



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Tjan Smrečnik

**VLOGA GENOV *GLCC1* in *SFXN1* PRI  
ZDRAVLJENJU OTROŠKE ASTME Z  
GLUKOKORTIKOIDI**

Diplomsko delo

Maribor, september 2014



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

## **VLOGA GENOV GLCCI1 in SFXN1 PRI ZDRAVLJENJU OTROŠKE ASTME Z GLUKOKORTIKOIDI**

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje

Študent: Tjan Smrečnik  
Študijski program: univerzitetni študijski program I. stopnje  
*Kemijska tehnologija*  
Predvideni strokovni naslov: diplomirani inženir kemijske tehnologije (UN)  
Mentor: izr. prof. dr. Uroš Potočnik  
Komentor: asist. dr. Vojko Berce, dr. med.

Maribor, september 2014



UNIVERZA V MARIBORU  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN  
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO  
Smetanova ulica 17  
2000 Maribor, Slovenija  
www.fkkt.um.si

Številka: K1003101  
Datum: 11.03.2013

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 46/2012)

izdajam

#### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

**Tjan Smrečnik**, študent-ka univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, lahko izdela diplomsko delo pri predmetu Biokemija in molekularna biologija.

Mentor-ica: izr. prof. dr. Uroš Potočnik  
Somentor-ica: dr. Vojko Berce

Naslov diplomskega dela:

VLOGA GENOV *GLCC1* IN *SFXN1* PRI ZDRAVLJENJU OTROŠKE ASTME Z GLUKOKORTIKOIDI

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

THE ROLE OF *GLCC1* AND *SFXN1* GENES IN THE GLUCOCORTICOID TREATMENT OF CHILDHOOD ASTHMA

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije do 30.09.2013 v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice v roku 3 delovnih dni.

Obvestiti:

- kandidata -ko,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv



DEKAN:  
red. prof. dr. Željko Knez



## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal/a sam/a, prispevki drugih so posebej označeni. Pregledal/a sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

<b>Vir:</b> NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )	
<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
asthma AND GLCCI1	30
childhood asthma AND GLCCI1	20
asthma AND SFXN1	1
childhood asthma AND SFXN1	0

<b>Vir:</b> COBIB-COBISS ( <a href="http://www.cobiss.si/scripts/cobiss?ukaz=getid">http://www.cobiss.si/scripts/cobiss?ukaz=getid</a> )	
<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
Otroška astma	8
Farmakogenomika in astma	10
SNP in astma	3

**Skupno število pregledanih člankov:** 40

**Skupno število pregledanih knjig:** 8

Maribor, september 2014

Tjan Smrečnik

## Zahvala

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Urošu Potočniku in somentorju asist. dr. Vojku Bercetu za strokovno pomoč, potrpežljivost in vzpodbudo pri pripravi diplomskega dela.

Posebno zahvalo izrekam asist. Petri Perin univ. dipl. inž. kem. teh., ter ostalim sodelavcem Centra za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete v Mariboru .

Zahvaljujem se tudi vsem mojim domačim za razumevanje in podporo.

## **Vloga genov GLCCI1 in SFXN1 pri zdravljenju otroške astme z glukokortikoidi**

### **Povzetek**

Astma je najpogostejša kronična bolezen pri otrocih, ki prizadene dihala. Poznamo dva tipa astme, in sicer alergijsko in nealergijsko obliko astme. V svetu je možno zaznati strmo naraščanje obolevnosti za astmo po letu 1980. Številne študije so potrdile vpliv več kot stotih genov na razvoj in potek zdravljenja astme. Predvidevamo, da je vpliv posameznega gena izredno majhen. Velikokrat raziskave z nasprotujočimi si rezultati otežujejo določitev vloge, ki jo ima posamezni gen na razvoj in zdravljenje astme. Pri raziskovalnem delu smo analizirali genotip in izražanje genov za gena GLCCI1 in SFXN1 jih primerjali z različnimi kliničnimi parametri. Izražanje izbranih genov smo izmerili z metodo kvantitativnega PCR v realnem času. Gensko tipizacijo DNA polimorfizmov smo izvedli z metodo »Restriction Fragment Length Polymorphism« in »High Resolution Melt«.

Z raziskavo smo želeli potrditi dosedanje rezultate raziskav za polimorfizem rs37972 za gen GLCCI1 in polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1. Z raziskavo smo potrdili povečano tveganje za obolevost za astmo pri osebah, ki imajo za polimorfizem rs37972 genotip TT ( $p=0,010$ ). Potrdimo lahko tudi vpliv genotipa CC, za polimorfizem rs37972, na vrednost parametra FEV1 ( $p=0,028$ ). Za gen SFXN1 in polimorfizem rs2644645 lahko povežemo alel T s povečano količino eozinofilcev ( $p=0,013$ ). Nadalje lahko potrdimo, da terapija s glukokortikoidi vpliva na izražanje gena SFXN1 ( $p=0,002$ ).

Rezultati, pridobljeni z raziskavo, bi lahko vplivali na razumevanje patogeneze astme in zdravljenju oz. lajšanju simptomov. Za zanesljivo uporabo genskih raziskav pri diagnosticiranju bolezni bodo v prihodnje potrebne še nadaljnje raziskave, ki bodo potrdile dosedanje povezave in analizirale gene ter njihove polimorfizme, ki imajo vpliv na razvoj in zdravljenje astme.

**Ključne besede:** GLCCI1, SFXN1, farmakogenomika, astma, genetika

**UDK:** 575:616.248(043.2)

## **Role of genes *GLCC1* and *SFXN1*, in the treatment of child asthma with glucocorticoids**

### **Abstract:**

Asthma is the most common chronic disease among children that affects the respiratory system. There are two types of asthma, i.e. allergic and non-allergic asthma. Following 1980, it is possible to observe asthma incidence rates increasing steeply in the world. Numerous studies have confirmed the influence of more than a hundred genes on the development and the course of treatment of asthma. It is expected that the influence of an individual gene is extremely small. The research projects are often conflicting in their results and make it difficult to define the role of an individual gene on the development and the course of treatment of asthma. In our research work, we have analyzed the genotype and expression of the *GLCC1* and *SFXN1* genes and compared them with various clinical parameters. The expression of chosen genes has been measured using quantitative real time PCR method. The genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) has been carried out by using »Restriction Fragment Length Polymorphism« and »High Resolution Melting curve« methods.

In this study we investigated for the role of SNP rs37972 in *GLCC1* gene and SNP rs2644645 in *SFXN1* gene in the development and treatment of childhood asthma. We found increased risk for asthma in persons having TT genotype ( $p=0.0100$ ) for rs37972 polymorphism. We also confirmed the influence of CC genotype on the FEV1 parameter value ( $p=0.0280$ ) for rs37972 polymorphism. In relation to *SFXN1* gene and rs2644645 polymorphism, T allele may be associated with the increased amount of eosinophiles ( $p=0.0130$ ). Moreover, we identified the influence of glucocorticoids treatment on the expression of *SFXN1* gene ( $p=0.0002$ ).

Our results contribute to understanding of asthma pathogenesis and asthma treatment with corticosteroids. Before using our results in clinical practice for further studies will be necessary in the future to confirm the associations identified in our study and to discover additional genes and their polymorphisms which influence the development and the course of treatment of asthma.

**Key words:** *GLCC1*, *SFXN1*, pharmacogenomics, asthma, genetics

**UDK:** 575:616.248(043.2)

## Kazalo

1	Uvod .....	1
2	Teoretični del .....	2
2.1	Splošno o astmi .....	2
2.2	Simptomi in diagnoza .....	2
2.3	Genetika astme .....	2
2.4	Farmakogenomika astme .....	3
2.4.1	Farmakogenomika glukokortikoidov pri zdravljenju astme .....	3
2.5	Gen GLCCI1 .....	5
2.6	Gen SFXN1 .....	5
2.7	Genetske študije pri astmi .....	5
2.7.1	Asociacijske študije .....	5
2.7.2	Ekspresijske študije .....	5
2.8	Namen raziskave .....	6
2.9	Hipoteze .....	6
3	Materiali in metode .....	7
3.1	Preiskovanci .....	7
3.1.1	Klinični parametri .....	7
3.2	Materiali .....	7
3.2.1	Kemikalije .....	7
3.2.2	Pufri in raztopine, uporabljene pri eksperimentalnem delu .....	8
3.2.3	Vzorci CEPH .....	9
3.2.4	Laboratorijska oprema .....	9
3.3	Metode .....	10
3.3.1	Izolacija levkocitov, DNK, RNK in proteinov iz krvi .....	10
3.3.2	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) .....	12
3.3.3	Elektroforeza in priprava agaroznega gela .....	14
3.3.4	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov – RFLP .....	15
3.3.5	HRM .....	16
3.3.6	Merjenje izražanja genov .....	17
3.4	Programska orodja .....	19
3.4.1	GeneRunner .....	19
3.4.2	Programski paket SPSS .....	20
4	Rezultati .....	21
4.1	Povezava genotipa z obolelostjo z astmo .....	21
4.1.1	GLCCI1 .....	21
4.1.2	SFXN1 .....	22
4.2	Povezava med genotipom in tipom astme .....	22
4.2.1	GLCCI1 .....	22
4.2.2	SFXN1 .....	23
4.3	Odvisnost kliničnih parametrov od genotipa .....	24
4.3.1	GLCCI1 .....	25
4.3.2	SFXN1 .....	26
4.4	Odvisnost kliničnih parametrov od genotipa pri posameznih podtipih astme .....	27
4.4.1	GLCCI1 .....	27
4.4.2	SFXN1 .....	29
4.5	Izražanje genov v odvisnosti od obolelosti z astmo .....	30
4.5.1	GLCCI1 .....	30
4.5.2	SFXN1 .....	31
4.6	Izražanje v odvisnosti od tipa astme .....	31



4.6.1	GLCCI1.....	31
4.6.2	SFXN1 .....	32
4.7	Izražanje v odvisnosti od genotipa .....	32
4.7.1	GLCCI1.....	32
4.7.2	SFXN1 .....	33
4.8	Izražanje pred in po terapiji.....	33
4.8.1	GLCCI1.....	33
4.8.2	SFXN1 .....	33
5	Razprava .....	34
6	Zaključki .....	37
7	VIRI .....	38
8	Življenjepis .....	40

## Seznam tabel

Tabela 3-1: Kemikalije uporabljeni pri delu in proizvajalci.....	8
Tabela 3-2: Začetni oligonukleotidi.....	8
Tabela 3-3: Oprema uporabljena pri raziskavi .....	9
Tabela 3-4: Reagenti, potrebni za PCR reakcijo .....	12
Tabela 3-5: Vrednosti parametrov, ki vplivajo na PCR reakcijo.....	13
Tabela 4-1: Optimalni pogoji za PCR reakcijo.....	14
Tabela 3-6: Sestava reagentov za RFLP postopek .....	15
Tabela 4-2: Podatki za RFLP postopek za gen SFXN1.....	15
Tabela 3-7: Razmerja reagentov za HRM analizo.....	16
Tabela 4-3: Optimizirani parametri za HRM reakcijo.....	17
Tabela 3-8: Razmerja reagentov za analizo izražanja genov.....	17
Tabela 3-9: Razmerje koncentracije DNK .....	17
Tabela 3-10: Razporeditev koncentracij na ploščici.....	18
Tabela 4-4: Parametri za merjenje izražanja .....	18
Tabela 4-5: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs37972 za gen GLCCII ..	21
Tabela 4-6: Statistična primerjava med bolniki in kontrolnimi osebki za gen GLCCII .....	21
Tabela 4-7: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 .....	22
Tabela 4-8: Statistična primerjava med bolniki in kontrolnimi osebki za gen SFXN1 .....	22
Tabela 4-9: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs37972 za gen GLCCII pri bolnikih z alergijsko astmo .....	22
Tabela 4-10: Statistična primerjava med bolniki z alergijsko astmo in kontrolnimi osebami za gen GLCCII .....	22
Tabela 4-11: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs37972 za gen GLCCII pri bolnikih z nealergijsko astmo.....	23
Tabela 4-12: Statistična primerjava med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolnimi osebki za SNP rs37972 v genu GLCCII .....	23
Tabela 4-13: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 pri bolnikih z alergijsko astmo .....	23
Tabela 4-14: Statistična primerjava med bolniki z alergijsko astmo in kontrolnimi osebki za gen SFXN1 .....	24
Tabela 4-15: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 pri bolnikih z alergijsko astmo .....	24
Tabela 4-16: Statistična primerjava med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolnimi osebki za gen SFXN1 .....	24
Tabela 4-17: Klinični parametri v odvisnosti od genotipa za gen GLCCII .....	25
Tabela 4-18: Klinični parametri v odvisnosti od genotipa za gen SFXN1 .....	26
Tabela 4-19: Klinični parametri v odvisnosti od alergijske za gen GLCCII .....	27
Tabela 4-20: Klinični parametri pri nealergijski astmi v odvisnosti od genotipa za gen GLCCII .....	28

Tabela 4-21: Klinični parametri pri alergijski astmi v odvisnosti od genotipa za gen SFXN1 .....	29
Tabela 4-22: Klinični parametri pri nealergijski astmi v odvisnosti od genotipa za gen SFXN1 .....	30
Tabela 4-23: Primerjalni podatki med izražanjem pri bolnikih in kontrolah za gen GLCC11 .....	30
Tabela 4-24: Primerjalni podatki med izražanjem in skupino vzorcev za gen SFXN1 .....	31
Tabela 4-25: Primerjava med izražanjem gena GLCC11 med bolniki z alergijsko astmo in kontrolami .....	31
Tabela 4-26: Primerjava med izražanjem gena GLCC11 med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolami .....	31
Tabela 4-27: Primerjava med izražanjem gena SFXN1 med bolniki z alergijsko astmo in kontrolami .....	32
Tabela 4-28: Primerjava med izražanjem gena SFXN1 med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolami .....	32
Tabela 4-29: Tabela 3 21: Vpliv genotipa SNP rs37972 na izražanje gena GLCC11 pri bolnikih z astmo .....	32
Tabela 4-30: Vpliv genotipa SNP rs2644645 na izražanje gena SFXN1 pri bolnikih z astmo .....	33
Tabela 4-31: Primerjava med izražanjem gena pred in po terapiji; Mann-Whitney .....	33
Tabela 4-32: Primerjava med izražanjem gena pred in po terapiji; Wilcoxon Signed Ranks test .....	33
Tabela 4-33: Povezava med izražanjem gena pred in po terapiji; Mann-Whitney .....	33

## Seznam slik

2-1: Vezava glukokortikoidov (GC).....	4
3-1: Kri in pufer PBS nanešena na Ficol .....	10
3-2: Ločene faze po centrifugiranju.....	11
3-3: Prikaz pomnoževanja pri PCR .....	13
3-4: Fragmenti vzorcev na agaroznem gelu od najnižje do najvišje temperature .....	15
3-5: Uporaba GeneRunner-ja.....	19
4-1: PCR produkti po restrikciji na agaroznem gelu razvščeni po velikosti .....	16

