



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Luka Mlinarič

**POVEZAVA MED POLIMORFIZMI IN  
IZRAŽANJEM GENOV *TRIM35* IN *EPHX2* PRI  
BOLNIKI Z OTROŠKO ASTMO**

*Diplomska naloga*

Maribor, 2016



Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa

**Povezava med polimorfizmi in izražanjem genov *TRIM35* in  
*EPHX2* pri bolnikih z otroško astmo**

Študent: Luka Mlinarič  
Študijski program: Kemijska tehnologija  
Smer: Biokemijska tehnika  
Predvideni strokovni naziv: uni. dipl. inž. kem. tehnol.

Mentor: red. prof. dr. Uroš Potočnik  
Somentor: doc. dr. Vojko Berce

IZJAVA:

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal sam, prispevki drugih so posebej označeni.  
Pregledal sem literature iz področja dipomskega dela po naslednjih elementih:

Vir:	PubMed, Science Direct
Gesla:	Asthma, association study, single nucleotide polymorphism, genotyping, gene expression, restriction fragment length polymorphism
Skupine gesel:	Association study, polymorphism
Časovno obdobje:	2015-2016
Število referenc:	48
Število prebranih izvlečkov:	62
Število prebranih člankov:	27
Število pregledanih knjig:	1



Univerza v Mariboru  
Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Številka: K-720  
Datum: 04.04.2016

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 44/2015)

izdajam

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Luka Mlinarič, študent-ka univerzitetnega študijskega programa KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, lahko izdela diplomsko delo.

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

#### Naslov diplomskega dela:

POVEZAVA MED POLIMORFIZMI IN IZRAŽANJEM GENOV TRIM35 IN EPHX2 Z OTROŠKO ASTMO

#### Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

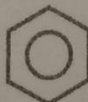
ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS AND EXPRESSION OF GENES TRIM35 AND EPHX2 WITH CHILDHOOD ASTHMA

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo. Rok za zaključek študija je 30. 9. 2016.

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

#### Obvestiti:

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



FAKULTETA ZA KEMIJO IN  
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

DEKAN:  
red. prof. dr. Zdravko Kravanja

*Zorka Novak Pintarič*

Po pooblastilu dekana  
prodekanica  
red. prof. dr. Zorka Novak Pintarič

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Urošu Potočniku za idejno zasnovo in pomoč pri usmerjanju. Somentorju doc. dr. Vojku Bercetu se zahvaljujem za posredovanje vzorcev bolnikov ter klinične podatke.

Posebna zahvala gre asistentki Katji Repnik za vso podporo, razlago in svetovanje pri pisanju diplomske naloge.

Navsezadnje gre velika zahvala zaročenki Tjaši in družini za nenehno vzpodbudo in pomoč.

## POVEZAVA MED POLIMORFIZMI IN IZRAŽANJEM GENOV *TRIM35* IN *EPHX2* PRI BOLNIKI Z OTROŠKO ASTMO

### Povzetek

Astma je najpogostejša resna kronična bolezen dihal. V razvitem svetu se pojavlja okrog 10 % obolelih otrok do 18. leta starosti. Kljub številnim raziskavam in razvoju novih zdravil, astme zaenkrat še ni mogoče preprečiti in ne pozdraviti. K nastanku astme poleg okoljskega dejavnika prispeva do danes znanih več kot 100 genov, zato je astma kompleksna bolezen. K razlagi genetskega dejavnika tveganja za nastanek astme so velik napredek prinesle asociacijske študije celotnega genoma (GWA). V letu 2009 so v GWA študiji potrdili povezavo med astmo in polimorfizmom posameznega nukleotida (SNP) rs11778371, ki je lociran na kromosomu 8 v bližini genov *EPHX2* in *TRIM35*, na izražanje katerih vplivajo bližnji SNP-ji. Namen diplomske naloge je bil ugotoviti povezavo in vlogo lokusa na kromosomu 8 pri slovenskih otrocih z astmo. V okviru naloge smo genotipizirali 3 SNP-je ter izmerili izražanje genov *EPHX2* in *TRIM35*.

V raziskavo je bilo vključenih 383 otrok z astmo ter 276 zdravih oseb, ki so šteli kot kontrolni vzorci. Izbrane SNP-je smo genotipizirali z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), ki ji je sledila tehnika analize talilne krivulje visoke ločljivosti (HRM) ali metoda polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). Izražanje genov pa smo izmerili s tehniko PCR v realnem času (qPCR).

V diplomski delu smo potrdili povezavo med SNP-jem rs11778371 in otroško astmo v slovenski populaciji ter povezavo med analiziranimi SNP-joma rs7017417 in rs4534095 in kliničnimi parametri ter odzivom na terapijo. eQTL vpliva izbranih SNP-jev na izražanje genov *EPHX2* in *TRIM35* nismo potrdili. Naša študija in pridobljeni rezultati bi tako v bodoče pripomogla k boljši patogenezi astme in k boljši prepoznavnosti obravnavanih polimorfizmov ter omenjenih genov. Tako bi lahko pripomogli h kvalitetnejšemu zdravljenju te kompleksne bolezni.

**Ključne besede:** rs11778371, *EPHX2*, *TRIM35*, GWA študija, astma, asociacijska analiza, farmakogenetska analiza, ekspresija genov, SNP

**UDK:**

# ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS AND EXPRESSION OF GENES *TRIM35* AND *EPHX2* IN PATIENTS WITH CHILDHOOD ASTHMA

## Abstract

Asthma is the most common serious chronic respiratory disease. In the developed world there are 10% of sick children up to 18 years of age. Despite numerous research and development of new drugs, asthma still can not be prevented, nor cured. In addition to environmental factors, more than 100 well known genes contribute to the occurrence of asthma. Therefore asthma is a complex disease. Genome-wide association studies (GWA) have brought great progress to the interpretation of the genetic risk factors for asthma. In 2009, GWA studies have confirmed the link between asthma and a single nucleotide polymorphism (SNP) rs11778371, which is located on chromosome 8 near *EPHX2* and *TRIM35* genes, which affect the expression of nearby SNPs. The purpose of this study was to identify the link between and the role of the locus on chromosome 8 in Slovenian children with asthma. Therefore we genotyped 3 SNPs and measured the expression of genes *EPHX2* and *TRIM35*.

This study included 383 children with asthma and 276 healthy individuals, who were regarded as control samples. Genotyping was done using polymerase chain reaction (PCR), followed by high resolution melting (HRM) or restriction fragment length polymorphism (RFLP). Gene expression was measured with real-time PCR (qPCR).

In this thesis, we confirmed the link between the SNP rs11778371 and childhood asthma in the Slovenian population and the link between analyzed SNPs rs7017417 and rs4534095 with clinical parameters and response to therapy. eQTL impact of selected SNPs on gene expression *EPHX2* and *TRIM35* was not confirmed. Our study and the results obtained would therefore help the pathogenesis of asthma in the future and increase the visibility of the mentioned polymorphisms and genes. This could raise the quality of treatment of this complex disease.

**Key words:** rs11778371, *EPHX2*, *TRIM35*, GWA study, asthma, associative analysis, pharmacogenetic analysis, gene expression, SNP

**UDK:**

## VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1.	Splošno o astmi .....	1
1.2.	Simptomi .....	1
1.3.	Fenotipi astme.....	2
1.4.	Genetika astme .....	2
1.5.	Asociacijske študije celotnega genoma pri astmi.....	3
1.6.	Farmakogenomika astme .....	5
1.7.	Genska tipizacija.....	6
1.7.1	Verižna reakcija s polimerazo – PCR.....	6
1.7.2	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov – RFLP .....	8
1.8.	Namen raziskave in hipoteze .....	8
2	MATERIALI IN METODE .....	10
2.1.	Preiskovanci.....	10
2.2.	Materiali .....	11
	Kemikalije .....	11
	Vzorci CEPH .....	12
	Raztopine in pufri .....	12
	Laboratorijska oprema .....	13
2.3	Metode.....	13
2.3.1	Izolacija RNK in DNK iz vzorcev krvi.....	13
2.3.1.1	Izolacija RNK s TRI reagentom .....	14
2.3.1.2	Izolacija DNK.....	15
2.3.2	Priprava 2 % agaroznega gela in gelska elektroforeza .....	15
2.3.3	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov.....	16
2.3.4	HRM analiza.....	18
2.3.5	Analiza genske ekspresije.....	19
2.3.5.1	Metoda računanja ekspresije – relativne kvantifikacije.....	20
2.3.5.2	Reverzna transkripcija .....	21
2.3.6	Statistična analiza .....	22
3	REZULTATI .....	22
3.1	Asociacijska analiza izbranih SNP-jev .....	22
3.2	Povezava med izbranimi SNP-ji in kliničnimi parametri ter farmakogenetska analiza .....	24

---

3.3 Genska ekspresija.....	29
4 RAZPRAVA .....	30
5 SKLEP .....	32
6 LITERATURA.....	33
6.1. Viri slikovnega materiala .....	36
7 PRILOGA .....	37
7.1 PRILOGE ZA ASOCIACIJSKO ŠTUDIJO .....	37
7.1.1 PRILOGA rs1778371 –GWA študija .....	37
7.1.2 PRILOGA rs7017417 – EPHX2 .....	43
7.1.3 PRILOGA rs4534095 – TRIM35 .....	50
7.2 PRILOGE ZA GENSKO EKSPRESIJO.....	58



## KAZALO SLIK

Slika 1: Regija okrog polimorfizma rs11778371 na kromosomu 8 <sup>(1)</sup> .....	4
Slika 2: Shematično prikazane tri faze reakcije PCR.....	8
Slika 3: Vzorec krvi pred centrifugiranjem .....	14
Slika 4: Vzorec krvi po centrifugiranju .....	14
Slika 5: Gelska elektroforeza .....	16
Slika 6: Slika gela, na kateri so razvidni posamezni genotipi .....	18
Slika 7: Normalizirane krivulje taljenja posameznih genotipov pri HRM analizi.....	19
Slika 8: Talilni vrhovi posameznik genotipov pri HRM analizi .....	19
Slika 9: Delovanje reverzne transkriptaze .....	21

## KAZALO TABEL

Tabela 2-1: Uporabljene osnovne kemikalije .....	11
Tabela 2-2: Laboratorijska oprema .....	13
Tabela 2-3: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odseka DNK okrog SNP-ja rs4534095 .....	16
Tabela 2-4: Sestava reakcijske mešanice .....	17
Tabela 2-5: Reakcijska mešanica za restrikcijo .....	17
Tabela 2-6: Sekvence začetnih oligonukleotidov .....	18
Tabela 2-7: Sestava reakcijske mešanice za HRM analizo .....	18
Tabela 2-8: Uporabljeni začetni oligonukleotidi (primerji) .....	20
Tabela 2-9: Mešanica za 250 nM primer .....	20
Tabela 3-1: Frekvence genotipov polimorfizma rs1177837 pri astmatikih in kontrolah .....	22
Tabela 3-2: Frekvence alelov polimorfizma rs11778371 pri astmatikih in kontrolah .....	23
Tabela 3-3: Frekvence genotipov polimorfizma rs7017417 pri astmatikih in kontrolah .....	23
Tabela 3-4: Frekvence alelov polimorfizma rs7017417 pri astmatikih in kontrolah .....	23
Tabela 3-5: Frekvence genotipov polimorfizma rs4534095 pri astmatikih in kontrolah .....	24
Tabela 3-6: Frekvence alelov polimorfizma rs4534095 pri astmatikih in kontrolah .....	24
Tabela 3-7: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih .....	24
Tabela 3-8: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih .....	25
Tabela 3-9: Vpliv zdravljenja s antilevkotrieni na klinični parameter TI glede na alel in fenotip .....	25
Tabela 3-10: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih .....	26
Tabela 3-11: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih .....	26
Tabela 3-12: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih .....	26
Tabela 3-13: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih .....	26
Tabela 3-14: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih .....	27
Tabela 3-15: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip .....	27
Tabela 7-1: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih .....	37
Tabela 7-2: Vpliv alelov polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih .....	37
Tabela 7-3: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih .....	38
Tabela 7-4: Vpliv alelov polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih .....	38

Tabela 7-5: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih.....	39
Tabela 7-6: Vpliv alelov polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih.....	39
Tabela 7-7: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter TI in FEV1 glede na genotip in fenotip.....	40
Tabela 7-8: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter TI in FEV1 glede na alel in fenotip.....	41
Tabela 7-9: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter TI in FEV1 glede na genotip in fenotip.....	41
Tabela 7-10: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter TI in FEV1 glede na alel in fenotip.....	42
Tabela 7-11: Vpliv genotipa polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih.....	43
Tabela 7-12: Vpliv alelov polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih.....	43
Tabela 7-13: Vpliv genotipa polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih.....	44
Tabela 7-14: Vpliv alelov polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih.....	44
Tabela 7-15: Vpliv genotipa polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih.....	45
Tabela 7-16: Vpliv alelov polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih.....	45
Tabela 7-17: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip.....	46
Tabela 7-18: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip.....	47
Tabela 7-19: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip.....	47
Tabela 7-20: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip.....	48
Tabela 7-21: Povezava med genotipom polimorfizma rs7017417 in izražanjem gena EPHX2 v odvisnosti od fenotipa.....	48
Tabela 7-22: Povezava med alelom polimorfizma rs7017417 in izražanjem gena EPHX2 v odvisnosti od fenotipa.....	49
Tabela 7-23: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih.....	50
Tabela 7-24: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih.....	50
Tabela 7-25: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih.....	51
Tabela 7-26: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih.....	51

Tabela 7-27: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih.....	52
Tabela 7-28: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih.....	52
Tabela 7-29: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip.....	53
Tabela 7-30: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip.....	54
Tabela 7-31: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip.....	55
Tabela 7-32: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip.....	56
Tabela 7-33: Povezava med genotipom polimorfizma rs4534095 in izražanjem gena TRIM35 v odvisnosti od fenotipa.....	56
Tabela 7-34: Povezava med alelom polimorfizma rs4534095 in izražanjem gena TRIM35 v odvisnosti od fenotipa.....	57
Tabela 7-35: Primerjava ekspresije gena EPHX2 in TRIM35 s kontrolami.....	58
Tabela 7-36: Primerjava ekspresije gena EPHX2 in TRIM35 s kliničnimi parametri pred zdravljenjem.....	58
Tabela 7-37: Primerjava ekspresije gena EPHX2 s kliničnima parametroma po terapiji ...	59
Tabela 7-38: Ekspresija gena EPHX2 in TRIM35 po zdravljenju s kortikosteroidi.....	59
Tabela 7-39: Ekspresija gena EPHX2 s kliničnimi parametri po terapiji s kortikosteroidi ..	59
Tabela 7-40: Ekspresija gena EPHX2 po zdravljenju z antilevkotrieni.....	59
Tabela 7-41: Primerjava ekspresije gena EPHX2 s kliničnimi parametri po terapiji z antilevkotrieni.....	60

**UPORABLJENE KRATICE IN OKRAJŠAVE**

SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
GWA	asociacijska študija celotnega genoma
TRIM	tripartite motif
HCC	karcinom jetrnih celic
sEH	topna epoksidna hidrolaza
EpFA	epoksi maščobne kisline
EETs	epoksi eikosatrenoične kisline
ARA	arahidonska kislina
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
HRM	talilna krivulja visoke ločljivosti
RE	restrikcijski encim
bp	bazni par
NCBI	Nacionalni center za biotehnološke informacije
SPSS	program za statistično obdelavo podatkov
rpm	število obratov na minuto

# 1 UVOD

Astma je najpogostejša resna kronična bolezen dihal. V razvitem svetu se pojavlja pri okrog 10 % otrok do 18. leta starosti. Kljub številnim raziskavam in razvoju novih zdravil, astme zaenkrat še ni mogoče preprečiti in ne pozdraviti.(1) Bolezen lahko le ublažimo in jo kontroliramo. Bolezen se pogosteje pojavlja v razvitih delih sveta, kjer ponekod oboli tudi več kot 15 % prebivalstva. Tako je od leta 2011 obolelih približno 300 milijonov ljudi in približno 0,1 % bolnikov letno tudi umre.(2) Najpogosteje se to zgodi zaradi podcenjevanja resnosti bolezni in simptomov s strani bolnika ter prepoznega iskanja zdravniške pomoči.

## 1.1. Splošno o astmi

Pri astmi gre za kronično vnetje dihalnih poti neznane etiologije. Najpogostejši sprožilci poslabšanj astme pa so alergeni, virusne okužbe, onesnažen zrak, močne vonjave, napor, mrzel zrak in stres. Pri astmi gre preodzivnost dihal na te sprožilce, ki povzročajo občasno zoženje (obstrukcijo) dihalnih poti oz. bronhov. Obstrukcija je združena z epizodami težkega dihanja, kašlja, tiščanja in piskanja v prsih. Simptome astme zdravimo z agonisti  $\beta_2$  adrenergičnih receptorjev, samo bolezen pa s protivnetnimi zdravili. Naravni potek bolezni je raznolik in nanj z zdravili ne moremo vplivati.(1) O točnih vzrokih za nastanek še vedno ne moremo govoriti. Gre pa za kombinacijo genetskih, razvojnih in okoljskih dejavnikov, pri čemer ima genetski dejavnik velik vpliv.(3)

## 1.2. Simptomi

Astma je posledica dolgotrajnega vnetja v steni dihalnih poti. Pri otrocih opišemo astmo kot ponavljajoče se napade zaradi zoženja dihalnih poti, kar povzroči povečana odzivnost na sprožilce, največkrat virusne okužbe ali alergene. Pri mladostnikih pa se poleg omenjenih pojavlja povečana odzivnost še na zdravila (Aspirin, različna protibolečinska zdravila, hormoni) in toksične snovi okolja, kot so kemikalije, cigaretni dim in onesnažen zrak.

