznog kolitisa (UC) u usporedbi s djecom oboljelom od celijakije i kontrolne skupine s neupalnom bolesti crijeva (160). U usporedbi s celijakijom i djecom oboljelom od neupalnih bolesti crijeva, serumska razina S100A12 bila je povišena u djece oboljele od IBD, dok je razina S100A12 u sluznici djece oboljele od IBD i celijakije bila veća nego u djece oboljele od neupalnih bolesti crijeva. Prema rezultatima ove studije nije bilo razlike u serumskoj razini sRAGE između ovih skupina i nije dokazana prisutnost sRAGE u crijevnoj sluznici. Utvrđena je neravnoteža između visoke serumske razine S100A12 i niske razine sRAGE u sluznice djece s IBD čime ova studija sugerira da serumska razina sRAGE ne može biti biljeg upale u IBD. Međutim, rezultati ukazuju na to da nedostatak antagonista, kao što je topljivi sRAGE, može omogućiti veću aktivaciju RAGE preko vezivanja S100 proteina što je vidljivo u upalom promijenjenoj sluznici djece oboljele od IBD-a. (158)

### **Moguća klinička primjena alarmina u JIA**

Prethodna diskusija ohrabruje na daljnja istraživanja mogućnosti farmakološke intervencije u mreži alarmina kao novog biološkog tretmana dječjeg artritisa. Naime,

usprkos tome što zadnjih godina dolazi do sve većeg napretka u razumijevanju imunopatogeneze i u mogućnostima liječenja JIA, ipak još uvijek nema jedinstvenog niti optimalnog načina liječenja ove dječje bolesti.

Da bolest nije benigna govori podatak kako znatan broj bolesne djece ulazi u odraslu dob s perzistentno aktivnom bolešću, a velik dio razvije teški tjelesni invaliditet. Zbog svega navedenog s velikim zanimanjem se iščekuju rezultati studija o primjeni bioloških agensa za koje se smatra da će dovesti do iznijeti dugoročne remisije JIA. Danas se u liječenju poliartikularnog i oligoartikularnog proširenog tipa JIA koriste lijekovi koji blokiraju djelovanje TNF- $\alpha$ , dok se u sistemskom tipu JIA nalaze značajno povišene razine IL-1 i IL-6 te je liječenje usmjereno na blokadu tih interleukina. Nažalost, blokada citokina nije se pokazala učinkovitom u svih bolesnika s JIA.

Novije studije ukazuju da bi uzvodni alarminski signalizacijski putovi mogli biti potencijalna terapijska meta u upalnoj kaskadi prirodene imunosti kao ključnog imunopatogenetskog mehanizma sistemskog tipa JIA. Stoga bi strategije liječenja koje su usmjerene na proupalna svojstva proteina S100 mogle pružiti novi pristup imunoterapiji uzvodno od TNF- $\alpha$  aktivacije, a to se još više odnosi na HMGB1 koji se čini neovisnim o TNF- $\alpha$  (93). Naime, pokazano je da anti-TNF- $\alpha$  terapija ne utječe na pojavnost proteina HMGB1 (94) te da HMGB1 antitijela i antagonist domene A uspješno inhibiraju razvoj sinovijalne upale i oteklinu zglobova na životinjskim modelima artritisa (93,95,96). Na primjer, studija Sundbera i suradnika (2008.) pokazala je da sistemska blokada TNF- $\alpha$  infliksimabom ne utječe na sinovijalni izražaj HMGB1 u bolesnika s reumatoidnim artritisom (94) što govori u prilog hipoteze da bi navedeni bolesnici vjerojatno imali koristi od pristupa kojem se cilja HMGB1. Stoga HMGB1 može biti privlačna meta, osobito u bolesnika koji ne reagiraju na anti-TNF- $\alpha$  terapiju.

Iako još uvijek nema kliničkih studija o specifičnom liječenju kojemu je meta HMGB1, postoje studije čiji rezultati upućuju na utjecaj lijekova koji se primjenjuju u liječenju pojedinih upalnih reumatskih bolesti na HMGB1. Utvrđena je smanjena pojavnost izvanstaničnog sinovijalnog HMGB1 u bolesnika s RA nakon intraartikularne injekcije kortikosteroida (226). Također, dokazan je smanjen izražaj HMGB1 u mišićima bolesnika s kroničnim miozitisom nakon sistemske primjene kortikosteroida (66). Andersson i sur. (2010.) pokazali su da liječenje solima zlata, tradicionalnom terapijom za reumatoidni artritis, inhibira HMGB1, ali ne i otpuštanje TNF iz aktiviranih makrofaga (196). Mala studija sistemske blokade TNF infuzijama infliksimaba u bolesnika s RA nije pokazala nikakve promjene u pojavljivanju HMGB1 u sinoviji. To može ukazivati da TNF nije glavni pokretač izvanstaničnog HMGB1 tijekom reumatoidnog sinovitisa (94). Najjače indicije koje govore o važnosti uloge HMGB1 u patogenezi artritisa temelje se na rezultatima dobivenim na životinjskim modelima koji koriste niz različitih eksperimentalnih strategija kako bi smanjili upalu posredovanu HMGB1. Mnogi odvojeni terapijski modaliteti koji neutraliziraju aktivnost izvanstaničnog HMGB1 ili njegovih receptora ili otpuštanja izvanstaničnog HMGB1 su uspješno primijenjeni u različitim modelima artritisa.

Nadalje, rezultati Kokkole i sur. (2003.) sugeriraju da intervencija neutralizirajućim poliklonskim anti-HMGB1 protutijelima sprječava napredovanje postojećeg CIA u glodavaca, smanjujući kliničke znakove artritisa i gubitak tjelesne težine (95,267). Važno je napomenuti da se neutraliziranjem HMGB1 također stječe značajna zaštita hrskavice i kosti zgloba od destrukcije koja je glavni uzrok kroničnog invaliditeta u te bolesti (223,226,229,249). Liječenje smanjuje pojavnost TNF i IL-1 $\beta$  i histološke znakove upale. Važno pitanje u procesu proizvodnje monoklonskog protutijela na HMGB1 jest kako smanjiti oslobađanje endogenog HMGB1 iz hibridnih stanica koji bi

mogao blokirati vezna mjesta za protutijela. Naime, u uvjetima kulture sa stresom, hipoksijom ili nekrozom hibridoma, stanice će otpuštati HMGB1 kojeg će prepoznati anti-HMGB1 monoklonska antitijela i time smanjiti njihovu učinkovitosti liječenja.

Još jedan uspješan način inhibiranja aktivnosti HMGB1 u CIA-modelu temelji se na primjeni tkz. A-domene rekombinantnog proteina HMGB1. Analize strukture i funkcije molekule HMGB1 pokazale su da DNA-vezujuća B-domena posreduje proupalne učinke HMGB1, dok je DNA-vezujuća A-domena protuupalna molekula. Domena A inhibira ove aktivnosti premještanjem membranskog HMGB1 receptora na stanicama (68). Sistemska primjena HMGB1 A-domene u CIA značajno poboljšava artritis „score“, smanjuje gubitak tjelesne težine uzrokovan bolešću i popravlja histološki nalaz u miševa i štakora (95). Pojavnost IL-1 $\beta$  u sinoviji i destrukcija zglobne hrskavice je također značajno smanjena u životinja tretiranih s A-domenom.

Trombomodulin (TM) je endotelni antikoagulantni kofaktor koji promiče stvaranje aktiviranog proteina C posredovano trombinom, aktivnost HMGB1 neutralizirana je vezivanjem na N-terminalni lektinsku domenu TM-a, dijela molekule koji ne sudjeluje u procesima zgrušavanja (199). Nadalje, miševi kojima nedostaje lektinu-nalik domena TM-a razvijaju teži oblik artritisa i artritis s bržim nastupom nego divlji kontrolni tip miševa.

U slijedu istraživanja koja se bave proučavanjem novijih metoda liječenja ciljanjem alarmina ističe se RAGE kao transmembranski protein imunoglobulinske obitelji koji djeluje kao multiligandski receptor sposoban za vezanje HMGB1, proteina S100A12, AGE i amiloid beta-peptida (268). Njegov izotip, topljivi sRAGE, nema transmembransku domenu i cirkulira u plazmi. Kompeticijom za vezivanje liganada, topljivi sRAGE može djelovati kao „mamac“ receptor koji uklanja cirkulirajuće RAGE-ligande (269). U skladu s ulogom RAGE kao HMGB1-receptora, sustavno liječenje

topljivim sRAGE proteinom može ublažiti upalu, a djelomično i ublažiti strukturno oštećenje u CIA (270).