## Uporabljeni simboli in kratice

<i>A</i>	adenin
<i>C</i>	citozin
<i>c</i>	množinska koncentracija (mol/l)
<i>f</i>	frekvenca (obrati/minuto)
<i>G</i>	gavnin
<i>P</i>	signifikanca
<i>t</i>	čas (h)
<i>T</i>	temperatura (°C)
<i>T</i>	timin
<i>V</i>	volumen (μL)
<i>U</i>	koncentracija (enot/volumen)

## Kratice

CEPH	The Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoxyribonucleotide
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina
FBAT	Family-Based Association Tests
GWA	Genome Wide Association
HRM	High Resolution Melt
KME	Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko
OR	Razmerje obetov
PBS	Phosphate buffered saline
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNK	Ribonukleinska kislina
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
PCR	Polymerase Chain Reaction
TBE	Tris/Borova kislina/EDTA
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

## 1 Uvod

Astma je najpogostejša kronična bolezen pri otrocih. [1] V svetu je možno zaznati strmo naraščanje obolevnosti za astmo po letu 1980. Posledično se je povečala smrtnost za 50%, med mladimi, do 19. leta starosti, pa za kar 80 %. Med otroki je na ravni svetovne populacije prizadetih kar 10% in med odraslimi osebami 5%. [2] Ocenjuje se, da je trenutno na svetu 300 milijonov ljudi obolelih za astmo. [3]

Raziskave so pokazale, da imajo pri razvoju astme in odzivu na terapije velik vpliv genski dejavniki oz. polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP – single nucleotide polymorphism), tudi do 79 %. [4, 5, 6]

V preteklosti so bile opravljene številne študije na področju farmakogenomike astme, ki so potrdile vlogo genov pri zdravljenju in razvoju astme. Identificirani so bili že geni CTLA4, TBX21, CRHC, LTC4S, ALOX5, ki so povezani z odzivom na terapijo z glukokortikoidi. [7, 8, 9, 10]

Leta 2011 pa je bila opravljena prva GWA (genome wide association) študija s področja farmakogenomike astme, kjer je bilo analiziranih več kot 500 000 polimorfizmov na celotnem genomu v povezavi z učinkom inhalacijskih glukokortikoidov pri zdravljenju astme. Študija je odkrila statistično povezavo med polimorfizmom rs37972 v bližini gena GLCC1 in učinkom inhalacijskih glukokortikoidov. Identifikacija polimorfizmov je pokazala tudi povezavo med učinkom protiastrmatične terapije polimorfizmom rs2644645, ki je lociran v bližini gena SFXN1. [11]

Pri zdravljenju oz. blaženju simptomov astmatičnega obolenja se najpogosteje uporabljajo glukokortikoidi. Največji problemi pri zdravljenju se pojavljajo zaradi različnega odziva vsakega posameznika na zdravilo, kar je posledica razlik v genskem zapisu. Če bi identificirali vse polimorfizme, ki vplivajo na zdravljenje, bi lahko predvideli stranske učinke in izbiro zdravila, ki bi bila najbolj optimalna za posameznika. [12]

Farmakogenomske študije preučujejo vpliv genskega zapisa na učinek terapije in lahko služijo pri določanju najprimernejših terapij za zdravljenje bolezni. Za preučevanje vpliva poznamo asociacijske študije, pri katerih želimo s pomočjo primerjav genotipov z ostalimi parametri, ki merijo učinek protiastrmatične terapije, potrditi ali ovreči povezavo in študije izražanja genov kjer preučujemo vpliv terapije na izražanje genov. V zadnjig letih se je močno povečalo število GWA (GWA – genome wide asociacion) študij, ki uporabljajo tehnologijo mikromrež. Metoda je zelo robustna in hitra, za večjo zanesljivost rezultatov je potrebno rezultate dodatno potrditi z asociacijskimi študijami. [13, 14, 15, 16, 17]

V prihodnje bo potrebno še veliko raziskav, da bomo lahko rezultate uporabljali v klinične namene. Predvsem pri poligenskih boleznih pa bodo imele študije velik vpliv, saj bodo bolniki lahko dobili zdravilo, ki bo imelo najboljši učinek z najmanj stranskimi učinki.

Namen študije je potrditi vlogo SNP-ov rs2644645 in rs37972 pri odzivu na zdravljenje astme z inhalacijskimi glukokortikoidi. Želimo ugotoviti tudi funkcijo polimorfizma rs2644645 v bližini gena SFXN1 na patogenezo astme. S pomočjo rezultatov bomo lahko preučevali interakcijo glukokortikoidov in genoma ter potrdili njuno vlogo pri odzivu na zdravljenje

## 2 Teoretični del

### 2.1 Splošno o astmi

Astma je vnetje, katerega posledica je začasno zoženje dihalnih poti in posledično otežen pretok zraka v in iz pljuč. Glavni krivec za astmatski napad je vdihnjeni alergen (živalska dlaka, cvetni prah) ali dražeče spojine, kot je npr. cigaretni dim. Simptomi se kažejo kot oteženo dihanje, piskanje in tiščanje v prsih ali kašljanje. Znani sta dve obliki astme, in sicer alergijska in nealergijska. Simptomi so pri obeh oblikah enaki. Pri alergijski obliki astme se težave pojavijo predvsem ob vdihovanju alergenov. Pri nealergijski astmi simptomi niso povezani z alergeni iz okolja, ampak astmatski napad povzročijo dejavniki kot so stres, hladen in suh zrak, telesna obremenitev, še najpogosteje pa virusne okužbe dihal. [2]

Ugotovljeno je, da je možnost razvoja astme povezana tudi z genskimi dejavniki. Če eden od staršev trpi za astmo, je možnost obolenja za otroka kar 33 %. V primeru, da se bolezen razvije pri obeh starših, se možnost poveča na kar 70 %. Posledično se astma pojavlja kot najpogostejša kronična bolezen pri otrocih. Pri otrocih se astma pogosteje pojavi pri moški populaciji, pri odraslih pa je moč zaznati pogostejša obolenja pri ženskah. Več smrtnih primerov je zabeleženih pri ženskah, ki predstavljajo kar 65% vseh oseb, ki umrejo zaradi astme. Pri Afro-Američankah je umrljivost za astmo kar 2,5-krat večja.[2]

### 2.2 Simptomi in diagnoza

Značilni znaki obolenosti za astmo so: tiščanje v prsih, dušenje, piskanje in kašelj. Simptomi so posledica vnetja v dihalnih poteh, ki pod vplivom sprožilcev dodatno vzplamti, kar vodi v krčenje gladkih mišic, izcejanje sluzi in posledično zoženje dihalnih poti. [2] Za astmo je značilna občasna in reverzibilna obstrukcija dihalnih poti, zato so tudi omenjeni simptomi občasni, težave prenehajo po terapiji ali tudi spontano.

Diagnozo nam postavi osebni zdravnik. Za potrditev astme se uporablja test pljučne funkcije, ki temelji na količini izdihanega zraka v prvi sekundi izdiha (FEV1). Pogoste so tudi meritve pljučne funkcije pred in po zaužitju bronhodilatatornih zdravil, ki odpirajo oz. sprostijo dihalne poti preko vpliva na relaksacijo gladkih mišic. Če zdravnik opazi znatno izboljšanje po tovrstni terapiji, obstaja velika verjetnost, da ima bolnik astmo, kajti le pri astmi gre za reverzibilno obstrukcijo dihal. Uporabljajo se tudi kožni in krvni (doliočanje specifičnih imunoglobulinov razreda E – IgE) alergološki testi, ki pomagajo pri natančnejši določitvi in omogočajo določitev sprožilcev napada. [2]

### 2.3 Genetika astme

Astma je posledica interakcije številnih genov in okoljskih dejavnikov, ki so povezani tudi z odzivom na terapijo. Študije so do sedaj povezale več kot sto različnih genov z razvojem in tipom astme. Ocenjuje se, da je prispevek genotipa k patogenezi astme približno med 36 % in 79 %. [3, 5, 6, 12]

Genski zapis se pri ljudeh najpogosteje razlikuje v polimorfizmih posameznega nukleotida (SNP – single nucleotide polymorphism), ki imajo ključno vlogo tudi pri odzivu na zdravljenje boleznih z različnimi zdravili. V prihodnosti lahko pričakujemo, da bomo lahko s pomočjo identifikacije polimorfizmov napovedali, kakšen prispevek imajo polimorfizmi na razvoj astme in pri odzivu na terapijo. [4]

## 2.4 Farmakogenomika astme

Farmakogenomika je veda, ki preučuje povezavo med genotipom in vsemi učinki terapije. Vpliv genskega zapisa predstavlja približno 80 % celotne variabilnosti pri odzivu na protiastrmatično terapijo, kar je posledica polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP-single nucleotide polymorphism). Izbiro zdravila otežuje dejstvo, da je astma poligenska bolezen, kar zelo zaplete vpliv kombinacije vseh polimorfizmov, ki so povezani z zdravljenjem in razvojem astme. [18]

Večina farmakogenomskih študij se ukvarja s področjem farmakodinamike, ki preučuje povezave med beljakovinami, ki jih kodira določen gen, in učinkom zdravil. [12, 18] Kandidatni geni pri farmakogenomiki astme so predvsem tisti, ki kodirajo receptorje za zdravila, komponente postreceptorske signalne transdukcije in transkripcijske dejavnike. Upoštevati je potrebno tudi gene, ki sodelujejo v metabolizmu posameznega zdravila. Pri zdravljenju oz. blaženju simptomov astme se uporablja več vrst zdravil:

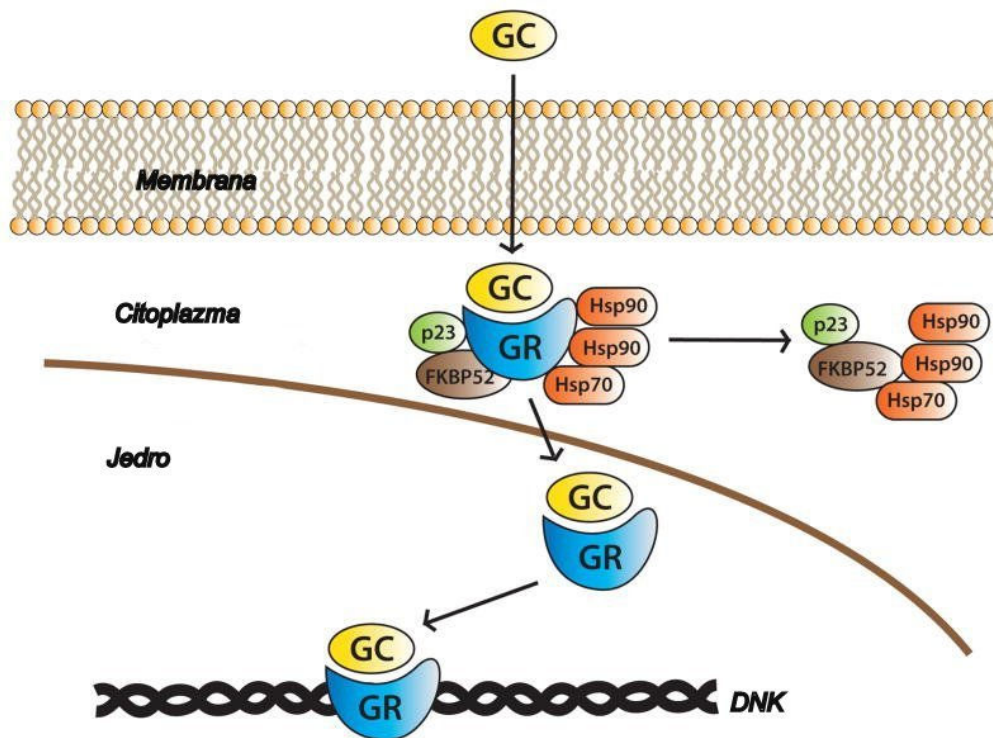
- Agoniste beta2 adrenergičnih receptorjev, ki delujejo kot bronhodilatatorji.
- Glukokortikoide, ki imajo protivnetni učinek. Njihova aplikacija se praviloma izvaja neposredno v dihala (inhalacijski glukokortikoidi) ali redkeje tudi sistemsko.
- Inhibitorje sinteze ali delovanja cisteinil levkotrienov.
- Zdravila, ki se redko uporabljajo (teofilin, nedokromil), o katerih ne obstaja veliko farmakogenomskih podatkov.

Za prve tri skupine zdravil so že pridobljeni uporabni podatki na področju farmakogenomike astme. [12]

### 2.4.1 Farmakogenomika glukokortikoidov pri zdravljenju astme

Glukokortikoidi so spojine, ki spadajo med steroide. Glukokortikoidi delujejo tako, da se vežejo in tvorijo z znotrajceličnimi receptorji kompleks, ki v jedru nato aktivira prepisovanje genov, katerih beljakovine imajo protivnetne lastnosti; geni IL-10 in IL-12. Hkrati pa zaustavi prepisovanje genov IL-3, IL-5 in IL-6, ki kodirajo proinflammatory citokine. Glukokortikoidni receptorji, ki se nahajajo znotraj celice in omogočajo prenos glukokortikoidov v jedro, so inhibirani s proteini. Po vezavi glukokortikoida v obliki zdravila poteče disociacija inhibitorja in aktivacija znotraj celičnega glukokortikoida oz. kompleksa, ki ga tvori. [18, 19]





2-1: Vezava glukokortikoidov (GC)

Poznani sta dve obliki glukokortikoidnega receptorja (GR), kar je posledica aktivnega izrezovanja intronov. Za učinek terapije je ugodnejše prevladovanje oblike GR $\alpha$ , ki ima protivneten učinek. Druga oblika GR $\beta$  ne deluje protivnetno, onemogoča pa delovanje GR $\alpha$ , ker veže znotrajcelične glukokortikoide, ti pa ob tem nimajo protivnetnega učinka. In zato deluje dominantno negativno. Povečano razmerje med mRNA, ki prenaša informacijo za sintezo GR $\beta$  in mRNA za sintezo GR $\alpha$  v limfocitih periferne krvi je možen razlog, da bolniki pri terapiji z IGK ne kažejo odziva oz. izboljšanja. [18]

V preteklosti so bile opravljene številne študije na področju farmakogenomike astme, ki so potrdile vlogo genov pri zdravljenju in razvoju astme. Identificirani so bili že geni CTLA4, TBX21, CRHC, LTC4S, ALOX5, ki so povezani z učinkom terapije z glukokortikoidi. [7, 8, 9, 10]

Leta 2011 pa je bila opravljena prva GWA (genome wide association) študija, kjer je bilo analiziranih več kot 500 000 polimorfizmov na celotnem genomu. Študija je odkrila statistično povezavo med polimorfizmom rs37972 ( $p=0,0002$ ) v bližini gena GLCC1 in alelom T, ki se izraža s povišanim izražanjem gena. Potrdili so tudi, da je polimorfizem rs37972 v vezavnem ravnotežju s polimorfizmom rs37973, ki znižuje izražanje gena GLCC1. Nižje izražanje genov je povezana z eksogenimi glukokortikoidi, ki vplivajo na izražanje v B-celicah. Rezultati raziskave kažejo, da pri osebah, ki imajo alel CC je bilo izboljšanje vrednosti FEV1 trikrat večje v primerjavi z bolniki, ki imajo alel TT ( $p<0,001$ ). Identifikacija polimorfizmov je pokazala tudi povezavo med učinkom zdravljenja astme in polimorfizmom rs2644645, ki je lociran v bližini gena SFXN1. [11]

Predvideva se tudi, da imajo stranski učinki, ki se lahko pojavijo pri nekaterih bolnikih na terapiji s sistemskimi (osteoporoza) ali inhalacijskimi (katarakta, glavkom) glukokortikoidi, prav tako svoj vzrok v genetskem zapisu. [18]

## 2.5 Gen GLCCI1

Do sedaj še ni bilo opravljenih veliko raziskav za gen glucocorticoid induced transcript 1 oz. GLCCI1. Znano je, da glukokortikoidi vplivajo na izažanje gena GLCCI1 in količino proteina, katerega funkcija še ni poznana. Dosedanje raziskave povezujejo gen GLCCI1 z astmo, putiko, ledvičnimi kamni in nefrotskim sindromom. Pri vseh boleznih je potrjen raznolik odziv (v povezavi z genotipom) na terapijo s glukokortikoidi, ki so pogosto uporabljajo kot najpogostejša izbira za zdravljenje omenjenih bolezni. [20, 21, 22]

Gen GLCCI1 se nahaja na sedmem kromosomu in meri 156Kbp (kilo baznih parov) med 8008374 Kbp in 8128710Kbp. Polimorfizem rs37972, ki ga želimo povezati z izažanjem vplivom na gen GLCCI1 leži na 8007876Kbp. Najpomembnejši polimorfizmi v genu za katere so že potrdili vpliv na izažanje gena: rs28177 (8016899Kbp), rs207467629 (8031994Kbp), rs267601577 (8043586 Kbp), rs9648623 (8098140 Kbp) in rs9648623 (8098140 Kbp). [21]

## 2.6 Gen SFXN1

Gen SFXN1 ali sideroflexin 1 je zelo slabo raziskan, dosedanje raziskave ga povezujejo z imunskimi pomanjkljivostmi in napredovanjem AIDS-a. [23, 24] Raziskava *Kelan G. Tantisira, M.D., Jessica Lasky-Su, Sc.D., Michishige Harada et al* [3] navaja gen SFXN1 kot enga pomembnejših genskih markerjev za napovedovanje odziva na terapijo in razvoj astme.