Pri otroku moramo upoštevati anatomske in fiziološke posebnosti, zaradi katerih je tveganje za nastanek zapore v dihalnih poteh večje. Te posebnosti so: premer dihalnih poti je majhen, v steni dihalnih poti je manj gladkih mišic, zmanjšana je elastičnost, povečano je izločanje sluzi, posledica tega pa je tvorba sluznih čepov. Otroci so nagnjeni k zapori dihalnih poti, celo k nepredihanosti pljuč tudi po običajnih virusnih okužbah. Značilnosti vnetja v dihalnih poteh se pri majhnih otrocih pomembno razlikujejo od značilnosti pri odraslih.(4)

### 1.3. Fenotipi astme

Otroška astma je zelo raznolika. Zadnja leta jo poskušamo razdeliti v posamezne podoblike ali fenotipe, ki bi imeli podoben ali enak odziv na protivnetna zdravila. Fenotip astme je skupek značilnosti bolezni. Odvisen je od genske predispozicije in vplivov okolja. Fenotip astme je v otroškem obdobju odvisen od starosti. Epizode piskanja in težkega dihanja se pri mnogih otrocih začnejo že v starosti nekaj mesecev in so posledica okužb spodnjih dihalnih poti. Neatopijski (nealergijski) fenotip se kaže kot epizodne obstrukcije v dihalnih poteh ob virusnih okužbah. Ta oblika astme največkrat izzveni pred puberteto. Sprožilci poslabšanja so virusne okužbe, tobačni dim in onesnažen zrak. Atopijski fenotip je pri otroški astmi prevladujoč. Kaže se v preobčutljivosti na enega ali več alergenov, prisotnosti specifičnih protiteles IgE, ti otroci imajo velikokrat pozitivno družinsko obremenitev z alergijo, astma se praviloma pojavi po drugem letu starosti, s puberteto pa ne izzveni. Zaradi enotne dihalne poti se ji velikokrat pridruži alergijski rinitis. Sprožilci poslabšanja so virusne okužbe, alergeni, napor in čustveni stres.(4)

### 1.4. Genetika astme

Astma je kompleksna bolezen, katere nastanka ni mogoče pojasniti z enim samim mehanizmom ali genom. V številnih študijah so z astmo doslej povezali več kot 100 različnih genov. Ocene o deležu dednosti v patogenezi astme tudi v sedanjem času znašajo od 36 do 79 %. Vpliv dednosti pa je večji pri otroški astmi.(8, 9)

Dešifriranje celotnega človeškega genoma in napredek v molekularni biologiji nam obetata, da bomo tudi na področju astme identificirali tiste gene, ki imajo nedvoumen prispevek k njeni etiopatogenezi. Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP, ang. za single nucleotide polymorphism) so tista mesta v človekovemu genomu, kjer se posamezniki razlikujemo. V genetiki jih uporabljamo za markerje za genetsko analizo. Nekateri polimorfizmi lahko tudi spremenijo izražanje ali produkt posameznega gena.(1)

Za ugotavljanje kandidatnih genov, ki so povezani oz. odgovorni za astmo in druge kompleksne genetske bolezni, se uporabljajo študije genetske vezave in asociacijske študije. V zadnjih letih so pogoste asociacijske študije celotnega genoma (GWAs, ang. za genome wide association studies). Namen teh študij je poiskati regije v genomu, ki prispevajo k patogenezi bolezni. Z asociacijskimi študijami iščemo povezave med boleznijo in SNP-ji pri posameznikih, ki nimajo nobenih sorodstvenih povezav. Pri tem primerjamo frekvence določenih alelov med kontrolnimi vzorci zdravih ljudi in bolniki. S temi študijami lažje odkrivamo polimorfizme, ki so povezani s kompleksnimi boleznimi, kot je astma. Vpliv na astmo ima veliko število genov, vendar je vpliv posameznega gena relativno majhen.

Podatkov o genetiki neatopijske astme oziroma o genetskih razlikah med atopijsko in neatopijsko astmo pa je v literaturi presenetljivo malo. Podobna ugotovitev velja tudi nasploh za študije o patogenezi neatopijske astme. Takšno pomanjkanje pravzaprav preseneča, kajti v nekaterih pomembnih prevalenčnih študijah kar od 25 do 50 % vseh astmatikov nima atopije.(6,7)

## 1.5. Asociacijske študije celotnega genoma pri astmi

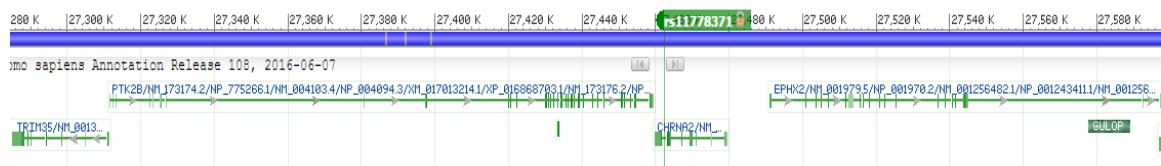
Z vedno več znanja o sekvenci humanega genoma in zmožnostmi raziskovanja le-tega, so študije GWA zelo začele pridobivati na popularnosti. Z nepristranskim pristopom identificiranja določenih regij genoma so zelo pripomogle k odkrivanju novih vzrokov za nastanek astme kot tudi napovedovanju tveganja za nastanek kompleksnih bolezni kot je astma. Veliko GWA študij je bilo narejenih za identifikacijo vzrokov za nastanek astme in kronično dovzetnost za obstrukcijo pljuč, pri čemer so identificirali številne genetske variante, od katerih pa vsaka le minimalno prispeva k splošnemu tveganju za nastanek bolezni. Potencialni vzrok za take minimalne prispevke je poligeno dedovanje in kompleksnost bolezni, saj še obstaja veliko neraziskanih redkih variant, epigenetskih sprememb, ki nastanejo pri genski ekspresiji ali slabo poznavanje interakcij med geni in okoljem.(12)

V dosedanjih GWA študijah se osredotočajo na interakcije med geni in okoljem ter vplivom genov, ki preko Th2 celic (podvrsta celic pomagalk) povzročijo alergijska vnetja (33), iščejo nove kandidatne gene in povezave z geni, ki so že bili vključeni v študije ter, na primer raziskujejo vlogo mutacij v genu za filagrin pri atopijskem dermatitisu in z njim povezanimi fenotipi astme.(32) Cilj raziskav je zajeti in ugotoviti vse povezave ter razjasniti nastanek astme. Po dosedanjih ugotovitvah med pomembnejše gene za nastanek astme sodijo gen *HLA-DQ*, ki je bil prvi povezan z dovzetnostjo za astmo, gen *ORMDL3* na kromosomu 17 na izražanje katerega vplivajo bližnji SNP-ji, polimorfizmi v bližini gena *IL33* na kromosomu 9, ki je bil identificiran v epitelijskih celicah dihalnih poti ter lokus na kromosomu 2, ki vključuje gena *IL1RL1* in *IL18R1*, ki sta v tesni povezavi in vzpodbujata nastanek interferona- $\gamma$ .(33) Z vplivom in delovanjem omenjenih in še veliko ostalih genov pa še vedno ne moremo pojasniti, kako dejansko vsi ti geni prispevajo k nastanku določenih fenotipov, ki povzročijo to heterogeno bolezen.

V letu 2009 so Himes BE in sod. v GWA študiji odkrili povezavo med SNP-jem rs11778371 in astmo. V študiji so genotipizirali več kot 500.000 SNP-jev pri 359 otrocih in 846 kontrolah, kjer so bili zajeti vsi fenotipi. SNP rs11778371 je pokazal močno povezavo z astmo ( $p = 8,1 \times 10^{-7}$ , OR = 2,32). SNP rs11778371 je lociran na kromosomu 8 v genu *CHRNA2* (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 2).(27) Za regijo na kromosomu 8 v bližini SNP-ja rs11778371 je bila v letu 2009 odkrita eQTL povezava, pri čemer so SNP-ji vplivali na izražanje dveh genov, *TRIM35* in *EPHX2*.(28) Oba gena sta zanimiva kandidatna gena za astmo. *TRIM35* spada v veliko skupino proteinov iz družine *TRIM* (tripartite motif), ki so inducirani s strani interferonov in predstavljajo pomemben del odpornosti, saj so



odgovorni za prepoznavo patogenov v okviru prirojene imunosti. Regija je prikazana na Sliki 1.



Slika 1: Regija okrog polimorfizma rs11778371 na kromosomu 8 <sup>(1)</sup>

*TRIM35* inducira apoptozo.(15) Sodeluje pri inhibiciji rasti celic in tumorogenosti, zaradi česar postaja zanimiv kot zaviralec rasti tumorjev. Do sedaj so ga na primer povezali z zaviranjem rasti karcinoma jetrnih celic.(14) Poleg vloge v prirojeni odpornosti so TRIM proteini vključeni še v širok spekter bioloških procesov, vključno z genetskimi boleznimi, nevrološkiimi boleznimi in rakom. (30) Na N-terminalu je vedno prisoten tridelen motiv, na C-terminalni del pa se lahko vežeta dve različni skupini proteinov (13). Proteini TRIM so vsestranski predvsem zaradi svoje raznolikosti, prepletenosti, različnega izražanja v tkivih in podcelične lociranosti. Vsestranskost pa je tudi rezultat izredno dobrih interakcij njihovih C in N terminalnih domen z drugimi proteini. Njihovi biološki vplivi se kažejo tudi v njihovi sposobnosti za neposredno vzajemno delovanje z virusnimi komponentami, bodisi samostojno ali v kombinaciji z drugimi celičnimi proteini in prav zato so vključeni v protivnetne odzive. Trenutno znanje o mehanizmih, s katerimi proteini TRIM omejujejo rast virusov in vplivajo na signalne poti, ni popolnoma raziskano. To je delno posledica nepoznavanja vseh funkcij proteina, preko katerih inhibirajo ali povišajo aktivnost encimov. Strukturne študije bodo imele čedalje pomembnejšo vlogo pri zagotavljanju boljšega razumevanja interakcij med proteini. Prav napredki na teh področjih bodo odprli nova obzorja pri preprečevanju in boju proti vnetjem, avtoimunih in nalezljivih boleznih.(31)

Gen *EPHX2* je sestavljen iz 18 eksonov in lociran na kromosomu 8.(16) Gen kodira za 555 aminokislinski dolgo topno epoksi hidrolazo (sEH), ki je bifunkcionalni encim. Ta encim, ki se nahaja tako v citosolu kot v peroksisomih, se veže na specifične epoksidge in jih pretvarja v ustrezne diole. Druga naloga gena je tudi aktivnost lipido-fosfatnih fosfataz.(17) sEH s svojo epoksihidrolazno aktivnostjo metabolizira tako maščobne kisline (EpFA) kot tudi eikosatrienične kisline (EETs). EETs so avtokrine in parakrine maščobne signalne molekule proizvedene iz arahidonske kisline (ARA). ARA je tudi predhodnik prostaglandinov in levkotrienov in prav ti lipidi imajo pomembno vlogo pri patogenezi in zdravljenju astme, bolečin in vnetja.

Pri astmatikih ugotavljajo višjo ekspresijo sEH v bronhijih, ki so jo izmerili imunohistokemično. Različne regije imajo različno raven prisotnega kisika na različnih stopnjah dihalnega cikla. To lahko pojasni različno ekspresijo sEH v bronhijih astmatikov. Razlika v izražanju sEH je domena možganov, a kontroliranje stalnega in dolgoročnega krvnega pretoka v pljuča je fiziološkega pomena.(17)

Inhibitorji sEH zmanjšajo z nevtrofilci sproženo infiltracijo vnetnic v pljuča in zmanjšajo levkotoksin diole, ki so strupeni za pljučne in žilne epitelijske celice, so povezani z dihalni pri odraslem človeku. Odmerjanje EETs in sEH inhibitorjev naj bi bilo povezano s številom nevtrofilcev v pljučih, kar jih omejuje v boju pri zdravljenju obstruktivnih pljučnih bolezni in astme, kjer večinoma ne prevladuje nevtrofilno vnetje.(18) Dokazano je tudi, da sEH in EETs sodelujejo pri spreminjanju vnetnih poti in srčnih ionskih kanalov, kar potencialno vpliva na nastanek atrijske fibrilacije.(26)

V študiji, ki jo je izvedel Polonikov s sod. so merili prispevek genov, med njimi tudi gena *EPHX2*, za ksenobiotično-metabolacijske encime (XMEs), ki povzročajo bronhialno astmo. Želeli so poudariti povezavo z delci v onesnaženem zraku, ki jih je v zadnjem desetletju vedno več. In prav ti delci so se pokazali za povzročitelje oksidativnega stresa, ki je bistvenega pomena pri alergijskih vnetjih, ki povečujejo dovzetnost dihalnih poti in povzročajo akutno astmatično poslabšanje. Ugotovili so, da so polimorfni geni za ksenobiotične-metabolne encime pomembni za gensko odpornost proti bronhialni astmi. Poleg delcev pa so našli tudi povezavo s kajenjem in vzrokom za nastanek astme. Čeprav ni bilo direktne povezave s kajenjem in nastankom astme, pa je bilo ugotovljeno, da izpostavljenost toksinom lahko vpliva na gene, ki so v povezavi z astmo. Tako so v študiji ugotovili, da se vsi najdeni geni v povezavi z astmo, izražajo v pljučih in dihalnih poteh. Zato je njihova povezava pomembna za morebiten nastanek in vpliv na patogenezo astme.(29)

## 1.6. Farmakogenomika astme

Farmakogenomika preučuje odnos med genotipom in odzivom na terapijo. Pri zdravljenju astme obstajajo velik razlike v odzivu na terapijo, ki so pogojene predvsem z razlikami v genetskem zapisu med zdravljenimi osebami. Zaenkrat se praktično vse farmakogenomske študije pri astmi ukvarjajo s področjem farmakodinamike in ugotavljajo vpliv genetskega zapisa za receptor za zdravila ali potencialne terapevtske tarče. Poleg genetskih dejavnikov določajo posameznika še številne druge lastnosti in vplivi okolja. Verjetno pa vpliv genetskega zapisa predstavlja kar okrog 80 % celokupne variabilnosti v odzivu na protiastrmatično terapijo med posamezniki.(10, 11) Pri zdravljenju astme se uporablja več skupin zdravil, ki različno delujejo na bolezen.

Gen *ADRB2* kodira beta2 ( $\beta_2$ ) adrenergični receptor in je povezan z astmo. Običajno predpisana zdravila za zdravljenje in obvladovanje astme so agonisti beta2 adrenergičnih receptorjev, ki delujejo kot bronhodilatatorji in širijo zožene dihalne poti.(34) Farmakogenetske študije pri astmi so se osredotočile predvsem na polimorfizme v genu *ADRB2* v povezavi z odzivom na agoniste beta2 adrenergičnih receptorjev. Večina študij se je osredotočila na vlogo kodirajočih polimorfizmov Arg16Gly, Gln27Glu, Val34Met in Thr164Ile. Ena izmed prvih ugotovitev je bila, da posamezniki z genotipom Arg16 boljše odgovarjajo na zdravljenje z agonisti beta2 adrenergičnih receptorjev. Nadaljnje študije so dale nasprotujoče rezultate, GWA študije pa so to povezavo ovrgle in predpostavile, da

*ADRB2* ni glavni gen, s katerim lahko napovemo odziv na terapijo z agonisti beta2 adrenergičnih receptorjev. (38)

Najbolj pogosta zdravila za zdravljenje astme so kortikosteroidi, saj hkrati delujejo na več kliničnih fenotipov, kot je delovanje pljuč, odziv bronhodilatatorjev, preodzivnost dihalnih poti in ostale simptome.(35) Pri zdravljenju astme delujejo protivnetno in so lahko aplicirani direktno v dihala. Slaba stran so stranski učinki kot so osteoporoza in supresija nadledvične žleze, zaradi česar bi bili učinkoviti farmakogenetski označevalci nujni. Do danes so našli povezavo med odgovorom na inhalacijske kortikosteroide in SNP-ji v genu *CRHR1* (corticotrophin-releasing hormone receptor 1). Nadalje so ugotovili povezavo med SNP-jem rs2240017C/G (His33Gln) v genu *TBX21* in izboljšanjem bronhialne preodzivnosti po zdravljenju s kortikosteroidi pri otrocih, predvsem pri nosilcih alela G.(37,42) Z odzivom na kortikosteroide so povezali tudi SNP-je v genih *STIP1*, *DUSP1* in *FCER2*.(43-45)

Za zdravljenje astme se uporabljajo tudi inhibitorji sinteze ali delovanja cisteinil levkotrienov, ti. antilevkotrieni. Do danes so tako z odgovorom na antilevkotriene povezali SNP-je v genih *ALOX5*, *ALOX5AP*, *LTC4S*, *CYSLTR1*, *CYSLTR2* in *MRP1*, ki večinoma kodirajo encime, ki sodelujejo v sintezi levkotrienov. Med zanimivimi je SNP rs730012 (A-444C) v promotorju gena *LTC4S* (human leukotriene C4 synthase gene), za katerega so ugotovili, da je pri nosilcih alela C po zdravljenju z antilevkotrieni odziv merjen z FEV1 boljši.(39,46)

## 1.7. Genska tipizacija

Genotip določimo s procesom genske tipizacije (genotipizacije). Izraz genotip pomeni genetsko sestavo posameznika in se lahko nanaša na celoten genom ali le na določeno področje (gen, SNP). Metode genotipizacije SNP-jev delimo na metode, ki temeljijo na hibridizaciji, encimske metode, druge metode post PCR, ki temeljijo na fizikalnih lastnostih DNK in določajo zaporedja nukleotidov. Največkrat uporabljamo pristop genotipizacije z metodami, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR, ang. za polymerase chain reaction). Sledita detekcija na agaroznem gelu in polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP – restriction fragment length polymorphism).(22)

### 1.7.1 Verižna reakcija s polimerazo – PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, ang. za polymerase chain reaction) je metoda, ki omogoča kopiranje odsekov DNK s pomočjo encima DNK polimeraze. S to metodo lahko kloniramo DNK, ne da bi za to potrebovali žive celice, kar pa pred odkritjem PCR praktično ni bilo mogoče.

