



**UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET**



Milena R. Despotović

**POLIMORFIZMI GENA UKLJUČENIH U
INFLAMATORNE, ANTIOKSIDATIVNE I
IMUNOREGULATORNE PROCESSE KOD OBOLELIH OD
BRONHIJALNE ASTME**

Doktorska disertacija

Niš, 2015



**UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF MEDICINE**



Milena R. Despotović

**POLYMORPHISMS IN GENES INVOLVED IN
INFLAMMATORY, ANTIOXIDATIVE AND
IMMUNOMODULATION PROCESSES IN PATIENTS
WITH BRONCHIAL ASTHMA**

Doctoral dissertation

Niš, 2015

PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

MENTOR

Dr Tatjana Jevtović Stoimenov

Vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Dušica Pavlović

Redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Dr Ivana Stanković

Redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Dr Tatjana Mitrović

Redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu

Dr Jelena Bašić

Docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Doktorska disertacija *Polimorfizmi gena uključenih u inflamatorne, antioksidativne i imunoregulatorne procese kod obolelih od bronhijalne astme* je rezultat višegodišnjeg istraživanja koje je sprovedeno u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije *Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije* (III41018).

Ovom prilikom želela bih da se najiskrenije zahvalim svima koji su pomogli da se ovo istraživanje ostvari i da rezultati budu uobličeni u doktorsku disertaciju. Najveću zahvalnost za ukazano poverenje, nesebičnu pomoć i podršku tokom izrade disertacije dugujem svom mentoru prof. dr Tatjani Jevtović Stoimenov, koja me je pažljivo vodila kroz rad, uvek bila na raspolaganju i dala nemerljiv doprinos svim fazama istraživanja.

Zahvaljujem se i:

- prof. dr Dušici Pavlović, rukovodiocu projekta u okviru koga je realizovana doktorska disertacija, na ukazanom poverenju, sugestijama i korisnim primedbama prilikom izrade doktorske disertacije i objavljivanja rezultata istraživanja;
- prof. dr Ivani Stanković na saradnji, pomoći pri odabiru ispitanika uključenih u istraživanje, sugestijama i savetima;
- profesorima i kolegama sa Katedre za biohemiju na pomoći i podršci;
- Slavoljubu Živanoviću, dipl.inž.hem. na saradnji i pomoći pri određivanju koncentracije vitamina D;
- kolegama iz Laboratorije za funkcionalnu genomiku i proteomiku na dobrom druženju i lepim trenucima provedenim u laboratoriji.

Za sugestije i jezičke korekcije veliku zahvalnost dugujem Ani Marinković, diplomiranom filologu za srpski jezik i književnost.

Na kraju, neizmernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, sestri, bratu i suprugu Vladimiru koji su uvek verovali u mene i pružali mi nesebičnu pomoć i podršku.

Milena Despotović

Polimorfizmi gena uključenih u inflamatorne, antioksidativne i imunoregulatorne procese kod obolelih od bronhijalne astme

Rezime

Bronhijalna astma (BA) je hronično, zapaljensko oboljenje disajnih puteva koje nastaje pod uticajem genetskih i faktora spoljašnje sredine. Geni uključeni u procese inflamacije, oksidativnog stresa i imunomodulacije mogu biti značajni faktori u patogenezi bronhijalne astme.

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita povezanost polimorfizama jednog nukleotida gena za faktor nekroze tumora- α (TNF- α , rs1800629), enzime antioksidativne zaštite, katalazu (CAT, rs7943316) i mangan-superoksid-dizmunazu (MnSOD, rs4880), i receptor vitamina D (VDR, rs2228570 i rs1544410) u BA, njihov udruženi efekat na pojavu BA, kao i da se proceni rizik za nastanak bolesti u prisustvu heterozigotnih i homozigotnih mutiranih genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama. Takođe, cilj je bio da se utvrdi uticaj polimorfizama gena za VDR na koncentraciju 25(OH)D₃ kod obolelih od BA.

U studiju je bilo uključeno 79 pacijenata obolelih od BA i 95 zdravih ispitanika. Polimorfizmi su određivani primenom PCR-RFLP metode, dok je koncentracija 25(OH)D₃ merena metodom na HPLC-u. Udruženi efekat ispitivanih polimorfizama na pojavu BA utvrđivan je primenom MDR programskog paketa.

Dobijeni rezultati pokazuju da su genotipovi sa mutiranim Val alelom ($p=0,001$), kao i Val alel rs4880 polimorfizma ($p=0,001$) značajno češći kod obolelih od BA u poređenju sa zdravim ispitanicima i da je rizik za razvoj bolesti 2,7 puta veći kod nosilaca AlaVal i 5,9 puta kod nosilaca ValVal genotipa rs4880 polimorfizma gena za MnSOD u poređenju sa nosiocima AlaAla genotipa. Takođe, Val alel nosi 2,2 puta veći rizik za razvoj BA u poređenju sa Ala alelom. Raspodela genotipova i alela rs1800629, rs7943316 i rs1544410 polimorfizama ne pokazuje značajne razlike između obolelih od BA i ispitanika kontrolne grupe ($p>0,05$).

Genotip FF ($p=0,004$) i F alel ($p=0,001$) rs2228570 polimorfizma gena za VDR značajno su češći kod zdravih ispitanika u odnosu na obolele od BA. Takođe, fb

haplotip ($p=0,009$) i FfBb diplotip ($p=0,018$) značajno su češći kod obolelih od BA u odnosu na kontrolnu grupu. Nosioци FF genotipa imaju 5,3 puta, a nosioци F alela 2,3 puta manji rizik za oboljevanje od BA u odnosu na nosioce ff genotipa, odnosno f alela rs2228570 polimorfizma gena za VDR. Takođe, nosioци Fb i FB haplotipova ispitivanih polimorfizama gena za VDR imaju oko 2 puta manji rizik za razvoj BA u poređenju sa nosiocima fb haplotipa.

Koncentracija 25(OH)D₃ ne pokazuje značajne razlike između obolelih od BA i zdravih ispitanika, kao ni između nosilaca odgređenih genotipova rs2228570 i rs7943316 polimorfizama ($p>0,05$).

Uzajamna interakcija za model sa tri polimorfizma (rs7943316, rs4880, rs1544410) pokazuje da rs1544410 polimorfizam ima pozitivan (sinergistički) efekat interakcije sa rs794336 polimorfizmom, dok između rs1544410 i rs4880, kao i između rs4880 i rs794336 polimorfizama, postoji negativan (redundantni) efekat interakcije. Uzajamna interakcija za model sa pet polimorfizama (rs1800629, rs7943316, rs4880, rs2228570, rs1544410) pokazuje redundantni efekat rs2228570 sa svim ostalim polimorfizmima u modelu.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se rs4880 polimorfizam gena za MnSOD i rs2228570 gena za receptor vitamina D mogu dovesti u vezu sa BA. Prisustvo Val alela rs4880 polimorfizma udruženo je sa pojavom bolesti i većim rizikom za oboljevanje od BA, dok F alel rs2228570 polimorfizma ispoljava zaštitni efekat na pojavu BA i udružen je sa značajno manjim rizičkom za razvoj bolesti.

Ključne reči: bronhijalna astma, polimorfizmi jednog nukleotida, TNF- α , katalaza, MnSOD, receptor vitamina D

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK: 616.248

Polymorphisms in genes involved in inflammatory, antioxidative and immunomodulation processes in patients with bronchial asthma

Abstract

Bronchial asthma (BA) is a chronic, inflammatory disease of the airways that is caused by the influence of genetic and environmental factors. Genes involved in inflammation, oxidative stress and immunomodulation might be important factors in BA pathogenesis.

The aim of the PhD thesis was to examine the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of tumor necrosis factor- α (TNF- α , rs1800629), antioxidative enzymes, catalase (CAT, rs7943316) and manganese superoxide dismutase (MnSOD, rs4880), and vitamin D receptor (VDR, rs2228570 and rs1544410) in BA, as well as their mutual influence on BA onset. Furthermore, the risk for BA development in the presence of minor alleles and heterozygous and homozygous genotypes containing minor allele was determined. The influence of VDR gene SNPs on 25(OH)D₃ blood levels was determined, as well.

Total of 79 patients with BA and 95 healthy controls were involved in this study. SNPs were determined using PCR-RFLP method, while 25(OH)D₃ concentration was measured using HPLC method. Mutual influence of studied SNPs was determined using MDR software.

Obtained results show that Val allele of rs4880 SNP ($p=0.001$) and genotypes containing Val allele ($p=0.001$) have significantly higher prevalence in BA patients compared to healthy controls. Carriers of AlaVal and ValVal genotypes have 2.7- and 5.9- fold respectively higher risk for BA development compared to the carriers of AlaAla genotype. Val allele is associated with 2.2-fold higher risk for BA compared to Ala allele.

Genotype FF ($p=0.004$) and F allele ($p=0.001$) of the rs2228570 are significantly higher in healthy controls compared to patients with BA. Moreover, fb haplotype ($p=0.009$) and FfBb diplotype ($p=0.018$) have significantly higher prevalence in patients compared to controls. Carriers of FF genotype and F allele have 5.3-fold and

2.3-fold lower risk for asthma development compared to the carriers of ff genotype and f allele of rs2228570 SNP. Moreover, carriers of Fb and FB haplotypes have 2-fold lower risk for BA compared to the carriers of fb haplotype.