Gen SFXN1 se nahaja na petem kromosomu med 174905514Kbp in 174956745Kbp. Gen ima dolžino 51231Kbp. Najpomembnejši polimorfizmi v genu za katere so že potrdili vpliv na izražanje gena: rs267600557 (174919230Kbp), rs925197 (174939214 Kbp), rs6897931 (174949475Kbp), rs6897931 (17903293Kbp). [23]

## 2.7 Genetske študije pri astmi

### 2.7.1 Asociacijske študije

Pri asociacijskih študijah primerjamo genotipske in alelne frekvence med dvema skupinama, najpogosteje skupino bolnikov in kontrolno skupino.

Poznamo navadne asociacijske študije, kjer analiziramo vsak polimorfizem posebej, in GWA študije, ki uporabljajo tehnologijo mikromrež in s tem omogočajo hkratno analizo celotnega genoma in polimorfizmov na njem. Zaradi velikega števila polimorfizmov, ki jih je mogoče analizirati hkrati, je veliko lažje preučevati kompleksne poligenske bolezni, kot so astma, kronična vnetna črevesna bolezen itd. [25]

### 2.7.2 Ekspresijske študije

Študije izražanja genov dobivajo vedno večji pomen pri raziskavah genetike in farmakogenomike bolezni. Študije izražanja genov so pomembne predvsem zato, ker je mnogo polimorfizmov, za katere so asociacijske in GWA študije ugotovile močno povezavo z boleznijo, nekodirajočih in predvidevamo da vplivajo na izražanje bližnjih genov. Izražanje genov v povezavi s polimorfizmi ugotavljamo s pomočjo meritev količine informacijske ribonukleinske kisline (messenger ribonucleic acid – mRNK). Na podlagi količine mRNK lahko sklepamo na vpliv posameznega ali skupine genov na razvoj bolezni in odziv na zdravlilo. V raziskavi bomo izražanje genov merili z PCR reakcijo v realnem času. [13, 14, 15, 16]

## 2.8 Namen raziskave

- Namen raziskave je s pomočjo bioinformatičnih podatkovnih baz izdelati genetsko karto za lokusa, na katerih se nahajata kandidatna SNP-a za astmo, rs37972 in rs2644645,
- ugotoviti, kako omenjena SNP-ja vplivata na razvoj, potek in zdravljenje astme pri otrocih,
- potrditi vpliv rs37972 na regulacijo izražanja GLCCI1 in ugotoviti vlogo SNP-ja rs2644645 pri izražanju SFXN1.

## 2.9 Hipoteze

Pričakujemo, da bomo ugotovili statistično značilne razlike med odzivom na terapijo z glukokortikoidi glede na genotip za SNP-a rs37972 in rs2644645 ter prav tako potrdili genotipsko odvisnost izražanja gena GLCCI1 pri slovenskih otrocih z astmo.

Predvidevamo tudi, da je izražanje gena SFXN1 pogojena z genotipom rs2344645. Predvidevamo da je ta SNP najverjetneje povezan s cis-regulatornimi elementi in posledično z regulacijo izražanja gena SFXN1. Posledično pričakujemo pri bolnikih z različnim genotipom za polimorfizem rs2644645 različne odzive na proti-astmatično terapijo.

### 3 Materiali in metode

#### 3.1 Preiskovanci

Laboratorijske genetske raziskave so bile izvedene na 351 vzorcih DNK in RNK astmatikov ter 364 vzorcih zdravih posameznikov, ki so pridobljeni v sklopu raziskave, ki jo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (KME 31/1/06).

Vsi bolniki, ki so vključeni v študijo, so bili seznanjeni s potekom študije in so s podpisom potrdili svoje prostovoljno sodelovanje v študiji. Za osebe, mlajše od 16 let, so prostovoljno sodelovanje potrdili starši oz. zakoniti zastopniki.

##### 3.1.1 Klinični parametri

- FeNO

Parameter nam pove količino dušikovega oksida v izdihanem zraku. Količina NO nam posredno lahko pove, ali ima bolnik eozinofilno vnetje dihalnih poti. Zelo pogosto se uporablja kot klinični parameter, ki pripomore k postavitvi diagnoze astmatikov. [17]

- Cel IgE

Vrednost, ki nam pove količino celokupnih imunoglobulinov razreda E v serumu, kar je pomemben marker atopije. [13]

- Eozinofili

Količina eozinofilcev na enoto krvi, ki je posredni pokazatelj alergijskega vnetja

- FEV1

FEV1 vrednost nam pove volumen izdihanega zraka v prvi sekundi izdiha, kar je pri astmi praviloma zmanjšano.

- dFEV1 p.t.

Parameter nam pove spremembo volumna izdihanega zraka v prvi sekundi po terapiji z glukokortikoidi in je merilo učinka terapije

- PC<sub>20</sub>

Parameter nam pove, koliko metaholina mora testiranec vdihniti, da se mu vrednost FEV1 zmanjša za 20 %. Bronhoprovokacijski test z metaholinom se uporablja v diagnostiki astme, PC<sub>20</sub> je merilo hiperaktivnosti dihal.

- TI

Tiffenau indeks nam pove odstotek FEV1 glede na forsirano pljučno kapaciteto (FVC). (TI= FEV1/FVC) in je merilo obstrukcije dihal.

#### 3.2 Materiali

##### 3.2.1 Kemikalije

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili kemikalije za izolacijo celičnih struktur s pomočjo TRI reagenta, PCR, RFLP, HRM in izražanja genov. Kemikalije in proizvajalci so navedene v tabeli (Tabela 3-1).

Tabela 3-1: Kemikalije uporabljeni pri delu in proizvajalci

Kemikalija	Proizvajalec
Etanol absolut	Merck
Saharoza	Merck
PBS pufer	Sigma Aldrich
EDTA	Sigma Aldrich
Kloroform	Sigma Aldrich
TRI reagent	Sigma Aldrich
TAQ polimeraza	Sigma Aldrich
PCR pufer	Sigma Aldrich
Začetni oligonukleotidi	Sigma Aldrich
Izopropanol	Sigma Aldrich
Ksilen cianol	Sigma Aldrich
Etidijev bromid	Sigma Aldrich
dNTP-ji	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	Fermentas
Restriksijski encimi	Fermentas
Pufri za restriksijske encime	Fermentas
Agaroz	SeaKem
TRIS baza	Calbiochem
Ficoll-Paque Plus™	GE Healthare

Tabela 3-2: Začetni oligonukleotidi

Gen	SNP ID	Oznaka	Primer 1 (Zaporedje 5' → 3')	Primer 2 (Zaporedje 5' → 3')
GLCC1	rs37972	GLCC1_rs37972h m	TGCTTTCTCGTCTGA ACACA	TACCCACAGTAAACC AAGG
SFXN1	rs264464 5	SFXN1_rs2644645	ACAATGACATCA TTCTGGAAAGT	GGAGTAGAGCCACCA CGTTT

### 3.2.2 Pufri in raztopine, uporabljene pri eksperimentalnem delu

Raztopine smo pripravljali z destilirano vodo, katero smo prečistili s pomočjo aparata TKA Pacific UP-UPW water purification system. Vse raztopine so bile pripravljene po predpisanih protokolih s strani proizvajalcev.

#### 3.2.2.1 PBS pufer

PBS smo dobili v obliki tablet. Pufer smo pripravili tako, da smo 1 tableto PBS v 200 ml vode. S pomočjo naprave za sterilizacijo in posebnega programa, ki omogoča sterilizacijo raztopin smo pufer sterilizirali.

### 3.2.2.2 TBE pufer

TBE pufer smo pripravili z 10x koncentracije (založna raztopina), ki smo ji potrebovali pri eksperimentalnem delu. Sestava 10x TBE pufra je:

- 445 mM TRIS
- 445 mM borova kislina
- 5 mM EDTA

Za 1 L pufrne raztopine smo stehali:

- $m = 108$  g TRIS baze
- $m = 3,72$  g EDTA
- $m = 55$  g borove kisline

Vse tri komponente smo raztopili v destilirani vodi,  $V = 1$  L. Za uporabo pri eksperimentih smo raztopino razredčili na 1x začetne koncentracije. Pripravili smo ga tako, da smo 100 mL 10 x TBE pufra dodali 900 mL vode.

### 3.2.2.3 TRIS-HCL pufer

Pripravljali smo 1 L pufra tako, da smo raztopili  $m = 1,21$  g TRIS baze v približno 800 mL vode in s pomočjo 10% HCl umerili pH na 7,6. Nato smo dodali vode, da smo dosegli volumen 1 L.

### 3.2.2.4 Pufer (barvilo) za nanašanje na gelsko elektroforezo

Pufer smo pripravili iz  $m = 40$ g saharoze in  $m = 0,25$ g ksilen cianola ter oboje raztopili v  $V = 100$  mL 1x TBE pufra.

## 3.2.3 Vzorci CEPH

Pri analizi vzorcev smo uporabili si z standardiziranimi vzorci CEPH, s katerimi smo si pomagali pri genotipizaciji vzorcev. Center za študijo polimorfizmov (The Centre d'Etude du Polymorphisme Humain – CEPH) je ustanovil Nobelov nagrajenec Jean Dausset, leta 1984. V fundaciji Jean Dausset-a hranijo podatkovno bazo za genetske markerje, ki raziskovalcem pomagajo pri določevanju polimorfizmov. V fundaciji je več kot 250 000 vzorcev. [<http://www.cephb.fr/en/index.php> dostop 2.8]

## 3.2.4 Laboratorijska oprema

V tabeli (Tabeli 3-3) je navedena oprema, ki smo jo uporabljali pri eksperimentih.

Tabela 3-3: Oprema uporabljena pri raziskavi

Oprema	Proizvajalec
Mikropipete (10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L, 5000 $\mu$ L)	Finnpipette
Centrifuge	Eppendorf centrifuge 5415R Biosan CMC-3000
Tehtnica	Centric 322A
Ciklični termostat	Biometra T1 Thermocycler Biometra Professional basic gradient
Kvantitativni PCR	Roche LC 480
Mikrovalovna pečica	Zanussi ZMC 19 MG
UV transiluminator	Biometra T1 2

Avtoklav	Avtoklav A-21
Fotoapar	Nikon Coolpix S2500
	Canon PowerShot A570 IS
Elektroforezni sistem	BIO-RAD, POWERPAL BASIC, SUB CELL
	BIO-RAD, Standard power pack P25
	WIDE MINI – SUB CELL GT
pH meter	HANNA HI 83141

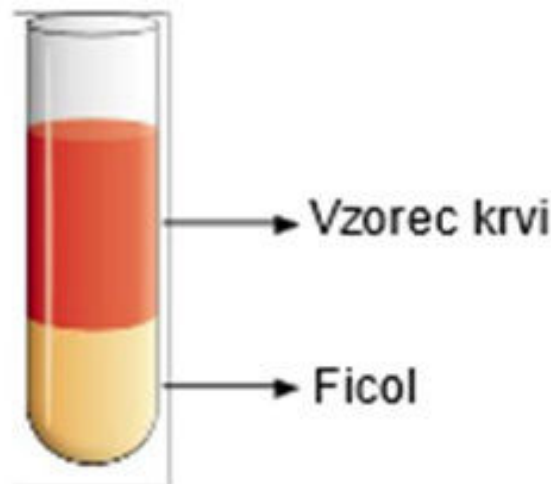
### 3.3 Metode

#### 3.3.1 Izolacija levkocitov, DNK, RNK in proteinov iz krvi

Vso opremo, ki smo jo uporabljali pri shranjevanju, začasnem ali dokončnem, smo označevali s številko vzorca. Vzorce in morebitna odstopanja pri postopkih obdelave smo zabeležili v evidenco.

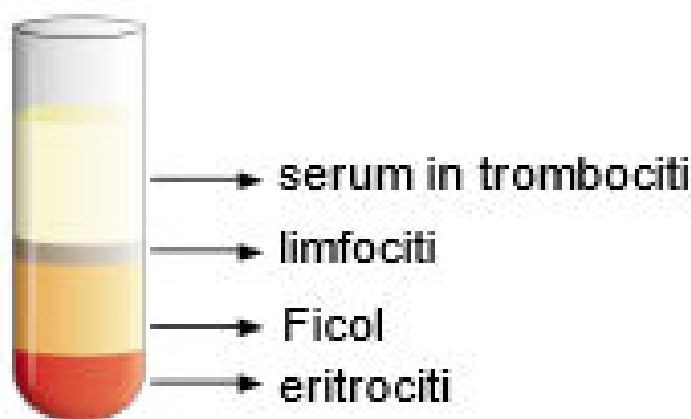
##### 3.3.1.1 Izolacija levkocitov z reagenotm Flicoll-Paque Plus™

Kri, ki je bila odvzeta  $V = 12\text{mL}$  v epruveto z dodatkom EDTA, ki preprečuje strjevanje krvi, smo prenesli v sterilno centrifugirko ( $V = 50\text{mL}$ ). Dodali smo  $V = 12\text{mL}$  pufru PBS, nato smo raztopino dobro premešali in jo previdno nanesli, da se plasti niso pomešale na plast Ficoll-a  $V = 12\text{mL}$ .