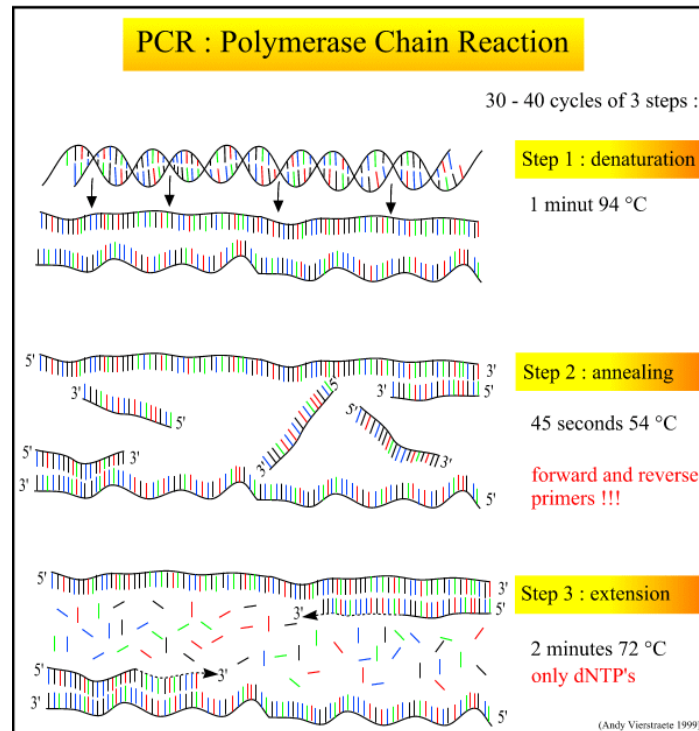
Kopiranje odsekov DNK poteka tako, da uporabimo dve kratki molekuli DNK, ki sta komplementarni začetnemu in končnemu delu segmenta, ki ga želimo kopirati, encim DNK polimerazo, raztopino soli in deoksiribonukleotide (gradnike DNK). Reakcija poteka verižno. Pri vsaki ponovitvi se število kopij pomnoževanega odseka podvoji. Tako po 20 ponovitvah reakcije iz 1 kopije DNK dobimo teoretično več kot 1 milijon kopij.

Metodo PCR so z leti izpopolnili tako, da so namesto DNK – polimeraze iz bakterije *Escherichia coli*, ki ima optimalno temperaturo za delovanje 37 °C in pri visokih temperaturah denaturacije DNK razpade, uporabili polimerazo iz bakterije *Thermus aquaticus*, ki so jo našli v vročih vrelih v ameriškem narodnem parku Yellowstone. Ta polimeraza je termostabilna: optimalno deluje pri 72 °C, prenese pa tudi kratkotrajna segrevanja nad 90 °C. Zato odtlej ni bilo več potrebno v vsakem ciklu dodati svežega encima, kar je omogočilo avtomatizacijo postopka.

Reakcija PCR je osnovni predpostopek pri določanju nukleotidnega zaporedja (sekvenciranja) DNA in je bila tako sestavni del mednarodnega projekta Humani genom, ki je leta 2000 objavil celotno zaporedje človeškega genoma. Danes je reakcija PCR sestavni del večine diagnostičnih postopkov molekularne medicine, kot so testi za genetske bolezni, določanje virusov itd.

PCR reakcija je sestavljena iz treh faz:

- denaturacija: pri visoki temperaturi (94–95 °C) pride do razpada dvojne vijačnice DNK, nastanejo enoverižne DNK molekule – matrice za pomnoževanje;
- pripenjanje začetnih oligonukleotidov: za začetek sinteze polimeraza potrebuje kratek odsek dvojno vijačne DNK, kar pridobimo s pripenjanjem kratkih (15–24 nukleotidov) začetnih oligonukleotidov – primerjev na izbrano mesto obeh verig matrične DNK;
- polimerizacija: DNK polimeraza z dodajanjem nukleotidov sintetizira novi verigi DNK. Optimalna temperatura večine polimeraz za polimerizacijo je 72 °C.



Slika 2: Shematično prikazane tri faze reakcije PCR

### 1.7.2 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov – RFLP

Pomnoževanju tarčne DNK lahko sledi metoda RFLP, ki je encimska reakcija z endonukleaznimi encimi oz. restrikcijskim encimom (RE). Vsak RE je specifičen in reže DNK na točno določenem mestu. RE prepozna specifično zaporedje nukleotidov, ki je lahko dolgo od 4 do 12 baznih parov (bp). Z dolžino zaporedja narašča specifičnost RE. Izbira encima je odvisna od nukleotidnega zaporedja okoli tarčnega SNP-ja. Pri izbiri si pomagamo z različnimi programskimi orodji, kot so GeneRunner ali aplikacijami na spletu, ki imajo vgrajene baze podatkov o zaporedjih za posamezen RE (23).

## 1.8. Namen raziskave in hipoteze

Veliko asociacijskih študij, predvsem asociacijskih študij celotnega genoma (GWA) je identificiralo številne kandidatne gene, ki sodelujejo v etiopatogenezi astme, vendar je vpliv posameznega gena relativno majhen. V letu 2009/2010 so z astmo povezali SNP rs11778371, ki leži na kromosomu 8 med genoma *TRIM35* in *EPHX2*. Za to regijo se je izkazalo, da imajo SNP-ji eQTL vpliv na gena *TRIM35* in *EPHX2*, kar pomeni, da spreminjajo njuno izražanje. Namen diplomske naloge je ugotoviti povezavo med izbranimi SNP-ji iz opisane regije in nastankom astme pri slovenskih otrocih, vpliv teh SNP-jev na odgovor na zdravljenje s protiastrmatično terapijo ter povezavo med

genotipom SNP-jev in izražanjem genov *TRIM35* in *EPHX2* pri otrocih z astmo. V nalogi pri izbranih slovenskih otrocih z astmo tudi pričakujemo statistično značilne rezultate omenjenega polimorfizma, ki je bil že v GWA študiji povezan z astmo, ter potrditi povezavo preostalih dveh, ki sta locirana v njegovi neposredni bližini. Z izmerjenimi laboratorijskimi in kliničnimi parametri ter ekspresijo genov, pa bomo skušali v farmakogenomski študiji dokazati in ugotoviti vpliv zdravljenja astmatikov

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1. Preiskovanci

V raziskavo je bilo vključenih 383 otrok z astmo ter 276 zdravih oseb, ki so šteli kot kontrolni vzorci. Med astmatiki je bilo 253 otrok z atopijsko in 111 otrok z neatopijsko astmo, pri 19 otrocih fenotip ni bil znan. Vsem otrokom so diagnosticirali astmo po NAEPP (National Asthma Education and Prevention Program) in AST (American Thoracic Society) smernicah v okviru pulmološke ambulante otroškega oddelka Splošne bolnišnice v Murski Soboti ter Univerzitetnega kliničnega centra Maribor. Število otrok, ki so se zdravili s vdihavanjem kortikosteroidov je znašalo 303, ostalih 232 pa se je zdravilo z antilevkotrieni.

Vsem preiskovancem so tudi izvedli alergološke teste ter določili naslednje parametre:

- PEFr – največja hitrost izdihanega zraka (peak expiratory flow rate)

Otrokom so PEFr merili dva tedna pred in štiri tedne po terapiji, doma s preprostim PEF merilčkom. Merili so trikrat zjutraj in zvečer ter izmed vseh izbrali najboljšo meritev. Primerjali smo razliko PEFr pred in po terapiji. Izračunali smo razliko med največjo in najmanjšo meritvijo. Rezultat smo prikazali v odstotkih.

- FEV<sub>1</sub> – volumen izdihanega zraka v prvi sekundi

FEV<sub>1</sub> so otrokom izmerili pred in štiri tedne po terapiji s pomočjo spirometrije ob obisku ambulante. FEV<sub>1</sub> smo izrazili z odstotkom glede na pričakovane vrednosti za spol, višino in starost otroka, kot jih navajajo standardi British Thoracic Society (19).

- Tiffeneau indeks – delež FEV<sub>1</sub>/FVC

Otrokom so pred in po terapiji izmerili FEV<sub>1</sub> in maksimalno pljučno kapaciteto – FVC (celoten volumen izdihanega zraka po maksimalnem vdihu). Tiffeneau indeks je razmerje med FEV<sub>1</sub> in FVC in je merilo obstrukcije dihalnih poti. Tiffeneau indeks smo podali v odstotkih.

- PC<sub>20</sub>

Otrokom je bila izmerjena hiperreaktivnost dihal s testiranjem z metaholinom po metodi kontroliranih inhalacij s pomočjo dozimetra (20). S PC<sub>20</sub> je podana koncentracija vdihanega metaholina, ki povzroči padec FEV<sub>1</sub> za 20 % glede na izhodišče.

- FeNO

Bolnikom je bil pred uvedbo terapije izmerjen delež dušikovega oksida v izdihanem zraku. Povišan FeNO je posredni dokaz eozinofilnega vnetja dihal (20). Meritev se izvede tako, da preiskovanec izdihuje zrak v ustnik, ki je povezan z analizatorjem. Analizator deluje po principu kemiluminiscence. Izdih v ustnik mora biti čim bolj enakomeren, saj pride do

reakcije NO z ozonom, ki po končani reakciji seva svetlobo in na ta način nato izmerimo rezultat v delcih NO na milijardo drugih delcev v izdihanem zraku (parts per billion – ppb).

- Cel IgE – vrednost celokupnih imunoglobulinov razreda E

Vsem otrokom je bila v krvnem serumu izmerjena vrednost celokupnih imunoglobulinov razreda E.

- Eozinofilci

Otrokom so odvzeli kri in določili število eozinofilcev v krvi.

- dTI in dFEV

Bolnikom so izmerili Tiffeneau indeks in FEV pred in po terapiji. Tako sta dTI in dFEV definirana kot sprememba TI in FEV po terapiji.

- Alergološke teste na najpogostejše inhalatorne alergene (pršica, pelodi, živalska dlaka, plesni, perje) so opravili s kožnimi vbodnimi testi in/ali določanjem specifičnih imunoglobulinov razreda E na te alergene

## 2.2. Materiali

### Kemikalije

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili osnovne kemikalije za izolacijo DNK in RNK, PCR, RFLP in HRM. Kemikalije s proizvajalci so podane v tabeli 2.1.

Tabela 2-1: Uporabljene osnovne kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
Agaroz	Sigma
EDTA	Sigma
Etanol abs.	Merck
NaCl	Merck
Kloroform	Sigma
Izopropanol	Sigma
TRI REAGENT	Sigma
Ficoll-Paque Plus	Fermentas
PCR pufer	Fermentas
PBS	Sigma
Dream Taq polimeraza	Fermentas
Restriksijski encimi	Fermentas
Pufri za RE	Fermentas
dNTP	Fermentas



Etidijev bromid	Sigma
Bromfenol	Sigma
Ksilnen cianol	Sigma
Light Cycler 480 High Resolution Melting Master	Roche
Light Cycler 480 SYBR Green I Master	Roche
začetni oligonukleotidi	Sigma

## Vzorci CEPH

Center za študijo človeških polimorfizmov (fran.: Centre d'etude du polymorphisme humaine – CEPH), zdaj znan kot fundacija Jean Dausset – CEPH, je mednarodni raziskovalni center v Parizu, ki raziskuje človeške polimorfizme na tridesetih družinah (oče, mati, otrok). V CEPH-ju so iz rakastih celic in celic posameznikov razvili nesmrtno celične linije, ki so vir DNK za genetske študije po vsem svetu (21). Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali CEPH vzorce kot referenčne vzorce pri genotipizacijah.

## Raztopine in pufri

Vse raztopine smo pripravili s čisto destilirano vodo iz naprave TKA Pacific UP – UPW water purification system.

TBE puffer:

TBE puffer smo pripravili kot 10 x koncentrirano raztopino. Sestava pufra je bila naslednja:

- 950 mM TRIS;
- 950 mM borova kislina;
- 20 mM EDTA.

Za pripravo 1 L pufra smo stehtali:  $m = 108\text{g}$  TRIS,  $m = 55\text{g}$  borove kisline in  $m = 7,44\text{g}$  EDTA ter vse skupaj raztopili v  $V = 1\text{ L}$  vode. Za pripravo 1 x TBE pufra pa smo odmerili:  $V = 100\text{ mL}$  10 x TBE pufra ter dodali  $V = 900\text{ mL}$  vode.

Puffer za gelsko elektroforezo:

Pri gelski elektroforezi smo uporabili 1 x TBE puffer z 0,25 % ksilen-cianolom in 40 % saharozo.

## Laboratorijska oprema

Preglednica 2.3 prikazuje uporabljeno laboratorijsko opremo in njene proizvajalce.

Tabela 2-2: Laboratorijska oprema

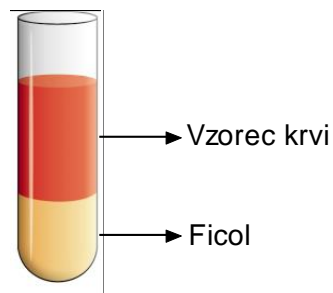
Oprema	Proizvajalec
Ciklični termostat	Biometra, T1 Thermocycler
Centrifuge	Biosan, LMC - 3000
	EPPENDORF Centrifuge 5415R
	SARSTEDT M6
UV-VIS spektrofotometer	Synergy2 BioTek
Mikrovalovna pečica	ZANUSSI, ZMC 19MG
Mikropipete za nanašanje na gel	Transpipette – 12, (5-50) $\mu$ L
Elektroforezni sistem	BIO – RAD, POWERPAL BASIC, SUB CELL BIO-RAD, Standard power pack P25 WIDE MINI - SUB CELL GT
pH meter	HANNA HI 83141
Mikropipete	FINEPIPETE 10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 200 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L,

## 2.3 Metode

### 2.3.1 Izolacija RNK in DNK iz vzorcev krvi

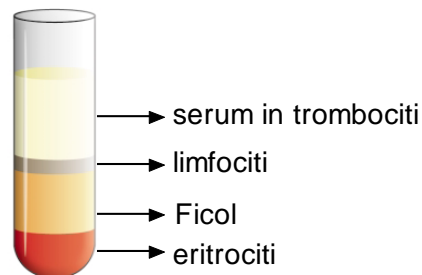
Za genotipizacijo vzorcev in merjenje izražanja izbranih genov smo iz vzorcev krvi izolirali DNK in RNK molekuli. V postopku izolacije smo najprej iz krvi izolirali mononuklearne celice periferne krvi (PBMC), jih homogenizirali v reagentu za izolacijo DNK in RNK ter DNK in RNK oborili, ju očistili nečistoč in nazadnje raztopili za nadaljnjo uporabo.

Priprava vzorca je potekala tako, da smo  $V = 12$  mL krvi prenesli v novo sterilno  $V = 50$  ml centrifugirko, dodali smo  $V = 12$  ml pufra PBS (skupen volumen  $V = 24$  ml) in premešali. Nato smo v novo sterilno  $V = 50$  ml centrifugirko nalili  $V = 12$  ml reagenta Ficoll-Paque PLUS in nanj previdno nanesli celotno suspenzijo krvi in PBS-a. Kri smo nalivali ob steni zelo počasi ter pazili, da se ne pomeša s Ficoll-om.



Slika 3: Vzorec krvi pred centrifugiranjem

Nato smo centrifugirali pri 1800 rpm,  $t = 30$  min na  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Prvo fazo (serum in trombocite) smo prenesli v sterilno  $V = 15$  ml centrifugirko in jo shranili na  $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Drugo fazo z limfociti smo prenesli s pipeto v novo  $V = 50$  ml sterilno centrifugirko.



Slika 4: Vzorec krvi po centrifugiranju

K limfocitom smo dodali pufer PBS do oznake  $V = 20$  ml, vorteksirali ter centrifugirali pri 1400 rpm,  $t = 15$  min. Po centrifugiranju smo supernatant odlili, nato pa dodali  $V = 5$  ml pufera PBS, vorteksirali in še enkrat centrifugirali pri 1400 rpm,  $t = 15$  min. Supernatant smo v celoti odstranili, limfocite pa uporabili za izolacijo DNK in RNK.

### 2.3.1.1 Izolacija RNK s TRI reagentom

Limfocitom smo dodal  $1500\text{ }\mu\text{L}$  TRI reagenta in celice razbili s pipetiranjem, da ni bilo vidnih večjih koščkov, inkubirali  $t = 5$  min na sobni temperaturi, nato pa prenesli v  $V = 2$  mL epice. Dodali smo  $V = 300\text{ }\mu\text{L}$  kloroforma, zaprli epice in vorteksirali  $t = 15$  s, da je raztopina postala motno bela. Vzorec smo nato inkubirali na sobni temperaturi  $t = 2\text{--}15$  min, nato pa smo mešanico centrifugirali na  $12000 \times g$  (rcf),  $t = 15$  min pri  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , da se je ločila v tri faze:

- spodnja rdeča – protein;
- vmesna bela – DNK;
- zgornja prozorna – vodna raztopina RNK.

Vodno fazo smo prenesli v svežo  $V = 1,5$  mL epico, preostanek pa uporabili za izolacijo DNK. Vodni fazi smo dodal  $V = 700$   $\mu$ L izopropanola in premešali z obračanjem, nato smo vzorec inkubirali  $t = 5$ – $10$  min na sobni temperaturi. Centrifugirali smo pri  $12000 \times g$  (rcf),  $t = 10$  min pri  $T = 4$  °C, da je nastal viden pelet na dnu epice. Supernatant smo odlili v čašo, dodali  $V = 1500$   $\mu$ L 75 % etanola, vorteksirali in centrifugirali pri  $12000 \times g$  (rcf),  $t = 5$  min pri  $T = 4$  °C. Nato smo supernatant odlili v čašo in vzorec posušili na zraku – v eksikatorju. Vzorec smo raztopili v  $V = 60$   $\mu$ L vode brez RNaz in ga shranili na  $T = -70$  °C.