25(OH)D₃ levels are not significantly different between patients with BA and healthy subjects, as well as between the carriers of the certain genotypes of rs2228570 and rs7943316 ($p>0.05$).

Mutual interaction for the model with 3 SNPs (rs7943316, rs4880, rs1544410) shows that rs1544410 has positive (synergistic) interaction effect with rs1544410, while negative (redundant) interaction effect is obtained between rs1544410 and rs4880, as well as between rs4880 and rs7943316. Mutual interaction for the model with 5 SNPs (rs1800629, rs7943316, rs4880, rs2228570, rs1544410) shows redundant effect of rs2228570 with all other SNPs.

In conclusion, rs4880 of MnSOD gene and rs2228570 of VDR gene are associated with BA. Presence of rs4880 Val allele is associated with BA and increased risk for disease development. Allele F of rs2228570 SNP has protective effect on BA development and it is associated with the lower risk of asthma development.

Key words: bronchial asthma, single nucleotide polymorphism, TNF- α , catalase, MnSOD, vitamin D receptor

Scientific field: Medicine

Narrow scientific field: Biochemistry

UDC: 616.248

SADRŽAJ

LISTA SKRAĆENICA	I
SPISAK SLIKA	IV
SPISAK TABELA	V
SPISAK GRAFIKONA.....	VII
1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Bronhijalna astma	3
2.1.1. Definicija i podela.....	3
2.1.2. Patogeneza bronhijalne astme	4
2.2. Citokini.....	7
2.2.1. Faktor nekroze tumora alfa	9
2.2.1.1. Biološki efekti faktora nekroze tumora alfa	9
2.2.1.2. Faktor nekroze tumora alfa u bronhijalnoj astmi	12
2.3. Reaktivne vrste kiseonika.....	13
2.3.1. Reaktivne vrste kiseonika i bronhijalna astma	14
2.3.2. Antioksidativna zaštita.....	16
2.3.2.1. Katalaza	16
2.3.2.2. Superoksid-dizmutaza	17
2.4. Vitamin D	18
2.4.1. Struktura i metabolizam vitamina D	18
2.4.2. Receptor vitamina D	20
2.4.3. Imunomodulatorni efekti vitamina D.....	22
2.4.4. Status vitamina D i bronhijalna astma	24

2.5.	Polimorfizmi gena.....	25
2.5.1.	Polimorfizam gena za TNF- α (rs1800629)	27
2.5.2.	Polimorfizmi gena za enzime antioksidativne zaštite	28
2.5.2.1.	Polimorfizam gena za katalazu (rs7943316)	28
2.5.2.2.	Polimorfizam gena za mangan-superoksid-dizmutazu (rs4880).....	29
2.5.3.	Polimorfizmi gena za receptor vitamina D (rs2228570 i rs1544410)	30
2.6.	SNP-SNP interakcije.....	31
3.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	33
4.	ISPITANICI I METODE.....	34
4.1.	Ispitanici	34
4.2.	Metode.....	34
4.2.1.	Izdvajanje plazme	34
4.2.2.	Izolacija DNK.....	35
4.2.3.	Lančana reakcije polimerizacije	35
4.2.4.	Elektroforeza na agaroznom gelu	36
4.2.5.	Određivanje dužine restrikcionih fragmenata	37
4.2.6.	Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)	37
4.2.7.	Analiza fragmenata dobijenih PCR-RFLP metodom	38
4.2.8.	Merenje koncentracije 25-hidroksi vitamina D ₃	40
4.3.	Statistička obrada podataka	41
5.	REZULTATI.....	43
5.1.	Analiza rs1800629 polimorfizma gena za TNF- α	43
5.2.	Analiza polimorfizama gena za enzime antioksidativne zaštite	44
5.2.1.	Polimorfizam rs7943316 gena za katalazu.....	44
5.2.2.	Analiza rs4880 polimorfizma gena za mangan-superoksid-dizmutazu	45
5.3.	Analiza polimorfizama gena za receptor vitamina D	47

5.3.1. Polimorfizam rs2228570	47
5.3.2. Polimorfizam rs1544410	49
5.3.3. Analiza haplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za receptor vitamina D	50
5.3.4. Analiza diplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za receptor vitamina D	51
5.4. Procena rizika za oboljevanje od bronhijalne astme u odnosu na ispitivane polimorfizme.....	52
5.5. SNP–SNP interakcije	55
5.6. Koncentracija 25-hidroksi vitamina D ₃ u plazmi	58
5.6.1 Koncentracija 25-hidroksi vitamina D ₃ u odnosu na polimorfizme gena za VDR.....	58
6. DISKUSIJA	60
6.1. Polimorfizam rs1800629 gena za TNF- α	60
6.2. Polimorfizmi gena za enzime antioksidativne zaštite	62
6.2.1. Polimorfizam rs7943316 gena za katalazu.....	63
6.2.2. Polimorfizam rs4880 gena za mangan-superoksid-dizmutazu.....	64
6.3. Polimorfizmi gena za receptor vitamina D	66
6.3.1. Polimorfizam rs2228570	66
6.3.2. Polimorfizam 1544410.....	68
6.4. Status vitamina D.....	69
6.5. SNP–SNP interakcije	71
7. ZAKLJUČAK	73
8. LITERATURA.....	75
BIOGRAFIJA	92
PRILOZI.....	93

LISTA SKRAĆENICA

1,25(OH) ₂ D	- 1,25-dihidroksi oblik vitamina D
¹ O ₂	- singletni kiseonik
25(OH)D	- 25-hidroksi oblik vitamina D
A	- adenine
APS	- amonijumpersulfat
BA	- bronhijalna astma
C	- citozin
CI	- interval poverenja (engl. Confidence Interval)
Co-Act	- koaktivator
CuZnSOD	- bakar-cink zavisna superoksid-dizmutaza
CVC	- konzistentnost unakrsne validacije (engl. Cross-Validation Consistency)
CYP	- citohrom P450
DBD	- DNK-vezujući domen (engl. DNA Binding Domain)
DD	- domen smrti (engl. Death Domain)
DRIP	- VDR-interreagujući protein (engl. VDR-Interacting Protein)
ERK	- kinaze čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima (engl. Extracellular Signal Regulated Kinase)
FADD	- domen smrti koji se pridružuje Fas receptoru (engl. Fas Associated Death Domain)
FasL	- Fas ligand
FeSOD	- gvožđe zavisna superoksid-dizmutaza
FGF23	- faktor rasta fibroblasta 23 (engl. Fibroblast Growth Factor 23)
G	- guanine
GINA	- Globalna inicijativa za astmu
GPx	- glutation-peroksidaza
GWAS	- genomske studije asocijacije (engl. Genome Wide Association Studies)
H ₂ O ₂	- vodonik peroksid
HO ^{2•}	- hidroperoksil
HOCl	- hipohlorasta kiselina
HPLC	- tačna hromatografija visokih performansi (engl. High-Performance Liquid Chromatography)

ICAM-1	- unutarćelijski adhezioni molekul 1 (engl. Intercellular Adhesion Molecule 1)
IFN- γ	- interferon- γ
Ig	- imunoglobulin
IKK	- I κ B kinazni kompleks (engl. I κ B Kinase)
IL	- interleukin
I κ B α	- inhibitor NF- κ B (engl. Inhibitor of NF- κ B α)
JNK	- c-Jun-N-terminalne kinaze
LBD	- ligand-vezujući domen (engl. Ligand Binding Domain)
LPS	- lipopolisaharid
LTB ₄	- leukotrien B ₄
LTC	- cisteinil leukotrieni
MAF	- učestalost retkog alela (engl. Minor Allele Frequency)
MDR metoda	- metoda smanjenja dimenzionalnosti (engl. Multifactor-Dimensionality Reduction)
MEKK1	- MAP/ERK kinaze kinaza 1
MHC	- glavni histokompatibilni kompleksa (engl. Major Histocompatibility Complex)
MKK	- MAP kinaze kinaza 7
MMP-9	- matriks-metaloproteinaze-9
MnSOD	- mangan zavisna superoksid-dizmutaza
NADPH	- nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NCoR	- korepresor jedarnog receptora (engl. Nuclear Receptor Co-repressor)
NF- κ B	- nuklearni faktor kapa B
NK ćelije	- ćelije prirodne ubice
O ₂ ^{•-}	- superoksidni anjon
O ₃	- ozon
OH [•]	- hidroksilni radikal
OR	- unakrsni odnos šansi (engl. Odds Ratio)
p38MAPK	- p38 mitogenom-aktivirane protein kinaze (engl. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase)
PgD ₂	- prostaglandin D ₂
PPAR γ	- gama receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (engl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)
PTH	- paratireoidni hormone
RAC3	- receptorom aktivirani koaktivator 3 (engl. Receptor-Aactivated Co-activators-3)
RIP1	- receptor interagujućeg proteina 1 (engl. Receptor-Interacting Protein 1)
RO [•]	- alkoksil radikal
RO ^{2•}	- peroksil radikal