S druge strane, nekoliko pristupa koji dovode do intranuklearnog zadržavanja HMGB1 pružilo je odlične terapijske rezultate u eksperimentalnim artritisima. HMGB1 se čvrsto veže na promijenjenu DNA, a protutumorski spoj oksaliplatina generira kovalentne DNK te tako izolira nuklearni HMGB1. Terapijska primjena oksaliplatine u CIA smanjuje upalu i strukturno oštećenje što je povezano s niskom razinom ekstracelularnog HMGB1. Prekid liječenja oksaliplatinom dovodi do masivnog otpuštanja HMGB1 i do pogoršanja bolesti (223).

Budući je HMGB1 strukturno identičan u 99 % sisavaca, jaz između pretkliničkih i kliničkih studija mogao bi biti manji nego što je uobičajeno. Domena A rekombinantnog proteina HMGB1 i tri različita anti-HMGB1 specifična monoklonska protutijela do sada su se, u eksperimentalnim modelima, pokazali kao najuspješniji specifični antagonisti HMGB1. Liječenje koje se temelji na A-domeni rekombinantnog proteina HMGB1 postiglo je vrlo dobre rezultate u širokom spektru pretkliničkih poremećaja. Međutim, ovaj protein sastavljen od oko 80 aminokiselinskih ostataka ima kratki vijek preživljavanja u cirkulaciji, a može se izmijeniti kako bi se produžila biološku raspoloživost. Sva tri anti-HMGB1 monoklonska protutitijela koja su učinkovita u životinjskim modelima mišjeg su podrijetla i treba ih humanizirati. Koncept inhibiranja aktivnog izlučivanja nuklearnog HMGB1 također je vrlo obećavajuć. Nedavno izvješće o netoksičnoj, niskoj dozi cisplatine u liječenju eksperimentalne sepse pokazuje odlične rezultate (271). Drugi pristup u djelovanju na HMGB1 u svrhu liječenja jest primjena etilnog piruvata, jako moćnog inhibitora sekrecije HMGB1. Liječenje s etil piruvatom poboljšalo je preživljavanje i/ili poboljšava klinički status u brojnim životinjskim modelima uključujući sepsu, akutni



pankreatitis i moždani udar (116,272), ali se još uvijek čekaju rezultati životinjskih modela artritisa. Daljnja opcija temelji se na činjenici da n. vagus može inhibirati izlučivanje proupalnih citokina (116). Identifikacija tog puta omogućila je veliki napredak u dizajniranju novih lijekova, ponajviše u liječenju sepse (273-275). U kontekstu upalnih reumatskih bolesti, studija na bolesnicima s reumatoidnim artritisom pokazala je vezu između smanjene aktivnosti n. vagusa i povišene serumske razine HMGB1 (172) što navodi na zaključak kako manipulacija anti-upalnog kolinergičnog puta također, može, biti upotrijebljena u liječenju JIA.

S druge strane, primjena farmakoloških sredstava koja bi mogla utjecati na aktivnost članova obitelji S100 otežana je činjenicom da navedeni geni ne postoje u laboratorijskih glodavaca (250). Drugi problem kojeg treba riješiti proizlazi iz svojstva članova obitelji S100 da oblikuju homo i heterokomplekse. Prethodno je spomenuta proupalna aktivnost S100A8/9 kompleksa, no trebalo bi napomenuti da su Hsu i suradnici (2005.) pokazali da bi S100A8 mogao imati protuupalna svojstva, moguće neovisno od hetero kompleksa sa S100A9 (276).

Činjenica da HMGB1 i S100A12 ostvaruju, svoje učinke barem djelomično, kroz RAGE otvara mogućnost da se djelujući na RAGE može utjecati na oba navedena proupalna alarmina. Naime, za razliku od suvremenih istraživanja u kojima se sRAGE prikazuje kao potencijalni biljeg u ljudi, u studijama starijeg datum primjena rekombinantnog sRAGE je bila korištena kao sredstvo liječenja u upalnim mišjim modelima. Eksperimentalno izazvan odgođeni tip hipersenzitivnosti (DTH, engl. *delayed-type hypersensitivity*) kao model akutne upale bio je induciran u miševa senzibiliziranih s metiliranim BSA (mBSA) s jakim upalnim odgovorom kod ubrizgavanja u nogu miša (249). Primjena mišjeg sRAGE intraperitonealno prije i poslije lokalne injekcije mBSA rezultirala je suzbijanjem upale što je objektivizirano

histološki i klinički. Nadalje, u mišjem modelu s upalnom bolesti crijeva, većina miševa tretiranih sa sRAGE nije kroz 6 tjedana pokazala upalu pri pregledu rektosigmoidnog dijela debelog crijeva (249). Značajno smanjen izražaj NF- $\kappa$ B u jezgrinim ekstraktima pripremljenim od tkiva kolona miševa tretiranih sa sRAGE, povezan je s 8,7 puta smanjenom razinom TNF-alfa u plazmi podupirući protuupalna svojstva sRAGE. U usporedbi s kontrolnim miševima, miševi s kolagen-induciranim artritisom tretirani sa sRAGE pokazali su histološki znatno niži stupanj sinovijalne hiperplazije/hipertrofije kao i znatno nižu destrukciju hrskavice i kosti (270).

U novije vrijeme potvrđeno je da intraperitonealna injekcija sRAGE štiti miševе od HMGB1-induciranog artritisa (277). Da bi utvrdili mehanizam djelovanja sRAGE, sRAGE i HMGB1 su bili istovremeno ubrizgani intraartikularno, ali protuupalni učinci nisu bili primijećeni sugerirajući da izravno vezanje HMGB1 sa sRAGE ne blokira proupalne aktivnosti HMGB1 in vivo. Paradoksalno, pokazalo se da intrartikularno ubrizgavanje samo sRAGE uzrokuje sinovitis! Nadalje, sRAGE može imati proupalne učinke preusmjerenjem upalnog odgovora iz perifernih organa na mjesto uboda (npr. peritoneum). U skladu s navedenim, ispitan je peritonealni lavat u miševa tretiranih intraperitonealnom injekcijom sRAGE te je zabilježena povećana ekstravazacija leukocita.

Eksperimentalni autoimuni encefalitis (EAE, engl. *experimental autoimmune encephalitis*) odgovara mišjem modelu multiple skleroze, razarajućeg neuroinflamatornog i autoimunog poremećaja CNS-a (278). Dnevno intraperitonealno ubrizgavanje sRAGE ima jak zaštitni učinak protiv induciranog EAE. Tretirani miševi pokazuju niži klinički skor težine bolesti, a histološka analiza tkiva leđne moždine ne pokazuje upalnu infiltraciju (279).

Osim toga, primjena sRAGE usporava ateroskleroza i stabilizirala postojeće aterosklerotske plakove u dijabetičkih miševa s nedostatkom apolipoproteina E (242,280). Svi ovi rezultati ukazuju na to da uporaba sRAGE kao sredstva liječenja može spriječiti neke upalne i/ili autoimune bolesti u životinjskim modelima, te stoga naglašavaju primjenu sRAGE ili V-domene vezanja liganda kao potencijalne terapijske mete za upalne bolesti.

S druge strane, niti jedna klinička studija nije istražila posljedice injiciranja topljivog sRAGE u ljudi, ali se u nekoliko studija pisalo o modulaciji razine topljivog sRAGE različitim tretmanima. U bolesnika s tipom 1 šećerne bolesti proučavane su početne razine AGE i sRAGE u plazmi i razine nakon 24 mjeseca, pri čemu su bolesnici bili randomizirani na placebo, perindopril (inhibitor angiotenzin-konvertaza enzima, ACE inhibitor) ili nifedipin (antagonist kalcija). U usporedbi s netretiranim i nifedipinom tretiranim grupama, bolesnici tretirani s perindoprilom su znatno smanjili razine AGE i povećali razine sRAGE u krvi (281). Autori pretpostavljaju da bi povećanje razine sRAGE moglo uzrokovati preusmjerenja vezanja AGE s membranskog oblika RAGE (fRAGE) na solubilni RAGE koji djeluje kao mamac („decoy“ receptor ) jer zbog skraćenog oblika nema sposobnost nizvodne signalizacije.