### 2.3.1.2 Izolacija DNK

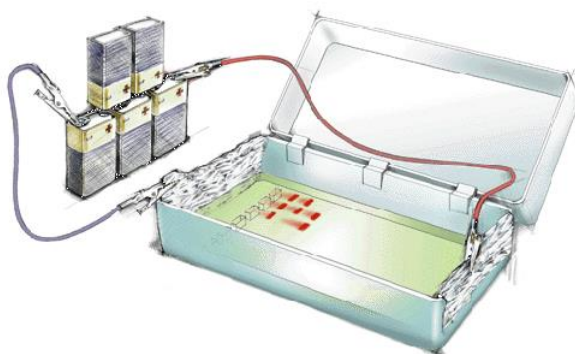
Po odstranitvi vodne faze za izolacijo RNK smo DNK precipitirali iz vmesne in organske faze tako, da smo dodali  $V = 450$   $\mu$ L 100 % etanola, premešali z obračanjem in pustili stati  $t = 2$ – $3$  min na sobni temperaturi. Centrifugirali smo pri  $5000 \times g$  (rcf),  $t = 5$  min pri  $T = 4$  °C. Nato smo supernatant prenesli v  $V = 2$  mL epico in ga shranili za izolacijo proteinov. Pelet DNK smo dvakrat sprali v  $V = 1500$   $\mu$ L  $n = 0,1$  M natrijevega citrata/10 % etanolu in premešali z obračanjem. Med vsakim spiranjem je pelet DNK moral stati najmanj  $t = 30$  min z občasnim mešanjem. Nato smo centrifugirali pri  $5000 \times g$  (rcf),  $t = 5$  min pri  $T = 4$  °C. Po spiranju smo DNK pelet resuspendirali v  $V = 1500$   $\mu$ L 75 % etanola in pustil vzorec, da je stal  $t = 10$ – $20$  min pri sobni temperaturi. Centrifugiral sem pri  $5000 \times g$  (rcf),  $t = 5$  min pri  $T = 4$  °C. Supernatant smo zavrgli, pelet DNK pa posušili na zraku – v eksikatorju in ga nato raztopili v  $V = 400$   $\mu$ L  $n = 8$  mM raztopine NaOH s ponavljajočim pipetiranjem z mikropipeto. Centrifugirali smo pri  $12000 \times g$  (rcf),  $t = 10$  min pri  $T = 4$  °C. V kolikor se je pojavila oborina, smo supernatant prelili v novo  $V = 2$  mL epico in jo shranili na  $T = 4$  °C v hladilnik.

### 2.3.2 Priprava 2 % agaroznega gela in gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza poteka v agaroznem ali poliakrilamidnem gelu, v pufru, ki omogoča stabilen pH in električno prevodnost. DNK je negativno nabita in potuje proti pozitivni elektrodi. Namen elektroforeze je preparativni ali analitski. Običajno poleg pridelka PCR ali odsekov DNK dodamo še velikostni marker, da lahko ocenimo velikost nastalih pridelkov PCR.

Za 2 % agarozni gel smo zatehtali  $m = 0,8$ g agaroze in jo raztopili v  $V = 40$  mL 1 x TBE pufru v erlenmajerici. Nato smo zmes segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agarozna popolnoma raztopila. Dodali smo  $V = 3$   $\mu$ L etidijevega bromida ter tako pripravljeno raztopino vlili na nosilec z glavnički. Etidijev bromid se vrine med bazne pare DNK in povzroča, da DNK flouescira v oranžnem delu spektra pod UV svetlobo ( $\lambda = 365$ nm). Ko se je gel strdil, smo odstranili glavniček. Tako pripravljen gel je nared za nanos vzorcev. Gel smo potopili v 1 x TBE pufer. V žepke gela smo nanесли vzorce tako, da smo predhodno vzorec  $V = 10$   $\mu$ L pomešali s  $V = 5$   $\mu$ L barvila (0,25 % ksilen cianol s 40 %

saharozo) in nanesti na dno žepka. Elektroforeza je tekla pri konstantni napetosti  $U = 150$  V od  $t = 15-20$  minut.



Slika 5: Gelska elektroforeza

### 2.3.3 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov

SNP rs4534095 na genu TRIM35 smo genotipizirali z metodo PCR-RFLP. Sekvence začetnih oligonukleotidov so prikazane v tabeli 2.3.

Tabela 2-3: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje odseka DNK okrog SNP-ja rs4534095

GEN	SNP	Zaporedje 5'-3'
TRIM35	rs4534095	GGCAATAGCCCAGAATGATGAC
		TCCTGTCCTCAAGTGATCCACC

Začetne oligonukleotide smo načrtovali s programom Gene Runner.

Program smo uporabljali za načrtovanje začetnih oligonukleotidov za PCR, iskanje restrikcijskih mest endonukleaznih encimov, analizo DNK zaporedij, kot ugotavljanje njihovih fizikalnih in kemijskih lastnosti. Zaporedje DNK okrog SNP-ja rs4534095 smo poiskali na spletnih straneh ameriškega Nacionalnega centra za biotehnoške informacije (NCBI) v podatkovni bazi dbSNP. Program GeneRunner ima integriran iskalnik začetnih oligonukleotidov, najbolj optimalnega pa izbere uporabnik sam. Za iskanje restrikcijskih mest smo za posamezen SNP zagnali programsko aplikacijo »restriction sites«. Kot rezultat smo dobili seznam encimov in restrikcijskih mest za dano zaporedje nukleotidov. Aplikacijo smo zagnali za vsak alel posebej in tako preverjali, ali pride do sprememb ne restrikcijskem mestu.

Sestava reakcijske mešanice za pomnožitev produkta, ki vsebuje preiskovan SNP, je prikazana v tabeli 2.4.

Tabela 2-4: Sestava reakcijske mešanice

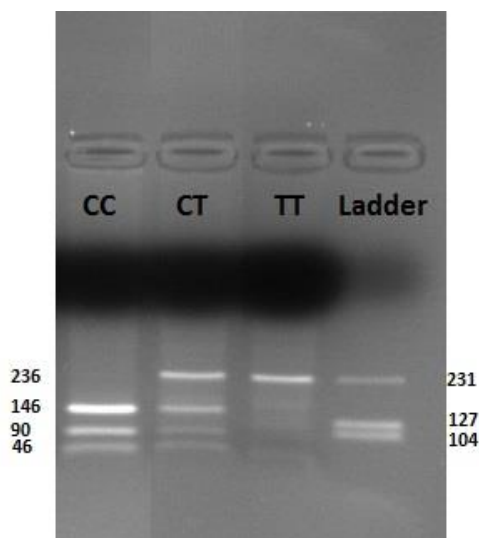
Komponenta	Volumen / $\mu\text{L}$
DNK	2
10x PCR pufer	1
Začetni oligonukleotid 1 (10 $\mu\text{M}$ )	0,2
Začetni oligonukleotid 2 (10 $\mu\text{M}$ )	0,2
Dream Taq polimeraza (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,05
dNTP (10 mM)	0,1
H <sub>2</sub> O	6,45
Skupen volumen	10

Po PCR reakciji smo produkt inkubirali ob prisotnosti encima Ddel (HpyF3I). Reakcijska mešanica je prikazana v tabeli 2.5. Mešanico smo inkubirali čez noč pri temperaturi 37°C.

Tabela 2-5: Reakcijska mešanica za restrikcijo

Komponenta	Volumen / $\mu\text{L}$
PCR produkt	10
H <sub>2</sub> O	18 – (0,5 do 3)
10 x TBE pufer	2
RE	(od 0,5 do 3)

Po inkubaciji smo z gelsko elektroforezo ločili produkte in določili genotipe.



Slika 6: Slika gela, na kateri so razvidni posamezni genotipi

### 2.3.4 HRM analiza

SNP-ja rs7017417 na genu *EPHX2* in rs11778371 na genu *CHRNA2* smo genotipizirali z metodo qPCR-HRM. Sekvence začetnih oligonukleotidov so prikazane v tabeli 2.6.

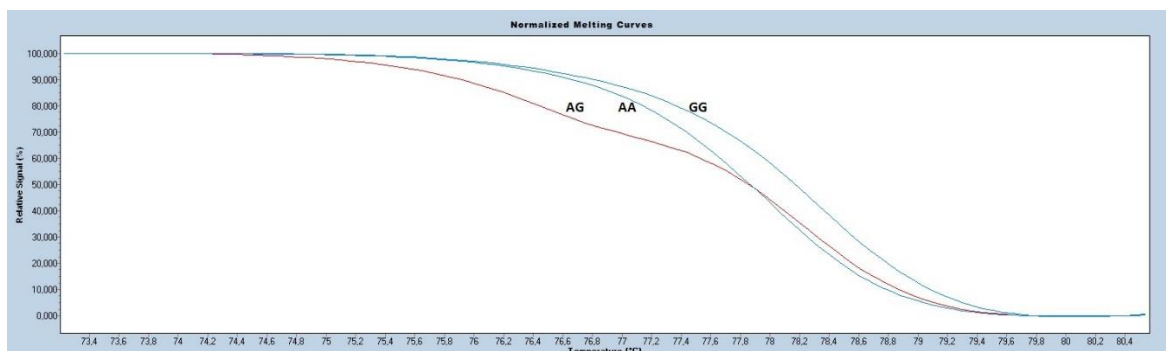
Tabela 2-6: Sekvence začetnih oligonukleotidov

GEN	SNP	Zaporedje 5'-3'
<i>EPHX2</i>	rs7017417	AGGAAGCTGGAAAATGACAAAT
		AGCAGTGAGAAGAATGAGATTGG
<i>CHRNA2</i>	rs11778371	TAATAACCTCCCGGCCTTTC
		AGCTCCTGTCTGCCATTGAG

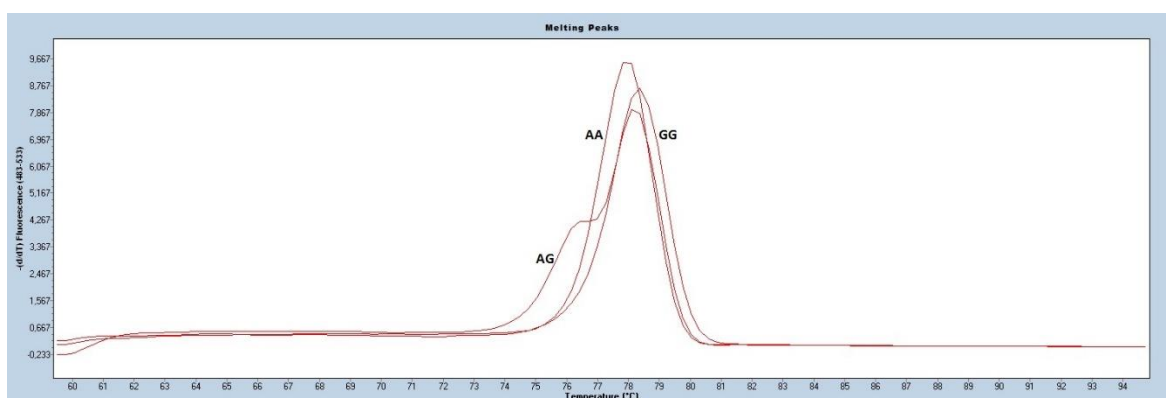
Reakcijska mešanica je prikazana v tabeli 2.7. Po končanem postopku smo s pomočjo programske opreme nameščene na aparaturi za PCR v realnem času LightCycler 480 iz grafov določili genotipe za posamezne vzorce.

Tabela 2-7: Sestava reakcijske mešanice za HRM analizo

Komponenta	Volumen / $\mu\text{L}$
DNK	2
HRM Master Mix	5
Začetni oligonukleotid 1	0,9
Začetni oligonukleotid 2	0,9
H <sub>2</sub> O	0,2
MgCl <sub>2</sub>	1
Skupen volumen	10



Slika 7: Normalizirane krivulje taljenja posameznih genotipov pri HRM analizi



Slika 8: Talični vrhovi posameznik genotipov pri HRM analizi

### 2.3.5 Analiza genske ekspresije

Novejša izvedba PCR reakcije, PCR v »realnem času«, omogoča sprotno zasledovanje količine nastalega produkta in je zato hitrejša, omogoča pa tudi kvantificiranje točno določene DNK v začetnem vzorcu.

Spremljanje reakcije v »realnem času« temelji na spreminjanju fluorescentnega signala, zato moramo vključiti tudi fluorescentne molekule. Jakost signala je sorazmerna s količino produkta. Uporabimo lahko fluorescenčno barvilo ali pa fluorescenčne probe oz. sonde, ki se specifično vežejo na komplementarno molekulo DNK. Signal meri PCR aparat (termocycler), ki tudi detektira fluorescenco. Povezan je z računalnikom in s programsko opremo, s pomočjo katere lahko po vsakem ciklu detektiramo rezultate, omogoča pa nam tudi številne analize le-teh. Za detekcijo produkta (v primerjavi z navadnim PCR-jem) ne potrebujemo gela, saj nam sam sistem že poda rezultate, s tem pa se zmanjša čas, ki ga za reakcijo porabimo, in tudi možnost kontaminacije.



PCR v »realnem času« lahko uporabimo tako za kvalitativno (zanima nas prisotnost/odsotnost določene sekvence) kot za kvantitativno (število kopij DNK) analizo. Kadar uporabljamo slednji način, imenujemo metodo tudi kvantitativni PCR (qPCR).

Reakcija PCR v »realnem času« ima tri faze:

- »background« faza: signala ne moremo zaznati, zato ne moremo meriti količine produkta;
- eksponencialna faza: optimalna kinetika; to fazo uporabimo za kvantifikacijo;
- faza platoja: produkt ne nastaja več zaradi prebitka produkta glede na primerje, zmanjšane encimske aktivnosti, zmanjšane koncentracije mononukleotidov.

Vsak posamezen cikel PCR v »realnem času« je sestavljen enako kot pri navadnem PCR iz treh faz: denaturacije (95 °C), pripenjanja oligonukleotidov (50–64 °C) in polimerizacije (72 °C).(48)

Tabela 2-8: Uporabljeni začetni oligonukleotidi (primerji).

GEN	Izooblika	
EPHX2	NM_001979.4	TTCATGCTCAGGAAGAAAGG
		GCCAGGCCATCTCTCTCA
TRIM35	NM_171982.3	CGCCAAGCACAATCAGGT
		AAGAACTCGCGAAGCTTATCA
GAPDH	NM_001289745.1	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
		GAAGATGGTGATGGGATTTC
B2M	NM_004048.2	TTCTGGCCTGGAGGCTATC
		TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC
ACTB	NM_001101.3	CATCGAGCACGGCATCGTCA
		TAGCACAGCCTGGATAGCAAC

Tabela 2-9: Mešanica za 250 nM primer

250 nM primer	Skupaj	
	1	10
H <sub>2</sub> O	0,2	2
MgCl <sub>2</sub>	1	10
SYBR Green Master Mix	5	50
Primer 1	0,9	9
Primer 2	0,9	9
DNA	2	20
<b>Skupaj</b>	10	100

### 2.3.5.1 Metoda računanja ekspresije – relativne kvantifikacije

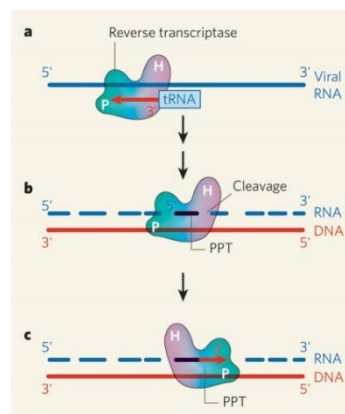
Relativna kvantifikacija je merjenje in primerjava izražanja dveh sekvenc v istem vzorcu. Rezultat prikažemo kot razmerje teh dveh. Tako pri genetiki in merjenju ekspresije vrednost Ct normaliziramo na referenčni gen, ki se med morebitnimi terapijami ne spreminja. Tako lahko hkrati primerjamo tudi več vzorcev in povprečno vrednost vzamemo za kalibrator in ekspresijo izbranih genov pokažemo kot zvišanje ali znižanje ekspresije. Zato najprej določimo Ct vrednost izbranega in referenčnega gena, da lahko kasneje določimo relativno ekspresijo.

V genetiki najpogosteje uporabljamo metodo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Izmerjenim vrednostim najprej odštejemo Ct vrednost referenčnega vzorca ( $\Delta Ct$ ). Temu rezultatu pa odštejemo razliko kalibratorja tarčnega in referenčnega gena ( $\Delta\Delta Ct$ ). Nato izračunamo nivo ekspresije kot  $2^{-(\Delta Ct \text{ vzorca} - \Delta Ct \text{ kalibratorja})}$ . Ta rezultat nam pove, ali gre za znižanje ali zvišanje ekspresije gena, ne glede na to kakšno količino vzorca smo imeli na začetku.

### 2.3.5.2 Reverzna transkripcija

Reverzna transkriptaza je encim, ki spada v razred transferaz. Katalizira podaljševanje DNK verige na 3'-koncu na osnovi RNA-matrice, torej omogoča prepis RNK v DNK (angl. RNA-directed DNA polymerase). Za začetek potrebuje že obstoječ začetni oligonukleotid (RNK ali DNK) – ne more ustvariti verige od začetka.(39)

Prepis poteka tako, da na obstoječi začetni oligonukleotid dodaja posamezne nukleotide, ki so komplementarni RNA-matrici, torej katalizira proces, ki poteka v nasprotni smeri kakor transkripcija, od koder izvirata tako ime encima kot tudi procesa, ki ga katalizira - reverzna (obratna) transkripcija.(41)



Slika 9: Delovanje reverzne transkriptaze

(a) Za tvorbo prve DNK verige encim uporabi tRNA kot primer in se poveže z tRNA 3' koncem. (b) Ko se komplementarna DNK sekvenca sintetizira, encim začne cepiti RNA template. (c) Za začetek sinteze druge DNK vezi, reverzna transkriptaza uporabi PPT sekvenco kot primer in tvori DNK vijačnico.(40)

### 2.3.6 Statistična analiza

SPSS je program za statistično obdelavo podatkov pridobljenih iz raziskav. Z njim lahko opravljamo standardne statistične analize z metodami, kot so: opisno statistične metode, korelacije in regresijske metode, linearno modeliranje itd. SPSS je organiziran v večje število modulov in dodatnih aplikacij, odvisno od potreb uporabnika. Pri obdelavi podatkov genotipizacije smo uporabljali različico SPSS 23.0, v kateri smo izvajali Fischer-jev natančni test za primerjavo frekvenc kategoričnih spremenljivk. Za vsak SNP smo izračunali razlike med frekvencami alelov in genotipov pri astmatikih in kontrolah, njihovo značilnost in razmerja obetov s 95 %-intervalom zaupanja. Vpliv genotipa na posamezne klinične in laboratorijske parametre, ki imajo naravno numerične spremenljivke, pa smo izračunali s pomočjo t-testa za dva neodvisna vzorca v primeru, kadar je bila razporeditev podatkov normalna, v primeru nenormalne porazdelitve pa neparametrični Mann-Whitney U-test. Pri genski ekspresiji smo za primerjavo ekspresije genov uporabili Pearsonovo korelacijo.