Rs	- rs broj (engl. reference SNP, rs)
RVK	- reaktivne vrste kiseonika
RXR	- VDR-retinoični X receptor (engl. Retinoid X Receptor)
SNP	- polimorfizam jednog nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism)
SOD	- superoksid-dizmutaza
SODD	- utišavač domena smrti (engl. Silencer of Death Domain)
SRC-1	- koaktivatori steroidnog receptora 1 (engl. Steroid Receptor Co-activators - 1)
sTNFR	- solubilni TNF- α receptor
sTNF- α	- solubilna forma TNF- α
T	- timin
TACE	- TNF- α konvertujući enzim (engl. TNF- α Converting Enzyme)
TAK1	- transformišućim faktorom rasta β aktivirana kinaza 1 (engl. TGF- β Activated Kinase 1)
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin
TFIIB	- transkripcioni faktor II B
TIF2	- transkripcioni intermedijerni faktor 2 (engl. Transcriptional Intermediary Factor 2)
TNFR	- receptor faktora nekroze tumora (engl. TNF Receptor)
TNF- α	- faktor nekroze tumora alfa (engl. Tumor Necrosis Factor- α)
TRADD	- domen smrti vezan za TNFR1 (engl. TNFR1-Associated Death Domain Protein)
TRAF2	- TNF receptoru pridruženi faktor 2 (engl. TNF-Receptor-Associated Factor 2)
TSLP	- timusni stromalni limfopetin
VCAM-1	- vaskularni adhezioni molekul 1 (engl. Vascular Adhesion Molecule 1)
VDBP	- vitamin D vezujući protein (engl. Vitamin D Binding Protein)
VDR	- receptor vitamina D (engl. Vitamin D Receptor)
VDRE	- elementi koji odgovaraju na vitamin D (engl. Vitamin D Response Elements)

SPISAK SLIKA

Slika 1. Patogeneza atopijske bronhijalne astme.....	5
Slika 2. Signalni putevi posredovani receptorima faktora nekroze tumora	11
Slika 3. Struktura i aktivacija NADPH oksidaze.....	15
Slika 4. Kvaternarna struktura i struktura aktivnog centra MnSOD.....	18
Slika 5. Struktura vitamina D ₂ i D ₃	18
Slika 6. Struktura VDR.....	20
Slika 7. Mehanizam delovanja 1,25(OH) ₂ D ₃	22
Slika 8. Efekti vitamina D u imunskom sistemu	23
Slika 9. Polimorfizam jednog nukleotida.....	26
Slika 10. TNF- α gen	28
Slika 11. VDR gen i lokalizacija najčešćih polimorfizama jednog nukleotida	30
Slika 12. Poliakrilamidna gel elektroforeza za TNF- α rs1800629 polimorfizam	38
Slika 13. Poliakrilamidna gel elektroforeza za MnSOD rs4880 polimorfizam.....	39
Slika 14. Poliakrilamidna gel elektroforeza za VDR rs2228570 polimorfizam	40
Slika 15. Poliakrilamidna gel elektroforeza za VDR rs1544410 polimorfizam	40
Slika 16. Dijagram SNP–SNP interakcije za model sa tri polimorfizma	56
Slika 17. Dijagram SNP–SNP interakcije za model sa pet polimorfizama	56
Slika 18. Raspodela genotipova visokog i niskog rizika za najbolji model interakcije dva SNP-a	57
Slika 19. Raspodela genotipova visokog i niskog rizika za najbolji model interakcije tri SNP-a	57

SPISAK TABELA

Tabela 1. Sastav reakcione smeše za lančanu reakciju polimerizacije	35
Tabela 2. Sekvence prajmera korišćenih za određivanje genskih polimorfizama	35
Tabela 3. Uslovi odvijanja lančane reakcije polimerizacije.....	36
Tabela 4. Restrikcioni enzimi korišćeni za određivanje ispitivanih polimorfizama	37
Tabela 5. Aleli i veličina odgovarajućih restrikcioniha fragmenata za ispitivane polimorfizme .	38
Tabela 6. Raspodela genotipova i alela rs1800629 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi.....	43
Tabela 7. Raspodela genotipova rs1800629 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	43
Tabela 8. Raspodela alela rs1800629 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	44
Tabela 9. Raspodela genotipova i alela rs7943316 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi.....	44
Tabela 10. Raspodela genotipova rs7943316 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	45
Tabela 11. Raspodela alela rs7943316 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	45
Tabela 12. Raspodela genotipova i alela rs4880 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi.....	46
Tabela 13. Raspodela genotipova rs4880 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi ..	46
Tabela 14. Raspodela alela rs4880 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	47
Tabela 15. Raspodela genotipova i alela rs2228570 polimorfizma gena za VDR u BA i kontrolnoj grupi.....	47
Tabela 16. Raspodela genotipova rs2228570 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	48
Tabela 17. Raspodela alela rs2228570 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	48
Tabela 18. Raspodela genotipova i alela rs1544410 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi.....	49
Tabela 19. Raspodela genotipova rs1544410 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	49
Tabela 20. Raspodela alela rs1544410 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi	50
Tabela 21. Analiza haplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR u BA i kontrolnoj grupi.....	51
Tabela 22. Analiza diplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR u BA i kontrolnoj grupi.....	51
Tabela 23. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na genotip ispitivanih polimorfizama	52
Tabela 24. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na alele ispitivanih polimorfizama	53

Tabela 25. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na haplotipove ispitivanih polimorfizama gena za VDR	53
Tabela 26. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na diplotipove ispitivanih polimorfizama gena za VDR	54
Tabela 27. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na pol i alele ispitivanih polimorfizama	54
Tabela 28. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na pol i genotip ispitivanih polimorfizama ..	55
Tabela 29. Rezultati MDR analize za SNP–SNP interakcije	55

SPISAK GRAFIKONA

Grafikon 1. Raspodela haplotipova na genu za VDR	50
Grafikon 2. Koncentracija 25(OH)D ₃ u plazmi kod obolelih od BA i u kontrolnoj grupi	58
Grafikon 3. Koncentracija 25-hidroksi vitamina D ₃ u plazmi kod obolelih od BA i u kontrolnoj grupi u odnosu na rs2228570 polimorfizam gena za VDR	59
Grafikon 4. Koncentracija 25(OH)D ₃ u plazmi kod obolelih od BA i u kontrolnoj grupi u odnosu na rs1544410 polimorfizam gena za VDR	59

1. UVOD

Bronhijalna astma je hronično, zapaljensko oboljenje disajnih puteva koje se karakteriše opstrukcijom disajnih puteva i klinički se manifestuje ponavljanim epizodama kašlja, osećajem nedostatka vazduha, stezanja i zviždanja u grudima. Prema podacima Globalne inicijative za astmu (GINA), procenjuje se da ukupan broj obolelih u svetu iznosi oko 300 miliona. U različitim delovima sveta prevalenca bronhijalne astme kreće se od 1% do 18%, a broj obolelih je u stalnom porastu.

Iako se za bronhijalnu astmu zna od davnina, tačni patogenetski mehanizmi bolesti nisu u potpunosti razjašnjeni. U patogenezi bronhijalne astme, pored faktora spoljašnje sredine, značajnu ulogu imaju i genetski faktori, ali se još uvek sa sigurnošću ne može reći koji su tačno geni odgovorni za nastanak bolesti. Ograničavajući faktor u identifikaciji gena odgovornih za nastanak bolesti jeste i činjenica da povezanost određenih gena sa bolešću u jednoj populaciji najčešće nije primenljiva i na pripadnike druge populacije zbog postojećih etničkih razlika, čime se mogu objasniti kontradiktorni rezultati sprovedenih studija.

Novija istraživanja posvećuju značajnu pažnju ispitivanju polimorfizama jednog nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP), koji predstavljaju najčešće genske varijante u populaciji a nastaju zamenom jedne baze unutar DNK sekvence. Smatra se da je oko 10% svih SNP-ova funkcionalno i da mogu dovesti do promena u biološkim procesima, a ukoliko su lokalizovani unutar promotorskog regiona, mogu imati uticaj na vezivanje transkripcionih faktora i samim tim menjati ekspresiju određenih gena.

Zapaljenje predstavlja jednu od najznačajnijih komponenti u patogenezi bronhijalne astme. Ono je posredovano složenom mrežom citokina, među kojima značajnu ulogu ima i faktor nekroze tumora alfa (TNF- α), koji pripada proinflamatornim citokinima. Polimorfizam rs1800629 nastaje zamenom guanina adeninom na poziciji -308 u promotorskom regionu gena za TNF- α i udružen je sa većom transkripcijom i povećanom sintezom TNF- α . Povećana sinteza TNF- α ne samo

da stimulise epitelne ćelije da stvaraju citokine, povećava ekspresiju adhezionih molekula i deluje kao hemoatraktant za druge zapaljenske ćelije već se dovodi u vezu i sa pojačanim inflamatornim odgovorom na različite oksidativne agense.

Činjenica da su pluća izložena visokom pritisku kiseonika i različitim iritansima spoljašnje sredine, kao i to da imaju veliku površinu i da su bogato prokrvljena, čini ih veoma pogodnim za oštećenja posredovana reaktivnim vrstama kiseonika, što može biti još jedan značajan faktor u patogenezi bronhijalne astme. Polimorfizmi na genima za enzime antioksidativne zaštite (rs4880 na genu za mangan-superoksid-dizmutazu i rs7943316 na genu za katalazu) dovode se u vezu sa smanjenom aktivnošću enzima, što za posledicu ima i smanjenu sposobnost antioksidativne odbrane i pojavu oksidativnog stresa.