Također je procjenjivana modulacija sRAGE-a s lijekovima za dijabetes i statinima (282,283). Razine sRAGE u plazmi izmjerene su u bolesnika s hiperkolesterolemijom koji nisu liječeni, u bolesnika s hiperkolesterolemijom liječenih sa statinima (CVD) kroz 3 mjeseca i zdravih kontrolnih ispitanika. Bolesnici s neliječenom hiperkolesterolemijom imali su niže razine sRAGE nego bolesnici druge dvije skupine. Kako bi se utvrdilo mogu li statini utjecati na sRAGE izmjerene su razine sRAGE u skupini bolesnika s hiperkolesterolemijom nakon 8 tjedana liječenja s atrovastatinom ili

pravastatinom. Bolesnici liječeni atorvastatinom imali su značajno povećanu razinu sRAGE (282).

Serumske razine sRAGE i esRAGE određene su u bolesnika s dijabetesom tipa 2 prije i nakon liječenja [dodatno liječenje-roziglitazonom (skupina tiazolinedina) ili sulfonilureje (oralni hipoglikemik) kroz šest mjeseci]. Bolesnici liječeni roziglitazonom imali su značajno povećanu razinu sRAGE i esRAGE. Nadalje, bolesnici liječeni s roziglitazonom u dozi od 8 mg/dan imali su više razine sRAGE i esRAGE od onih liječenih s 4mg dnevno (282). Ovi rezultati pokazuju da različiti lijekovi, osobito iz kardiovaskularnog područja, mogu utjecati na razinu sRAGE, ali potrebne su dugoročne prospektivne studije za procjenu mogućnosti da moduliranje razine sRAGE može spriječiti ili odgoditi komplikacije upale.

Zaključno, jasna je potreba za novim istraživanjima na tom području, ali opće je vjerovanje da će se usmjeravanje interesa na alarmine pokazati korisnim. Očekuje se, da će uvođenje novih strategija liječenja, kao što je blokada proteina HMGB1 pokazati alarmine terapijskim metama koje će omogućiti dugoročnu remisiju u bolesnika s JIA.

## 7. ZAKLJUČCI

1. U sistemskom tipu JIA serumska razina proupalnog alarmina HMGB1 statistički je značajno povišena u odnosu na oligoartikularni i poliartikularni tip JIA i kontrolnu skupinu. To ukazuje na različitost imunopatogeneze pojedinih tipova JIA, odnosno govori u prilog tome da HMGB1 kao medijator prirodene imunosti može biti uključen u imunopatogenezu sistemskog tipa JIA. Navedeno doprinosi mišljenju da prirodni imunski sustav ima dominantnu ulogu u imunopatogenetskom mehanizmu sistemskog JIA koji se može smatrati više autoinflamatornim nego autoimunskim poremećajem za razliku od artikularnih tipova JIA.
2. Serumska razina proupalnog alarmina HMGB1 u akutnoj fazi sistemskog tipa JIA statistički je značajno povezana s klasičnim laboratorijskim pokazateljima akutne bolesti (ubrzanom sedimentacijom eritrocita, povišenom razinom C-reaktivnog proteina i povišenom razinom  $\alpha$ -2 globulina) što ukazuje da određivanje alarmina HMGB1 u bolesnika sa sistemskim tipom JIA može biti koristan parametar za utvrđivanje aktivnosti bolesti.
3. Genski izražaj alarmina HMGB1 statistički je značajno povezan s ubrzanom sedimentacijom eritrocita, povišenom razinom C-reaktivnog proteina, povišenom razinom  $\alpha$ -2 globulina te razinom hemoglobina, hematokrita i broja eritrocita u bolesnika sa sistemskim tipom JIA.
4. Serumska razina topljiva sRAGE kao i genski izražaj istog receptora u sistemskom, oligoartikularnom i poliartikularnom tipu JIA su niži u odnosu na kontrolnu skupinu što može biti posljedica „trošenja“ budući da membranski receptor RAGE i topljivi sRAGE imaju istu specifičnost za vezivanje liganada. Prema tom modelu sRAGE djeluje kao „mamac“ blokirajući interakciju membranskog RAGE i

- njegovih pro-upalnih liganada kao npr. proupalnog HMGB1 čija je razina povišena u aktivnoj bolesti. Uspoređujući razinu topljiva sRAGE u sistemskom tipu JIA u odnosu na oligoartikularni i poliartikularni tip utvrđena je niža razina u sistemskom tipu.
5. U bolesnika sa sistemskim tipom JIA utvrđena je statistički značajna, ali negativna korelacija između serumske razine topljivog sRAGE i ubrzane sedimentacije eritrocita, povišene razine C-reaktivnog proteina te povišene razine  $\alpha$ -2 globulina što ukazuje na to da je aktivnost bolesti veća što je ubrzanija sedimentacija eritrocita, viša razina C-reaktivnog proteina te viša razina  $\alpha$ -2 globulina, a niža razina serumskog sRAGE. Statistički značajna i negativna povezanost utvrđena je između genskog izražaja sRAGE i ubrzane sedimentacije eritrocita, povišene razine C-reaktivnog proteina te pozitivna korelacija s razinom hemoglobina i hematokrita.
  6. Određivanje razine HMGB1 i sRAGE moglo bi biti korisno u procjenjivanju aktivnosti bolesti pri čemu bi visoka razina HMGB1 i niska razina sRAGE označavala aktivnu bolest. S druge strane, određivanje istih molekula moglo bi se koristiti u diferencijalnoj dijagnostici sistemskog JIA prema ozbiljnim sistemskim infekcijama i drugim upalnim stanjima ili malignim bolestima koje u inicijalnoj fazi imaju povišene klasične pokazatelje upale kao što su SE, CRP i  $\alpha$ -2 globulin.
  7. Serumaska razina alarmina S100A12 kao i njegov genski izražaj u mononuklearima periferne krvi statistički su značajno viši u djece s poliartikularnim tipom JIA u odnosu na kontrolnu skupinu što bi moglo značiti da su makrofagi u ciljnom tkivu, odnosno u upalom zahvaćenom zglobu, glavni izvor S100A12 u poliartikularnom tipu JIA.
  8. U djece s poliartikularnim tipom JIA značajno je povezana serumaska razina i genski izražaj alarmina S100A12 s povišenom razinom  $\alpha$ -2 globulina, dok u djece

sa sistemskim tipom JIA nema povezanosti serumske razine niti genskog izražaja S100A12 s laboratorijskim nalazima aktivne bolesti, iako je genski izražaj navedenog alarmina u sistemskom tipu JIA statistički značajno viši u odnosu na kontrolu.

9. Nema značajne razlike u serumskoj razini alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova topljiva receptora sRAGE između JIA bolesnika (neovisno o tipu bolesti) i kontrolne skupine, što potvrđuje poremećenu ravnotežu i različitu ulogu alarmina u pojedinim tipovima JIA.