## 3 REZULTATI

### 3.1 Asociacijska analiza izbranih SNP-jev

Genotipizirali smo 3 SNP; rs11778371, ki leži med genoma *TRIM35* in *EPHX2* in je v GWA študiji bil povezan z astmo, ter SNP-ja rs7017417 v genu *EPHX2* in rs4534095 v genu *TRIM35*, ki sta pokazala vpliv na izražanje genov *EPHX2* in *TRIM35* (eQTL vpliv).

Pri primerjavi frekvence genotipov SNP-ja rs11778371 smo ugotovili, da je frekvenca genotipa CC pri vseh astmatikih znašala 83%, pri atopijskih prav tako 83%, pri neatopijskih pa 85%. V kontrolni skupini je frekvenca genotipa CC znašala 76%. Statistična analiza je pokazala signifikantno razliko pri primerjavi frekvenc genotipov med astmatiki in kontrolami pri modelu CC+CT/TT, ter pri primerjavi atopijskih bolnikov in kontrol (Tabela 3-1). Pri kontrolni skupini je frekvenca genotipa TT znašala 4 % v primerjavi s frekvenco genotipa pri astmatikih, kjer genotipa TT nismo našli (0 %,  $p = 0,006$ , OR = 0,46). Sklepamo lahko, da genotip TT deluje zaščitno pred nastankom astme.

Tabela 3-1: Frekvence genotipov polimorfizma rs1177837 pri astmatikih in kontrolah

Fenotip	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
	n (%)	n (%)	n (%)	p-vrednost OR (95%CI)	p-vrednost OR (95%CI)
<b>Astmatiki</b>	182 (83)	38 (17)	0	0,162 1,48 (0,86-2,54)	<b>0,006</b> 0,36(0,31-0,41)
<b>Atopijski</b>	118 (83)	24 (17)	0	0,174 1,52(0,83-2,77)	<b>0,022</b> 0,46(0,41-0,53)
<b>Neatopijski</b>	56 (85)	10 (15)	0	0,194 1,73(0,79-3,81)	0,167 0,65(0,58-0,72)

<b>Kontrole</b>	97 (76)	25 (20)	5 (4)		
-----------------	------------	------------	----------	--	--

Prav tako smo statistično značilno razliko ugotovili pri primerjavi alelov med astmatiki in kontrolami. Tako je pri astmatikih povišana frekvenca alela C (91 %) v primerjavi s kontrolami (86 %,  $p = 0,040$ ,  $OR = 1,69$ ). Iz tega lahko sklepamo, da alel C poveča tveganje za astmo. (Tabela 3-2)

**Tabela 3-2: Frekvence alelov polimorfizma rs11778371 pri astmatikih in kontrolah**

Fenotip	C (%)	T (%)	p-vrednost OR (95%CI)
<b>Astmatiki</b>	91	9	<b>0,040</b> 1,69(1,04-2,75)
<b>Atopijski</b>	92	8	0,053 1,73(1,00-3,00)
<b>Neatopijski</b>	92	8	0,094 1,95(0,93-4,07)
<b>Kontrole</b>	86	14	

Pri analizi SNP-ja rs7017417 nismo našli statistično značilnih razlik med skupino astmatikov in med kontrolami. Asociacijska analiza za genotipe je prikazana v Tabeli 3-3, za alele pa v tabeli 3-4.

**Tabela 3-3: Frekvence genotipov polimorfizma rs7017417 pri astmatikih in kontrolah**

Fenotip	AA	AG	GG	AA/AG+GG	AA+AG/GG
	n (%)	n (%)	n (%)	p-vrednost OR (95%CI)	p-vrednost OR (95%CI)
<b>Astmatiki</b>	250 (85)	40 (13)	5 (2)	1,000 1,02(0,63-1,66)	0,752 1,32(0,38-4,62)
<b>Atopijski</b>	162 (83)	30 (15)	4 (2)	0,689 0,88(0,52-1,48)	1,000 1,089(0,29-4,12)
<b>Neatopijski</b>	76 (86)	11 (13)	1 (1)	0,719 1,23(0,59-2,55)	1,000 1,95(0,22-16,9)
<b>Kontrole</b>	190 (85)	30 (13)	5 (2)		

**Tabela 3-4: Frekvence alelov polimorfizma rs7017417 pri astmatikih in kontrolah**

Fenotip	A (%)	G (%)	p-vrednost OR (95%CI)
<b>Astmatiki</b>	93	7	0,823 1,05(0,68-1,63)
<b>Atopijski</b>	97	3	0,719 0,91(0,57-1,46)
<b>Neatopijski</b>	92	8	0,519 1,28(0,65-2,50)
<b>Kontrole</b>	93	7	

Pri analizi SNP-ja rs4534095 prav tako nismo ugotovili statistično značilnih razlik med astmatiki in kontrolami. Asociacijska analiza za SNP rs4534095 je prikazana v Tabeli 3-5 in 3-6.

**Tabela 3-5: Frekvence genotipov polimorfizma rs4534095 pri astmatikih in kontrolah**

Fenotip	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
	n (%)	n (%)	n (%)	p-vrednost OR (95%CI)	p-vrednost OR (95%CI)
<b>Astmatiki</b>	62 (28)	109 (48)	55 (24)	0,900 0,95(0,58-1,54)	0,793 0,92(0,55+1,55)
<b>Atopijski</b>	44 (28)	77 (49)	35 (23)	1,000 0,96(0,58+1,67)	0,885 1,06(0,60+1,87)
<b>Neatopijski</b>	14 (23)	28 (47)	18 (30)	0,48 0,76(0,37+1,55)	0,37 0,70(0,35+1,39)
<b>Kontrole</b>	35 (28)	59 (48)	29 (24)		

**Tabela 3-6: Frekvence alelov polimorfizma rs4534095 pri astmatikih in kontrolah**

Fenotip	C (%)	T (%)	p-vrednost OR (95%CI)
<b>Astmatiki</b>	52	48	0,75 0,95(0,69+1,30)
<b>Atopijski</b>	53	47	1,00 1,01(0,73+1,42)
<b>Neatopijski</b>	47	53	0,316 0,78(0,50+1,21)
<b>Kontrole</b>	53	47	

### 3.2 Povezava med izbranimi SNP-ji in kliničnimi parametri ter farmakogenetska analiza

Analizo vpliva genotipov in alelov na laboratorijske in klinične parametre smo statistično ovrednotili s t-testom za dva neodvisna vzorca. Izračunali smo p-vrednost, povprečje in standardno deviacijo. Za statistično signifikatne so se pokazale vrednosti FEV1 pri atopijskih astmatikih (Tabela 3-7) za SNP rs11778371. Iz tega lahko sklepamo, da imajo astmatiki z atopijsko obliko bolezni z genotipom CC nižjo vrednost FEV1, kar nakazuje na hujšo obliko astme v primerjavi z bolniki z genotipom CT.

**Tabela 3-7: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih**

Atopijski astmatiki	Parametri	CC	CT	TT
n	FEV1 <sup>1</sup>	113	24	/
Povprečje (± s. d.)		90,5 (14,5)	97,4 (12,4)	/
p-vrednost		<b>0,034</b>		

<sup>1</sup>FEV1 je prikazan v odstotku od predvidene (referenčne) vrednosti za starost, spol in višino

Pri bolnikih z neatopijsko obliko bolezni smo statistično značilno razliko ugotovili pri parametru TI in FeNO. Bolniki z genotipom CT so imeli statistično značilno nižjo vrednost TI (84,8) in statistično značilno višjo vrednost FeNO (45,4) v primerjavi z bolniki z genotipom CC (TI: 89,1,  $p = 0,049$ ; FeNO: 22,6,  $p = 0,027$ ) (Tabela 3-8). Iz rezultatov lahko sklepamo, da imajo bolniki z genotipom CT težjo obliko astme, saj imajo znižan TI (merilo obstrukcije dihalnih poti) in bolj izraženo eozinofilno vnetje v dihalnih poteh.

**Tabela 3-8: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih**

Neatopijski astmatiki	Parametri	CC	CT	TT
n		56	10	/
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	TI	89,1 (8,3)	84,8 (4,3)	/
p-vrednost		<b>0,049</b>		

n	FeNO	46	8	/
Povprečje ( $\pm$ s. d.)		22,6 (19,4)	45,4 (27,8)	/
p-vrednost		<b>0,027</b>		

Za ostale analizirane parametre statistično značilnih povezav nismo ugotovili. Rezultati so prikazani v prilogi v Tabelah 7.1. - 7.6.

Nadalje smo primerjali vpliv genotipa na izide zdravljenja z inhalacijskimi glukokortikosteroidi in antilevkotrieni. Statistično značilno povezavo smo ugotovili pri astmatikih z atopijsko obliko bolezni in sicer je bil pri nosilcih alela T za SNP rs11778371 dTI večji (3,4) kot pa pri nosilcih alela C (0,38,  $p = 0,035$ ), kar pomeni da so posamezniki z alelom T bolje odgovarjali na terapijo z antilevkotrieni. (Tabela 3-9)

**Tabela 3-9: Vpliv zdravljenja s antilevkotrieni na klinični parameter TI glede na alel in fenotip**

	LTRA	Parametri	C	T
Astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTI	0,96 (4,37)	2,22 (3,88)
	p-vrednost		0,181	
Atopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTI	0,38 (3,99)	3,4 (4,50)
	p-vrednost		<b>0,035</b>	

Drugih statistično značilnih povezav med SNP-jem rs11778371 in odzivom na terapijo z inhalacijskimi glukokortikosteroidi in antilevkotrieni nismo našli. Rezultati so prikazani v prilogi v Tabelah 7.7. - 7.10.

Pri analizi SNP-ja rs4534095 smo pri vplivu genotipa na laboratorijske parametre signifikantno značilne razlike opazili v skupini vseh astmatikov pri dveh parametrih (Tabela 3-10). FEV1 pred uvedbo terapije je bil statistično značilno povišan pri

posameznikov z genotipom CC v primerjavi s posamezniki z genotipom CT in TT ( $p=0,045$ ), medtem ko je bil FeNO statistično značilno nižji pri posameznikov z genotipom CC v primerjavi s posamezniki z genotipom CT in TT ( $p=0,038$ ). Rezultati nakazujejo na to, da imajo posamezniki z genotipom CC SNP-ja rs4534095 lažjo obliko astme v primerjavi z bolniki z genotipom CT ali TT.

**Tabela 3-10: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih**

Astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n		60	106	55		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	FEV1	93,0 (13,6)	88, (15,9)	88,3 (13,8)		
p-vrednost		0,124			<b>0,045</b>	0,286
n		43	80	46		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	FeNO	32,9 (28,7)	45,6 (32,2)	42,7 (32,2)		
p-vrednost		0,101			<b>0,036</b>	0,27

Pri atopijskih astmatikih so posamezniki z genotipom CC imeli nižjo vrednost parametra FeNO (Tabela 3-11).

**Tabela 3-11: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih**

Atopijski astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n		29	55	26		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	FeNO	37,14 (27,52)	52,44 (31,6)	53,19 (33,97)	<b>p = 0,024</b>	p = 0,445
p-vrednost		0,080				

Pri primerjavi alelov smo v skupini atopijskih astmatikov ugotovili, da imajo posamezniki z alelom T močnejše izraženo hiperreaktivnost dihalnih poti (nižja vrednost PC<sub>20</sub> pri metaholinskem testu) v primerjavi z bolniki z alelom T. Rezultati so prikazani tabeli 3-12.

**Tabela 3-12: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih**

Atopijski astmatiki	Parametri	C	T
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,55 (0,64)	-0,40 (0,65)
p-vrednost		<b>0,041</b>	

V skupini neatopijskih astmatikov smo ugotovili, da imajo posamezniki z genotipom TT nižji TI pred uvedbo terapije v primerjavi s posamezniki z genotipom CC in heterozigoti ( $p=0,010$ ), Tabela 3-13.

**Tabela 3-13: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih**

Neatopijski	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
-------------	-----------	----	----	----	----------	----------

astmatiki						
n	TI	14	28	18	p = 0,456	p = <b>0,010</b>
Povprečje (± s. d.)		90,07 (5,24)	90,27 (8,17)	84,67 (7,48)		
p-vrednost		<b>0,036</b>				

Enako se je potrdilo pri alelnem modelu, kjer imajo posamezniki z alelom T nižji TI v primerjavi s posamezniki z alelom T ( $p=0,034$ ). Iz rezultatov lahko sklepamo, da imajo posamezniki z alelom T težjo obliko astme (Tabela 3-14).

**Tabela 3-14: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parameter pri neatopijskih astmatikih**

Neatopijski astmatiki	Parametri	C	T
Povprečje (± s. d.)	TI	90,07 (6,86)	87,03 (8,23)
p-vrednost		<b>0,034</b>	

Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi se je pri astmatikih pokazal za signifikantnega pri parametru FEV1. Porast FEV1 po terapiji z inhalacijskimi kortikosteroidi je bil pri posameznikih z genotipom TT oz. CT dvakrat oz. trikrat večji glede na posameznike z genotipom CC. Podobno se je izkazalo pri atopijskih bolnikih, kar je razvidno iz tabele 3-15.

**Tabela 3-15: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip**

	ICS	Parame	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
Astmatiki	n	dTI	37	64	34	p = 0,853	p = 0,546
	Povprečje (± s. d.)		2,81 (6,93)	3,11 (5,85)	2,82 (8,74)		
	p-vrednost		0,831				
	n	dFEV1	36	64	34	p = <b>0,013</b>	p = 0,925
	Povprečje (± s. d.)		2,97 (11,19)	9,52 (13,12)	7,35 (10,38)		
	p-vrednost		0,310				
Atopijski astmatiki	n	dTI	29	45	25	p = 0,761	p = 0,231
	Povprečje (± s. d.)		3,14 (7,45)	3,82 (5,33)	2,52 (9,47)		
	p-vrednost		0,482				
	n	dFEV1	28	45	25	p = <b>0,046</b>	p = 0,763
	Povprečje (± s. d.)		3,68 (11,5)	9,64 (11,73)	8,40 (11,10)		
	p-vrednost		0,123				

Pri odzivu na zdravljenje z antilevkotrieni pa smo ugotovili, da je pri posameznikih z genotipom TT sprememba v indeksu TI višja in s tem odziv na terapijo boljši v primerjavi s posamezniki z genotipom CC ali CT ( $p=0,023$ ), Tabela 3-16.



Tabela 3-16: Vpliv zdravljenja s antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na genotip

	LTRA	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
Astmatici	n	dTI	17	35	19	p = 0,651	p = <b>0,023</b>
	Povprečje (± s. d.)		1,41 (6,13)	-0,54 (4,20)	3,00 (5,05)		
	p-vrednost		<b>0,033</b>				
	n	dFEV1	17	34	19	p = 0,758	p = 0,587
	Povprečje (± s. d.)		-0,47 (10,79)	1,06 (6,27)	-0,79 (6,94)		
	p-vrednost		0,750				

Tudi pri alelnem modelu je v skupini neatopijskih astmatikov bil dTI večji pri bolnikih z alelom T (3,47) v primerjavi z bolniki z alelom C (-0,10, p=0,009) po zdravljenju z antilevkotrieni, kar nakazuje na to, da bolniki z alelom T bolje odgovarjajo na terapijo. Rezultati so prikazani v tabeli 3-17.

Tabela 3-17: Vpliv zdravljenja s antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip

	LTRA	Parametri	C	T
Neatopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTI	-0,10 (3,40)	3,47 (5,81)
	p-vrednost		<b>0,009</b>	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	1,40 (9,53)	0,60 (8,00)
	p-vrednost		0,764	

### 3.3 Genska ekspresija

Pri ekspresijski analizi smo primerjali izražanje genov *EPHX2* in *TRIM35* med astmatiki in kontrolami ter glede na genotip izbranih SNP-jev. Ugotovili smo statistično značilno razliko v ekspresiji? med astmatiki in kontrolami za gen *EPHX2*. Pri skupini atopijskih astmatikov, pa se je v primerjavi s kontrolno skupino statistično značilno razlikovalo izražanje obeh genov, *EPHX2* in *TRIM35*. V obeh primerih je bila ekspresija gena pri atopijskih bolnikih večja kot pri kontrolah (Tabela 3-18).

Tabela 3-18: Primerjava ekspresije gena *EPHX2* in *TRIM35* med astmatiki in kontrolami

Fenotip		EPHX2		TRIM35	
Vsi astmatiki	p-vrednost	<b>0,033</b>		0,070	
	Mediana <sup>1</sup>	0,906	1,034	0,918	1,046
Atopijski astmatiki	p-vrednost	<b>0,013</b>		<b>0,008</b>	
	Mediana <sup>1</sup>	0,868	1,034	0,880	1,046

<sup>1</sup> Mediana je podana za parameter 2<sup>-AACT</sup>

Pri korelacijah med ekspresijo genov in kliničnimi parametri pred zdravljenjem pa smo dobili statistično značilno obratno povezavo med ekspresijo gena *TRIM35* in logPC<sub>20</sub> za vse astmatike in podskupino atopijskih astmatikov. (Tabela 3-19).