Zahvaljujući tome što se CYP27B1, odgovoran za nastanak aktivne forme vitamina D, i receptor vitamina D nalaze i na ćelijama imunskog sistema, vitaminu D se pripisuju i imunomodulatorna svojstva. Njegova uloga u patogenezi bronhijalne astme nije u potpunosti jasna, ali se pretpostavlja da dovoljna koncentracija vitamina D omogućava diferencijaciju naivnih T-limfocita u T-regulatorne limfocite, koji stvaraju interleukin-10, nishodno reguliše dendritične ćelije koje su neophodne za aktivaciju Th2 odgovora, i ima pozitivan uticaj na imunološku funkciju pluća, čime se potencira zaštitni efekat od respiratornih infekcija, koje su česti pokretači astmatičnog odgovora. Polimorfizam rs2228570 na genu za receptor vitamina D utiče na sintezu proteina, dok rs1544410 može imati uticaj na stabilnost iRNK i regulaciju transkripcije gena za receptor vitamina D.

Iako su pojedinačni SNP-ovi značajni indikatori genetske komponente kompleksnih bolesti, oni objašnjavaju samo deo genetskog rizika, zbog čega je od posebnog značaja i ispitivanje mogućeg istovremenog uticaja više različitih SNP-ova na nastanak bolesti. Kako su inflamacija, oksidativni stres i imunomodulacija mogući patogenetski mehanizmi nastanka bronhijalne astme, polimorfizmi jednog nukleotida na genima za TNF- α , enzime antioksidativne zaštite i receptor vitamina D mogli bi imati udruženi efekat u nastanku bronhijalne astme.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Bronhijalna astma

2.1.1. Definicija i podela

Bronhijalna astma (BA) predstavlja hronično, zapaljensko oboljenje disajnih puteva u čijem nastanku značajnu ulogu igraju brojne ćelije i ćelijski elementi. Hronično zapaljenje je udruženo sa bronhijalnom hiperreaktivnošću i opstrukcijom disajnih puteva koja dovodi do ponavljanih epizoda kašlja, osećaja nedostatka vazduha, stezanja i zviždanja u grudima. Opstrukcija disajnih puteva je reverzibilna i povlači se spontano ili nakon primenjene terapije [1].

Bronhijalna hiperreaktivnost se definiše kao povećano sužavanje disajnih puteva nakon provokacije endogenim ili egzogenim faktorima [2].

Prema podacima Globalne inicijative za astmu (GINA), procenjuje se da se ukupan broj obolelih u svetu kreće oko 300 miliona. U različitim delovima sveta prevalenca bronhijalne astme iznosi od 1% do 18%, a broj obolelih je u stalnom porastu [3].

Faktori koji utiču na nastanak i tok BA mogu biti:

1. predisponirajući (atopijska konstitucija i pol);
2. uzročni (alergeni u zatvorenom prostoru, alergeni na otvorenom prostoru, alergeni na radnom mestu, lekovi, aditivi iz hrane);
3. doprinoseći (pušenje, različiti respiratorni iritansi, respiratorne infekcije, dijeta).

Atopija predstavlja predispoziciju za povećanu produkciju imunoglobulina klase E (IgE) nakon izlaganja alergenima spoljašnje sredine i smatra se veoma značajnim faktorom rizika za nastanak BA. Epidemiološki podaci pokazuju da je oko 50% slučajeva BA povezano sa atopijom [4]. Ipak, iako većina pacijenata sa BA ima dokazanu atopiju, značajan broj ima takozvanu „intrinzičnu“ astmu, kod koje ne postoje

znaci atopije (normalan nivo ukupnog i specifičnog IgE u serumu, negativne kožne probe) [5].

Pored podele na „ekstrinzič“ i „intrinzič“ astmu, astma se može klasifikovati i na osnovu faktora koji dovode do napada, i to na klasičnu astmu i specifične oblike astme. U specifične oblike astme ubrajaju se: polenska, aspirinska, profesionalna, psihogena i astma izazvana naporom. Poseban oblik astme predstavlja takozvana kašalj varijanta astme, kod koje je jedini simptom bolesti kašalj koji traje najmanje 3 nedelje, a najčešće je provociran infekcijama gornjih disajnih puteva.

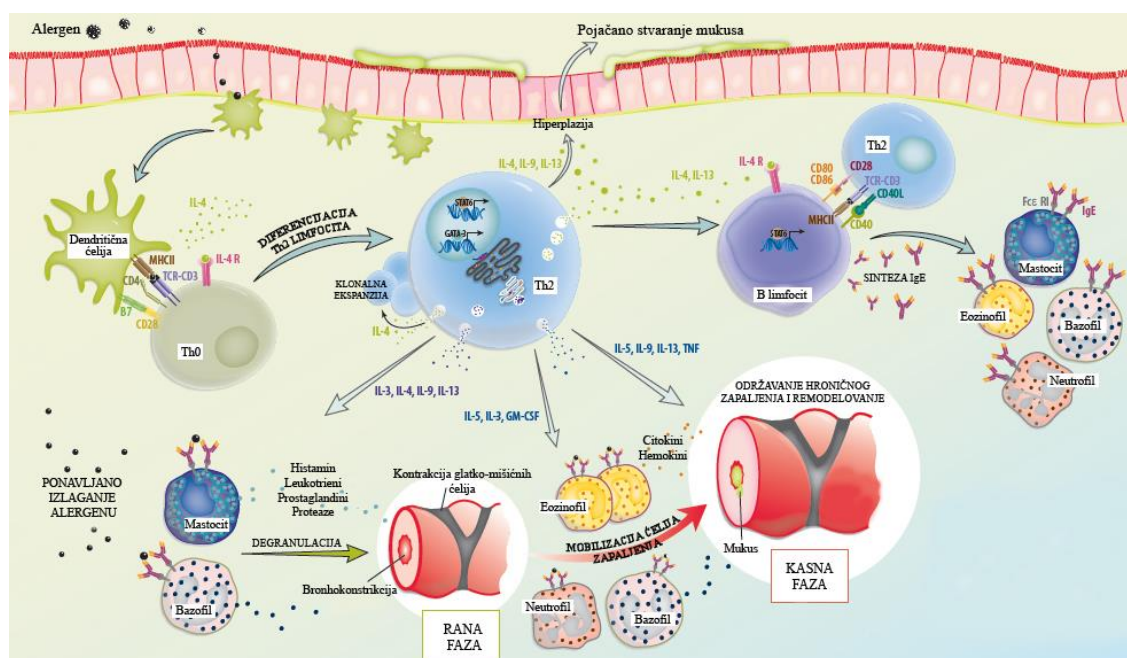
2.1.2. Patogeneza bronhijalne astme

Iako tačni patogenetski mehanizmi nastanka BA do danas nisu u potpunosti razjašnjeni, smatra se da astma nastaje složenom interakcijom genetskih i faktora spoljašnje sredine.

Zapaljenje predstavlja najznačajniju komponentu u patogenezi BA, pokretač je bronhijalne hiperreaktivnosti i opstrukcije i visoko korelira sa ispoljavanjem većine simptoma i patofizioloških promena koje prate ovu bolest. Direktnom bronhoskopijom potvrđeno je prisustvo znakova zapaljenja (crvenilo i otok) u disajnim putevima astmatičara, a u bronhoalveolarnom lavatu dokazan je povećan broj limfocita, mastocita i eozinofila [5]. Ovakve promene prisutne su i kod pacijenata sa lakom formom BA kod kojih se simptomi bolesti samo povremeno ispoljavaju [5]. Zapaljenje u BA ima hronični karakter, a pod uticajem faktora rizika (alergeni, infekcije, fizički napor, aerozagađenje, duvanski dim, emocionalni stres itd.) mogu se javiti akutne epizode pogoršanja bolesti.

Patogeneza atopijske BA prikazana je na slici 1. Jedan od prvih koraka u nastanku atopijske BA jeste senzibilizacija na odgovarajuće alergene i stvaranje alergen-specifičnog T ćelijskog odgovora. Iako je Th2 odgovor karakterističan za atopijsku astmu, T-limfociti ne reaguju direktno na inhalirane alergene, već zahtevaju instrukcije od strane urođenog imunskog sistema. Oni najpre dolaze u kontakt sa dendritičnim ćelijama lokalizovanim u bazalnom sloju epitela, koji u fiziološkim uslovima predstavlja nepropustljivu barijeru. Ipak, neki alergeni mogu menjati propustljivost epitelne barijere, aktivirati epitelne ćelije ili ćelije imunskog sistema [6].

Nakon preuzimanja i obrade antigena dendritične ćelije odlaze do regionalnih limfnih čvorova, gde prezentuju obrađeni antigen T ćelijskom receptoru lokalnih T-limfocita.