## 8. SAŽETAK

### **Značenje alarmina HMGB1 i S100A12 te njihova receptora RAGE u juvenilnom idiopatskom artritisu**

Razumijevanje imunopatogeneze juvenilnog idiopatskog artritisa (JIA) još uvijek je nepotpuno. Cilj ovog rada bio je utvrditi značenje proteina visoke pokretljivosti iz skupine 1 (HMGB1, engl. high mobility group box 1), proteina koji veže kalcij S100A12 (S100A12, engl. calcium-binding protein S100A12) i njihova topljiva receptora za krajnje produkte uznapredovale glikozilacije sRAGE (engl. soluble receptor for advanced glycation end products) u JIA. Uključeno je 102 djece sa JIA i 28 djece kontrolne skupine kojima je izvađena periferna krv prije započetog liječenja. Serumska razina alarmina analizirana je ELISA testom, dok je izražaj gena određen u mononuklearima periferne krvi kvantitativnim PCR-om. U sistemskom tipu JIA (sJIA) utvrđene su značajno više serumske razine HMGB1 u odnosu na oligoartikularni ( $P < 0,000$ ) i poliarтикуlarni ( $P < 0,002$ ) tip JIA te kontrolnu skupinu ( $P < 0,032$ ). Istovremeno, serumska razina ( $P < 0,036$ ) kao i genski izražaji ( $P < 0,007$ ) sRAGE bili su statistički značajno niži u sJIA u odnosu na kontrolu. K tome, serumski HMGB1 u sJIA djece bio je statistički značajno povezan s ubrzanom sedimentacijom eritrocita ( $r = 0,51$ ;  $P < 0,001$ ), povišenom razinom C-reaktivnog proteina ( $r=0,52$ ;  $P < 0,000$ ) i povišenom razinom  $\alpha_2$ -globulina ( $r= 0,50$ ;  $P < 0,001$ ), dok je sRAGE i pokazao značajnu, ali negativnu korelaciju sa istim proteinima akutne faze. Navedeno ukazuje na to da HMGB1, kao medijator prirodene imunosti, u interakciji sa sRAGE sudjeluje u imunopatogenezi sJIA te može služiti kao biomarker za određivanje aktivnosti i moguća meta u liječenju sJIA.



## 9. SUMMARY

### **The significance of alarmins HMGB1 and S100A12 and their receptor RAGE in juvenile idiopathic arthritis**

Dubravka Bobek 2014.

Our understanding of the immunopathogenesis of juvenile idiopathic arthritis (JIA) is still incomplete. The aim of this study was to determine the significance of high mobility group box 1 (HMGB1), calcium-binding protein S100A12 and their soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in JIA. We included 102 children with JIA (28 children with systemic-onset JIA, 39 children with oligoarticular-onset JIA, and 35 children with polyarticular-onset JIA) and 28 children as control group and harvested peripheral blood before any therapy was introduced. The serum levels of the alarmins were determined by ELISA, while gene expression in mononuclears was assessed by quantitative PCR. The level of the HMGB1 protein was significantly higher in the group of children with systemic JIA (sJIA), as compared to the oligoarticular ( $P < 0,000$ ) or polyarticular ( $P < 0,002$ ) subtype of JIA and control group ( $P < 0,032$ ). The children with sJIA had a significant reduction of sRAGE protein in the serum ( $P < 0,036$ ) and the gene expression ( $P < 0,007$ ) of sRAGE. Additionally, serum HMGB1 in sJIA children was positively correlated with ESR ( $r = 0,51$ ;  $P < 0,001$ ), C-reactive protein ( $r=0,52$ ;  $P < 0,000$ ) levels and  $\alpha 2$  globulin ( $r= 0,50$ ;  $P < 0,001$ ), while sRAGE serum level showed significantly close but inverse relationship with the same proteins of acute phase. These data indicate that HMGB1, a mediator of innate immunity, through interactions with sRAGE contributes to immunopathogenesis of sJIA. Furthermore, HMGB1 may serve as a biomarker for determining disease activity and a potential target of therapy in systemic JIA patients.

## 10. LITERATURA

1. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* (Epub ahead of print) Feb 26, 2009.
2. Lukić IK, Jelušić-Dražić M, Kovačić N, et al. Damage-associated molecular patterns– emerging targets for biologic therapy of childhood arthritides. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2009;8:139-45.
3. Foell D, Wittkowski H, Rot J. Mechanisms of Disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2007;3:382-390.
4. Woo P, Wedderburn LR. Juvenile chronic arthritis. *Lancet* 1998;351:969–73.
5. Woo P. Systemic juvenile idiopathic arthritis: diagnosis, management, and outcome. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2:28–33.
6. Brewer EJ, Bass JC, Baum J, Cassidy JT, Fink C, Jacobs J. et al. Current proposed revision of JRA Criteria. JRA Criteria Subcommmiteme of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Section of The Arthritis Foundation. *Arthritis Rheum* 1977;20:195-199.
7. Wood PH. Nomenclature and classification of arthritis in children. In: Munthe E, ed. *The care of rheumatic children.* Basel, European League Against Rheumatism. 1978;47-50.
8. Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P, et al. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 1998;25:1991-4.
9. Brewer EJ, Bass JC, Cassidy TJ. Criteria for the classification of juvenile rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 1973;23:712-719.

10. Marija Jelušić, Ivan Malcic i suradnici. U: *Pedijatrijska reumatologija*. Zagreb; Medicinska naklada, 2014;163-168.
11. Yu-Tsan Lin, Chen-Ti Wang, M. Eric Gershwin, Bor-Luen Chiang. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity Reviews* 2001;10:482-489.
12. Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest* 1994;94:25–33.
13. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:617–29.
14. Gattorno M, Gerloni V, Morando A, Comanducci F, Buoncompagni A, Picco P, et al. Synovial membrane expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor 1 in juvenile idiopathic arthritides. *J Rheumatol* 2002;29:1774–9.
15. Kamphuis S, Hrafnkelsdottir K, Klein MR, de Jager W, Haverkamp MH, van Bilsen JH, et al. Novel self-epitopes derived from aggrecan, fibrillin, and matrix metalloproteinase-3 drive distinct autoreactive T-cell responses in juvenile idiopathic arthritis and in health. *Arthritis Res Ther* 2006;8:178.
16. de Graeff-Meeder ER, van Eden W, Rijkers GT, Prakken BJ, Kuis W, Voorhorst-Ogink MM, et al. Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis. *J Clin Invest* 1995;95:934–40.
17. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004;172:6435–43.

18. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmun Rev* 2010;10:112–5.
19. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–61.
20. Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, et al. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:2423–33.
21. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008;29:429–35.
22. Glass DN, Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis Rheum* 1999;42:2261–8.
23. Prahalad S. Genetics of juvenile idiopathic arthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:588–94.
24. Thomson W, Donn R. Juvenile idiopathic arthritis genetics — what's new? What's next? *Arthritis Res* 2002;4:302–6.
25. Shoenfeld Y, Blank M, Abu-Shakra M, Amital H, Barzilai O, Berkun Y, et al. The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases — 2008. *Isr Med Assoc J* 2008;10:13–9.
26. Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G, Stojanovich L, Cutolo M, Amital H, Levy Y, et al. The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases — 2008. *Isr Med Assoc J* 2008;10:8–12.
27. Zandman-Goddard G, Berkun Y, Barzilai O, Boaz M, Ram M, Anaya JM, et al. Neuropsychiatric lupus and infectious triggers. *Lupus* 2008;17:380–4.

28. Zandman-Goddard G, Berkun Y, Barzilai O, Boaz M, Blank M, Ram M, et al. Exposure to Epstein–Barr virus infection is associated with mild systemic lupus erythematosus disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1173:658–63.
29. Frosch M, Roth J. New insights in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2008;47:121-125.
30. Quartier P, Taupin P, Bourdeaut F et al. Efficacy of etanercept for the treatment of juvenile idiopathic arthritis according to the onset type. *Arthritis Rheum* 2003;48:1093–101.
31. Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereaux J. Role of interleukin (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2005;201:1479–86.
32. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005;201:1355–9.
33. De Benedetti F, Massa M, Robbioni P, Ravelli A, Burgio GR, Martini A. Correlation of serum interleukin-6 levels with joint involvement and thrombocytosis in systemic juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:1158–63.
34. De Benedetti F, Pignatti P, Gerloni V, Massa M, Sartirana P, Caporali R, et al. Differences in synovial fluid cytokine levels between juvenile and adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997;24:1403-1409.
35. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice. A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 2006;54:3551–63.
36. Woo P, Wilkinson N, Prieur AM et al. Open label phase II trial of single, ascending doses of MRA in Caucasian children with severe systemic juvenile idiopathic