Tabela 3-19: Primerjava ekspresije gena *EPHX2* in *TRIM35* s kliničnimi parametri pred zdravljenjem

Fenotip	Parametri	EPHX2		TRIM35	
		p-vrednost	r	p-vrednost	r
Vsi astmatiki	TI	0,585	0,033	0,400	-0,050
Atopijski astmatiki		0,746	0,024	0,814	-0,017
Neatopijski astmatiki		0,797	0,029	0,118	0,029
Vsi astmatiki	FEV1	0,169	-0,082	0,838	0,012
Atopijski astmatiki		0,438	0,057	0,074	0,129
Neatopijski astmatiki		0,888	0,016	0,674	0,047
Vsi astmatiki	logPC <sub>20</sub>	0,200	-0,077	<b>0,035</b>	-0,125
Atopijski astmatiki		0,150	-0,106	<b>0,007</b>	-0,194
Neatopijski astmatiki		0,608	0,058	0,739	0,037

## 4 RAZPRAVA

V nalogi smo pri otrocih z astmo raziskovali povezave z SNP rs11778371, rs7017417 in rs4534095 ter genoma *TRIM35* in *EPHX2*. Gena in polimorfizmi so locirani na kromosomu 8 in obsegajo regijo, za katero je bila že dokazana povezava z astmo. V izbrani regiji so v GWA študiji predhodno potrdili povezavo med SNP-jem rs11778371 in astmo. V okolici tega lokusa se nahajajo SNP-ji, za katere je bilo v eQTL študijah dokazano, da vplivajo na izražanje sosednjih genov, tj. genov *TRIM35* in *EPHX2*. Zato smo v diplomski nalogi želeli ugotoviti ali je izbrana regija povezana z astmo tudi pri slovenskih otrocih ter ugotoviti povezavo med analizirani SNP-ji ter laboratorijskimi in kliničnimi parametri, izvesti farmakogenetsko analizo otrok, zdravljenih s kortikosteroidi in antilevkotrieni ter ugotoviti vpliv izražanja izbranih genov na astmo, klinične parametre ter povezave med izražanjem genov in genotipom izbranih SNP-jev.

V naši študiji smo polimorfizem rs11778371, ki je bil že predhodno povezan z astmo v GWA študijah, povezali z astmo tudi pri slovenskih otrocih. Pri primerjavi frekvence genotipov in alelov SNP-ja rs11778371 smo ugotovili značilno višjo frekvenco genotipa TT pri kontrolni skupini v primerjavi z astmatiki glede na dominantni model CC+CT/TT ( $p = 0,006$ ,  $OR=0,36$ ). Glede na to lahko sklepamo, da genotip TT deluje zaščitno pred nastankom astme. V nasprotju z našimi rezultati so v GWA študiji, v kateri je bila povezava med SNP-jem rs11778371 in astmo prvič omenjena, ugotovili povečano frekvenco alela T pri bolnikih v primerjavi s kontrolno skupino ( $p=8,1 \times 10^{-7}$ ).<sup>(27)</sup> Drugih študij za omenjen SNP ni na voljo.

Nadalje smo za isti SNP odkrili tudi povezavo s kliničnimi parametri. Bolniki z genotipom CT so imeli višjo povprečno vrednost FEV1 pred terapijo v primerjavi z bolniki z genotipom CC, vendar samo pri atopijskem fenotipu. Pri neatopijskem fenotipu so bolniki z genotipom CC imeli višji TI ter imeli nižji FeNO v primerjavi z bolniki z genotipom CT. Pri atopijskih astmatiki smo dodatno ugotovili boljši odziv na zdravljenje z antilevkotrieni pri bolnikih z alelom T SNP-ja rs11778371, predvsem kar se tiče zmanjšanja obstrukcije dihal. Iz rezultatov lahko sklepamo, da alel T deluje ugodno v smislu odziva na protiastmatično terapijo pri atopijski astmi, hkrati pa poveča tveganje za neatopijsko astmo. Takšne ugotovitve dodatno potrjujejo hipotezo o heterogenosti astme in nujnosti stratifikacije bolnikov glede na fenotip tako pri študijah kot tudi v klinični praksi.

Za SNP rs7017417 nismo našli nobene statistično značilne povezave pri primerjavi genotipov in alelov med kontrolno skupino in skupino astmatikov kot tudi ne pri analizi povezave genotipa z kliničnimi parametri in pri farmakogenetski analizi. Prav tako nismo zasledili nobene povezave med izražanjem genov in genotipom polimorfizma v eQTL analizi.

V asociacijski študij za SNP rs4534095 nismo zasledili nobenih povezav med genotipi in aleli pri primerjavi kontrol in bolnikov. So se pa za signifikantne pokazali rezultati pri primerjavah med polimorfizmom in genotipa s kliničnimi parametri. Bolniki z genotipom CC so imeli višjo povprečno vrednost parametra FEV1 glede na genotip CT ali TT. Prav tako je bila povprečna vrednost parametra FeNO znižana v skupini astmatikov z

genotipom CC v primerjavi s posamezniki z genotipom CT ali TT. Pri atopijskih astmatikih pa je razlika med vrednostjo parametra FeNO pri bolnikih z genotipom CC in bolnikih z genotipom CT ali TT še večja. Glede na to lahko sklepamo, da je genotip CC povezan z lažjo obliko astme. Prav tako se je hiperreaktivnost dihal pri testiranju z metaholinom pri atopijskih astmatikih statistično značilno razlikovala med bolniki z alelom T in bolniki z alelom C, pri čemer so bile povprečne vrednosti pri bolnikih z alelom T nižje in s tem povečana hiperreaktivnost dihal, glede na bolnike z alelom C. V skupini neatopijskih astmatikov smo na podlagi indeksa TI prav tako ugotovili, da je genotip CC povezan z blažjo obliko astme.

Pri farmakogenetski analizi vpliva genotipa SNP-ja rs4534095 na izid zdravljenja s kortikosteroidi smo ugotovili, da imajo posamezniki z genotipom CC slabši odziv na kortikosteroide v primerjavi s posamezniki z genotipom CT ali TT. Pri bolnikih s CC je bil porast FEV1 po zdravljenju (dFEV1) manjši kot pri bolnikih z genotipom CT ali TT. Enako smo ugotovili tudi pri podskupini bolnikov z atopijsko obliko astme. Pri zdravljenju z antilevkotrieni pa se je pokazalo, da imajo posamezniki z genotipom CC ali CT slabši odziv v primerjavi s posamezniki z genotipom TT, saj je bila pri posameznikih z genotipom CC ali CT sprememba v indeksu TI pred in po terapiji manjša v primerjavi s posamezniki z genotipom TT. Zaključimo lahko, da imajo posamezniki z genotipom TT SNP-ja rs4534095 boljši odziv tako na zdravljenje z inhalacijskimi kortikosteroidi kot z antilevkotrieni. Na razliko v odzivnosti na protiastmatično terapijo, ki je povezana z genotipom SNP-ja rs4534095 pa lahko vpliva tudi t.i. »fenomen stropa«. Bolniki z genotipom TT imajo namreč že pred uvedbo terapije slabšo pljučno funkcijo in s tem več »prostora« za izboljšanje v primerjavi z bolniki z genotipom CC ali CT, pri katerih je pljučna funkcija že pred uvedbo terapije praktično normalna.

Pri ekspresijski analizi smo primerjali izražanje obeh genov *EPHX2* in *TRIM35*. Za signifikantno se je pokazala razlika v ekspresijah med kontrolno skupino in skupino vseh astmatikov pri genu *EPHX*. Pri primerjavi skupine atopijskih bolnikov s kontrolami pa se je pokazala signifikantna razlika v ekspresiji tako pri genu *TRIM35* kot *EPHX2*. V obeh primerih je bila ekspresija gena pri bolnikih z atopijsko astmo večja kot pri kontrolah.

## 5 SKLEP

V diplomski delu smo potrdili povezave med SNP-jem rs11778371 in otroško astmo v slovenski populaciji ter povezavo med analiziranimi SNP-ji in kliničnimi parametri ter odzivom na terapijo. Dodatno smo pokazali na smiselnost stratificirane analize pri posameznih fenotipih, saj so se povezave med atopijskim in neatopijskim fenotipom razlikovale. eQTL vpliva izbranih SNP-jev na izražanje genov *EPHX2* in *TRIM35* nismo potrdili. Zaključimo lahko, da izbran lokus na kromosomu 8 vpliva na astmo in njen potek pri slovenskih otrocih, vendar bi bilo potrebno rezultate naše študije potrditi na drugih populacijah in na večjem številu vzorcev.

## 6 LITERATURA

1. Berce Vojko, Identifikacija nekaterih kandidatnih genov za astmo ter povezava teh genov s fenotipom astme in odgovorom na terapijo pri otrocih z astmo, Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, doktorska dizertacija 2009.
2. "Asthma Fact sheet N°307". WHO. November 2013.
3. Martinez FD (2007). "Genes, environments, development and asthma: a reappraisal". *European Respiratory Journal*. 29 (1): 179–84.
4. Skerbinjek Kavalari, M. Astma pri otrocih in mladostnikih. V: Brunčko, A., Homšak, M., Berce, V., (ur.). Bolezni dihal in alergije pri otrocih, 3. november 2014. Maribor: UKC Maribor, 2014, str. 30-34.
5. Kreuh Kuhta, B. Astma – diagnostika in zdravljenje. V: Perdija, Ž (ur.). I. učna delavnica o inhalacijskem zdravljenju obstruktivnih pljučnih boleznih za zdravnike, farmacevte, diplomirane medicinske sestre in zdravstvene tehnike, 27. oktober 2004. Maribor: Splošna bolnišnica, Oddelek za pljučne bolezni, 2004.
6. Nystad W, Magnus P, Gulsvik. Increasing risk of asthma without other atopic diseases in school children: a repeated cross-sectional study after 13 years. *Eur J Epidemiol* 1998; 14: 247-52.
7. Pearce N, Pekkanen J, Beasley R. How much asthma is really attributable to atopy? *Thorax* 1999; 54: 268-72.
8. Vercelli D. Advances in asthma and allergy genetics in 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 267-71.
9. Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics. *Respir Res* 2008; 9: 4.
10. Hawkins GA, Peters SP. Pharmacogenetics of asthma. *Methods Mol Biol* 2008; 448: 359-378.
11. Palmer LJ, Cookson WO. Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res* 2000; 10: 1280-7.
12. Todd JL, Goldstein DB, Ge D, Christie J, Palmer SM. The state of genome-wide association studies in pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 2011; 8: 873-80.
13. Spletna stran: [https://en.wikipedia.org/wiki/Tripartite\\_motif\\_family](https://en.wikipedia.org/wiki/Tripartite_motif_family).
14. Chen Z, Lu X, Wang Z. Co-expression of PKM2 and TRIM35 predicts survival and recurrence in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6: 2538-48
15. Spletna stran: <http://www.phosphosite.org/proteinAction?id=7982&showAllSites=true>
16. Harris TR, Hammock BH. Soluble epoxide hydrolase: Gene structure, expression and deletion. *Gene* 2013; 2: 61-74
17. Spletna stran: [https://en.wikipedia.org/wiki/Epoxide\\_hydrolase\\_2](https://en.wikipedia.org/wiki/Epoxide_hydrolase_2)
18. Shen HC, Hammock BD. Discovery of Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase: A Target with Multiple Potential Therapeutic Indications. *J Med Chem* 2012; 5: 1789-1808
19. Rosenthal M, Bain SH, Cramer D, Helms P, Denison D, Bush A, et al. Lung function in white children aged 4 to 19 years: I-Spirometry. *Thorax* 1993; 48: 794-802

20. Beach JR, Young CL, Avery AJ s sod. Measurement of airway responsiveness to methacholine: relative importance of the precision of drug delivery and the method of assessing response. *Thorax* 1993; 48: 293-43
21. NIH/CEPH Collaborative Mapping Group. A comprehensive genetic linkage map of the human genome. *Science* 1992; 258: 67-86
22. Mitrovič M, Asociacijska analiza nekaterih kandidatnih genov izbranih z orodji bioinformatike pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo, Univerza v Mariboru. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2008
23. Chang HW, Yang CH, Chang PL et al. RFLPing: restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *BMC Genomics*, 2006; 17:30
24. Berce Vojko, Identifikacija nekaterih kandidatnih genov za astmo ter povezava teh genov s fenotipom astme in odgovorom na terapijo pri otrocih z astmo, Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, doktorska dizertacija 2009.
25. Perin Petra, Analiza polimorfizmov izbranih genov pri otrocih z astmo ter povezava teh polimorfizmov s fenotipom astme in odzivom na terapijo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Diplomaska naloga, 2010
26. Wutzler A, Kestler C, Perrot A et al. Variations in the human soluble epoxide hydrolase gene recurrence of atrial fibrillation after catheter ablation. *International Journal of Cardiology* 168. 2013; 3647-3651
27. Himes BE, Hunninghake GM, Baurley JW. Genome-wide Association analysis Identifies PDE4D as an Asthma-Susceptibility Gene. *American Journal of Human Genetics* 2009; 84: 581-593
28. Heap GA, Trynka G, Jansen RC et al. Complex nature of SNP genotype effect on gene expression in primary human leucocytes. *BMC Medical Genomics* 2009; 2:1
29. Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA. Genetic variation of genes for xenobiotic-metabolizing enzymes and risk of bronchial asthma: the importance of gene-gene and gene-environment interactions for disease susceptibility. *Journal of Human Genetics* 2009; 54:440-449
30. Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*. 2005;27:1147-1157
31. Ozato K, Shin D, Chang T, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(11):849-860
32. Vercelli D. Advances in asthma and allergy genetics in 2007. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122:267-71
33. Moffat MF et al. A Large-Scale, Consortium-Based Genomewide Association Study of Asthma. *New England Journal of Medicine*. 2010; 363(13): 1211-1221.
34. Ortega VE. Pharmacogenetics of beta2 adrenergic receptor agonists in asthma management. *Clinical genetics*. 2014; 86(1):12-20
35. Clemmer GL et al. Measuring the corticosteroid responsiveness endophenotype in asthmatic patients. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015; 136(2):274-81
36. Nieuwenhuis MA et al. Combining Genome Wide Association Study and lung eQTL analysis provides evidence for novel genes associated with asthma. *Allergy*. 2016

37. Wu AC et al. Inhaled corticosteroid treatment modulates ZNF432 gene variant's effect on bronchodilator response in asthmatic. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014; 133(3):723-8
38. Dahlin A et al. Genome-wide Association Study Identifies Novel Pharmacogenomics Loci for Treatment Response to Montelukast in Asthma. *PLoS One*. 2015; 10(6)
39. Spletna stran: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/7/7/49.html>
40. Spletna stran: [http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7192/fig\\_tab/453169b\\_F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7192/fig_tab/453169b_F1.html)
41. Spletna stran: [http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Reverzna\\_transkriptaza](http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Reverzna_transkriptaza)
42. Tantisira KG, Lake S, Silverman ES et al. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Hum. Mol. Genet.* 13(13), 1353–1359 (2004).
43. Hawkins GA, Lazarus R, Smith RS et al. The glucocorticoid receptor heterocomplex gene STIP1 is associated with improved lung function in asthmatic subjects treated with inhaled corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123(6), 1376–1383 (2009).
44. Jin Y, Hu D, Peterson EL et al. Dual-specificity phosphatase 1 as a pharmacogenetic modifier of inhaled steroid response among asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126(3), 618–625.e1–2 (2010).
45. Tantisira KG, Silverman ES, Mariani TJ et al. FCER2: a pharmacogenetic basis for severe exacerbations in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120(6), 1285–1291 (2007).
46. Portelli M1, Sayers I. Genetic basis for personalized medicine in asthma. *Expert Rev Respir Med.* 2012 Apr;6(2):223-36.
47. Repnik K, Potočnik U. Biokemija in molekularna biologija, navodila za laboratorijske vaje. FKKT UM. 2013
48. Repnik K, Potočnik U. Genomika v biomedicinski tehnologiji, navodila za laboratorijske vaje. FKKT UM. 2013



## 6.1. Viri slikovnega materiala

1. Spletna stran: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11778371](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11778371)
2. Spletna stran: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
3. Repnik K, Potočnik U. Biokemija in molekularna biologija, navodila za laboratorijske vaje. FKKT UM. 2013
4. Spletna stran: [http://lh5.ggpht.com/-7hVgva1K\\_\\_I/TeGIRdi-M3I/AAAAAAAAADx4/Gh92pY7UXP0/electroforesis\\_thumb1.gif?imgmax=-800](http://lh5.ggpht.com/-7hVgva1K__I/TeGIRdi-M3I/AAAAAAAAADx4/Gh92pY7UXP0/electroforesis_thumb1.gif?imgmax=-800)
5. Spletna stran: [http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7192/fig\\_tab/453169b-F1.html](http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7192/fig_tab/453169b-F1.html)

## 7 PRILOGA

### 7.1 PRILOGE ZA ASOCIACIJSKO ŠTUDIJO

#### 7.1.1 PRILOGA rs1778371 –GWA študija

Tabela 7-1: Vpliv genotipa polimorfizma rs1778371 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih

Astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n	TI	176	38	/		
Povprečje (± s. d.)		90 (8,9)	88 (10,7)	/		
p-vrednost		0,378			0,378	/
n	FEV1	176	38	/		
Povprečje (± s. d.)		90 (14,0)	93 (14,2)	/		
p-vrednost		0,316			0,316	/
n	logPC <sub>20</sub>	173	34	/		
Povprečje (± s. d.)		-0,44 (0,63)	-0,52 (0,65)	/		
p-vrednost		0,381			0,381	/
n	FeNO	143	30	/		
Povprečje (± s. d.)		40,5 (30,1)	51,7 (34,3)	/		
p-vrednost		0,114			0,114	/
n	Cel IgE	79	16	/		
Povprečje (± s. d.)		600,8 (632,8)	796,4 (1121,6)	/		
p-vrednost		0,784			0,784	/
n	Eozinofilci	76	16	/		
Povprečje (± s. d.)		545,9 (312,6)	421,2 (325,4)	/		
p-vrednost		0,067			0,067	/