Slika 1. Patogeneza atopijske bronhijalne astme

Aktivacija Th2 limfocita dovodi do povećane produkcije citokina interleukina-4 i -13 (IL-4, IL-13) i sazrevanja B limfocita u plazma ćelije, koje preusmeravaju svoju aktivnost sa sinteze IgM i IgG na sintezu IgE antitela. Oslobođena IgE antitela kratko cirkulišu pre nego što se vežu za FcεRI, receptor visokog afiniteta koji se nalazi na površini mastocita i bazofila, ili FcεRII (CD23), receptor niskog afiniteta koji se nalazi na površini limfocita, eozinofila, trombocita i makrofaga [7]. U disajnim putevima astmatičara najveći deo IgE vezuje se za FcεRI mastocita čineći ih vrlo osetljivim na inhalatorne alergene. Inhalacija dovoljne količine alergena dovodi do povezivanja dva IgE molekula vezana za površinu mastocita, što za posledicu ima njihovu degranulaciju. Degranulacija je praćena oslobađanjem biogenih amina (histamina), proteoglikana (heparin i hondroitin sulfat), serin proteaza (triptaze, himaze) i drugih enzima, citokina i faktora rasta. Iz aktiviranih mastocita oslobađaju se i prostaglandini (posebno prostaglandin D₂, PgD₂), leukotrien B₄ (LTB₄ ili CXCL8) i cisteinil leukotrieni (posebno LTC₄). Efekti oslobođenih medijatora su bronhokonstrikcija, vazodilatacija, povećana vaskularna propustljivost i povećano stvaranje mukusa. Time počinje takozvana rana faza astmatičnog odgovora disajnih puteva, koja se maksimalno ispoljava 15 do 30 minuta nakon izlaganja alergenu i traje oko 60 minuta.

Postepeno oslobađanje novosintetisanih citokina, hemokina i faktora rasta iz aktiviranih mastocita dovodi do nakupljanja zapaljenskih ćelija i nastanka kasnog odgovora disajnih puteva, koji se najčešće javlja dva do šest sati nakon izlaganja alergenu i dostiže maksimum nakon šest do devet sati. Ipak, nije u potpunosti razjašnjeno zbog čega se kasni odgovor javlja samo kod 40% do 60% senzibilisanih osoba, kao ni zašto kod određenog broja obolelih nema jasne kliničke granice između kraja rane i početka kasne faze astmatičnog odgovora [8].

Pod uticajem oslobođenih medijatora u disajnim putevima dolazi do nakupljanja eozinofila, CD4⁺ T-imfocita, bazofila i neutrofila. Kada je pokrenuta zapaljenska reakcija ili kasni odgovor, eozinofili postaju glavni medijatori hroničnog zapaljenja u atopijskoj astmi. Aktivirani eozinofili oslobađaju čitav niz različitih molekula (glavni bazični protein, eozinofilnu peroksidazu, RANTES, eotaksin 1 i 2, cisteinil leukotriene i Th2 tip citokina) koji ispoljavaju direktne toksične efekte na respiratorni epitel, dovode do degranulacije mastocita, kontrakcije glatkomišićnih ćelija, deluju kao hemoatraktanti i održavaju zapaljenje posredovano Th2 limfocitima [9]. Elastaza oslobođena iz neutrofila dovodi do aktivacije matriks metaloproteinaza i destrukcije kolagena tip III. Takođe, eozinofili, neutrofili i druge ćelije uključene u zapaljenski odgovor stvaraju i velike količine slobodnih radikala, a posebno superoksidnog anjona i peroksinitrita, što dodatno doprinosi oštećenju tkiva [10].

Ponavljano oštećenje tkiva i mobilizacija ćelija zapaljenja postaju hronični, čak i u odsustvu alergena, omogućavajući održavanje hronične zapaljenske reakcije. Ipak, još uvek nema jasnih podataka o tome da li je zapaljenski proces koji se minimalno klinički ispoljava dovoljan da dovede do progresivnih hroničnih promena na disajnim putevima [10].

Prema Jingu (Ying) i saradnicima, patofiziološke promene u intrinzič astmi su veoma slične onima u atopijskoj astmi i praćene su povećanim lokalnim stvaranjem IgE, koje je verovatno karakteristika same astme, a ne isključivo atopije [11]. Takođe, postoje podaci da je i neatopijska astma praćena pojavom visokih vrednosti ukupnog serumskog IgE [12,13]. Neke kliničke i eksperimentalne studije upućuju na to da u nastanku astme značajnu ulogu imaju i drugi faktori nezavisni od Th2 odgovora. Tome u prilog ide i činjenica da je u plućima obolelih od teškog oblika astme ili astme rezistentne na glikokortikoide dokazano prisustvo Th2 nezavisnih faktora poput interferona- γ (IFN- γ), IL-17 i neutrofila [14]. Terapija glikokortikoidima u ovim

slučajevima najčešće ne daje zadovoljavajuće rezultate, iako se sa uspehom koristi kod atopijskog oblika astme, što dodatno upućuje na mogućnost postojanja različitih patogenetskih mehanizama nastanka bolesti.

Hronično zapaljenje koje karakteriše BA može biti i posledica nedostatka „stop“ signala zapaljenske reakcije [9]. Naime, rezolucija zapaljenja je dinamički proces koji obuhvata eliminaciju stimulusa, nishodnu regulaciju medijatora i uklanjanje apoptotičnih ćelija. Poremećaj ili izostanak ovog procesa onemogućavaju uspostavljanje homeostaze i doprinose daljem oštećenju tkiva i progresiji hroničnog zapaljenja.

Zapaljenski proces u BA dovodi do ponavljanih oštećenja epitela koja su praćena procesima reparacije. Ove procese u BA karakteriše složena unutarćelijska signalizacija između epitelnih ćelija i subepitelnog (mio)fibroblastnog sloja [15]. U ovakvim uslovima promene na epitelu u BA ponašaju se kao „hronična rana“, što je praćeno povećanim oslobađanjem citokina i faktora rasta u cilju njenog „zarastanja“.

Verovatno je da je u BA proces reparacije oštećenog epitela neadekvatan i da se uporedo sa njim odvija i takozvani proces remodelovanja, koji se karakteriše strukturnim promenama u disajnim putevima (narušavanje integriteta epitelnog sloja, istanjenje bazalne membrane, subepitelna fibroza, hiperplazija submukoznih žlezda, peharastih ćelija i glatkomišićnih ćelija, povećana vaskularizacija).

Ovako nastale promene u disajnim putevima astmatičara imaju za posledicu da bronhokonstrikcija dovodi do mnogo izraženijeg suženja lumena u poređenju sa normalnim disajnim putevima. Hronično zapaljenje i remodelovanje koji se javljaju u BA uz neadekvatno lečenje bolesti vremenom dovode do ireverzibilnih promena.

2.2. Citokini

Citokini su signalni proteini, najčešće molekulske mase manje od 80 kDa, koji regulišu različite biološke funkcije uključujući stečenu i urođenu imunost, hematopoezu, proliferaciju, zapaljenje i reparaciju [16]. Svoje biološke efekte ispoljavaju vezivanjem za receptore na ciljnim ćelijama, nakon čega se odvijaju kaskadne reakcije unutarćelijske signalizacije dovodeći do ushodne i/ili nishodne regulacije gena i transkripcionih faktora. Receptori za citokine mogu biti sekretovani kao solubilne (rastvorljive) forme koje nastaju alternativnim splajsingom njihovih

mRNK transkripata ili kao citoplazmatske proksimalne rezidue koje vezuju protein u membrani. Oni mogu da deluju kao agonisti ili antagonisti, ili imaju ulogu transportnih proteina za citokine [17].

U najvećem broju slučajeva citokini ispoljavaju parakrini efekat, mada mogu ispoljavati i autokrini i endokrini efekat.

Ćelije koje učestvuju u zapaljenju sekrecijom citokina i proinflamatornih molekula ostvaruju ključnu ulogu u patogenezi BA. Tip 2 CD4⁺ limfocita (Th2 limfociti) i njihovi citokini dominiraju u lakoj i srednjeteškoj formi alergijske astme, dok tešku, steroid-rezistentnu astmu karakteriše povećana produkcija i Th2 i Th1 citokina [18]. Osim zapaljenskih ćelija, neutrofili, makrofagi i dendritične ćelije, ali i strukturne ćelije poput epitelnih i glatkomišićnih ćelija disajnih puteva, mogu da produkuju citokine, koji se dovode u vezu sa BA. U BA citokini imaju značajnu ulogu ne samo u održavanju hroničnog zapaljenskog procesa u disajnim putevima već su odgovorni i za pokretanje zapaljenske reakcije. Makrofagi disajnih puteva su značajan izvor „prvog talasa“ citokina (IL-1, TNF- α , IL-6) koji se oslobađaju nakon izlaganja inhalacionim alergenima. Dalje, oslobođeni citokini deluju na epitelne ćelije, koje oslobađaju „drugi talas“ citokina (GM-CSF, IL-8, RANTES). Oni pojačavaju zapaljenski odgovor i dovode do nakupljanja sekundarnih ćelija poput eozinofila, koji dalje i sami mogu proizvoditi brojne citokine [17]. Takođe, citokini su u BA odgovorni za regulaciju ekspresije adhezionih molekula, mobilizaciju zapaljenskih ćelija, proliferaciju miofibroblasta i glatkomišićnih ćelija u disajnim putevima i angiogenezu [17].

Imajući u vidu plejotropne efekte citokina i činjenicu da se biološki efekti različitih citokina često preklapaju, veoma je teško izvršiti njihovu klasifikaciju. Uzimajući u obzir karakteristike promena u disajnim putevima u BA i patogenetske mehanizme bolesti, citokini uključeni u BA klasifikovani su u pet grupa: limfokini (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17), proinflamatorni citokini (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-11, GM-CSF), antiinflamatorni citokini (IFN- γ , IL-10, IL-12, IL-18), hemokini (RANTES, IL-8, eotaksin, MCP) i faktori rasta (TGF- β , PDGF, FGF; EGF, IGF) [19].