3-1: Kri in pufer PBS, nanešena na Ficol

Centrifugirko smo nato postavili v centrifugo in ločili suspenzijo na štiri faze: dobili eritrocite, Ficoll-Paque plus™, lifocite in na vrhu krvno plazmo. Centrifugiranje je potekalo pri konstantni temperaturi  $T = 18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $f = 1800\text{ vrt./min}$  in  $t = 30\text{min}$ .



3-2: Ločene faze po centrifugiranju

Krvno plazmo in trombocite smo odpipetirali v novo cetrifugirko in jih shranili za potrebe raziskav pri  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Serum + PBS smo prenesli v falkonko in jo shranili pri  $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Limfocite smo prenesli v novo centrifugirako in dodali  $V = 10\text{ mL}$  PBS pufra. Ponovili smo centrifugiranje pri  $f = 1400\text{ vrt./min}$ ,  $t = 15\text{ min}$ . Postopek smo ponovili z dodatkom  $V = 5\text{ mL}$  PBS-a in  $f = 1400\text{ vrt./min}$ ,  $t = 5\text{ min}$ . Izolirane limfocite smo shranili na  $T = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$  do nadaljnje uporabe za izolacijo celičnih struktur. Nato smo še odstranili Ficoll, ki je bil nad plastjo eritrocitov in jih shranili pri  $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.1.2 Izolacija RNK

Po končani izolaciji limfocitov smo jim dodali  $1500\text{ }\mu\text{L}$  TRI reagenta. Skupek celic smo razbili s večkratnim pipetiranjem. Vzorce smo inkubirali  $t = 5\text{ min}$  pri sobni temperaturi in jih nato razdelili v dve  $V = 2\text{ mL}$  epici. Po dodatku  $V = 300\text{ }\mu\text{L}$  kloroforma smo epici postavili na vibracijski mešalnik za približno  $t = 15\text{ s}$ , da je suspenzija postala motna. Vzorce smo inkubirali pri sobni temperaturi za približno  $t = 15\text{ min}$ , da je bilo možno ločiti obe fazi. Epici smo nato centrifugirali pri  $f = 12\text{ }000\text{ x vrt./min}$ ,  $t = 15\text{ min}$ ,  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po končanem cetrifugiranju smo dobili tri faze. V zgornji vodni fazi z RNK, vmesno belo fazo z DNK in spodnjo rdeče obarvano fazo z proteini. Vodno fazo smo prenesli v novo epico  $V = 1500\text{ }\mu\text{L}$ , ostanek pa shranili za nadaljnjo izolacijo DNK in proteinov. V epico z RNK molekulami smo dodali  $V = 700\text{ }\mu\text{L}$  izopropanola in vzorec inkubirali  $t = 10\text{ min}$  na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali na  $f = 12000\text{ vrt./min}$ ,  $t = 10\text{ min}$  in  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na dnu epice je nastal pelet RNK, supernatant smo previdno odlili ali odpipetirali. Nato smo dodali  $1\text{ }500\text{ }\mu\text{L}$  75% etanola in zmešali na vibracijskem mešalniku. Sledilo je centrifugiranje pri  $f = 12\text{ }000\text{ vrt./min}$ ,  $t = 5\text{ min}$ ,  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Etanol oz. supernatant smo odstranili in vzorec posušili v eksikatorju. Suhi vzorec smo shranili v vodi  $V = 60\text{ }\mu\text{L}$  in  $T = -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.1.3 Izolacija DNK

Ko smo ločili vodno fazo z RNK, smo v posebno epico s DNK in proteini dodali  $V = 450\text{ }\mu\text{L}$  100 % etanola. Zmes smo premešali in inkubirali pri sobni temperaturi  $t = 2\text{--}3\text{ min}$ . Po končani inkubaciji smo vzorce dali v centrifugirko na  $f = 5\text{ }000\text{ vrt./min}$ ,  $t = 5\text{ min}$ ,  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . V supernatant smo dobili raztopljene proteine, ki smo jih do nadaljnje obdelave shranili v hladilniku pri  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ostanek DNK-ja smo dvakrat sprali v natrijevem citratu  $V = 1500\text{ }\mu\text{L}$  in  $c = 0,1\text{ M}$ . Vzorec smo med spiranjem vsakokrat inkubirali za  $t = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  ob večkratnem mešanju. Sprane vzorce smo centrifugirali pri  $f = 5\text{ }000\text{ vrt./min}$ ,  $t = 5\text{ min}$  in  $T$



= 4 °C. Supernatant smo odstranili, DNK peltu pa dodali  $V = 1,5$  mL 75 % etanola in zmes inkubirali pri sobni temperaturi  $T = 20$  min. Po zadnjem centrifugiranju pri  $f = 5\ 000$  vrt./min,  $t = 5$  min,  $T = 4$  °C smo supernatant zavrgli pelet DNK pa posušili v eksikatorju. Nazadnje smo ga raztopili v  $V = 400$   $\mu$ L  $c = 8$  mM NaOH s večkratnim pipetiranjem. Raztopino smo shranili pri  $T = 4$  °C.

### 3.3.1.4 Izolacija proteinov

Proteine, ki so bili raztopljeni v fenol-etanolnem, smo oborili s pomočjo izopropanola  $V = 2\ 250$   $\mu$ L. Vzorec smo inkubirali pri sobni temperaturi za  $t = 10$  min. Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali pri  $f = 12\ 000$  vrt./min,  $t = 10$  min in  $T = 4$  °C. Po centrifugiranju smo na dnu dobili pelet proteinov. Tekoči ostanek smo zavrgli in proteine sprali v  $V = 1$  mL  $c = 0,3$ M gvanidinijevega hidroksida v 95% etanolu. Spiranje smo ponovili trikrat. Med spiranjem smo vzorce inkubirali za  $t = 20$  min pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo jih centrifugirali pri  $f = 7\ 500$  vrt./min,  $t = 5$  min in  $T = 4$  °C. Proteine smo shranili pri  $T = -20$  °C v  $V = 2,5$  mL 100 % etanolu.

### 3.3.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

S pomočjo verižne reakcije s polimerazo smo pomnožili željene odseke, ki so nam omogočili zadostno količino vzorca za uspešno pridobivanje podatkov s pomočjo RFLP metode. Reakcijsko mešanico za analizo polimorfizmov smo v epico  $V = 0,5$  mL dodali naslednje reagente:

Tabela 3-4: Reagenti, potrebni za PCR reakcijo

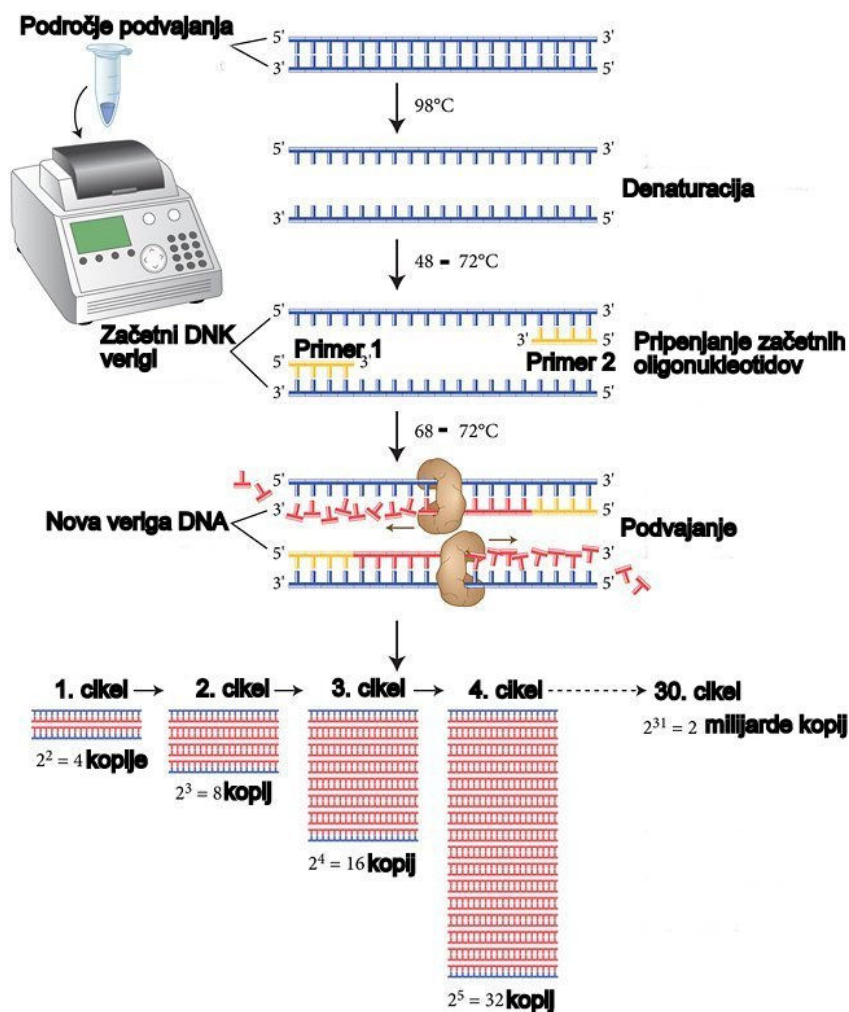
Reagenti	Volumen za 1 vzorec ( $\mu$ L)
DNK	2
dH <sub>2</sub> O	V1
PCR pufer	1
MgCl <sub>2</sub>	V2
dNTP	0,2
Začetni oligonukleotidi 1	V3
Začetni oligonukleotidi 2	V3
TAQ polimeraza	0,05

Volumni (V1, V2, V3), ki niso definirani v tabeli, so določeni za vsak gen posebej tako, da dobimo najboljše rezultate. Količino MgCl<sub>2</sub> in količino začetnih oligonukleotidov smo določili s pomočjo optimizacije, volumen vode pa smo določili tako, da je končni volumen  $V = 10$   $\mu$ L. Potrebno je bilo določiti tudi ostale parametre za optimalno delovanje encimov, ki so prikazani v tabeli:

Tabela 3-5: Vrednosti parametrov, ki vplivajo na PCR reakcijo

Parameter	Največkrat izbarne vrednosti
Število ciklov	35 – 40 ciklov
Začetna denaturacija	T = 94 – 96°C, t = 5 min
Denaturacija	T = 94 – 96°C, t = 30 – 60 s
Pripenjanje začetnih oligonukleotidov	T = 65 – 66°C, t = 20 – 30 s
Podvajanje	T = 72°C, t = 30 s
Končno podaljševanje	T = 72°C, t = 7 min

Mešanico reagentov smo naprej zmešali v epici. Premešali smo jih s pomočjo vibracijskega mešalnika in cetrifugirali. V novo sterilno epico smo na dno odpipetirali  $V = 2 \mu\text{L}$  vzorca DNK in ji dodali reakcijsko mešanico. Na cikličnem termostatu smo nastavili optimalne vrednosti parametrov. Uspešnost pomnoževanja smo preverili s pomočjo gelske elektroforeze. Pregled gela smo opravili s pomočjo UV transiluminatorja.



3-3: Prikaz pomnoževanja pri PCR

### 3.3.2.1 Optimizacija PCR reakcije

Za vsak gen posebej smo izvedli optimizacijo magnezija, temperature in začetnih oligonukleotidov. Z optimizacijo smo zmanjšali stroške raziskave in pridobili najboljše možne rezultate. PCR motijo predvsem nespecifični produkti, ki so posledica prevelikih količin reaktantov in otežujejo oz. onemogočajo nadaljnje raziskave DNK.

Najprej smo s pomočjo programskih orodij poiskali začetne oligonukleotide za posamezni polimorfizem. Optimizacijo smo začeli z presežnimi količinami, pri katerih je znano, da bo nastalo dovolj produktov za detekcijo na agaroznem gelu. Optimizacijo temperature smo izvedli pri: T=52,3 °C, T=54,1 °C, T=56 °C, T=58°C, T=60 °C, T=62 °C, T=64 °C. Pri obeh genih smo določili T=64 °C kot optimalno temperaturo, pri ostalih temperaturah so nastali nespecifični produkti, ki so vidni kot trakovi pod željenim produktom (zaradi manjše velikosti potujejo hitreje po gelu). Optimizacijo magnezija smo začeli s koncentracijami c=2,5mM, c=2mM in c=1,5mM. Za gen GLCC11 smo kot primarno koncentracijo določilo c=1,5mM, za SFXN1 pa c=2mM Mg<sup>2+</sup>. Začetne koncentracije pri optimizaciji začetnih oligonukleotidov so: c=2mM, c=1,5mM, c=1mM. Kot optimalno koncentracijo smo za gen SFXN1 izbrali c=1mM in za gen GLCC11 c=1,5mM.

Tabela 3-6: Optimalni pogoji za PCR reakcijo

reaktant	Volumen (μL) za gen SFXN1	Volumen (μL) za gen GLCC11
DNK	2	2
H <sub>2</sub> O	3,95	3,15
dNTPs	0,2	0,2
pufer	1	1
MgCl <sub>2</sub>	0,8	0,6
Začetni oligonukleotidi 1	1	1,5
Začetni oligonukleotidi 1	1	1,5
polimeraza	0,05	0,05
Skupni volumen	10	10

\*Količina polimeraze, pufera in dNTP je konstantna. Volumen vode se preračuna tako, da je skupni volumen V=10μL. Reakcija poteka pri T=64 °C in se 35x ponovi. Produkti so dolžine

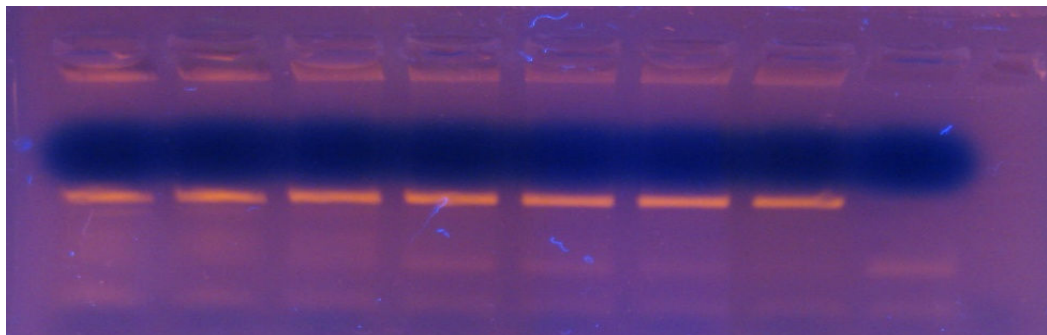
4bp pri genu SFXN1 in 70bp pri genu GLCC11. Volumni so podani za en vzorec.

Vzorci smo nanesti na 2 % agarozni gel in jih z elektroforezo pregledali, da smo potrdili uspešnost reakcije. Če reakcija ni uspela, smo ponovili postopek pomnoževanja.