- arthritis: proof of principle of the efficacy of IL-6 receptor blockade in this type of arthritis and demonstration of prolonged clinical improvement. *Arthritis Res Ther* 2005;7:1281–8.
37. Foell D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3762-3771.
38. Frosch M, Vogl T, Seeliger S, et al. Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2622-2626.
39. Foell D, Wittkowski H, Hammerschmidt I et al. Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations. *Arthritis Rheum* 2004;50:1286–95.
40. de Jager W, Hoppenreijns EP, Wulffraat NM, Wedderburn LR, Kuis W, Prakken BJ. Blood and synovial fluid cytokine signatures in patients with juvenile idiopathic arthritis; a cross-sectional study. *Ann Rheum Dis* 2007;66:589–98.
41. Kawashima M, Yamamura M, Tani ai M et al. Levels of interleukin-18 and its binding inhibitors in the blood circulation of patients with adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum* 2001;44:550–60.
42. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:95–104.
43. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 2001;29:301–5.
44. Rammes A, Roth J, Goebeler M, Klempt M, Hartmann M, Sorg C. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calciumbinding proteins of the S100 family, are

- secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 1997;272:9496-9502.
45. de Benedetti F, Meazza C, Vivarelli M, Rossi F, Pistorio A, Lamb R, et al. Functional and prognostic relevance of the -173 polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1398-407.
46. Donn R, Alourfi Z, Zeggini E, Lamb R, Jury F, Lunt M, et al. A functional promoter haplotype of macrophage migration inhibitory factor is linked and associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1604-10.
47. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-76.
48. Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, et al. The -174 G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum* 2003;48:3202-6.
49. Lin YT, Wang CT, Gershwin ME, Chiang BL. The pathogenesis of oligoarticular/polyarticular vs systemic juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity Reviews* 2011;10:482-489.
50. De Benedetti F, Ravelli A, Martini A. Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:428-433.
51. Madson KL, Moore TL, Lawrence JM, Osborn TG. Cytokine levels in serum and synovial fluid of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994;21:2359-2363.

52. Ozen S, Saatci U, Bakkaloglu A, Ozmdemir O, Besbas N, Kirazli S et al. Interleukin-1, -6, and -8 levels in juvenile chronic arthritis. *Clin Rheumatol* 1997;16:173-178.
53. Rooney M, Varsani H, Martin K, Lombard PR, Dayer JM, Woo P. Tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors in juvenile chronic arthritis. *Rheumatology* 2000;39:432-438.
54. Marušić M, Grčević D. Fiziološki tijek imunoreakcije. U: *Imunologija*. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjčić D. 6. izd, Zagreb; Medicinska naklada, 2004;139-156.
55. Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F. Study od pro-inflammatory (TNF-a, IL-1a, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol* 1998;17:288-292.
56. Berner B, Akca D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J Rheumatol* 2000;27:1128-1135.
57. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2007;220:35-46.
58. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *The Journal of Clinical Investigation* 2012;8:2711-2719.
59. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81:1-5.
60. Odink K, Cerletti N, Brügggen J, et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature.* 1987;330:80-2.



61. Urbonaviciute V, Fürnrohr BG, Meister S. et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1–nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med.* 2008;205:3007-3018.
62. Soyfoo MS, Roth J, Vogl T, et al. Phagocyte specific S100A8/A9 protein levels during disease exacerbations and infections in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatology.* 2009;36(10):2190-4.
63. Portela LVC, Brenol JCT, Walz R, et al. Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clinical diagnostic labor immunol.* 2002;9(1):164–166.
64. Popović K, Ek M, Espinosa A, et al. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arth Rheum.* 2005;52:3639–3645.
65. Wittkowski H, Hirono K, Ichida F, et al. Acute Kawasaki disease is associated with reverse regulation of soluble receptor for advance glycation end products and its proinflammatory ligand S100A12. *Arth Rheum.* 2007;56(12):4174-4181.
66. Ulfgren AK, Grundtman C, Borg K, et al. Down-regulation of the aberrant expression of the inflammation mediator high mobility group box chromosomal protein 1 in muscle tissue of patients with polymyositis and dermatomyositis treated with corticosteroids. *Arth Rheum.* 2004;50:1586–1594.
67. Ek M, Popović K, Harris HE, et al. Increased extracellular levels of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Arth Rheum.* 2006;54:2289–2294.

68. Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(1):296-301.
69. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, Maseri A, Bianchini ME. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J.* 2006;20(14): 2565-6.
70. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* 2005;437(7057):369-75.
71. Areschoug T, Gordon S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib. Microbiol.* 2008;15:45-60.
72. Yang D, Tewary P, de la Rosa G, Wei F, Oppenheim JJ. The alarmin functions of high-mobility group proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799(1-2):157-163.
73. Dumitriu IE, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. *J Immunol.* 2005;174(12):7506-7515.
74. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):59-66.
75. Frosch M, et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(3):628-637.

76. van Lent PL, et al. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(12):1750–1758.
77. van Lent PL, et al. Stimulation of chondrocyte-mediated cartilage destruction by S100A8 in experimental murine arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(12):3776–3787.
78. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
79. Claus RA, Otto GP, Deigner HP, Bauer M. Approaching clinical reality: markers for monitoring systemic inflammation and sepsis. *Curr Mol Med.* 2010;10(2):227–235.
80. Mease PJ. The potential roles for novel biomarkers in rheumatoid arthritis assessment. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(3):567–574.
81. Hammer HB, et al. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(8):1093–1097.
82. Brun JG, Jonsson R, Haga HJ. Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 1994;21(4):733–738.
83. Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48(6):1676–1685.
84. Foell D, Ichida F, Vogl T, et al., “S100A12 (EN-RAGE) in monitoring Kawasaki disease,” *The Lancet*, 2003;361:1270–1272.

85. Foell D, Frosch M, Schulze zur Wiesch A, Vogl T, Sorg C, Roth J. Methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop? *Ann Rheum Dis.* 2004;63(2):206–208.
86. Foell D, et al. Methotrexate withdrawal at 6 vs 12 months in juvenile idiopathic arthritis in remission: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2010;303(13):1266–1273.
87. Liao H, et al. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3792–3803.
88. Hammer HB, et al. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):150–154.
89. Taylor PC, Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5(10):578–582.
90. Feldmann M, Maini RN. Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med.* 2003;9(10):1245–1250.
91. Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med.* 2001;29(7):121–125.
92. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, et al. “Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome,” 2007;56(12):1706–1713.
93. Pullerits R, Jonsson IM, Kollias G, Tarkowski A. Induction of arthritis by high mobility group box chromosomal protein 1 is independent of tumour necrosis factor signalling. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(3):R72.

94. Sundberg E, Grundtman C, Af Klint E, et al. Systemic TNF blockade does not modulate synovial expression of the pro-inflammatory mediator HMGB1 in rheumatoid arthritis patients-a prospective clinical study, *Arthritis Res. Ther.* 2008;10(2):33.
95. Kokkola R, Li J, Sundberg E, et al. Successful therapy in collagen-induced arthritis in mice and rats targeting extracellular HMGB1 activity, *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):2052–2058.
96. Ostberg T, et al. Protective targeting of high mobility group box chromosomal protein 1 in a spontaneous arthritis model. *Arthritis Rheum.* 2010;2(10):2963–2972.
97. Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C, Driscoll PC, Norman DG. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:3427–36
98. Thomas JO. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 2001;29:395–401
99. Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 2001;26:167–74
100. Stros M, Stokrova J, Thomas JO. DNA looping by the HMG-box domains of HMG1 and modulation of DNA binding by the acidic C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:1044–51
101. Watson M, Stott K, Thomas JO. Mapping intramolecular interactions between domains in HMGB1 using a tail-truncation approach. *J. Mol. Biol.* 2007;374:1286–97
102. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice, *Science* 1999;285:248–251.

103. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation, *Nature* 2002;418:191–195.
104. Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. 2006. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291:C1318–25
105. Jiang W, Bell CW, Pisetsky DS. The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid. *J. Immunol.* 2007;178:6495–6503.
106. Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* 2008;29:21–32
107. Wähämaa H, Vällerskog T, Qin S, et al. HMGB1-secreting capacity of multiple cell lineages revealed by a novel HMGB1 ELISPOT assay, *J. Leukoc. Biol.* 2007;81:129–136.
108. Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis, *Arthritis Rheum.* 2008;58:2675–2685.
109. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway, *EMBO Rep.* 2002;13:995–1001.
110. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils, *J. Biol. Chem.* 2007;282:16336–16344.
111. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion, *EMBO J.* 2003;22:5551–5560.

112. Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion, *J. Immunol.* 2006;177:7889–7897
113. Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages, *Nature* 2006;43:998–1002.
114. Hacker H. Signal transduction pathways activated by CpG-DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2000;247:77–92.
115. Li J, Wang H, Mason JM, et al. Recombinant HMGB1 with cytokine stimulating activity. *J. Immunol. Methods*, 2004;289:211-23.
116. Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:189-201.
117. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, et al. Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). Regulation of monocyte migration by amphotericin. *Blood*, 2004;104:1174-1182.
118. Orlova VV, Choi EY, Xie C, et al. A novel pathway of HMGB1-mediated inflammatory cell recruitment that requires Mac-1-integrin, *EMBO J.* 2007;26:1129–1139.
119. Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H, et al. IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2003;170:3890-3897.
120. Telusma G, Datta S, Mihajlov I, Ma W, Li J, Yang H, et al. Dendritic cell activating peptides induce distinct cytokine profiles. *Int. Immunol* 2006;18:1563-1573.

121. Penza P, Moniuszko A, Zajkowska J. High mobility group box I (HMGB1) and its effect on dendritic cells. *Pol Merkur Lekarski*. 2012;33(195):129-32.
122. Hori O, Brett J, Slattery T, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system, *J. Biol. Chem.* 1995;270:25752–25761.
123. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.*, 2004;279:7370-7377.
124. Tian J, Avalos AM, Mao SY, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE, *Nat. Immunol.* 2007;8:487–496.
125. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Georgoulas P et al. “Moderate performance of serum S100A12, in distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome,” *BMC Gastroenterology*, 2010;10:118.
126. Moore BW. “A soluble protein characteristic of the nervous system,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 19, no. 6, pp. 739–744, 1965.
127. Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, and Shaw GS. “Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family,” *Biochemical Journal* 2006;396(2):201–214.
128. Pietzsch J, Hoppmann S. “Human S100A12: a novel key player in inflammation?” *Amino Acids*, 2009;36(3):381–389.
129. Guignard F, Mauel J, and Markert M, “Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family,” *Biochemical Journal*, 1995;309(2):395–401.



130. Heilmann RM, Suchodolski JS, and Steiner JM. "Purification and partial characterization of canine S100A12," *Biochimie*, 2010;92(12):1914–1922.
131. Chen H, Cheng L, Yang S, et al., "Molecular characterization, induced expression, and transcriptional regulation of porcine S100A12 gene," *Molecular Immunology*, 2010;47(7-8):1601–1607.
132. Yamashita K, Oyama Y, Shishibori T, Matsushita O, Okabe A and Kobayashi R. "Purification of bovine S100A12 from recombinant *Escherichia coli*," *Protein Expression and Purification*, 1999;16(1):47–52.
133. Ilg EC, Troxler H, B'urgisser DM, et al., "Amino acid sequence determination of human S100A12 (P6, calgranulin C, CGRP, CAAF1) by tandem mass spectrometry," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996;225(1):146–150.
134. Meijer B, Geary RB, Day AS. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *Int J Inflamm*. 2012;2012:907078.
135. Yilmaz Y, Yonal O, Eren F, Atug O, and Over Hamzaoglu H. "Serum levels of soluble receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) are higher in ulcerative colitis and correlate with disease activity," *Journal of Crohn's and Colitis*, 2011;5(5):402–406.
136. Han EC, Cho SB, Ahn KJ, et al., "Expression of proinflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in Behc,et's disease and its association with disease activity: a pilot study," *Annals of Dermatology*, 2011;23(3):313–320.
137. Kallinich T, Wittkowski H, Keitzer R, Roth J, and Foell D. "Neutrophil-derived S100A12 as novel biomarker of inflammation in familial Mediterranean fever," *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2010;69(4):677–682.

138. Ye F, Foell D, Hirono KI, et al., “Neutrophil-derived S100A12 is profoundly upregulated in the early stage of acute Kawasaki disease,” *American Journal of Cardiology*, 2004;94(6):840–844.
139. Komatsuda A, Ohtani H, Wakui H et al. “Increased serum levels of S100A12 in patients with MPO-ANCA-associated glomerulonephritis,” *Clinical Nephrology*, 2006;66:315–321.
140. Kaiser T, Langhorst J, Wittkowski H, et al., “Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome,” *Gut*, 2007;56(12):1706–1713.
141. Manolakis AC, Kapsoritakis AN, Tiaka EK, and Potamianos SP. “Calprotectin, calgranulin C, and other members of the s100 protein family in inflammatory bowel disease,” *Digestive Diseases and Sciences*, 2011;56:1601–1611.
142. Foell D, Wittkowski H, and Roth J, “Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage,” 2009;58(6):859–868.
143. Foell D, Kane D, Bresnihan B, et al., “Expression of the proinflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid and psoriatic arthritis,” *Rheumatology*, 2003;42(11):1383–1389.
144. Donato R. “Intracellular and extracellular roles of S100 proteins,” *Microscopy Research and Technique*, 2003;60(6):540–551.
145. Lukić IK, Humpert PM, Nawroth PP, Bierhaus A. The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1126:76-80.

146. Chavakis T, Bierhaus A, Nawroth PP. RAGE (receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes Infect.* 2004;6:1219-1225.
147. Yan SF, Barile GR, D'Agati V, Du Yan S, Ramasamy R, Schmidt AM. The biology of RAGE and its ligands: uncovering mechanisms at the heart of diabetes and its complications. *Curr. Diab. Rep.* 2007;7:146-153.
148. Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J. Exp. Med.* 2003;198:1507-1515.
149. Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature.* 1996;382:685-691.
150. Wolf R, Howard OM, Dong HF, Voscopoulos C, Boeshans K, Winston J, et al. Chemotactic activity of S100A7 (psoriasin) is mediated by the receptor for advanced glycation end products and potentiates inflammation by highly homologous but functionally distinct S100A15. *J. Immunol.* 2008;181:1499-1506.
151. Neeper M, Schmidt AM, Brett J et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 1992;267:14998–5004.
152. Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K et al. Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 1994;23:408–19.

- 153.Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108(7):949–955.
- 154.Smith MA, Taneda S, Richey PL et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:5710–14.
- 155.Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:103–13.
- 156.Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 2003;370:1097–109.
- 157.Hudson BI, Carter AM, Harja E et al. Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. *Faseb J* 2008;22:1572–80.
- 158.Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI and Lambert M. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology* 2009;48:1190–1196.
- 159.Nienhuis HL, de Leeuw K, Bijzet J et al. Skin autofluorescence is increased in systemic lupus erythematosus but is not reflected by elevated plasma levels of advanced glycation endproducts. *Rheumatology* 2008;47:1554–8.

160. Leach ST, Yang Z, Messina I et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2007;42:1321–31.
161. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1117–28.
162. Yamagishi S, Adachi H, Nakamura K et al. Positive association between serum levels of advanced glycation end products and the soluble form of receptor for advanced glycation end products in nondiabetic subjects. *Metabolism* 2006;55:1227–31.
163. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:359-365.
164. Adams DD, Knight JG, Ebringer A. Autoimmune diseases: solution of the environmental, immunological and genetic components with principles for immunotherapy and transplantation. *Autoimmun Rev* 2010;9:525–30.
165. Berkun Y, Padeh S. Environmental factors and the geoepidemiology of juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmun Rev* 2010;9:A319–24.
166. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;33:3–11.
167. Invernizzi P, Gershwin ME. The genetics of human autoimmune disease. *J Autoimmun* 2009;33:290–9.
168. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: underlying evidence of ethnic differences. *J Autoimmun* 2009;32:158–62.
169. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. *J Autoimmun* 2010;34:J168–77.

170. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2010;35:10–4.
171. Yokota S, Miyamae T, Imagawa T et al. Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:818–25.
172. Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Mol. Med.*, 2007;13:210-215.
173. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine, *Arthritis Rheum*. 2003;48:971–981.
174. Urbonaviciute V, Voll RE. HMGB1 in SLE. *J Intern Med* 2011;270.
175. Barkauskaite V, EkM, Popovic K, Harris HE, Wahren-Herlenius M, Nyberg F. Translocation of the novel cytokine HMGB1 to the cytoplasm and extracellular space coincides with the peak of clinical activity in experimentally UV-induced lesions of cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 2007;16:794–802.
176. Jiang W, Pisetsky DS. Expression of high mobility group protein 1 in the sera of patients and mice with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008;67:727–8.
177. Bruchfeld A, Qureshi AR, Lindholm B et al. High Mobility Group Box Protein-1 correlates with renal function in chronic kidney disease. *Mol Med* 2008;14:109–15.
178. Abdulahad DA, Westra J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. HMGB1 in systemic lupus erythematosus: its role in cutaneous lesions development. *Autoimmun Rev* 2010; 9:661–5.