2.2.1. Faktor nekroze tumora alfa

Faktor nekroze tumora alfa (engl. Tumor Necrosis Factor-alpha, TNF- α) jeste plejotropni, proinflamatorni citokin koji pripada TNF superfamiliji citokina. Otkriće antitumorskog efekta bakterijskog lipopolisaharida (LPS) dovelo je do identifikacije i karakterizacije TNF- α , a dalja istraživanja su pokazala da ima ne samo značajnu ulogu u regulaciji gena odgovornih za smrt ćelije već i ključnu ulogu u zapaljenskom odgovoru [20].

Humani TNF- α sintetiše se kao protein sastavljen od 233 aminokiseline, molekulske mase 26 kDa, koji je vezan za ćelijsku membranu (mTNF- α). Pod uticajem TNF- α konvertujućeg enzima (engl. TNF- α Converting Enzyme, TACE) nastaje solubilna forma TNF- α (sTNF- α) sastavljena od 157 aminokiselina, molekulske mase 17 kDa. Obe forme TNF- α (sTNF- α i mTNF- α) mogu biti prisutne u obliku mono-, di- i trimernih proteina, ali su samo trimerne forme biološki aktivne. Aktivna forma TNF- α zapravo je homotrimer koji nastaje nekovalentnim vezivanjem identičnih monomernih subjedinica formirajući strukturu oblika zvona [21].

Konvertujući enzim faktora nekroze tumora α je adamalizin, poznat još i kao ADAM17, koji pripada tipu 1 transmembranskih proteina, čija je karakteristika da sadrže i dezintegrinski i metaloproteinazni domen. Enzim raskida vezu između alanina na položaju 76 i valina na položaju 77 u sve tri monomerne subjedinice TNF- α trimera, nakon čega se TNF- α oslobađa sa membrane i gradi trimolekularni kompleks, homotrimer molekulske mase 51 kDa, koji se vezuje za receptor faktora nekroze tumora (engl. TNF Receptor, TNFR) [21]. On nije odgovoran samo za oslobađanje sTNF- α već i drugih proteina vezanih za membranu (Fas Ligand, FasL; receptor za epitelijalni faktor rasta, EGFR). Takođe, pod uticajem TACE dolazi do odvajanja vanćelijskog domena TNFR i formiranja solubilnog TNF- α receptora (sTNFR). Solubilni receptor se vezuje za trimernu formu TNF- α čineći je biološki neaktivnom. Na ovaj način dolazi do inhibicije ćelijske signalizacije posredovane TNF- α , zbog čega sTNFR deluje kao prirodni inhibitor TNF- α *in vivo* [22].

2.2.1.1. Biološki efekti faktora nekroze tumora alfa

Biološki efekti TNF- α obuhvataju najmanje pet različitih tipova signalnih puteva:

- aktivaciju nuklearnog faktora kapa B (NF- κ B);
- aktivaciju puteva apoptoze;
- aktivaciju kinaze, čija je aktivnost regulisana vanćelijskim signalima (engl. Extracellular Signal Regulated Kinase, ERK);
- aktivaciju p38 mitogenom aktivirane protein kinaze (engl. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, p38MAPK);
- aktivaciju c-Jun-N-terminalne Kinaze (JNK) [23].

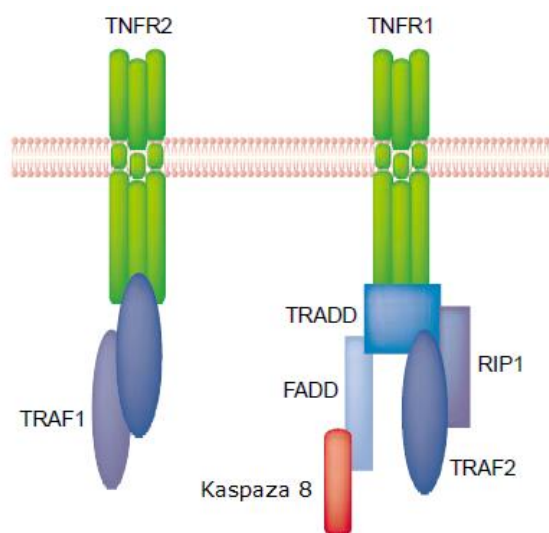
Ove efekte TNF- α ostvaruje vezujući se za dva tipa receptora: tip 1 (engl. Tumor Necrosis Factor Receptor 1, TNFR1) i tip 2 (engl. Tumor Necrosis Factor Receptor 2, TNFR2). Oni pripadaju superfamiliji TNFR, koja broji 29 članova. Po svojoj strukturi TNFR1 i TNFR2 jesu transmembranski glikoproteidi čiji vanćelijski domeni pokazuju samo 28% homologije i sadrže tandemske ponovke cisteinom bogatih motiva, dok su unutarćelijske sekvence međusobno različite [21]. Vanćelijski domeni receptora odgovorni su za vezivanje liganada, dok unutarćelijski domeni posreduju u aktivaciji odgovarajućih signalnih puteva.

Tip 1 receptora sadrži takozvani domen smrti (engl. Death Domain, DD) i eksprimira se na skoro svim tipovima ćelija, dok je ekspresija TNFR2, koji ne sadrži DD, ograničena samo na ćelije imunskog sistema, endotelne i nervne ćelije [23]. Za razliku od TNFR1, koji se aktivira obema formama TNF- α , TNFR2 može biti aktiviran jedino membranskom formom.

Najveći deo bioloških efekata TNF- α ostvaruje se preko TNFR1, dok TNFR2 igra glavnu ulogu u limfnom sistemu [24]. Vezivanjem trimerne forme TNF- α za receptor dolazi do trimerizacije samih receptora, što dalje pokreće odgovarajuće signalne puteve u ćeliji. Čan (*Chan*) i saradnici su, međutim, pokazali da se subjedinice TNFR1 i TNFR2 mogu međusobno spajati i u odsustvu liganada. Naime, aminoterminalni regioni vanćelijskog domena receptora međusobnim spajanjem obrazuju poseban funkcionalni domen, nazvan PLAD (engl. Pre-ligand-binding Assembly Domain, PLAD), koji se razlikuje od ligand vezujućeg domena. Delecija PLAD domena onemogućava vezivanje liganada, što upućuje na činjenicu da vezivanje TNF- α za TNFR zavisi i od međusobnog spajanja receptorskih subjedinica [25].

Nakon vezivanja TNF- α za TNFR1 najpre dolazi do odvajanja takozvanog utišavača domena smrti (engl. Silencer of Death Domain, SODD), koji u fiziološkim

uslovima sprečava spontanu agregaciju citoplazmatskih DD TNFR1 [26]. Pošto je uklonjen SODD, za TNFR1 vezuje se domen smrti vezan za TNFR1 (engl. TNFR1-Associated Death Domain Protein, TRADD), što dalje za posledicu ima vezivanje proteina sa domenom smrti koji se pridružuje Fas receptoru (engl. Fas Associated Death Domain, FADD) ili TNF receptoru pridruženog faktora 2 (engl. TNF-Receptor-Associated Factor 2, TRAF2) i receptor interregujućeg proteina 1 (engl. Receptor-Interacting Protein 1, RIP1) (slika 2). Za razliku od FADD, koji dovodi do apoptoze aktivacijom kaskadnog sistema kaspaza, TRAF2 i RIP1 imaju ključnu ulogu u aktivaciji NF- κ B i JNK, ali i MAPK puta.



Slika 2. Signalni putevi posredovani receptorima faktora nekroze tumora [27]

TNFR1 – receptor 1 faktora nekroze tumora; TNFR2 – receptor 2 faktora nekroze tumora; TRADD – domen smrti vezan za TNFR1; FADD – protein sa domenom smrti koji se pridružuje Fas receptoru; RIP1 – receptor interregujući protein 1; TRAF2 – TNF receptoru pridruženi faktor 2; TRAF1 – TNF receptoru pridruženi faktor 1

Naime, kada se TRADD veže za TNFR1, proces unutarćelijske signalizacije može ići u dva pravca: jedan je vezivanje FADD za TRADD i aktivacija kaspaze 8 i kaspaze 3, što ćeliju uvodi u apoptozu, a drugi je vezivanje TRAF2 i RIP1 koji pokreću signalnu kaskadu koja aktivira transformišućim faktorom rasta β aktiviranu kinazu 1 (engl. TGF- β Activated Kinase 1, TAK1), I κ B kinazni kompleks (engl. I κ B Kinase, IKK), inhibitor NF- κ B (engl. Inhibitor of NF- κ B α , I κ B α) i njegovu fosforilaciju i ubikvitinaciju, a krajnji efekat je aktivacija transkripcionog faktora NF- κ B i njegova translokacija u jedro.

Proinflammatorni efekti TNF- α posredovani su proteinima koje reguliše transkripcioni faktor NF- κ B (IL-6, IL-8, hemokini, inducibilna azot oksid sintaza, 5-lipooksigenaza), a koji su glavni medijatori zapaljenja [27]. Antiapoptotski efekti posledica su indukcije brojnih gena transkripcionim faktorom NF- κ B, čiji produkti (cIAP1, cIAP2, FLIP, Bfl1) inhibiraju apoptozu [28].