### 3.3.3 Elektroforeza in priprava agaroznega gela

Agarozni gel smo pripravili s V= 50 mL 1x TBE pufera in m = 1g agaroze. Agarozo smo raztopili s pomočjo segrevanja v mikrovalovni pečici in ji nato dodali V = 3 μL etidijevega bromida. Vse skupaj smo dobro premešali in še tekočo zmes vlili v modelčke in dodali glavničke. Lastnost etidijevega bromida, da fluorescira v spektru oranžne barve in se vriva med molekule DNK, izkoriščamo za pregled vzorcev in njihovo analizo. S pomočjo glavničkov smo dobili v agaroznem gelu žepke, v katere smo nato napipetirali vzorce po

vzorcev na gel smo vsakemu vzorcu dodali  $V = 5 \mu\text{L}$  barvila (0,25 % ksilencianol in 40 % saharoze). Tako pripravljene vzorce smo nanegli na dno žepkov. Vir napetosti smo nastavili na konstantno napetost  $U = 150 \text{ V}$  in ga povezali z elektroforetsko celico. Tok smo pustili teči  $t = 15 \text{ min}$ . Elektroforeza izkorišča lastnost DNK molekule, da je negativno nabita, zato molekule potujejo k pozitivnemu naboju. Krajši kot so fragmenti, lažje se pomikajo med prazninami v gelu in prepotujejo daljšo pot, daljši kot so fragmenti, krajšo pot prepotujejo. Posledica so fragmenti razvrščeni po velikosti.



3-4: Fragmenti vzorcev na agaroznem gelu od najnižje do najvišje temperature

### 3.3.4 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov – RFLP

Produktom, ki so nastali pri PCR postopku, smo dodali predhodno pripravljeno mešanico restrikcijskega encima, restrikcijskega pufera in vode. Vzorce smo premešali z vibracijskim mešalnikom in centrifugirali. Na koncu smo vzorce inkubirali pri  $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $t = 16 \text{ h}$ .

Tabela 3-7: Sestava reagentov za RFLP postopek

Reagent	Volumen
voda	17,85 $\mu\text{L}$
pufer	2 $\mu\text{L}$
encim	0,25 $\mu\text{L}$

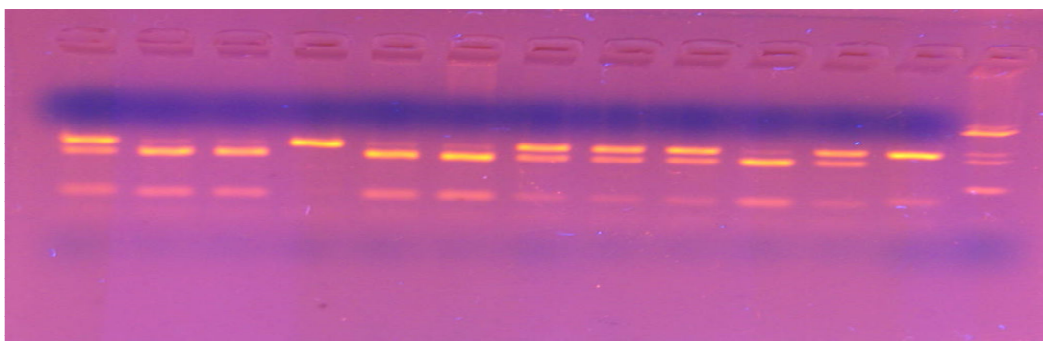
#### 3.3.4.1 Optimizacija RFLP reakcije

S pomočjo RFLP testa smo določili polimorfizme za gen SFXN1. Pri restrikciji smo uporabili encim Hin1 II, ki reže PCR produkte na specifične dolžine za vsak polimorfizem. Pred začetkom smo morali poiskati najmanjšo količino encima, ki še zagotavlja uspešno detekcijo polimorfizmov. Pri optimizaciji smo določili volumen encima  $V = 0,075 \mu\text{L}$  oz. 0,75U, ki je primeren za 10  $\mu\text{L}$  reakcijo.

Tabela 3-8: Podatki za RFLP postopek za gen SFXN1

Encim	Hin1 II
Količina encima	0,75 U
Temperatura inkubacije	37 $^\circ\text{C}$
Čas inkubacije	16 h
Dolžina fragmentov za GG	274 bp
Dolžina fragmentov za GT	274 bp, 186 bp, 88 bp

Dolžina fragmentov za TT	186bp, 88bp
--------------------------	-------------



3-5: PCR produkti po restrikciji na agaroznem gelu, razvrščeni po velikosti

Za gen GLCC11 ni bilo možno uspešno določiti količino encima. Rezultati so bili preveč nejasni in bi lahko bistveno vplivali na potek in rezultate raziskave.

### 3.3.5 HRM

Vzorci, ki jih ni mogoče analizirati s RFLP metodo, smo analizirali s HRM (High Resolution Melting) postopkom, ki temelji na višji temperaturi, ki je potrebna za razcep trojne vezi med gvaninom in citozinom.

Najprej smo za manjše število vzorcev določili optimalno oz. najnižjo količino magnezija, pri kateri je še mogoča uspešna določitev polimorfizmov.

Na ploščico smo najprej nanesti vzorce z znanimi genotipi. Za vsak polimorfizem po tri vzorce. Nato smo pripravili tri mešanice z različnimi koncentracijami magnezija  $c=2,5\text{mM}$ ,  $c=3,0\text{mM}$ ,  $c=3,5\text{mM}$ .

Tabela 3-9: Razmerja reagentov za HRM analizo

Reagenti	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
DNK	2
HRM Master mix	2,5
voda	V1
MgCl <sub>2</sub>	V2
Začetni oligonukleotidi 1	0,2
Začetni oligonukleotidi 2	0,2
Skupni volumen	5

\* V2 je odvisen od koncentracije MgCl<sub>2</sub>, volumen vode V1 je preračunan tako, da je skupni volumen reagenčne mešanice  $V=5 \mu\text{L}$ .

#### 3.3.5.1 Optimizacija HRM metode

Zaradi nemogoče optimizacije RFLP metode smo se odločili, da za genotipizacijo polimorfizmov za gen GLCC11 opravimo s pomočjo HRM (High Resolution Melting) metode, ki temelji na temperaturni razliki, ki jo je potrebno dodatno dovesti za razcep trojne vezi med gvaninom in citozinom.

Pred uporabo za večje število vzorcev je bilo potrebno optimizirati količino magnezija v reakcijski mešanici. Pripravili smo tri različne mešanice s koncentracijo  $c=2,5\text{mM}$ ,  $c=3\text{mM}$  in  $c=3,5\text{mM}$  magnezija. Optimalno koncentracija je  $c=2,5\text{mM}$ .

Tabela 3-10: Optimizirani parametri za HRM reakcijo

Reagenti	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
DNK	2
HRM master mix	3
Voda	0
MgCl <sub>2</sub>	0,6
Začetni oligonukleotidi 1	0,24
Začetni oligonukleotidi 2	0,24
Skupni volumen	6,08

\*Volumni so podani za en vzorec.

### 3.3.6 Merjenje izražanja genov

Izražanje izbranih genov smo izmerili z metodo kvantitativnega PCR v realnem času. Pri merjenju izražanja genov je bilo potrebno optimizirati porabo začetnih oligonukleotidov in količino DNK vzorca. Optimizacija za oba parametra in gena je potekala istočasno zaradi nižjih stroškov. Najprej smo v epice zmešali različne koncentracije začetnih oligonukleotidov z ostalimi reagenti.

Tabela 3-11: Razmerja reagentov za analizo izražanja genov

Reagent	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Voda	V1
SYBR Green Mix	2,5
Začetni oligonukleotidi 1	V2
Začetni oligonukleotidi 1	V2
DNK	2
Skupni volumen	5

\*V2 je odvisen od koncentracije oligonukleotidov, V1 je preračunan tako, da je skupni volumen  $V1=5 \mu\text{L}$ .

Med nanašanjem SYBR Green Mix-a smo morali paziti, da je bilo v prostoru čim temnejše, saj je reagent občutljiv na svetlobo. Kadar se SYBR Green Mix je shranjen v zaprti posodi v zamrzovalniku ali na ledu (med pripravo ostalih reagentov).

DNK vzorec smo redčili v razmerjih:

Tabela 3-12: Razmerje koncentracije DNK

Redčitveni faktor	$V_{\text{vode}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{vzorca}} (\mu\text{L})$	Skupni volumen ( $\mu\text{L}$ ) $V_{\text{vode}} + V_{\text{vzorca}}$	Volumen po redčitvi ( $\mu\text{L}$ )
1	0	70	70	35
1:2	35	35	70	42

1:5	42	28	70	35
1:10	35	35	70	35
1:20	35	35	70	35
1:40	35	35	70	35
1:80	35	35	70	70

Na ploščico smo nanašali po dve koloni za vsako koncentracijo oligonukleotidov in koncentracijo DNK vzorca.

Tabela 3-13: Razporeditev koncentracij na ploščici

vrstic a	SFXN1						GLCC11					
	Koncentracija oligonukleotidov						Koncentracija oligonukleotidov					
	200nM	250nM	300nM	200nM	250nM	300nM						
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
C	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5	1:5
D	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10	1:10
E	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
F	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40	1:40
G	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80	1:80
H	vod	vod	vod	vod	vod	vod	vod	vod	vod	vod	vod	vod
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

\*Za gen SFXN1 smo dodatno opravili teste s koncentracijo  $c=350$  nM začetnih oligonukleotidov

### 3.3.6.1 Optimizacija izražanja

Za uspešno merjenje izražanja smo morali določiti optimalno količino začetnih oligonukleotidov in količino DNK vzorec. Za gena GLCC11 in SFXN1 je bilo potrebno določiti, ali (first cycle) so podatki že dovolj jasni za uporabo in število točk (fit points), s katerimi program izračuna  $C_t$  vrednost.

Tabela 3-14: Parametri za merjenje izražanja

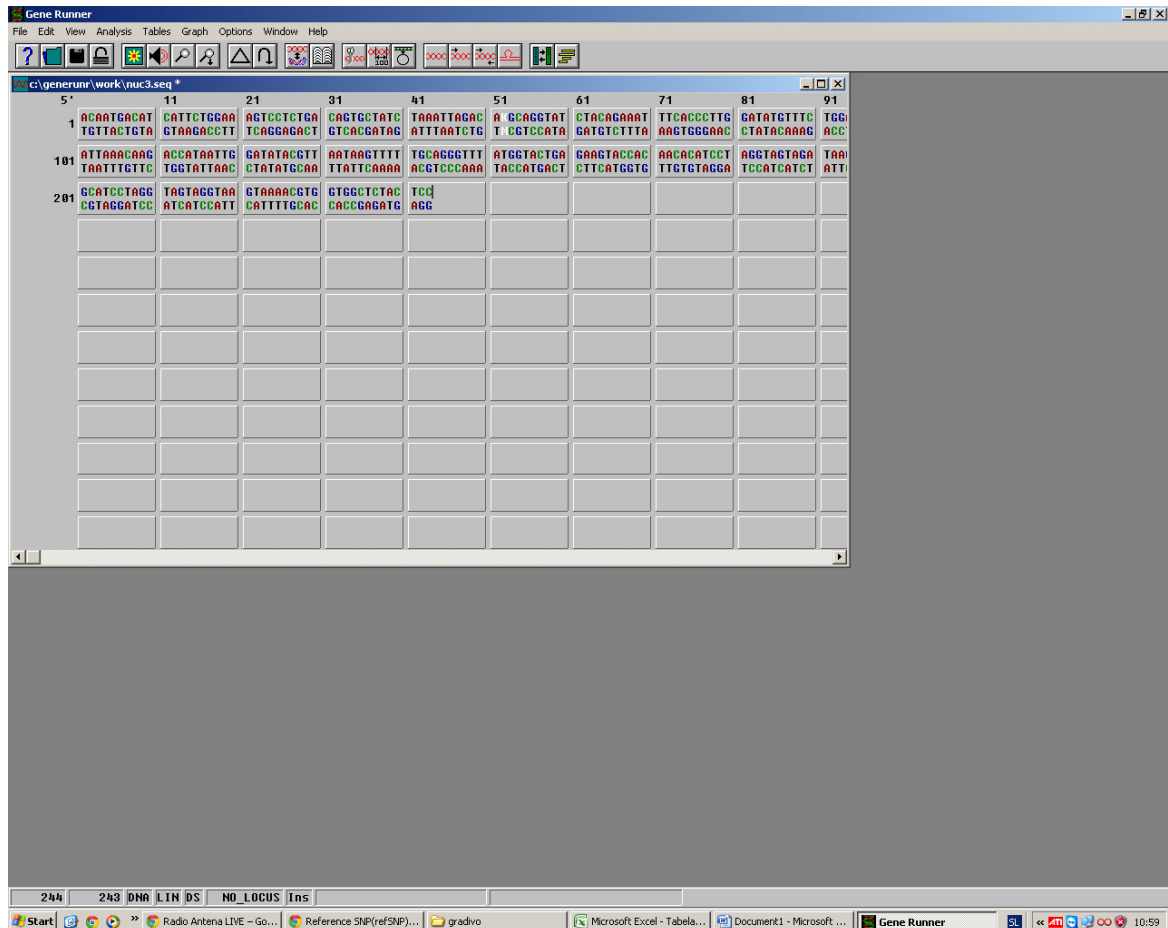
parameter	SFXN1	GLCC11
Koncentracija začetnih oligonukleotidov (nM)	300	250
First cycle	17	16
Fit points	2	4
Voda ( $\mu$ L)	0,2	0,25
SYBR Green Mix ( $\mu$ L)	2,5	2,5
Začetni oligonukleotidi ( $\mu$ L)	1 0,15	0,125

Začetni oligonukleotidi (μL)	2 0,15	0,125
DNK (μL)	2	2
Skupni volumen (μL)	5	5

### 3.4 Programska orodja

#### 3.4.1 GeneRunner

GeneRunner se uporablja za določitev sekvenc začetnih nukleotidov. Na strani Nacionalnega centra za biotehniške informacije - NCBI smo poiskali sekvenco fragmenta, ki smo ga želeli pomnožiti. Program nam navede več začetnih nukleotidov, raziskovalec nato sam izbere optimalni začetni fragment. Na podlagi izbranega oligonukleotida smo dobili seznam možnih restrikcijskih encimov. Za vsak encim in alel smo morali posebej preveriti mesto restrikcije. Na osnovi razlik smo izbrali najprimernejši encim za RFLP metodo.



3-6: Uporaba GeneRunner-ja



### 3.4.2 Programski paket SPSS

Pri statistični obdelavi podatkov smo si pomagali s programom SPSS (verzija 21), ki nam omogoča različne statistične analize podatkov, ko so: regresijske in korelacijske analize, opisno statistične metode, linearno modeliranje itd. Za določanje značilnosti razlik v frekvencah genotipov med astmatiki in kontrolnimi vzorci smo uporabili statistično analizo  $\chi^2$  (hi-kvadrat), t-test za analizo vpliva genotipa na učinek protiastmatične terapije, ki imajo numerične spremenljivke. Za statistično analizo odvisnosti izražanja od bolnikov in kontrolnih vzorcev, odvisnosti izražanja od tipa astme in spremembo izražanja pred in po terapiji smo uporabili Mann-Whitney-ev test. Za primerjavo vpliva genotipa na izražanje smo uporabili Kruskal Wallis-ov test. Zaradi majhnega števila vzorcev pri analizi spremembe izražanja po terapiji smo za gen GLCC1 izvedli dodatno analizo z Wilcoxon Signed Ranks-ovim testom.