179. Li J, Xie H, Wen T, Liu H, Zhu W, Chen X. Expression of high mobility group box chromosomal protein 1 and its modulating effects on downstream cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2010;37:766–75.
180. Ma CY, Jiao YL, Zhang J et al. Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2010 (Epub ahead of print).
181. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Weber C et al. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J Leukoc Biol* 2007; 81:67–74.
182. Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R71.
183. Andersson U, Rauvala H. Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity. *Journal of Internal Medicine* 2011;270:296-300.
184. Banerjee S, Friggeri A, Liu G, Abraham E. The C-terminal acidic tail is responsible for the inhibitory effects of HMGB1 on efferocytosis. *J Leukoc Biol* 2010;88:973–9.
185. Friggeri A, Yang Y, Banerjee S, Park YJ, Liu G, Abraham E. HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299:1267–76.
186. Yanai H, Ban T, Taniguchi T. HMGB proteins in nucleic acid mediated innate immune responses. *J Intern Med* 2011;270.
187. Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11942–7.

188. Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Lavery H, Park BK. Diet restriction inhibits apoptosis and HMGB1 oxidation and promotes inflammatory cell recruitment during acetaminophen hepatotoxicity. *MolMed* 2010;16:479–90.
189. Rosenberg, AM, Cordeiro, DM. Relationship between sex and antibodies to high mobility group proteins 1 and 2 in juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.*, 2000;27:2489-2493.
190. Wittemann B, Neuer G, Michels H, Truckenbrodt H, Bautz FA. Autoantibodies to nonhistone chromosomal proteins HMG-1 and HMG-2 in sera of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1990;33(9):1378-83.
191. Jung F, Neuer G, Bautz FA. Antibodies against a peptide sequence located in the linker region of the HMG-1/2 box domains in sera from patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997;40(10):1803-9.
192. Burlingame RW, Rubin RL, Rosenberg AM. Autoantibodies to chromatin components in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1993;36(6):836-41.
193. Qin S, Wang H, Yuan R, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J. Exp. Med.* 2006;203:1637–1642.
194. Liu K, Mori S, Takahashi HK, et al. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats, *FASEB J.* 2007;21:3904–3916.
195. Chen GY, Tang J, Zheng P, Liu Y. CD24 and Siglec-10 selectively repress tissue damage-induced immune responses, *Science* 2009;323:1722–1725.
196. Andersson U, Erlandsson Harris H. The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochimica et Biophysica* 2010;1799:141–148.



197. Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, et al. Antihigh-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis, *World J. Surg.* 2006;30:1755–1762.
198. Levy RM, Mollen KP, Prince JM, et al. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007;293:1538–1544.
199. Abeyama K, Stern DM, Ito Y, et al. The N-terminal domain of thrombomodulin sequesters high-mobility group-B1 protein, a novel antiinflammatory mechanism, *J. Clin. Invest.* 2005;115:1267–1274.
200. Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage, *J. Neurosci.* 2008;28:12023–12031.
201. Tsung A, Sahai R, Tanaka H et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia–reperfusion, *J. Exp. Med.* 2005;201:1135–1143.
202. Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, et al. High-mobility group box-1 in ischemia–reperfusion injury of the heart, *Circulation* 2008;117:3216–3226.
203. Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, et al. Blockade of high mobility group box-1 protein attenuates experimental severe acute pancreatitis, *World J. Gastroenterol.* 2006;12:7666–7670.
204. Yuan H, Jin X, Sun J, et al. Protective effect of HMGB1 a box on organ injury of acute pancreatitis in mice, *Pancreas* 2009;38:143–148.
205. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ, HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation, *J. Immunol.* 2000;165:2950–2954.
206. Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, et al. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004;170:1310–1316.

207. Kim JY, Park JS, Strassheim D, et al. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005;288:958–965.
208. Ogawa EN, Ishizaka A, Tasaka S, et al. Contribution of high-mobility group box-1 to the development of ventilator-induced lung injury, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;174:400–407.
209. Gong Q, Xu JF, Yin H, Liu SF, Duan LH, Bian ZL, Protective effect of antagonist of high-mobility group box 1 on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice, *Scand. J. Immunol.* 2009;69:29–35.
210. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, et al. HMG-1 stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes, *J. Exp. Med.* 2000;192:565–570.
211. Bianchi ME. HMGB1 loves company, *J. Leukoc. Biol.* 2009;86:573–576.
212. Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA, *Blood* 2007;110:1970–1981.
213. Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes, *J. Immunol.* 2008;180:5067–5074.
214. Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines, *J. Immunol.* 2008;180:2531–2537.
215. Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wahamaa H, et al. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 2009;86:655–662.

216. Campana L, Bosurgi L, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 for stromal cell-derived factor-1/CXCL12-dependent migration of macrophages and dendritic cells, *J. Leukoc. Biol.* 2009;86:609–615.
217. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2006;290:917–924.
218. Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, et al. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells, *J. Cell. Biol.* 2001;152:1197–1206.
219. Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis, *Cancer Res.* 2002;62:4805–4811.
220. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1, *Mol. Med.* 2003;9:37–45.
221. Yuan Z, Chen J, Zhang Y, Peng Y. Construction and characterization of the HMGB1 mutant as a competitive antagonist to HMGB1 induced cytokines release, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;372:703–707.
222. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgrén AK et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2598–603.
223. Östberg T, Wähämaa H, Palmblad K, et al. Oxaliplatin retains HMGB1 intranuclearly and ameliorates collagen type II-induced arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 2008;10:1.

224. Palmblad K, Sundberg E, Diez M, et al. Morphological characterization of intra-articular HMGB1 expression during the course of collagen-induced arthritis, *Arthritis Res. Ther.* 2007;9:35.
225. Parkkinen J, Rauvala H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphoterin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin, *J. Biol. Chem.* 1991;266:16730–16735.
226. Yamoah K, Brebene A, Baliram R, et al. High-mobility group box proteins modulate tumor necrosis factor-alpha expression in osteoclastogenesis via a novel deoxyribonucleic acid sequence, *Mol. Endocrinol.* 2008;22:1141–1153.
227. Yang J, Shah R, Robling AG, et al. HMGB1 is a bone-active cytokine, *J. Cell. Physiol.* 2008;214:730–739.
228. Zhou Z, Han JY, Xi CX, et al. HMGB1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis in a manner dependent on RAGE, *J. Bone Miner. Res.* 2008;23:1084–1096.
229. Mouri F, Tsukada J, Mizobe T, et al. Intracellular HMGB1 transactivates the human IL1B gene promoter through association with an Ets transcription factor PU.1, *Eur. J. Haematol.* 2008;80:10–19.
230. af Klint E, Grundtman C, Engstrom M, et al. Intraarticular glucocorticoid treatment reduces inflammation in synovial cell infiltrations more efficiently than in synovial blood vessels, *Arthritis Rheum.* 2005;52:3880–3889.
231. Pullerits R, Jonsson IM, Verdrengh M et al. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1693–700.