Tabela 7-2: Vpliv alelov polimorfizma rs1778371 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih

Astmatiki	Parametri	C	T
Povprečje (± s. d.)	TI	89,4 (7,5)	87,8 (9,0)
p-vrednost		0,402	
Povprečje (± s. d.)	FEV1	90,4 (14,0)	93,0 (14,2)
p-vrednost		0,340	
Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,44 (0,68)	-0,52 (0,65)
p-vrednost		0,403	

Povprečje ( $\pm$ s. d.)	FeNO	41,6 (30,7)	51,7 (34,3)
p-vrednost		0,132	
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	Cel IgE	618,8 (694,6)	796,4 (1121,6)
p-vrednost		0,794	
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	Eozinofilci	534,1 (316,0)	421,2 (325,4)
p-vrednost		0,081	

Tabela 7-3: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih

Atopijski astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n	TI	113	24	/		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)		89,4 (6,7)	88,9 (9,7)	/		
p-vrednost		0,610			0,610	/
n	FEV1	113	24	/		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)		90,5 (14,5)	97,4 (12,4)	/		
p-vrednost		<b>0,034</b>			<b>0,034</b>	/
n	logPC <sub>20</sub>	112	21	/		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)		-0,52 (0,64)	-0,57 (0,63)	/		
p-vrednost		0,646			0,646	/
n	FeNO	91	18	/		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)		53,3 (32,3)	53,3 (32,3)	/		
p-vrednost		0,807			0,807	/
n	Cel IgE	53	11	/		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)		756,7 (693,3)	1055,8 (1267,3)	/		
p-vrednost		0,810			0,810	/
n	Eozinofilci	52	11	/		
Povprečje ( $\pm$ s. d.)		564,8 (301,9)	505,7 (359,2)	/		
p-vrednost		0,431			0,431	/

Tabela 7-4: Vpliv alelov polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih

Atopijski astmatiki	Parametri	C	T
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	TI	84,4 (7,0)	88,9 (9,7)
p-vrednost		0,627	
Povprečje ( $\pm$ s. d.)	FEV1	91,2 (14,5)	97,4 (12,4)
p-vrednost		0,059	

Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,53 (0,64)	-0,57 (0,63)
p-vrednost		0,659	
Povprečje (± s. d.)	FeNO	50,85 (30,9)	53,3 (32,3)
p-vrednost		0,815	
Povprečje (± s. d.)	Cel IgE	784,8 (770,8)	1055,8 (1267,3)
p-vrednost		0,818	
Povprečje (± s. d.)	Eozinofilci	559,1 (311,3)	505,7 (359,2)
p-vrednost		0,849	

Tabela 7-5: Vpliv genotipa polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih

Neatopijski astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n	TI	56	10	/		
Povprečje (± s. d.)		89,1 (8,3)	84,8 (4,3)	/		
p-vrednost		<b>0,049</b>			<b>0,049</b>	/
n	FEV1	56	10	/		
Povprečje (± s. d.)		89,8 (13,1)	87,9 (12,9)	/		
p-vrednost		0,671			0,671	/
n	logPC <sub>20</sub>	55	10	/		
Povprečje (± s. d.)		-0,23 (0,57)	-0,30 (0,71)	/		
p-vrednost		0,792			0,792	/
n	FeNO	46	8	/		
Povprečje (± s. d.)		22,6 (19,4)	45,4 (27,8)	/		
p-vrednost		<b>0,027</b>			<b>0,027</b>	/
n	Cel IgE	22	4	/		
Povprečje (± s. d.)		216,5 (253,5)	168,8 (86,1)	/		
p-vrednost		0,943			0,973	/
n	Eozinofilci	20	4	/		
Povprečje (± s. d.)		457,7 (328,5)	206,8 (42,3)	/		
p-vrednost		0,920			0,920	/

Tabela 7-6: Vpliv alelov polimorfizma rs11778371 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih

Netopijski astmatiki	Parametri	C	T
Povprečje (± s. d.)	TI	88,8 (11,3)	84,8 (4,3)
p-vrednost		0,058	
Povprečje	FEV1	89,7	87,9

(± s. d.)		(15,3)	(12,9)
p-vrednost		0,564	
Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,24 (0,58)	-0,30 (0,71)
p-vrednost		0,800	
Povprečje (± s. d.)	FeNO	24,5 (21,1)	45,4 (27,8)
p-vrednost		0,035	
Povprečje (± s. d.)	Cel IgE	212,5 (243,7)	168,8 (86,1)
p-vrednost		0,960	
Povprečje (± s. d.)	Eozinofilci	434,9 (324,5)	206,8 (42,3)
p-vrednost		0,125	

Tabela 7-7: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter TI in FEV1 glede na genotip in fenotip

	ICS	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
Astmatici	n	dTI	104	26	/		
	Povprečje (± s. d.)		2,01 (6,98)	4,35 (6,87)	/		
	p-vrednost		0,239			0,239	/
	n	dFEV1	104	26	/		
	Povprečje (± s. d.)		7,79 (11,78)	3,92 (12,65)	/		
	p-vrednost		0,220			0,220	
Atopijski astmatiki	n	dTI	74	18	/		/
	Povprečje (± s. d.)		2,83 (7,12)	4,72 (7,84)	/		
	p-vrednost		0,654			0,654	/
	n	dFEV1	74	18	/		
	Povprečje (± s. d.)		7,76 (10,77)	5,67 (7,42)	/		
	p-vrednost		0,591			0,591	/
Neatopijski astmatiki	n	dTI	28	5	/		
	Povprečje (± s. d.)		0,11 (6,32)	4,8 (3,37)	/		
	p-vrednost		0,127			0,127	/
	n	dFEV1	28	5	/		
	Povprečje (± s. d.)		8,11 (11,51)	6,2 (19,65)	/		
	p-vrednost		0,858			0,858	/

Tabela 7-8: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter TI in FEV1 glede na alel in fenotip

	ICS	Parametri	C	T
Astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTI	2,27 (7,00)	4,35 (6,87)
	p-vrednost		0,266	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	7,36 (11,94)	3,92 (12,65)
	p-vrednost		0,247	
Atopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTI	3,04 (7,22)	4,72 (7,84)
	p-vrednost		0,671	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	7,53 (10,48)	5,67 (7,42)
	p-vrednost		0,611	
Neatopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTI	0,49 (6,27)	4,8 (3,37)
	p-vrednost		0,068	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	7,95 (12,39)	6,2 (19,65)
	p-vrednost		0,869	

Tabela 7-9: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter TI in FEV1 glede na genotip in fenotip

	LTRA	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
Astmatiki	n	dTI	58	9	/		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		0,86 (4,39)	2,22 (3,88)	/		
	p-vrednost		0,346			0,346	/
	n	dFEV1	58	9	/		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		-0,48 (7,36)	0,56 (10,45)	/		
	p-vrednost		0,792			0,792	/
Atopijski astmatiki	n	dTI	33	5	/		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		0,15 (3,85)	3,4 (4,50)	/		
	p-vrednost		0,146			0,146	/
	n	dFEV1	33	5	/		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		-0,12 (5,67)	-2,2 (9,91)	/		
	p-vrednost		0,513			0,513	/

	vrednost					
Neatopijski astmatiki	n	dTI	24	3	/	
	Povprečje (± s. d.)		1,46 (4,65)	1 (2,45)	/	
	p-vrednost		0,873			0,873
	n	dFEV1	24	3	/	
	Povprečje (± s. d.)		-0,83 (9,20)	1,67 (10,66)	/	
	p-vrednost		0,635			0,635

Tabela 7-10: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter TI in FEV1 glede na alel in fenotip

	LTRA	Parametri	C	T
Astmatiki	Povprečje (± s. d.)	dTI	0,96 (4,37)	2,22 (3,88)
	p-vrednost		0,181	
	Povprečje (± s. d.)	dFEV1	-0,41 (7,60)	0,55 (10,45)
	p-vrednost		0,937	
Atopijski astmatiki	Povprečje (± s. d.)	dTI	0,38 (3,99)	3,4 (4,50)
	p-vrednost		0,035	
	Povprečje (± s. d.)	dFEV1	-0,27 (6,09)	-2,2 (9,91)
	p-vrednost		0,069	
Neatopijski astmatiki	Povprečje (± s. d.)	dTI	1,43 (4,56)	1 (2,45)
	p-vrednost		0,831	
	Povprečje (± s. d.)	dFEV1	-0,69 (9,31)	1,67 (10,66)
	p-vrednost		0,681	

## 7.1.2 PRILOGA rs7017417 – EPHX2

Tabela 7-11: Vpliv genotipa polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih

Astmatiki	Parametri	AA	AG	GG	AA/AG+GG	AA+AG/GG
n	TI	246	38	5		
Povprečje (± s. d.)		89,0 (7,7)	89,9 (5,8)	86 (5,6)		
p-vrednost		0,596			0,902	0,358
n	FEV1	245	38	5		
Povprečje (± s. d.)		90,5 (14,7)	94,1 (11,5)	98,2 (9,5)		
p-vrednost		0,249			0,128	0,259
n	logPC <sub>20</sub>	231	37	5		
Povprečje (± s. d.)		-0,44 (0,64)	-0,41 (0,61)	-0,59 (0,53)		
p-vrednost		0,879			0,962	0,621
n	FeNO	194	30	4		
Povprečje (± s. d.)		40,8 (30,7)	43,5 (32,5)	32,3 (11,9)		
p-vrednost		0,956			0,856	0,866
n	Cel IgE	102	21	1		
Povprečje (± s. d.)		573,0 (662,6)	441,4 (377,9)	46 (/)		
p-vrednost		0,408			0,509	0,274
n	Eozinofilci	100	20	1		
Povprečje (± s. d.)		521,9 (342,5)	510,3 (270,7)	715 (/)		
p-vrednost		0,632			0,649	0,479

Tabela 7-12: Vpliv alelov polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih

Astmatiki	Parametri	A	G
Povprečje (± s. d.)	TI	89,5 (7,5)	89,0 (5,5)
p-vrednost		0,845	
Povprečje (± s. d.)	FEV1	90,1 (14,3)	92,32 (10,0)
p-vrednost		0,077	
Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,44 (0,63)	-0,53 (0,64)
p-vrednost		0,833	
Povprečje (± s. d.)	FeNO	41,1 (30,6)	45,5 (31,6)
p-vrednost		0,913	
Povprečje (± s. d.)	Cel IgE	602,7 (628,7)	409,7 (407,0)
p-vrednost		0,371	
Povprečje (± s. d.)	Eozinofilci	533,7 (327,2)	584,2 (214,2)
p-vrednost		0,529	



Tabela 7-13: Vpliv genotipa polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih

Atopijski astmatiki	Parametri	AA	AG	GG	AA/AG+GG	AA+AG/GG
n	TI	159	29	4		
Povprečje (± s. d.)		89,3 (7,3)	89,9 (5,7)	84,5 (5,3)		
p-vrednost		0,406			0,775	0,182
n	FEV1	158	56	4		
Povprečje (± s. d.)		97,8 (14,9)	47,1 (12,4)	43,6 (10,4)		
p-vrednost		0,489			0,228	0,345
n	logPC <sub>20</sub>	155	56	4		
Povprečje (± s. d.)		-0,52 (0,64)	-0,38 (0,63)	-0,79 (0,41)		
p-vrednost		0,380			0,433	0,406
n	FeNO	120	23	4		
Povprečje (± s. d.)		49,2 (31,2)	50,4 (32,4)	32,3 (11,9)		
p-vrednost		0,664			0,766	0,365
n	Cel IgE	70	16	/		
Povprečje (± s. d.)		712,4 (742,6)	538,1 (379,1)	/		
p-vrednost		0,669			0,669	/
n	Eozinofilci	69	16	/		
Povprečje (± s. d.)		550,2 (340,6)	563,6 (291,1)	/		
p-vrednost		0,586			0,586	/

Tabela 7-14: Vpliv alelov polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih

Atopijski astmatiki	Parametri	A	G
Povprečje (± s. d.)	TI	89,5 (6,9)	87,2 (5,4)
p-vrednost		0,470	
Povprečje (± s. d.)	FEV1	91,0 (14,8)	45,9 (11,0)
p-vrednost		0,222	
Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,52 (0,64)	-0,66 (0,67)
p-vrednost		0,675	
Povprečje (± s. d.)	FeNO	50,2 (31,0)	56,7 (28,9)
p-vrednost		0,545	
Povprečje (± s. d.)	Cel IgE	753,0 (691,6)	624,5 (416,2)
p-vrednost		0,685	
Povprečje (± s. d.)	Eozinofilci	558,9 (317,8)	665,4 (218,4)
p-vrednost		0,604	

**Tabela 7-15: Vpliv genotipa polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih**

Neatopijski astmatiki	Parametri	AA	AG	GG	AA/AG+GG	AA+AG/GG
n	TI	75	10	1		
Povprečje (± s. d.)		87,7 (8,0)	90,0 (6,0)	92 /		
p-vrednost		0,597			0,361	0,605
n	FEV1	75	10	1		
Povprečje (± s. d.)		89,0 (14,2)	92,4 (7,9)	94 /		
p-vrednost		0,638			0,422	0,767
n	logPC <sub>20</sub>	74	9	1		
Povprečje (± s. d.)		-0,17 (0,57)	-0,50 (0,53)	0,19 /		
p-vrednost		0,169			0,175	0,524
n	FeNO	63	7	/		
Povprečje (± s. d.)		25,5 (21,5)	20,7 (19,6)	/		
p-vrednost		0,342			0,342	/
n	Cel IgE	27	5	1		
Povprečje (± s. d.)		224,6 (252,5)	132,0 (119,8)	46 /		
p-vrednost		0,866			0,665	0,788
n	Eozinofilci	26	5	1		
Povprečje (± s. d.)		423,5 (345,5)	350,4 (68,5)	715 /		
p-vrednost		0,561			0,524	0,438

**Tabela 7-16: Vpliv alelov polimorfizma rs7017417 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih**

Neatopijski astmatiki	Parametri	A	G
Povprečje (± s. d.)	TI	88,5 (8,3)	92,1 (4,2)
p-vrednost		0,292	
Povprečje (± s. d.)	FEV1	89,5 (13,4)	92,1 (7,8)
p-vrednost		0,321	
Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,23 (0,59)	-0,29 (0,50)
p-vrednost		0,319	
Povprečje (± s. d.)	FeNO	25,2 (21,4)	13,7 (10,0)
p-vrednost		0,353	
Povprečje (± s. d.)	Cel IgE	215,7 (238,6)	123,3 (109,3)
p-vrednost		0,560	
Povprečje (± s. d.)	Eozinofilci	426,3 (339,1)	489,3 (164,6)
p-vrednost		0,319	

Tabela 7-17: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip

	ICS	Parametri	AA	AG	GG	AA/AG+GG	AA+AG/GG
Astmatici	Povprečje (± s. d.)	dTI	3,19 (6,86)	1,72 (6,43)	8 (/)		
	p- vrednost		0,482			0,578	0,456
	Povprečje (± s. d.)	dFEV1	7,76 (12,33)	6,08 (9,28)	4 (/)		
	p- vrednost		0,803			0,537	0,800
Atopijski astmatiki	Povprečje (± s. d.)	dTI	3,68 (7,03)	2,74 (6,79)	/ (/)		
	p- vrednost		0,878			0,878	/
	Povprečje (± s. d.)	dFEV1	8,41 (11,06)	6,21 (9,76)	/ (/)		
	p- vrednost		0,622			0,622	/
Neatopijski astmatiki	Povprečje (± s. d.)	dTI	1,72 (6,18)	-1,50 (3,55)	8 (/)		
	p- vrednost		0,175			0,463	0,278
	Povprečje (± s. d.)	dFEV1	7,64 (12,72)	5,67 (7,52)	4 (/)		
	p- vrednost		0,905			0,665	0,788

Tabela 7-18: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip

	ICS	Parametri	A	G
Astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	2,27 (6,90)	1,35 (7,05)
	p-vrednost		0,739	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	7,49 (12,23)	5,47 (8,51)
	p-vrednost		0,515	
Atopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	3,03 (7,02)	1,78 (8,36)
	p-vrednost		0,883	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	7,62 (10,58)	5,67 (9,92)
	p-vrednost		0,637	
Neatopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	0,43 (6,42)	0,875 (5,13)
	p-vrednost		0,800	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	8,36 (13,00)	5,25 (6,55)
	p-vrednost		0,655	

Tabela 7-19: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip

	LTRA	Parametri	AA	AG	GG	AA/AG+GG	AA+AG/GG
Astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	1,22 (4,95)	-0,90 (1,64)	2,50 (6,26)		
	p-vrednost		0,273			0,299	0,610
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	0,05 (9,98)	-3,30 (7,31)	-0,25 (3,70)		
	p-vrednost		0,677			0,515	0,865
Atopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	0,52 (4,57)	-1,57 (1,50)	2,50 (6,26)		
	p-vrednost		0,182			0,328	0,475
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	-1,40 (7,71)	-5,43 (7,11)	-0,25 (3,70)		
	p-vrednost		0,422			0,404	0,678
Neatopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	2,06 (5,26)	0,67 (0,47)	/ (/)		
	p-vrednost		0,179			0,179	/
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	2,06 (12,52)	1,67 (4,99)	/ (/)		

	p-vrednost		0,955	0,955	/
--	------------	--	-------	-------	---

Tabela 7-20: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip

	LTRA	Parametri	C	T
Astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	0,83 (4,28)	2,4 (5,14)
	p-vrednost		0,529	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	-0,35 (7,77)	-1,1 (5,20)
	p-vrednost		0,639	
Atopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	0,06 (3,61)	2,88 (5,64)
	p-vrednost		0,679	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	-0,10 (6,20)	-1,63 (4,85)
	p-vrednost		0,814	
Neatopijski astmatiki	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dTl	1,47 (4,64)	0,5 (0,5)
	p-vrednost		0,800	
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)	dFEV1	-0,76 (9,42)	1 (6)
	p-vrednost		0,958	