## 4 Rezultati

Izvedli smo različne simulacije statističnih povezav, na podlagi katerih lahko sklepamo na vlogo genov GLCC1 in SFXN1 pri bolnikih z astmo. Statistične analize smo izvedli ločeno dominantno za alela T in C za gen GLCC1 in za alela G in T za gen SFXN1.

### 4.1 Povezava genotipa z obolelostjo z astmo

S primerjavo frekvenc genotipov bolnih in zdravih otrok smo želeli povezati možnost razvoja astme s polimorfizmi v analiziranih genih. Za vsak polimorfizem posebej smo izvedli statistično analizo  $\chi^2$  (hi-kvadrat). Primerjali smo frekvence genotipov med zdravimi oz. kontrolnimi vzorci in bolniki obolelimi za astmo.

#### 4.1.1 GLCC1

Tabela 4-1: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs37972 za gen GLCC1

	CC	CT	TT
Kontrolni vzorci	64 (36,99%)	90 (52,02%)	19 (10,98%)
Bolniki	83 (31,56%)	128 (48,67%)	52 (19,77%)

Tabela 4-2: Statistična primerjava med bolniki in kontrolnimi osebki za gen GLCC1

	CC	CT + TT	p	CC + CT	TT	p
Kontrolni vzorci	57 (34,97%)	106 (62,03%)	p=0,6070 OR=	145 (88,96%)	18 (11,04%)	<b>0,0100</b> OR=
Bolniki	80 (32,52%)	166 (67,48%)	1,116 (0,735 – 1,695)	195 (79,27%)	51 (20,73%)	2,107 (1,181 – 3,758)

\*v oklepaju je podan interval zaupanja, OR= razmerje obetov

Po statistični obdelavi smo ugotovili, da obstaja statistično značilna povezava dominantno za C alel in polimorfizmom rs37972 in razvojem astme ( $p=0,0100$ ). Sklepamo lahko, da alel T vpliva na razvoj astme, saj je med astmatiki značilno večji delež posameznikov z genotipom TT (20,73 %) kot v skupini zdravih posameznikov (11,04 %).

#### 4.1.2 SFXN1

Tabela 4-3: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1

	<b>GG</b>	<b>GT</b>	<b>TT</b>
Kontrolni vzorci	79 (30,74%)	134 (52,14%)	44 (17,12%)
Bolniki	87 (30,63%)	148 (52,11%)	49 (17,25%)

Tabela 4-4: Statistična primerjava med bolniki in kontrolnimi osebki za gen SFXN1

	<b>TT</b>	<b>GT + GG</b>	<b>p</b>	<b>TT + GT</b>	<b>GG</b>	<b>p</b>
Kontrolni vzorci	49 (19,22%)	206 (80,78%)	0,5760 OR=	178 (69,80%)	68 (30,20%)	0,3180 OR= 1,21
Bolniki	50 (17,48%)	236 (82,52%)	1,132 (0,732 – 1,751)	200 (69,93%)	88 (30,07%)	(0,732 – 1,759)

\*v oklepaju je podan interval zaupanja, OR= razmerje obovetov

Za gen SFXN1 analiza podatkov ni pokazala statistično značilne povezanosti med genotipom in povečanim tveganjem za razvoj astme ( $p=0,5670$ ,  $p=0,3180$ ).

## 4.2 Povezava med genotipom in tipom astme

Z primerjavo smo želeli ugotoviti povezavo med polimorfizmom in povečano možnostjo za razvoj za eno od oblik astme; alergijsko ali nealergijsko. Statistično analizo smo opravili z metodo  $\chi^2$  (hi-kvadrat).

### 4.2.1 GLCCI1

#### 4.2.1.1 Alergijska astma

Tabela 4-5: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs37972 za gen GLCCI1 pri bolnikih z alergijsko astmo

	<b>CC</b>	<b>CT</b>	<b>TT</b>
Kontrolni vzorci	64 (36,99%)	90 (52,02%)	19 (10,98%)
Bolniki	48 (32,43%)	75 (50,68%)	25 (16,89%)

Tabela 4-6: Statistična primerjava med bolniki z alergijsko astmo in kontrolnimi osebami za gen GLCCI1

	<b>CC</b>	<b>CT + TT</b>	<b>p</b>	<b>CC + CT</b>	<b>TT</b>	<b>p</b>
Kontrolni vzorci	57 (34,97%)	106 (65,03%)	0,6000 OR=	145 (88,96%)	18 (11,04%)	0,1090 OR=
Bolniki	42 (32,06%)	89 (67,84%)	1,139 (0,699 – 1,857)	108 (81,82%)	23 (18,18%)	1,716 (0,882 – 3,337)

\*v oklepaju je podan interval zaupanja, OR= razmerje obovetov

Iz dobljenih rezultatov sklepamo, da ne obstaja statistično značilna povezava med preiskovanim polimorfizmom in alergijsko astmo. Na osnovi tega lahko zaključimo, da ni mogoče povezati razvoja alergijske oblike astme s polimorfizmom za gen GLCC11.

#### 4.2.1.2 Nealergijska astma

Tabela 4-7: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs37972 za gen GLCC11 pri bolnikih z nealergijsko astmo

	CC	CT	TT
Kontrolni vzorci	64 (36,99%)	90 (52,02%)	19 (10,98%)
Bolniki	15 (22,39%)	36 (53,73%)	16 (23,88%)

Tabela 4-8: Statistična primerjava med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolnimi osebki za SNP rs37972 v genu GLCC11

	CC	CT + TT	p	CC + CT	TT	p
Kontrolni vzorci	57 (34,97%)	106 (65,03%)	0,0930 OR=	145 (88,96%)	18 (11,04%)	<b>0,0040</b> OR=
Bolniki	15 (23,44%)	49 (76,56%)	1,757 (0,906 – 3,405)	47 (73,43%)	17 (26,57%)	2,914 (1,39 – 6,107)

\*v oklepaju je podan interval zaupanja, OR= razmerje obetov

Razvoj nealergijske astme lahko povežemo z SNP rs37972 ( $p=0,0040$ ). Sklepamo torej, da imajo osebe s genotipom TT večjo možnost za obolenost z nealergijsko obliko astme. Sklepamo, da alel T povečuje možnost za obolenost z nealergijsko obliko astme saj je delež bolnikov z genotipom TT 26,57%, kar je značilno več kot 11,04% pri kontrolah.

#### 4.2.2 SFXN1

##### 4.2.2.1 Alergijska astma

Tabela 4-9: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 pri bolnikih z alergijsko astmo

	GG	GT	TT
Kontrolni vzorci	79 (30,74%)	134 (52,14%)	44 (17,12%)
Bolniki	47 (26,86%)	97 (55,43%)	31 (17,71%)

Tabela 4-10: Statistična primerjava med bolniki z alergijsko astmo in kontrolnimi osebki za gen SFXN1

	TT	GT + GG	p	TT + GT	GG	p
Kontrolni vzorci	49 (19,22%)	206 (80,78%)	0,2320 OR=	187 (73,33%)	68 (26,67%)	0,2460 OR=
Bolniki	26 (14,77%)	150 (85,23%)	1,372 (0,816 – 2,308)	120 (68,18%)	56 (31,82%)	1,283 (0,842 – 1,956)

\*v oklepaju je podan interval zaupanja, OR= razmerje obetov

Povezave med genom SFXN1 in povečanim tveganjem za razvoj alergijske oblike astme ni mogoče potrditi ( $p=0,232$ ,  $p=0,246$ ).

#### 4.2.2.2 Nealergijska astma

Tabela 4-11: Frekvenca posameznega genotipa za polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 pri bolnikih z alergijsko astmo

	GG	GT	TT
Kontrolni vzorci	79 (30,74%)	134 (52,14%)	44 (17,12%)
Bolniki	32 (38,55%)	38 (45,78%)	13 (15,66%)

Tabela 4-12: Statistična primerjava med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolnimi osebki za gen SFXN1

	TT	GT + GG	p	TT + GT	GG	p
Kontrolni vzorci	49 (19,22%)	206 (80,78%)	0,5220 OR=	187 (73,33%)	68 (26,67%)	0,5600 OR=
Bolniki	18 (22,5%)	62 (77,5%)	0,819 (0,445 – 1,508)	56 (70%)	24 (30%)	1,179 (0,678 – 2,049)

\*v oklepaju je podan interval zaupanja, OR= razmerje obetov

Pri bolnikih z nealergijsko astmo nismo ugotavljali statistično značilnih razlik v genotipu polimorfizma rs2644645 SFXN1 v primerjavi z kontrolami ( $p=0,5220$ ,  $p=0,5600$ ).

### 4.3 Odvisnost kliničnih parametrov od genotipa

S pomočjo analize laboratorijskih in kliničnih parametrov odvisnosti od genotipa smo želeli potrditi vpliv preučevanih genov, na fenotipske lastnosti astmatikov. Preverili smo naslednje parametre: FEV1, eozinofilci, PEF, PC20, FeNO, Cel IgE in TI. Vsi klinični parametri so bili izmerjeni pred terapijo s glukokortikoidi. Dodatno smo analizirali tudi razliko (dFEV) med FEV1 pred terapijo in po terapiji pri bolnikih, ki so bili zdravljeni z glukokortikoidi.

### 4.3.1 GLCCI1

Tabela 4-13: Klinični parametri v odvisnosti od genotipa za gen GLCCI1

	CC/CT+TT				p	CC+CT/TT				p
	CC		CT+TT			CC+CT		TT		
	N	Srednja vrednost t *	N	Srednja vrednost t *		N	Srednja vrednost t *	N	Srednja vrednost t *	
%FEV1	60	86,63	14 5	92,03	<b>0,0280</b>	164	90,21	41	91,41	0,6220
dFEV	44	7,64	90	6,44	0,5710	110	7,05	24	5,83	0,6270
eozinofilci	27	515,96	47	580,91	0,4170	60	548,20	14	595,86	0,9690
PEF	33	30,0	60	24,0	0,5050	72	26,5	21	35	0,3070
PC20	59	0,5	14 3	0,5850	0,7140	161	0,485	41	1,41	0,3770
FeNO	41	43	12 4	32	0,7270	131	26	34	43	0,3910
Cel IgE	25	253	49	388	0,0670	57	256	17	434	0,7770
TI	60	90	14 5	89	0,6020	164	89	41	91	0,9140

\*Za podatke %FEV1, dFEV in eozinofilci so podane povprečne vrednosti. Pri PERF, PC20, FeNO, Cel IgE in TI so podane mediane.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da obstaja statistično značilen vpliv SNP rs37972 na parameter FEV1 ( $p=0,0280$ ). Genotip CC je povezan s slabšo pljučno funkcijo (FEV1 = 86,63) v primerjavi z genotipoma CT in TT (FEV1 = 92,03) pred uvedbo terapije.

Statistično značilne razlike, ki bi potrjevala povezave ostalih kliničnih parametrov s genotipom, ni možno potrditi v povezavi s tem genom.

## 4.3.2 SFXN1

Tabela 4-14: Klinični parametri v odvisnosti od genotipa za gen SFXN1

	TT/GT+GG				p	TT+GT/GG				p
	TT		GT+GG			TT+GT		GG		
	N	Srednja vrednost *	N	Srednja vrednost t *		N	Srednja vrednost *	N	Srednja vrednost t *	
%FEV <sub>1</sub>	4	87,09	21	89,86	0,25	182	89,73	80	88,63	0,58
	6		9		20					10
dFEV	2	9,86	13	6,34	0,15	112	7,33	54	6,17	0,57
	9		7		10					60
eozinofilci	2	471,401	93	279,14	<b>0,01</b>	80	521,09	33	489,64	0,60
	0		4		<b>30</b>					90
PERF	2	26,5	10	26	0,28	93	26,5	41	24	0,77
	5		9		80					90
PC20	4	0,605	21	0,4	0,24	180	0,44	82	0,35	0,92
	5		7		80					90
FeNO	3	27	16	33	0,80	139	35	63	32	0,89
	4		8		70					80
Cel IgE	2	361	92	315	0,92	79	362	34	291	0,45
	1				40					80
TI	4	99	22	93	0,34	182	96	84	89	0,91
	6		0		80					30

\*Za podatke %FEV<sub>1</sub>, dFEV in eozinofilci so podane povprečne vrednosti. Pri PERF, PC20, FeNO, Cel IgE in TI so podane mediane

Za polimorfizem rs2644645 lahko sklepamo, da statistično značilno vpliva količino eozinofilcev v krvi ( $p=0,0130$ ). Genotip »TT« je povezan z višjim številom eozinofilcev v krvi (eozinofilci = 471,4) v primerjavi z genotipoma GT in GG (eozinofilci = 279,14).

Statistično značilne razlike, ki bi potrjevala povezavo ostalih kliničnih parametrov z genotipom za analizirani polimorfizem, ni možno potrditi.

#### 4.4 Odvisnost kliničnih parametrov od genotipa pri posameznih podtipih astme

##### 4.4.1 GLCCI1

##### 4.4.1.1 Alergijska astma

Tabela 4-15: Klinični parametri v odvisnosti od alergijske za gen GLCCI1

	CC/CT+TT				p	CC+CT/TT				p
	CC		CT+TT			CC+CT		TT		
	N	Srednja vrednost *	N	Srednja vrednost *		N	Srednja vrednost *	N	Srednja vrednost *	
%FEV <sub>1</sub>	65	86,4	15	90,645	0,0820	179	89,358	41	89,537	0,9380
dFEV	36	7,083	57	8,509	0,5450	78	8,615	15	4,533	0,1490
eozinofilci	31	507,774	58	558,793	0,4970	74	529,473	15	598	0,5450
PERF	37	26,5	72	35,0	0,3800	87	30,0	22	24,0	0,4850
PC20	64	0,485	15	1,413	0,5510	176	0,5	41	0,585	0,8500
FeNO	44	26,0	12	43,06	0,9760	136	43,0	34	32,0	0,4650
Cel IgE	29	256,0	60	434,0	0,0730	71	253,0	18	388,0	0,6460
TI	65	95,5	15	35,05	0,8320	179	94,0	41	92,5	0,6600

\*Za podatke %FEV<sub>1</sub>, dFEV in eozinofilci so podane povprečne vrednosti. Pri PERF, PC20, FeNO, Cel IgE in TI so podane mediane

Statistično značilne povezave nismo ugotovili pri nobenem od kliničnih parametrov. Pri %FEV<sub>1</sub> ( $p=0,0820$ ) obstaja tendenca povezave nižje vrednosti z genotipom CC. Podobno tudi za vrednost Cel IgE ( $p=0,0730$ ) lahko opazimo tendenco povezave višjih vrednosti z alelom T.