Takođe, TNF- α svoje proinflammatorne efekte ispoljava aktivacijom još jednog transkripcionog faktora aktivator protein 1 (AP-1). U ovom slučaju signalna kaskada se može odvijati preko TRAF2 i RIP1 koji aktiviraju MAP/ERK kinaze kinazu 1 (MEKK1), MAP kinaze kinazu 7 (MKK) i JNK, ili aktivacijom TAK1, MKK3 i p38MAPK.

Aktivacija JNK posredovana TNF- α , osim aktivacije transkripcionog faktora AP-1, može za posledicu imati i apoptozu ćelije. Ovako indukovana apoptoza pokrenuta je onda kada izostaje aktivacija NF- κ B, a samim tim i oslobađanje takozvanih inhibitora apoptoze pod njegovim uticajem. U odsustvu aktivacije NF- κ B, TNF- α indukuje apoptozu aktivacijom kaspaza i produženom aktivnošću JNK, koje ne mogu nužno izazvati apoptozu, već samo pospešuje TNF- α indukovani proces [29].

Biološki efekti TNF- α posredovani TNFR2 ostvaruju se direktnim vezivanjem TRAF2 za receptor, a zatim vezivanjem TRAF1 i aktivacijom NF- κ B i MAPK puta. Strukturne i biohemijske analize TRADD-TRAF2 kompleksa pokazale su da TRAF2 ima veći afinitet za TRADD nego za TNFR1 i TNFR2, čime se može objasniti činjenica da je TNF- α „bolji“ aktivator TNFR1, koji koristi TRADD kao adapter, nego TNFR2, koji sa njim ne reaguje [30,27].

2.2.1.2. *Faktor nekroze tumora alfa u bronhijalnoj astmi*

Izvor TNF- α u respiratornom traktu pored mastocita i makrofaga predstavljaju i druge ćelije uključene u patogenezu BA, poput eozinofila, epitelnih ćelija i neutrofila. Ukoliko su mastociti senzibilisani, u njima se TNF- α nalazi deponovan u granulama i oslobađa se nakon prezentacije antigena, dok ga makrofagi *de novo* sintetišu nakon stimulacije i oslobađaju tek posle nekoliko sati. Kitings (*Keatings*) i saradnici su pokazali da u sputumu obolelih od atopijske astme 24 časa nakon izlaganja alergenu dolazi do povišenja nivoa TNF- α [31]. Sekretiju TNF- α od strane mastocita i

makrofaga dodatno stimulišu IL-1, GM-CSF i INF- γ [17]. Takođe, TNF- α stimuliše oslobađanje histamina iz mastocita i sekreciju drugih citokina iz ovih ćelija [32].

Uticaj TNF- α na endotelne ćelije disajnih puteva praćen je povećanim stvaranjem GM-CSF, RANTES i IL-8 i povećanom ekspresijom unutarćelijskog adhezionog molekula 1 (engl. Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1). Osim toga, TNF- α sinergističkim delovanjem sa IL-4 i INF- γ povećava ekspresiju vaskularnog adhezionog molekula 1 (engl. Vascular Adhesion Molecule 1, VCAM-1) u endotelnim ćelijama, čime pojačava adheziju eozinofila i neutrofila u disajnim putevima [17]. Sekundarno, pod uticajem endotelina 1 (ET-1) TNF- α uzrokuje vazokonstrikciju [33].

Kao i drugi medijatori oslobođeni iz aktiviranih mastocita, TNF- α odgovoran je za nastanak hiperreaktivnosti disajnih puteva. Ona se u *in vitro* uslovima javlja neposredno nakon njegovog oslobađanja, dok *in vivo* ima odloženi efekat [34]. Inhalacija rekombinantnog TNF- α kod grupe zdravih ispitanika dovela je do nastanka hiperreaktivnosti disajnih puteva i infiltracije sputuma neutrofilima, dok su se kod obolelih od srednjeteškog oblika astme pojačale već postojeće hiperreaktivnost i infiltracija [35,36]. Hiperreaktivnost disajnih puteva, kao jedan od glavnih poremećaja u BA, može biti posledica pojačane mobilizacije zapaljenskih ćelija pod dejstvom TNF- α , njegovog direktnog delovanja na glatkomišićne ćelije respiratornih puteva ili se pod uticajem TNF- α pokreće kaskada zapaljenskih odgovora koji su praćeni oslobađanjem medijatora, pojačanom senzibilizacijom i oslobađanjem histamina [34].

Indirektni uticaj TNF- α na proces remodelovanja, karakterističan za hroničnu astmu, ostvaruje se pojačanom sintezom matriks metaloproteinaze-9 (MMP-9) u eozinofilima i glikozoaminoglikana u fibroblastima pluća [37,34].

U refraktarnoj astmi TNF- α odgovoran je još i za mobilizaciju neutrofila, rezistenciju na glikokortikoide, proliferaciju miocita, stimulaciju rasta fibroblasta i njihovo sazrevanje do miofibroblasta [38].

2.3. Reaktivne vrste kiseonika

Slobodni radikali predstavljaju molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali, što ih čini veoma nestabilnim i reaktivnim [39]. Reaktivne vrste kiseonika (RVK), slično kao i slobodni radikali, imaju nespareni elektron u poslednjoj orbitali, ali pored slobodnih radikala kiseoničnog porekla

(superoksidni anjon, $O_2^{\bullet-}$; hidroksilni radikal, $OH^{\bullet}$; hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$; alkoksil radikal, $RO^{\bullet}$; peroksil radikal, $RO_2^{\bullet}$) obuhvataju i neradikalske molekule (vodonik peroksid, H_2O_2 ; hipohlorasta kiselina, $HOCl$; ozon, O_3 ; singletni kiseonik, 1O_2) koji nastaju u toku metabolizma kiseonika [40]. Kada nivo stvorenih RVK nadvlada antioksidativni odbrambeni sistem organizma, zbog povećane produkcije RVK i/ili smanjene antioksidativne odbrane dolazi do pojave oksidativnog stresa, stanja koje za posledicu ima direktno ili indirektno RVK posredovano oštećenje lipida, nukleinskih kiselina i proteina [41].

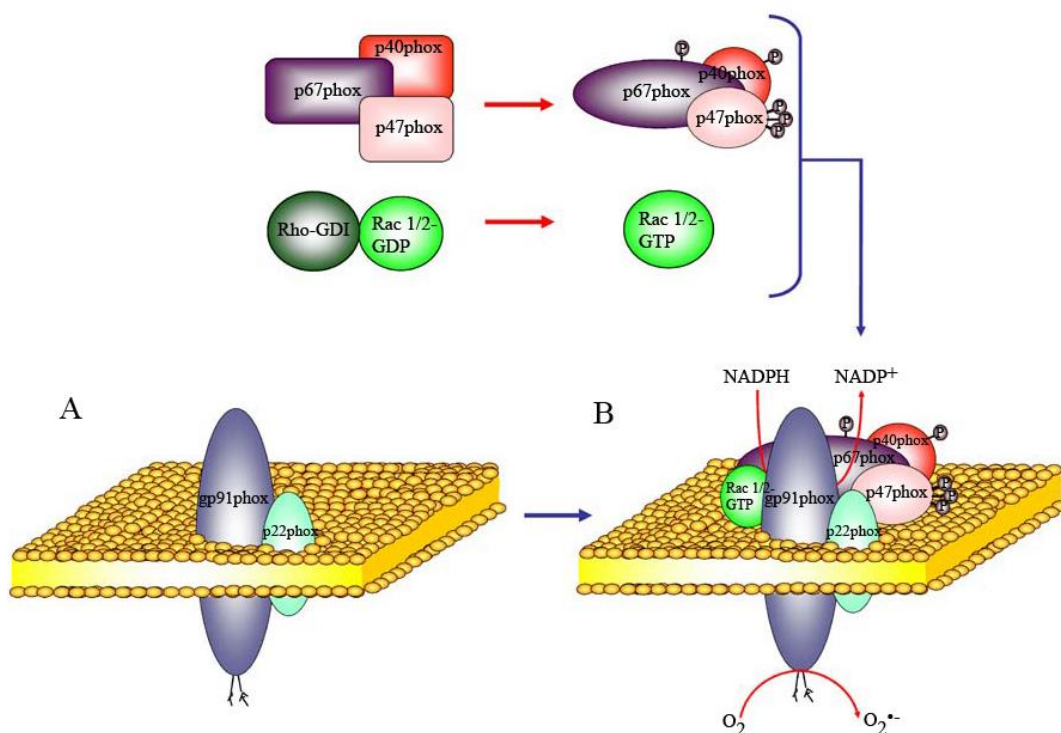
2.3.1. Reaktivne vrste kiseonika i bronhijalna astma

Pluća za razliku od drugih organa pokazuju izvesne specifičnosti koje ih čine veoma pogodnim za oštećenja posredovana RVK. Naime, pluća imaju veliku površinu koja je direktno izložena visokom pritisku kiseonika i različitim iritansima. Takođe, pluća su izložena brojnim mikroorganizmima koji se nalaze u udahnutom vazduhu, a proces njihovog uklanjanja u cilju održavanja donjih disajnih puteva sterilnim praćen je i povećanim stvaranjem RVK [42].