Tabela 7-21: Povezava med genotipom polimorfizma rs7017417 in izražanjem gena EPHX2 v odvisnosti od fenotipa

eQTL	EPHX2	AA	AG	GG	AA/AG+GG	AA+AG/GG
Kontrole	n	105	20	4		
	Mediana	0,96	1,07	1,50		
	p-vrednost	0,066*			0,233	0,080
Astma	n	209	31	5		
	Mediana	0,94	0,71	1,25		
	p-vrednost	0,445*			0,813	0,467
Atopijska astma	n	135	23	4		
	Mediana	0,92	0,81	1,41		
	p-vrednost	0,554*			0,490	0,612
Neatopijska astma	n	62	8	1		
	Mediana ( $\pm$ IQR)	0,91	0,64	1,25		

	p-vrednost	0,667*	0,822	0,648
--	------------	--------	-------	-------

\* P-VREDNOST MED OBEMA HOMOZIGOTOMA

**Tabela 7-22: Povezava med alelom polimorfizma rs7017417 in izražanjem gena EPHX2 v odvisnosti od fenotipa**

eQTL		A	G
Kontrole	n	230	28
	Mediana	0,966	1,182
	p-vrednost	0,080	
Astma	n	462	42
	Mediana	0,951	0,831
	p-vrednost	0,647	
Atopijska astma	n	302	32
	Mediana	0,925	0,831
	p-vrednost	0,441	
Neatopijska astma	n	136	10
	Mediana	0,912	0,893
	p-vrednost	1,000	

## 7.1.3 PRILOGA rs4534095 – TRIM35

Tabela 7-23: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih

Astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n	TI	61	106	55		
Povprečje (± s. d.)		89,2 (6,5)	90,1 (7,3)	88,2 (8,2)		
p-vrednost		0,375			0,602	0,302
n	FEV1	60	106	55		
Povprečje (± s. d.)		93,0 (13,6)	88, (15,9)	88,3 (13,8)		
p-vrednost		0,124			<b>0,045</b>	0,286
n	logPC <sub>20</sub>	60	106	52		
Povprečje (± s. d.)		-0,49 (0,63)	-0,44 (0,62)	-0,27 (0,63)		
p-vrednost		0,181			0,251	0,079
n	FeNO	43	80	46		
Povprečje (± s. d.)		32,9 (28,7)	45,6 (32,2)	42,7 (32,2)		
p-vrednost		0,101			<b>0,036</b>	0,27
n	Cel IgE	60	43	22		
Povprečje (± s. d.)		658,5 (937,2)	536,6 (463,2)	438,6 (467,2)		
p-vrednost		0,541			0,813	0,359
n	Eozinofilci	29	43	21		
Povprečje (± s. d.)		447,3 (294,6)	553,8 (341,9)	533,6 (322,1)		
p-vrednost		0,273			0,108	0,623

Tabela 7-24: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri astmatikih

Astmatiki	Parametri	C	T
Povprečje (± s. d.)	TI	89,6 (6,9)	89,1 (7,8)
p-vrednost		0,763	
Povprečje (± s. d.)	FEV1	90,8 (14,9)	88,3 (14,8)
p-vrednost		0,055	
Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,47 (0,63)	-0,36 (0,62)
p-vrednost		0,074	
Povprečje (± s. d.)	FeNO	39,0 (31,1)	44,1 (32,3)
p-vrednost		0,129	

Povprečje (± s. d.)	Cel IgE	607,6 (777,7)	487,0 (467,8)
p-vrednost		0,693	
Povprečje (± s. d.)	Eozinofilci	492,7 (320,0)	553,7 (332,2)
p-vrednost		0,176	

Tabela 7-25: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih

Atopijski astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n	TI	43	75	34		
Povprečje (± s. d.)		89,07 (6,71)	89,84 (6,85)	90,32 (7,62)		
p-vrednost		0,583			0,371	0,424
n	FEV1	42	75	34		
Povprečje (± s. d.)		93,40 (14,66)	89,13 (16,33)	88,24 (13,88)		
p-vrednost		0,173			0,101	0,424
n	logPC <sub>20</sub>	42	76	32		
Povprečje (± s. d.)		-0,59 (0,66)	-0,51 (0,62)	-0,27 (0,65)		
p-vrednost		0,093			0,189	0,038
n	FeNO	29	55	26		
Povprečje (± s. d.)		37,14 (27,52)	52,44 (31,6)	53,19 (33,97)		
p-vrednost		0,080			<b>0,024</b>	0,445
n	Cel IgE	23	18	18		
Povprečje (± s. d.)		815,74 (1016,4)	678,67 (495,83)	523,61 (475,95)		
p-vrednost		0,472			0,815	0,324
n	Eozinofilci	23	28	18		
Povprečje (± s. d.)		475,43 (304,48)	645,32 (363,22)	558,56 (295,29)		
p-vrednost		0,165			0,080	0,946

Tabela 7-26: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri atopijskih astmatikih

Atopijski astmatiki	Parametri	C	T
Povprečje (± s. d.)	TI	89,43 (6,79)	90,07 (7,23)
p-vrednost		0,296	
Povprečje (± s. d.)	FEV1	91,39 (15,62)	88,71 (15,22)
p-vrednost		0,063	
Povprečje (± s. d.)	logPC <sub>20</sub>	-0,55 (0,64)	-0,40 (0,65)



p-vrednost		<b>0,041</b>	
Povprečje (± s. d.)	FeNO	44,58 (30,55)	52,80 (32,78)
p-vrednost		0,062	
Povprečje (± s. d.)	Cel IgE	765,04 (863,88)	590,06 (490,61)
p-vrednost		0,644	
Povprečje (± s. d.)	Eozinofilci	539,72 (338,14)	596,52 (329,57)
p-vrednost		0,224	

Tabela 7-27: Vpliv genotipa polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih

Neatopijski astmatiki	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
n	TI	14	28	18		
Povprečje (± s. d.)		90,07 (5,24)	90,07 (8,17)	84,67 (7,48)		
p-vrednost		<b>0,036</b>			0,456	<b>0,010</b>
n	FEV1	14	28	18		
Povprečje (± s. d.)		92,86 (11,86)	87,00 (14,69)	90,44 (12,37)		
p-vrednost		0,380			0,258	0,691
n	logPC <sub>20</sub>	14	28	18		
Povprečje (± s. d.)		-0,14 (0,49)	-0,25 (0,58)	-0,22 (0,57)		
p-vrednost		0,890			0,630	0,840
n	FeNO	10	22	16		
Povprečje (± s. d.)		14,40 (8,32)	29,73 (29,19)	26,50 (18,34)		
p-vrednost		0,344			0,161	0,387
n	Cel IgE	7	13	4		
Povprečje (± s. d.)		141,86 (147,28)	264,69 (246,37)	56,00 (48,25)		
p-vrednost		0,159			0,494	0,135
n	Eozinofilci	6	12	3		
Povprečje (± s. d.)		339,67 (222,69)	348,00 (207,28)	524,00 (449,37)		
p-vrednost		0,928			0,791	0,814

Tabela 7-28: Vpliv alelov polimorfizma rs4534095 na laboratorijske in klinične parametre pri neatopijskih astmatikih

Neatopijski astmatiki	Parametri	C	T
n	TI		
Povprečje (± s. d.)		90,07 (6,86)	87,03 (8,23)

p-vrednost		<b>0,034</b>	
n	FEV1		
Povprečje (± s. d.)		89,93 (13,67)	88,94 (13,54)
p-vrednost		0,736	
n	logPC <sub>20</sub>		
Povprečje (± s. d.)		-0,19 (0,54)	-0,23 (0,58)
p-vrednost		0,674	
n	FeNO		
Povprečje (± s. d.)		22,46 (23,19)	27,81 (23,43)
p-vrednost		0,160	
n	Cel IgE		
Povprečje (± s. d.)		201,00 (210,33)	185,19 (220,75)
p-vrednost		0,724	
n	Eozinofilci		
Povprečje (± s. d.)		343,83 (215,16)	406,67 (320,67)
p-vrednost		0,722	

Tabela 7-29: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip

	ICS	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
Astmatici	n	dTI	37	64	34		
	Povprečje (± s. d.)		2,81 (6,93)	3,11 (5,85)	2,82 (8,74)		
	p-vrednost		0,831			0,853	0,546
	n	dFEV1	36	64	34		
	Povprečje (± s. d.)		2,97 (11,19)	9,52 (13,12)	7,35 (10,38)		
	p-vrednost		0,310			<b>0,013</b>	0,925
Atopijski astmatiki	n	dTI	29	45	25		
	Povprečje (± s. d.)		3,14 (7,45)	3,82 (5,33)	2,52 (9,47)		
	p-vrednost		0,482			0,761	0,231
	n	dFEV1	28	45	25		
	Povprečje (± s. d.)		3,68 (11,5)	9,64 (11,73)	8,40 (11,10)		
	p-vrednost		0,123			<b>0,046</b>	0,763

Neatopijski astmatiki	n	dTI					
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()	()		
	p- vrednost		0,879			0,808	0,751
	n	dFEV1					
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()	()		
	p- vrednost		0,144			0,051	0,588

Tabela 7-30: Vpliv zdravljenja s kortikosteroidi na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip

	ICS	Parametri	C	T
Astmatiki	n	dTI		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,625	
	n	dFEV1		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,104	
Atopijski astmatiki	n	dTI		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,350	
	n	dFEV1		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,144	
Neatopijski astmatiki	n	dTI		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,966	
	n	dFEV1		
	Povprečje ( $\pm$ s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,316	

Tabela 7-31: Vpliv zdravljenja z antilevketrieni na klinični parameter FEV1 glede na genotip in fenotip

	LTRA	Parametri	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
Astmatiki	n	dTI	17	35	19		
	Povprečje (± s. d.)		1,41 (6,13)	-0,54 (4,20)	3,00 (5,05)		
	p- vrednost		<b>0,033</b>			0,651	<b>0,023</b>
	n	dFEV1	17	34	19		
	Povprečje (± s. d.)		-0,47 (10,79)	1,06 (6,27)	-0,79 (6,94)		
	p- vrednost		0,750			0,758	0,587
Atopijski astmatiki	n	dTI					
	Povprečje (± s. d.)		()	()	()		
	p- vrednost		0,063			0,080	0,328
	n	dFEV1					
	Povprečje (± s. d.)		()	()	()		
	p- vrednost		0,999			0,833	0,921
Neatopijski astmatiki	n	dTI					
	Povprečje (± s. d.)		()	()	()		
	p- vrednost		0,057			0,061	0,064
	n	dFEV1					
	Povprečje (± s. d.)		()	()	()		
	p- vrednost		0,503			0,717	0,397

Tabela 7-32: Vpliv zdravljenja z antilevkotrieni na klinični parameter FEV1 glede na alel in fenotip

	LTRA	Parametri	C	T
Astmatiki	n	dTI		
	Povprečje (± s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,250	
	n	dFEV1		
	Povprečje (± s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,877	
Atopijski astmatiki	n	dTI		
	Povprečje (± s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,626	
	n	dFEV1		
	Povprečje (± s. d.)		()	()
	p-vrednost		0,965	
Neatopijski astmatiki	n	dTI		
	Povprečje (± s. d.)		-0,10 (3,40)	3,47 (5,81)
	p-vrednost		<b>0,009</b>	
	n	dFEV1		
	Povprečje (± s. d.)		1,40 (9,53)	0,60 (8,00)
	p-vrednost		0,764	

Tabela 7-33: Povezava med genotipom polimorfizma rs4534095 in izražanjem gena TRIM35 v odvisnosti od fenotipa

eQTL	TRIM35	CC	CT	TT	CC/CT+TT	CC+CT/TT
Kontrole	n	17	34	15		
	Mediana	1,20	1,18	1,10		
	p-vrednost	0,551*			0,981	0,316
Astma	n	58	99	51		
	Mediana	0,89	0,95	0,88		
	p-vrednost	0,653*			0,685	0,291
Atopijska astma	n	42	71	30		
	Mediana	0,89	0,92	0,83		
	p-vrednost	0,424*				
Neatopijska astma	n	12	25	18	0,993	0,238
	Mediana	0,83	0,96	0,84		
	p-vrednost	0,884*			0,451	0,464

\* P-VREDNOST MED OBEMA HOMOZIGOTOMA

Tabela 7-34: Povezava med alelom polimorfizma rs4534095 in izražanjem gena TRIM35 v odvisnosti od fenotipa

eQTL		C	T
Kontrole	n	68	64
	Mediana (±IQR)	1,201	1,135
	p-vrednost	0,542	
Astma	n	215	201
	Mediana (±IQR)	0,931	0,911
	p-vrednost	0,700	
Atopijska astma	n	155	131
	Mediana (±IQR)	0,919	0,951
	p-vrednost	0,491	
Neatopijska astma	n	49	61
	Mediana (±IQR)	0,937	0,953
	p-vrednost	0,952	

## 7.2 PRILOGE ZA GENSKO EKSPRESIJO

Tabela 7-35: Primerjava ekspresije gena EPHX2 in TRIM35 s kontrolami

Fenotip		EPHX2		TRIM35	
Vsi astmatiki	p-vrednost	<b>0,033</b>		0,070	
	Mediana	0,906	1,034	0,918	1,046
Atopijski astmatiki	p-vrednost	<b>0,013</b>		<b>0,008</b>	
	Mediana	0,868	1,034	0,880	1,046
Neatopijski astmatiki	p-vrednost	0,079		0,519	
	Mediana	0,912	1,034	0,949	1,046

Tabela 7-36: Primerjava ekspresije gena EPHX2 in TRIM35 s kliničnimi parametri pred zdravljenjem

Fenotip	Parametri	EPHX2		TRIM35	
		p-vrednost	r	p-vrednost	r
Vsi astmatiki	TI	0,585	0,033	0,400	-0,050
Atopijski astmatiki		0,746	0,024	0,814	-0,017
Neatopijski astmatiki		0,797	0,029	0,118	0,029
Vsi astmatiki	FEV1	0,169	-0,082	0,838	0,012
Atopijski astmatiki		0,438	0,057	0,074	0,129
Neatopijski astmatiki		0,888	0,016	0,674	0,047
Vsi astmatiki	logPC <sub>20</sub>	0,200	-0,077	<b>0,035</b>	-0,125
Atopijski astmatiki		0,150	-0,106	<b>0,007</b>	-0,194
Neatopijski astmatiki		0,608	0,058	0,739	0,037
Vsi astmatiki	FeNO	0,717	-0,025	0,785	-0,018
Atopijski astmatiki		0,897	0,011	0,899	-0,011
Neatopijski astmatiki		0,689	-0,051	0,290	0,132
Vsi astmatiki	Cel IgE	0,606	0,050	0,249	0,111
Atopijski astmatiki		0,536	0,073	0,076	0,205
Neatopijski astmatiki		0,941	-0,015	0,524	0,128
Vsi astmatiki	Eozinofilci	0,152	-0,139	0,930	-0,009
Atopijski astmatiki		0,162	-0,162	0,696	0,045
Neatopijski astmatiki		0,566	-0,118	0,846	-0,040

Tabela 7-37: Primerjava ekspresije gena EPHX2 s kliničnima parametroma po terapiji

Fenotip	Parametri	EPHX2		TRIM35	
		p-vrednost	r	p-vrednost	R
Vsi astmatiki	$\Delta$ TI	0,622	-0,029	0,911	0,006
Atopijski astmatiki		0,368	-0,064	0,754	-0,022
Neatopijski astmatiki		0,620	0,055	0,555	0,064
Vsi astmatiki	$\Delta$ FEV1	0,289	0,062	0,512	0,038
Atopijski astmatiki		0,643	0,033	0,487	0,049
Neatopijski astmatiki		0,325	0,108	0,910	-0,012

Tabela 7-38: Ekspresija gena EPHX2 in TRIM35 po zdravljenju s kortikosteroidi

Fenotip		EPHX2	TRIM35
Vsi astmatiki	n	236	239
	p-vrednost	0,467	0,527
	Mediana	0,93	0,92
Atopijski astmatiki	n	162	165
	p-vrednost	0,313	0,830
	Mediana	0,89	0,88
Neatopijski astmatiki	n	61	61
	p-vrednost	0,678	0,415
	Mediana	0,99	0,95

Tabela 7-39: Ekspresija gena EPHX2 s kliničnimi parametri po terapiji s kortikosteroidi

Fenotip	Parametra	EPHX2		TRIM35	
		p-vrednost	r	p-vrednost	r
Vsi astmatiki	$\Delta$ TI	0,510	-0,048	0,576	-0,041
Atopijski		0,424	-0,070	0,749	-0,028
Neatopijski		0,900	-0,019	0,538	-0,092
Vsi astmatiki	$\Delta$ FEV1	0,779	0,021	0,695	0,029
Atopijski		0,918	0,009	0,311	0,089
Neatopijski		0,453	-0,112	0,378	-0,132

Tabela 7-40: Ekspresija gena EPHX2 po zdravljenju z antilevkotrieni

Fenotip		EPHX2	TRIM35
Vsi astmatiki	n	202	207
	p-vrednost	0,533	0,078
	Mediana	0,84	0,95



Atopijski astmatiki	n	130	133
	p-vrednost	0,780	0,375
	Mediana	0,84	0,95
Neatopijski astmatiki	n	68	70
	p-vrednost	0,467	0,079
	Mediana	0,86	0,95

Tabela 7-41: Primerjava ekspresije gena EPHX2 s kliničnimi parametri po terapiji z antilevkotrieni

Fenotip	Parametra	EPHX2		TRIM35	
		p-vrednost	r	p-vrednost	r
Vsi astmatiki	$\Delta$ TI	0,674	-0,042	0,305	0,100
Atopijski		0,316	-0,127	0,725	0,043
Neatopijski		0,851	-0,033	0,431	0,133
Vsi astmatiki	$\Delta$ FEV1	0,576	0,056	0,613	0,050
Atopijski		0,619	-0,064	0,622	-0,061
Neatopijski		0,442	0,132	0,704	0,065