## 4.4.1.2 Nealergijska astma

Tabela 4-16: Klinični parametri pri nealergijski astmi v odvisnosti od genotipa za gen GLCC11

	CC/CT+TT				p	CC+CT/TT				p
	CC		CT+TT			CC+CT		TT		
	N	Srednja vrednost t *	N	Srednja vrednost t *		N	Srednja vrednost t *	N	Srednja vrednost t *	
%FEV <sub>1</sub>	65	86,4	15 5	90,645	0,08 20	179	89,358	41	89,537	0,93 80
dFEV	7	10,286	28	5,286	0,43 00	26	5,692	9	8	0,64 80
eozinofilci	31	507,77 4	58 3	558,79	0,49 70	74	529,47 3	15	598,0	0,54 50
PERF	37	30,0	72	24,0	0,38 00	87	26,5	22	35,0	0,48 50
PC20	64	0,5	15 3	0,585	0,55 10	176	0,485	41	1,41	0,85 00
FeNO	44	43,0	12 6	32,0	0,97 60	136	26,0	34	43,0	0,46 50
Cel IgE	29	253,0	60	388,0	0,07 30	71	256,0	18	434,0	0,64 60
TI	65	94,0	15 5	92,5	0,83 20	179	95,5	41	92,0	0,66 00

\*Za podatke %FEV<sub>1</sub>, dFEV in eozinofilci so podane povprečne vrednosti. Pri PERF, PC20, FeNO, Cel IgE in TI so podane mediane.

Tendenco vpliva genotipa lahko opazimo za FEV p=0,0820 in Cel IgE p=0,0730.

## 4.4.2 SFXN1

### 4.4.2.1 Alergijska astma

Tabela 4-17: Klinični parametri pri alergijski astmi v odvisnosti od genotipa za gen SFXN1

	TT/TG+GG				p	TT+TG/GG				p
	TT		TG+GG			TT+TG		GG		
	N	Srednja vrednost t *	N	Srednja vrednost t *		N	Srednja vrednost t *	N	Srednja vrednost t *	
%FEV <sub>1</sub>	43	58,884	22	89,489	0,1850	182	89,346	82	87,915	0,4630
dFEV	19	8,211	97	7,371	0,7590	81	6,691	35	9,4	0,2530
eozinofilci	21	557,619	92	505,63	0,5990	80	526,763	33	487,485	0,5360
PERF	25	26,5	10	26	0,9040	94	26,5	39	24,0	0,5120
PC20	42	0,605	22	0,4	0,3440	181	0,44	81	0,35	0,6160
FeNO	32	37,6	16	33,0	0,9270	138	35,0	62	32,0	0,8550
Cel IgE	22	361,0	91	315,0	0,5350	81	362,0	32	291,0	0,5430
TI	43	99,0	22	93,0	0,4040	182	96,0	83	89,0	0,6250

\*Za podatke %FEV<sub>1</sub>, dFEV in eozinofilci so podane povprečne vrednosti. Pri PERF, PC20, FeNO, Cel IgE in TI so podane mediane.

Med kliničnimi parametri in polimorfizmom za gen SFXN1 nismo našli statistične povezave, ki bi potrdila vpliv gena na fenotipske lastnosti pri bolnikih s alergijsko obliko astme.

#### 4.4.2.2 Nealergijska astma

Tabela 4-18: Klinični parametri pri nealergijski astmi v odvisnosti od genotipa za gen SFXN1

	TT/TG+GG				p	TT+TG/GG				p
	TT		TG+GG			TT+TG		GG		
	N	Srednja vrednos t *	N	Srednja vrednos t *		N	Srednja vrednos t *	N	Srednja vrednos t *	
%FEV1	43	85,884	22	89,489	0,18	182	89,346	82	87,915	0,46
1			1		50					30
dFEV1	10	13	33	4,636	0,09	28	9,393	15	1,333	<b>0,03</b>
					70					<b>20</b>
eozinofilci	21	557,619	92	505,630	0,59	80	526,63	33	487,485	0,53
					90					60
PERF	25	26,5	10	26,0	0,90	94	26,5	39	24,0	0,51
			8		40					20
PC20	42	0,605	22	0,4	0,34	181	0,44	83	0,35	0,61
			2		40					60
FeNO	32	27,0	22	33,0	0,92	138	35,0	81	32,0	0,85
			0		70					50
Cel IgE	22	361,0	16	315,0	0,53	81	362,0	62	291,0	0,54
			8		50					30
TI	43	99,0	91	93,0	0,40	182	96,0	32	89,0	0,62
					40					50

\*Za podatke %FEV1, dFEV1 in eozinofilci so podane povprečne vrednosti. Pri PERF, PC20, FeNO, Cel IgE in TI so podane mediane.

Pri bolnikih z nealergijsko obliko astme smo ugotovili statistično značilen vpliv na dFEV1 (odziv na terapijo) v statistični analizi po dominantnem modelu ta T alel in sicer je genotip GG povezan s slabšim odzivom na terapijo ( $p=0,032$ ).

#### 4.5 Izražanje genov v odvisnosti od obolevnosti z astmo

V raziskavo smo vključili tudi merjenje ekspresije oz. izražanje genov, za katere domnevamo, da bi bili lahko povezani z učinkom terapije. S pomočjo povezav izražanja z različnimi dejavniki bi lahko pripomogli k boljši izbiri zdravil za posameznika, ki bi imela najmanj stranskih učinkov. Pri statistični obdelavi smo uporabili Mann-Whitneyev test.

##### 4.5.1 GLCC1

Tabela 4-19: Primerjalni podatki med izražanjem pri bolnikih in kontrolah za gen GLCC1

	N	Mediana	p
Kontrolni vzorci	162	0,9693	0,8650
Bolniki	245	0,9806	

Pri primerjavi izražanja med kontrolnimi vzorci in bolniki nismo potrdili statistične povezave ( $p=0.8650$ ) za gen GLCC11.

#### 4.5.2 SFXN1

Tabela 4-20: Primerjalni podatki med izražanjem in skupino vzorcev za gen SFXN1

	N	Mediana	p
Kontrolni vzorci	133	0,65	0,3280
Bolniki	239	0,67	

Pri primerjavi izražanja med kontrolnimi vzorci in bolniki nismo potrdili statistične povezave ( $p=0.3280$ ) za gen SFXN1.

### 4.6 Izražanje v odvisnosti od tipa astme

Opravili smo tudi primerjavo med izražanjem ločeno za bolnike z alergijsko in nealergijsko astmo. P-vrednost smo izračunali s Mann-Whitney-evim testom.

#### 4.6.1 GLCC11

##### 4.6.1.1 Alergijska astma

Tabela 4-21: Primerjava med izražanjem gena GLCC11 med bolniki z alergijsko astmo in kontrolami.

	N	Mediana	p
Kontrolni vzorci	162	0,9693	0,2000
Bolniki	154	0,8661	

V tabeli so prikazani podatki primerjave med bolniki z alergijsko obliko astme in kontrolnimi vzorci, med katerimi nismo potrdili statistično značilne razlike v izražanju ( $p=0,2000$ ).

##### 4.6.1.2 Nealergijska astma

Tabela 4-22: Primerjava med izražanjem gena GLCC11 med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolami.

	N	Mediana	p
Kontrolni vzorci	162	0,9693	0,0950
Bolniki	70	1,134	

Iz dobljenih podatkov ni mogoče sklepati, da obstaja razlika med izražanjem pri bolnikih z nealergijsko astmo in zdravo populacijo ( $p=0,0950$ ). Rezultati pa kažejo na tendenco razlike v izražanju.

## 4.6.2 SFXN1

### 4.6.2.1 Alergijska astma

Tabela 4-23: Primerjava med izražanjem gena SFXN1 med bolniki z alergijsko astmo in kontrolami.

	N	Mediana	p
Kontrolni vzorci	133	0,9693	0,2540
Bolniki	148	0,88	

V tabeli so prikazani podatki primerjave med bolniki z alergijsko obliko astme in kontrolnimi vzorci, med katerimi nismo potrdili statistično značilne razlike v izražanju ( $p=0,2540$ ) za gen SFXN1.

### 4.6.2.2 Nealergijska astma

Tabela 4-24: Primerjava med izražanjem gena SFXN1 med bolniki z nealergijsko astmo in kontrolami.

	N	Mediana	p
Kontrolni vzorci	133	0,9693	0,2080
Bolniki	58	0,97	

V tabeli so prikazani podatki primerjave med bolniki z nealergijsko obliko astme in kontrolnimi vzorci, med katerimi nismo potrdili statistično značilne razlike v izražanju ( $p=0,2080$ ) za gen SFXN1.

## 4.7 Izražanje v odvisnosti od genotipa

Preverili smo tudi, kako vpliva genotip analiziranih polimorfizmov na izražanje posameznega gena. Statistično analizo smo opravili s pomočjo Kruskal-Wallis-ovega primerjalnega testa.

### 4.7.1 GLCCI1

Tabela 4-25: Tabela 3 21: Vpliv genotipa SNP rs37972 na izražanje gena GLCCI1 pri bolnikih z astmo

	N	Mediana	p
CC	98 (31,92%)	0,9199	0,3590
CT	153 (49,84%)	1,027	
TT	56 (18,24%)	0,8566	

Sklepamo lahko, da polimorfizem rs37972 za gen GLCCI1 ne vpliva na izražanje gena ( $p=0,3590$ ).

#### 4.7.2 SFXN1

Tabela 4-26: Vpliv genotipa SNP rs2644645 na izražanje gena SFXN1 pri bolnikih z astmo

	N	Mediana	p
TT	65 (18,95%)	0,583	0,1190
GT	175 (51,02%)	0,6666	
GG	103 (30,03%)	0,717	

Sklepamo lahko, da polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 ne vpliva na izražanje gena ( $p=0,1190$ ).

#### 4.8 Izražanje pred in po terapiji

Primerjali smo spremembo izražanja genov pred in po terapiji s glukokortikoidi. Zaradi manjše količine podatkov smo pri analizi izražanja genov izvedli tudi Wilcoxon test predznačenih rangov. Za oba gena smo izvedli tudi Mann-Whitney-ev test.

##### 4.8.1 GLCCI1

Tabela 4-27: Primerjava med izražanjem gena pred in po terapiji; Mann-Whitney

	N	Mediana	p
Pred terapijo	154	1,057	0,4710
Po terapiji	41	0,9668	

Tabela 4-28: Primerjava med izražanjem gena pred in po terapiji; Wilcoxon Signed Ranks test

	N	p
Zvišanje izražanja	13	0,9770
Znižanje izražanja	11	

Pri primerjavi izražanja pred in po terapiji za gen GLCCI1 nismo ugotovili statistično značilne razlike  $p=0,4710$  in  $p=0,9770$ , s katero bi lahko potrdili vpliv glukokortikoidov na izražanje.

##### 4.8.2 SFXN1

Tabela 4-29: Povezava med izražanjem gena pred in po terapiji; Mann-Whitney

	N	Mediana	p
Pred terapijo	107	0,84	<0,001
Po terapiji	27	1,832	

Pri genu SFXN1 smo ugotovili vpliv terapije s glukokortikoidi na izražanje gena ( $p=0,0002$ ) in sicer se izražanje po terapiji značilno zviša ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,832$ ) v primerjavi z izražanjem pred uvedbo terapije ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,840$ ).

## 5 Razprava

V naši študiji smo preučevali možnost povezave polimorfizmov rs37972 in rs2644645 na zdravljenje otroške astme. Korelacije smo iskali s primerjavami med in znotraj skupine astmatikov (nealergijski astmatiki, alergijski astmatiki) ter kontrolno skupino. Zanimalo nas je, ali se genotipske in alelna frekvenca izbranih polimorfizmov statistično značilno razlikujejo glede na preučevane skupine ter, ali posamezni genotipi ali aleli statistično značilno vplivajo na klinične in laboratorijske parametre. Nadalje smo preverjali korelacije med genotipi in aleli polimorfizma rs2644645 z izražanjem gena SFXN1 ter med genotipi in aleli polimorfizma rs37972 z izražanjem gena GLCCI1, in sicer med in znotraj navedenih skupin.

Pri primerjavi kontrolne skupine in skupine astmatikov v celoti za gen GLCCI1 smo pri ločeni analizi, dominantno za alel C in dominantno za alel T, ugotovili statistično značilno povezavo z alelom T polimorfizma rs37972 ( $p=0,010$ ). Alel T je statistično značilno pogostejši pri skupinah astmatikov v celoti kot pri kontrolni skupini. Sklepamo lahko, da alel T vpliva na razvoj astme, tako alergijske kot nealergijske. Naša ugotovitev se pridružuje rezultatom iz študije *Kelan G. Tantisira, M.D., Jessica Lasky-Su, Sc.D., Michishige Harada et al* [3], ki je zajela 1041 otrok, starih med 5 in 12 let. Omenjena raziskava potrjuje vpliv oz. povezavo polimorfizma rs37972 in gena GLCCI1.

Za gen GLCCI1 smo nadalje pri primerjavi med kontrolno skupino in bolniki z nealergijsko astmo, ugotovili, da je alel T polimorfizma rs37972 statistično pogostejši pri bolnikih z nealergijsko astmo ( $p=0,0040$ ). Ugotovitev je v skladu z rezultati, dobljenimi pri primerjavi kontrolne skupine in skupine bolnikov v celoti. Medtem pa primerjava med kontrolno skupino in bolniki z alergijsko astmo ni pokazala statistično značilne povezave med pojavnostjo alela T in alela C polimorfizma rs37972.

Skupni rezultati primerjave alelnih in genotipskih frekvenc nakazujejo, da ima alel T polimorfizma rs37972 dominanten vpliv na razvoj astme, in sicer pri bolnikih z nealergijsko astmo.

Dosedanje raziskave povezujejo gen GLCCI1 tudi z boleznimi: putika, ledvični kamni in nefrotski sindrom. Pri vseh boleznih je v povezavi z genotipom potrjen raznolik odziv na terapijo s glukokortikoidi, ki so pogosto uporabljajo kot najpogostejša izbira za zdravljenje omenjenih bolezni. [20, 21, 22]

Pri preučevanju gena SFXN1 pri ločeni analizi, dominantno za alel G in dominantno za alel T, nismo pri primerjavi med kontrolno skupino in bolniki z nealergijsko astmo ugotovili statistično značilnih povezav med aleloma T in G polimorfizma rs2644645. Prav tako naši rezultati niso pokazali na razlike pri primerjavi kontrolne skupine s skupino z alergijsko astmo. Na podlagi naših rezultatov lahko ugotovimo, da alela T in G polimorfizma rs2644645 nimata vpliva na razvoj astme, alergijske in nealergijske.

Gen SFXN1 ali sideroflexin 1 je zelo slabo raziskan, dosedanje raziskave ga povezujejo z imunskimi pomanjkljivostmi in napredovanjem AIDS-a. [23, 24]

Značilnost in stanje astme lahko definiramo s kliničnimi parametri, kot so hiper-reaktivnost dihal (PC20), pljučna funkcija (FEV1, PEFr), obstrukcija (TI), vnetje (FeNO, eozinofilija) in atopija (IgE). V naši raziskavi je bilo ugotovljeno, da polimorfizem rs37972 vpliva na potek astme, kar se kaže v statistično značilnih razlikah v parametru FEV1 in tendenci razlik za parameter IgE.