- 232.van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo, *Shock* 2009;31:280–284.
- 233.Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response—the evidence mounts, *J. Leukoc. Biol.* 2009;86:505–512.
- 234.Yu M, Wang H, Ding A, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2, *Shock* 2006;26:174–179.
- 235.van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1), *Angiogenesis* 2008;11:91–99.
- 236.Drinda S, Franke S, Ruster M et al. Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005;25:411–13.
- 237.Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R817–24.
- 238.Pullerits R, Bokarewa M, Dahlberg L, Tarkowski A. Synovial fluid expression of autoantibodies specific to RAGE relates to less erosive course of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2007;46:1367-1371.
- 239.Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: autoimmune epithelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:162–5.
- 240.Katz J, Stavropoulos F, Bhattacharyya I, Stewart C, Perez FM, Caudle RM. Receptor of advanced glycation end product (RAGE) expression in the minor

- salivary glands of patients with Sjogren's syndrome: a preliminary study. *Scand J Rheumatol* 2004;33:174–8.
241. Stewart C, Cha S, Caudle RM, Berg K, Katz J. Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int* 2008;28:771–6.
242. Park L, Raman KG, Lee KJ et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 1998;4:1025–31.
243. Raucci A, Cugusi S, Antonelli A et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membranebound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J* 2008;22:3716–27.
244. Geroldi D, Falcone C, Minoretti P, Emanuele E, Arra M, D'Angelo A. High levels of soluble receptor for advanced glycation end products may be a marker of extreme longevity in humans. *J Am Geriatr Soc* 2006;54:1149–50.
245. Koyama H, Shoji T, Yokoyama H et al. Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2587–93.
246. Wulffraat NM, Haas PJ, Frosch M, De Kleer IM, Vogl T, Brinkman DM, et al. Myeloid elated protein 8 and 14 secretion reflects phagocyte activation and correlates with disease activity in juvenile idiopathic arthritis treated with autologous stem cell transplantation. *Ann. Rheum. Dis.* 2003;62:236-41.
247. Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, et al. Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). Regulation of monocyte migration by amphoterin. *Blood.* 2004;104:1174-1182.

248. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarisation. *J. Immunol.* 2004;173:307-313.
249. Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides, *Cell* 1999;97:889–901.
250. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):28–37.
251. Yan WX, Armishaw C, Goyette J, Yang Z, Cai H, Alewood P, et al. Mast cell and monocyte recruitment by S100A12 and its hinge domain. *J. Biol. Chem.* 2008;283:13035-13043.
252. Yang Z, Yan WX, Cai H, Tedla N, Armishaw C, Di Girolamo N, et al. S100A12 provokes mast cell activation: a potential amplification pathway in asthma and innate immunity. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2007;119:106-114.
253. Roth J, Vogl T, Sorg C, Sunderkotter C. Phagocyte specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol* 2003;24:155–8.
254. Viemann D, Strey A, Janning A et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood* 2005;105:2955–62.
255. Viemann D, Barczyk K, Vogl T et al. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood* 2007;109:2453–60.

256. Larsen A, Bronstein IB, Dahl O, Wentzel-Larsen T, Kristoffersen EK, et al. "Quantification of S100A12 (EN-RAGE) in blood varies with sampling method, calcium and heparin," *Scandinavian Journal of Immunology*, 2007;65:192–201.
257. Wittkowski H, Sturrock A, van Zoelen M et al. Neutrophil-derived S100A12 in acute lung injury and respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2007;35:1369–75.
258. Bovin LF, Rieneck K, Workman C, et al. Blood cell gene expression profiling in rheumatoid arthritis. Discriminative genes and effect of rheumatoid factor. *Immunol. Lett.*, 2004;93:217-226.
259. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2006;8:69.
260. de Seny D, Fillet M, Ribbens C, et al. Monomeric calgranulin measured by SELDI-TOF mass spectrometry and calprotectin measured by ELISA as biomarkers in arthritis. *Clin. Chem.* 2008;54:1066-1075.
261. Wittkowski H, Foell D, af Klint E, et al. Effects of intra-articular corticosteroids and anti-TNF therapy on neutrophil activation in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2007;66:1020-1025.
262. Moser B, Desai DD, Downie MP, et al. *J. Immunol* 2007;179:8051.
263. Wittkowski H, Frosch M, Wulffraat N, Goldbach-Mansky R, Kallinich T, Kuemmerle-Deschner J, et al. S100A12 Is a Novel Molecular Marker Differentiating Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis From Other Causes of Fever of Unknown Origin. *American College of Rheumatology*. 2008;58:3924–3931.



- 264.Ogilvie EM, Khan A, Hubank M, Kellam P, Woo P. Specific gene expression profiles in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1954–65.
- 265.Allantaz F, Chaussabel D, Stichweh D, et al. Blood leukocyte microarrays to diagnose systemic onset juvenile idiopathic arthritis and follow the response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2007;204:2131–44.
- 266.Burns JC. S100 proteins in the pathogenesis of Kawasaki disease. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1265–7.
- 267.Kokkola R, Li J, Sundberg E, Aveberger AC, Palmblad K, et al. Successful therapy in collagen-induced arthritis in mice and rats targeting extracellular HMGB1 activity, *Arthritis Rheum.* 2003;48:2052–2058.
- 268.Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products, *J. Mol. Med.* 2005;83:876–886.
- 269.Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target, *Curr. Med. Chem.* 2006;13:1971–1978
- 270.Hofmann MA, Drury S, Hudson BI et al. RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response. *Genes Immun* 2002;3:123–35.
- 271.Pan P, Cardinal J, Dhupar R, et al. Low-dose cisplatin administration in murine cecal ligation and puncture prevents the systemic release of HMGB1 and attenuates lethality, *J. Leukoc. Biol.* 2009;86:625–632.
- 272.Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J. Intern. Med.*, 2007;261:349-362.
- 273.Hofer S, Eisenbach C, Luki IK, et al. Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. *Crit. Care Med.*, 2008;36:404-408.

274. Bopp C, Bierhaus A, Hofer S, et al. Bench-to-bedside review: The inflammation-perpetuating pattern-recognition receptor RAGE as a therapeutic target in sepsis. *Crit. Care*, 2008;12:201.
275. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest.*, 2007;117:289-296.
276. Hsu K, Passey RJ, Endoh Y, et al. Regulation of S100A8 by glucocorticoids. *J. Immunol.*, 2005;174:2318-2326.
277. Pullerits R, Brisslert M, Jonsson IM, Tarkowski A. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1. *Arthritis Rheum* 2006;54:3898–907.
278. Wong FS, Dittel BN, Janeway CA Jr. Transgenes and knockout mutations in animal models of type 1 diabetes and multiple sclerosis. *Immunol Rev* 1999;169:93–104.
279. Yan SS, Wu ZY, Zhang HP et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med* 2003;9:287–93.
280. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W et al. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2002;106:2827–35.
281. Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2363–72.
282. Tan KC, Chow WS, Tso AW et al. Thiazolidinedione increases serum soluble receptor for advanced glycation end-products in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007;50:1819–25.

283. Santilli F, Bucciarelli L, Noto D et al. Decreased plasma soluble RAGE in patients with hypercholesterolemia: effects of statins. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1255–62.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođena 9. veljače 1974. u Vinkovcima gdje je pohađala gimnaziju.

Udana, majka jednog djeteta.

### *Edukacija*

2012. položila subspecijalistički ispit iz reumatologije

2012. obranila temu disertacije „Uloga alarmina HMGB1, S100A12 i njihova receptora RAGE u juvenilnom idiopatskom artritisu“

2011./2012. završila treću godinu doktorskog studija „Biomedicina i zdravstvo“,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2007. položila specijalistički ispit iz fizikalne i rehabilitacijske medicine

2005.-2006. stručni poslijediplomski studij „Fizikalna i rehabilitacijska medicina“  
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2002. obranila znanstveni magistarski rad pod nazivom „Značenje CD30 na limfocitima  
u infiltratu akutne faze atopijskog dermatitisa“ te stekla akademski stupanj magistra  
znanosti

1998.-2000. znanstveni poslijediplomski studij „Biomedicina“, Medicinski fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu

1992.-1998. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### *Radno iskustvo*

2013. do danas pročelnica Centra za fizikalnu i rehabilitacijsku medicinu s  
reumatologijom u KB Dubrava

2012. do danas fizijatar-reumatolog u KB Dubrava

2003.-2007. specijalizant iz fizikalne medicine i rehabilitacije za KB Dubrava

2000.- 2003. liječnik OM, DZ Sesvete, Zagreb

1998.-1999. pripravnički staž , DZ Peščenica, Zagreb

*Publikacije, kongresi*

Objavila više stručnih i znanstvenih radova. Sudjelovala aktivno na domaćim i međunarodnim stručno-znanstvenim skupovima.

*Nastava*

2007. predavač na poslijediplomskom studiju Fizikalna medicina i rehabilitacija na Medicinskom fakultetu u Zagrebu

2010. godine izabrana u nastavno zvanje predavača kao naslovno zvanje u području biomedicine i zdravstva, polje kliničke medicinske znanosti, grana fizikalna medicina i rehabilitacija.