Rezultati kažejo, da je vrednost FEV1 nižja pri astmatikih z alelom T kot pri astmatikih z alelom C, kar pomeni, da imajo bolniki z alelom T slabši pretok zraka ob izdihu kot astmatiki z alelom C. Iz naših rezultatov je razvidno, da alel T polimorfizma rs37972 vpliva na izboljšanje kliničnega parametra FEV1 ( $p=0,0300$ ) in tendenca za parameter IgE ( $p=0,0600$ ), in sicer neodvisno od tipa astme. Dobljeni rezultati niso povsem v skladu z

ugotovitvami študije *Kelan G. Tantisira, M.D., Jessica Lasky-Su, Sc.D., Michishige Harada et al* [3]. V omenjeni študiji je pri primerjavi genotipov CC, CT in TT prišlo do izboljšanja pljučne funkcije pri vseh genotipih, najbolj pa genotipu CC.

Pri naših nadaljnjih raziskavah, ločeno glede za tip astme, se pri naših rezultatih kaže tendenca razlik kliničnih parametrov FEV1 ( $p=0,0820$ ) in IgE ( $p=0,0700$ ). Sklepamo lahko, da ima terapija z glukokortikoidi enak vpliv ne glede na tip astme. Na tem mestu navajamo ugotovitev raziskave *Vijverberg SJI, Tavendale R, Leusink M et al* [29], da ne obstaja povezava med alelom T polimorfizma rs37972 in povečanjem tveganja za uporabo kortikosteroidov pri zdravljenju astme.

Iz naših rezultatov je nadalje razvidno, da alel G polimorfizma rs2644645 vpliva na izboljšanje kliničnega parametra eozinofilci ( $p=0,0130$ ) neodvisno od tipa astme. Za nealergijsko astmo lahko na podlagi raziskave zaključimo, da ne glede na alel polimorfizma rs2644645, opazimo spremembo kliničnega parametra FEV1. Dominantno za alel T lahko potrdimo statistično značilno povezavo ( $p=0,0320$ ), dominantno za alel G pa se kaže tendenca ( $p=0,0970$ ).

Pri preverjanju izboljšanja ostalih kliničnih parametrov naša raziskava ni pokazala statistično značilne povezave med aleloma G in T polimorfizma rs2644645 in kliničnimi parametri: hiper-reaktivnost dihal (PC20), pljučna funkcija (FEV1, PEFr), obstrukcija (TI) in atopija (IgE). Prav tako ni pokazala statistično značilne povezave med aleloma C in T polimorfizma rs37972 s kliničnimi parametri (hiper-reaktivnost dihal (PC20), obstrukcija (TI) in atopija (IgE)).

Z analizo izražanja genov GLCC1 in SFXN1 lahko na podlagi naših rezultatov potrdimo, da ni razlik med kontrolnimi vzorci in bolniki za celotno populacijo astmatikov. Zaradi različnih sprožilcev poslabšanj astme pa lahko pri obeh podtipih astme obstaja možnost, da se bodo pojavile razlike v izražanju genov. Pri bolnikih z nealergijsko obliko astme se kaže tendenca ( $p=0,0950$ ), ki nakazuje na povečano izražanje gena GLCC1. Za gen SFXN1 ne moremo potrditi povezave med izražanjem gena in obojeleostjo.

Za polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 in polimorfizem rs37972 za gen GLCC1 lahko na podlagi naših rezultatov zaključimo, da ne vpliva na izražanje posameznega gena glede na posamezne skupine.

V raziskavi smo primerjali tudi spremembo izražanja genov pred in po terapiji z glukokortikoidi. Za gen SFXN1 lahko potrdimo statistično značilno povezavo ( $p=0,0002$ ). Po terapiji se je bolnikom močno povečalo izražanje gena ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,832$ ) v primerjavi z izražanjem pred uvedbo terapije ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0,840$ ). Povečanje izražanja genov lahko povežemo z znižanjem vrednosti eozinofilcev (iz 471,401 na 279,14), ki kažejo na alergijsko vnetje. Glukokortikoidi aktivirajo prepisovanje beljakovin, ki imajo protivnetne lastnosti, kar privede do znižanja eozinofilcev v krvi. [18, 19] Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da ima beljakovina, ki je kodirana z genom SFXN1, pomembno vlogo pri protivnetnih terapijah. Trdimo lahko, da imajo glukokortikoidi velik vpliv na izražanje gena SFXN1.

Za gen SFXN1 in polimorfizem rs2644645 do sedaj ni bilo opravljene nobene – nam poznane študije, ki bi povezala ali ovrgla vpliv genov ali polimorfizma na zdravljenje astme.

*Kelan G. Tantisira et al* [3] je polimorfizem rs2644645 za gen SFXN1 uvrstil med sto najpomembnejših polimorfizmov, ki bi lahko imeli vpliv na terapijo pri zdravljenju astme s glukokortikoidi  $p_{FBAT}=0,021$ ; mesto na lestvici=83. [3]

Za razumevanje mehanizma delovanja glukokortikoidov na beljakovini, ki ji kodirata gena SFXN1 in GLCC1 in nadaljnjih procesov, ki so posledica interakcije beljakovine in glukokortikoidov, bi bilo potrebno določiti natančno funkcijo beljakovin.



Naša raziskava je potrdila, da sta gena SFXN1 in GLCCI1 ena od ključnih markerjev pri genski analizi na področju zdravljenja astme in ostalih pljučnih in vnetnih obolenj.

Rezultate in ugotovitve našega raziskovalnega dela bi bilo potrebno preveriti v neodvisnih raziskavah ter na večjem številu vzorcev, da bi bili rezultati in zaključki zanesljivejši.

## 6 Zaključki

Podatki, pridobljeni z raziskavo bodo lahko pomembno vplivali na diagnosticiranje astme in izbire zdravila pri zdravljenju. Farmakogenomske študije imajo velik potencial, zato je smiselno analizirati vse potencialne polimorfizme, ki bi lahko imeli vpliv pri zdravljenju z astmo. Zaradi velikega števila genov in polimorfizmov pa bo potrebno v prihodnosti narediti še veliko raziskav, da bodo farmakogenomske študije postale zanesljivejši pokazatelj za nadaljnje odločitve pri zdravljenju bolezni. S pomočjo preučevanja vplivov genetskih dejavnikov bomo lahko v prihodnje predvideli stranske učinke na posamezno zdravilo in tako izbrali najboljše zdravilo za vsakega posameznika. S poznavanjem vloge polimorfizmov in genov bi lahko olajšali razvoj novih zdravil, ki bi delovala na posamezne gene ali polimorfizme in bi tako izboljšala učinek zdravil.

## 7 VIRI

- [1] Spletna stran: <http://www.anteros.eu/astma/#.UfpO0G0SaKI> dostop 1. 8. 2013
- [2] Spletna stran: <http://www.asthmacapitals.com/> dostop 1. 8. 2013
- [3] Kelan G. Tantisira, M.D., et. al. Genomewide Association between GLCC11 and Response to Glucocorticoid Therapy in Asthma, *The new england journal of medicine*, SEP 29 2011
- [4] Berce Vojko, Identifikacija nekaterih kandidatnih genov za astmo ter povezava teh genov s fenotipom astme in odgovorom na terapijo pri otrocih z astmo, Medicinska fakulteta doktorska disertacija
- [5] Vercelli d., Advances in asthma and allergy genetics in 2007, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Volume 122, Issue 2, August 2008, Pages 267-271
- [6] J Zhang, PD Paré, AJ Sandford, Recent advances in asthma genetics, *Respir res* 2008, 9: 4
- [7] Berce V, Potocnik U., Functional polymorphism in CTLA4 gene influences the response to therapy with inhaled corticosteroids in Slovenian children with atopic asthma., *Biomarkers*. Mar2010, Vol. 15 Issue 2, p158-166. 9p. 5 Charts.
- [8] Lima JJ., Blake KV., Tantisira KG., Weiss ST. Pharmacogenetics of asthma. *Current Opinion In Pulmonary Medicine [Curr Opin Pulm Med]* 2009 Jan; Vol. 15 (1), pp. 57-62.
- [9] Tantisira KG., Lake S., Silverman ES., Palmer LJ., Lazarus R., Silverman EK., Liggett SB. , Gelfand EW., Rosenwasser LJ., Richter B., Israel E., Wechsler M., Gabriel S., Altshuler D., Lander E., Drazen J., Weiss ST. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Human Molecular Genetics [Hum Mol Genet]* 2004 Jul 1; Vol. 13 (13), pp. 1353-9. Date of Electronic Publication: 2004 May 05.
- [10] Zhang Y., Huang H., Huang J., Xiang Z., Yang M., Tian C., Fan H. The -444A/C polymorphism in the LTC4S gene and the risk of asthma: a meta-analysis. *Archives Of Medical Research [Arch Med Res]* 2012 Aug; Vol. 43 (6), pp. 444-50. Date of Electronic Publication: 2012 Aug 10.
- [11] Sze Man Tse, Kelan Tantisira, Scott T. Weiss. The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Asthma Therapy. *Pharmacogenomics J.* 2011 December; 11(6): 383–392.
- [12] Berce V., Ptočnik U., Farmakogenomika v zdravljenju astme. *Farmecevtski vestnik* 59 303-306 (2008)
- [13] Cai M., Dai H., Qiu Y., Zhao Y., Zhang R., Chu M., Dai J., Hu Z., Shen H., Chen F., SNP set association analysis for genome-wide association studies. *Plos One [PLoS One]* 2013 May 03; Vol. 8 (5), pp. e62495. Date of Electronic Publication: 20130503 (Print Publication: 2013).
- [14] Unnur S. Bjornsdottir, Stephen T. Holgate, Padmalatha S. Reddy, Andrew A. Hill, Charlotte M. McKee, Cristina I. Csimma, Amy A. Weaver, Holly M. Legault, Clayton G. Small, Renee C. Ramsey, Debra K. Ellis, Conor M. Burke, Philip J. Thompson, Peter H. Howarth, Andrew J. Wardlaw, Phillip G. Bardin, David I. Bernstein, Louis B. Irving, Geoffrey L. Chupp, George W. Bensch, Gregory W. Bensch, Jon E. Stahlman, Monroe Karetzky, James W. Baker, Rachel L. Miller, Brad H. Goodman, Donald G. Raible, Samuel J. Goldman, Douglas K. Miller, John L. Ryan, Andrew J. Dorner, Frederick W. Immermann, Margot O'Toole, Pathways Activated during Human Asthma Exacerbation as Revealed by Gene Expression Patterns in Blood, *PLoS One*. 2011; 6(7): e21902. Published online 2011 July 14. doi: 10.1371/journal.pone.0021902

- [15] McClintock TS, High-throughput expression profiling techniques, *Chemical Senses* [Chem Senses] 2002 Mar; Vol. 27 (3), pp. 289-91.
- [16] David J Duggan, Michael Bittner, Yidong Chen, Paul Meltzer, Jeffrey M., Trent Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNK microarrays, *Nature Genetics* 21, 10 - 14 (1999)
- [17] Guajardo JR, Schleifer KW, Daines MO, Ruddy RM, Aronow BJ, Wills-Karp M Hershey GK, Altered gene expression profiles in nasal respiratory epithelium reflect stable versus acute childhood asthma, *The Journal Of Allergy And Clinical Immunology* [J Allergy Clin Immunol] 2005 Feb; Vol. 115 (2), pp. 243-51.
- [18] Palmer, L. J., Silverman, E. S., Weiss, S. T., Drazen, J. M. Pharmacogenetics of asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 165, 861-866 (2002)
- [19] Sze Man Tse, Kelan Tantisira, Scott T. Weiss. The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics of Asthma Therapy. *Pharmacogenomics J.* 2011 December; 11(6): 383–392.
- [20] Spletna stran: <http://hugenavigator.net/HuGENavigator/huGEPedia.do?firstQuery=GLCC11&geneID=113263&typeSubmit=GO&check=y&typeOption=gene&which=2&pubOrderType=pubD> dostop 21. 8. 2013
- [21] Spletna stran: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/113263> dostop 21. 8. 2013
- [22] Cheong HI., Kang HG., Schlondorff J., GLCC11 single nucleotide polymorphisms in pediatric nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology* (Berlin, Germany) [Pediatr Nephrol] 2012 Sep; Vol. 27 (9), pp. 1595-9. Date of Electronic Publication: 2012 Jun 04.
- [23] Spletna stran: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/94081> dostop 21. 8. 2013
- [24] Spletna stran: <http://hugenavigator.net/HuGENavigator/huGEPedia.do?firstQuery=SFXN1&geneID=94081&typeSubmit=GO&check=y&typeOption=gene&which=2&pubOrderType=pubD> dostop 21. 8. 2013
- [25] Ferrante G ; Malizia V ; Antona R ; Corsello G ; La Grutta S, The value of FeNO measurement in childhood asthma: uncertainties and perspectives. *Multidisciplinary Respiratory Medicine* 2013 Jul 31; Vol. 8 (1), pp. 50
- [26] Ahmad Al Obaidi, Amina Hamed Mohamed Al Samarai, Abdul Ghani Yahya Al Samarai, Abdul Kareem Al Janabi, Jasim Mohamad. The Predictive Value of IgE as Biomarker in Asthma. *Journal of Asthma.* Oct2008, Vol. 45 Issue 8, p654-663
- [27] McGeachie MJ, Wu AC, Chang HH, Lima JJ, Peters SP, Tantisira KG., Predicting inhaled corticosteroid response in asthma with two associated SNPs, *Pharmacogenomics J.* 2013 Aug;13(4):306-11. doi: 10.1038/tj.2012.15. Epub 2012 May 29.
- [28] Postma DS, Kerkhof M, Boezen HM, Koppelman GH. Asthma and chronic obstructive pulmonary disease: common genes, common environments? *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1588-94.
- [29] Vijverberg SJ1, Tavendale R, Leusink M, Koenderman L, Raaijmakers JA, Postma DS, Koppelman GH, Turner SW, Mukhopadhyay S, Palmer CN, Maitland-van der Zee AH. Pharmacogenetic analysis of GLCC11 in three north European pediatric asthma populations with a reported use of inhaled corticosteroids. [29]

## 8 Življenjepis

OSEBNI PODATKI **Tjan Smrečnik**

✉ [Tjan.smrecnik@gmail.com](mailto:Tjan.smrecnik@gmail.com)

🔒 [Vpišite naslov svoje osebne spletne strani](#)

Spol Moški | Datum rojstva 30/08/1991 | Državljanstvo Slovensko

### IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

2010-2014 diplomirani inženir kemijske tehnologije (UN)

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,  
Smetanova ulica 17, 2000 Maribor

### KOMPETENCE

Materni jezik Slovenščina

Drugi jeziki

	RAZUMEVANJE		GOVORJENJE		PISNO SPOROČANJE
	Slušno razumevanje	Bralno razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje	
Angleščina	C2	C1	B2	B2	C1
	Matura				
Nemščina	B1	B1	B1	B1	B1

Stopnja: A1/A2: Osnovni uporabnik - B1/B2: Samostojni uporabnik - C1/C2: Usposobljeni uporabnik  
Skupni evropski jezikovni okvir

Računalniške kompetence

- dobro obvladovanje orodij Microsoft Office™
- Osnovna uporaba orodja SPSS Statistics

Vozniško dovoljenje

▪ AM, B1, B, G