Izvori RVK u plućima mogu biti egzogeni i endogeni. U egzogene izvore ubrajaju se različiti faktori spoljašnje sredine: aerozagađenje, duvanski dim, alergeni, mikroorganizmi itd. Čelije koje učestvuju u zapaljenskoj reakciji (aktivirani eozinofili, neutrofili, monociti i makrofagi), ali i epitelne čelije, stvaraju endogene RVK u enzimskim procesima koji su deo zapaljenskog i imunskog odgovora na različite patogene ili iritanse [43]. U endogene izvore RVK ubrajaju se proces oksidativne fosforilacije na respiratornom lancu mitohondrija, nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidazni i ksantin/ksantin-oksida sistemi.

Primarni izvor RVK u plućima je NADPH oksidaza fagocita. Ona se sastoji iz nekoliko proteina koji čine membranski vezanu i citozolnu komponentu enzima (slika 3A). Flavocitohrom b558 jeste membranski vezana komponenta sastavljena od glikozilisane proteinske subjedinice gp91phox (molekulske mase 91 kDa) – koja u svom sastavu ima FAD, NADPH i dva hema – i u odnosu 1:1 nekovalentno vezanog stabilizirajućeg kompleksa za p22phox subjedinicu (molekulske mase 22 kDa) neophodnu za sazrevanje i stabilnu ekspresiju flavocitohroma b558. Proteine citozola čine p47phox, p67phox i p40phox, koji međusobno reaguju stvarajući kompleks, kao i

mali G-proteini (Rac1 u monocitima i Rac2 u neutrofilima) [44]. Ovakva prostorna raspodela komponenti NADPH oksidaze omogućava da je enzim neaktivan kada se neutrofili nalaze u stanju mirovanja. Tada se 60-70% flavocitohroma b558 nalazi na membrani specifičnih granula, 20-25% na membrani želatinoznih granula, dok je ostatak vezan za plazma membranu i membrane sekretornih vezikula [45]. Kada su neutrofili aktivirani flavocitohrom b558 preusmerava se na plazma membranu, kao i 10-20% citozolnih proteinskih komponenti NADPH oksidaze. Naime, citozolne komponente p47phox, p67phox i p40phox fosforilišu se i migriraju do membrane gde se vezuju za gp91phox i p22phox. Istovremeno se Rac2 odvaja od Rho-GDI inhibitora uz prevođenje GDP u GTP i migrira do membrane. Nakon vezivanja proteina citozola za flavoprotein b558 dolazi do njegove aktivacije pod uticajem aktivacionog domena p67phox i Rac2 [44]. Aktivirani flavoprotein b558 katalizuje prenos elektrona najpre sa NADPH na FAD, a zatim, u drugom koraku, na hem grupu pri čemu iz kiseonika nastaje $O_2^{\cdot-}$ (slika 3B). Najveći deo $O_2^{\cdot-}$ podleže neenzimskoj ili supeoksid-dizmutazom posredovanoj dizmutaciji do H_2O_2 , a sam H_2O_2 može nastati i direktnim delovanjem enzima poput ksantin-oksidge ili monoamino oksidge.



Slika 3. Struktura i aktivacija NADPH oksidge [44]

Transkripcija obeju subjedinica flavoproteina b558 regulisana je proinflamatornim citokinima ili samim RVK [46]. U neutrofilima GM-CSF dovodi do aktivacije ERK1/2, što fosforiliše p47phox u položaju Ser345, dok TNF- α i LPS ovu fosforilaciju ostvaruju aktivacijom p38 MAPK [44].

Delujući zajedno sa proteazama oslobođenim iz neutrofila, RVK povećavaju stepen tkivnog oštećenja inaktivacijom antiproteaza (oksidacijom metionina u molekulu α 1-antitripsina) i/ili promenom strukture proteina, što ih čini lako podložnim proteolizi [47]. U odsustvu stimulusa neutrofili stvaraju više superoksidnog anjona u atopijskoj astmi u poređenju sa neatopijskom astmom [47]. Epitelne ćelije disajnih puteva, takođe, kao odgovor na TNF- α i LPS u hroničnim zapaljenskim bolestima pluća, stvaraju veće količine endogenih RVK-a [48].

Sveukupno, nastali oksidativni stres u BA pojačava postojeće zapaljenje posredstvom različitih proinflamatornih medijatora, povećava bronhijalnu hiperreaktivnost, stimuliše bronhospazam i povećava sekreciju mukusa [49].

2.3.2. Antioksidativna zaštita

Homeostaza ćelijskih funkcija u toku oksidativnog stresa zavisi od adekvatne indukcije zaštitnih antioksidativnih mehanizama. U fiziološkim uslovima, zahvaljujući brojnim enzimskim i neenzimskim sistemima antioksidativne zaštite, redukujući agensi značajno prevazilaze nivo oksidativnih agenasa i održavaju redukujuće redoks stanje. Sistemi antioksidativne zaštite svrstavaju se u dve velike grupe: enzimске (superoksid-dizmutaza, SOD; katalaza; glutathion-peroksidaza, GPx) i neenzimske (beta-karoten, vitamini C i E, glutathion, bilirubin, koenzim Q).

2.3.2.1. Katalaza

Katalaza (E.C. 1. 11. 1. 6) jeste enzim odgovoran za razgradnju H₂O₂ do molekulskog kiseonika i vode. Nalazi se u svim tkivima sisara, pretežno lokalizovana u peroksizomima i mitohondrijama, sa izuzetkom eritrocita gde se nalazi u citoplazmi. Najveću aktivnost katalaza ispoljava u jetri i eritrocitima. Enzim je po svojoj strukturi hemohromoproteid sastavljen iz četiri identične subjediniće, od kojih svaka sadrži feriprotoporfirinski prsten, koji ulazi u sastav aktivnog centra enzima. Aktivnost katalaze je regulisana na posttranslacionom nivou. U uslovima oksidativnog stresa

dolazi do fosforilacije tirozina u položajima 231 i 386, što dovodi do povećanja aktivnosti enzima i smanjenja koncentracije H_2O_2 u ćeliji. Nasuprot tome, oksidacija tirozinskih ostataka, pre svega u položaju 358, dovodi se u vezu sa gubitkom aktivnosti katalaze u uslovima oksidativnog stresa [42]. Katalaza je posebno efikasna pri visokim koncentracijama H_2O_2 , ali se u uslovima produženog oksidativnog stresa njena aktivnost smanjuje. Naime, za vreme produženog izlaganja katalaze H_2O_2 , NADPH vezan za katalazu oksiduje se do NADP^+ , što je praćeno smanjenjem aktivnosti katalaze za jednu trećinu u poređenju sa inicijalnom aktivnošću [42,50].

Eksperimentalni podaci pokazuju da je aktivnost enzima čak 50% manja u bronhoalveolarnom lavatu astmatičnih pluća u poređenju sa zdravim kontrolama, što je posledica oksidativne modifikacije proteina, a ne i smanjenja ukupne količine enzima [42,51]. Takođe, eritrociti dece obolele od BA pokazuju manju aktivnost katalaze u poređenju sa zdravim ispitanicima [52].

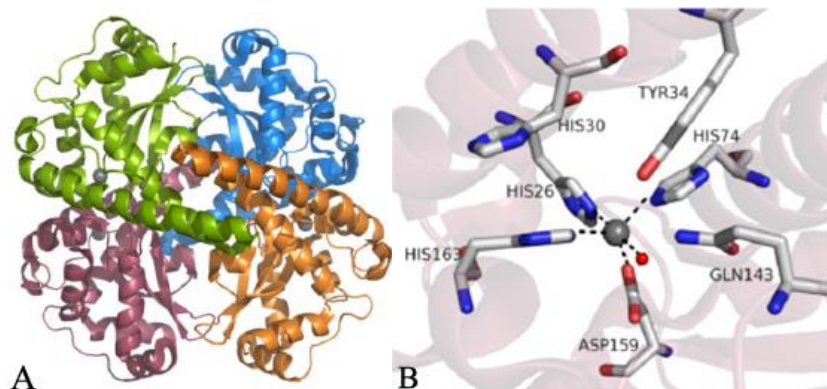
2.3.2.2. Superoksid-dizmutaza

Superoksid-dizmutaza (SOD; E.C. 1.15.1.1) jeste metaloenzim koji katalizuje reakciju dizmutacije $\text{O}_2^{\cdot-}$ do O_2 i H_2O_2 i smatra se prvom linijom odbrane od toksičnih efekata RVK-a. U zavisnosti od toga koji metal kao kofaktor ulazi u sastav aktivnog centra enzima razlikuju se bakar-cink zavisna SOD (CuZnSOD), mangan zavisna SOD (MnSOD) i gvožđe zavisna SOD (FeSOD). Kod ljudi se u zavisnosti od lokalizacije unutar ćelije razlikuju: SOD1 koja se nalazi u citoplazmi i u svom sastavu ima bakar i cink, SOD2 koja se nalazi u mitohondrijama i ima mangan u svom sastavu i SOD3 ili ekstracelularna SOD koja se nalazi u međućelijskom prostoru i ekstracelularnoj tečnosti i sadrži bakar i cink.

Mehanizam delovanja SOD naziva se i „ping-pong“ mehanizmom jer dolazi do serijske redukcije i oksidacije metala u molekulu enzima i posledične oksidacije i redukcije $\text{O}_2^{\cdot-}$ [53,54].

Mangan zavisna SOD je mitohondrijalni metaloenzim koji se sastoji od četiri identična monomera, a svaka monomerna subjedinica ima u svom centru dvovalentni ili trovalentni jon mangana. Struktura enzima i struktura aktivnog centra MnSOD prikazani su na slici 4. Enzim se primarno sintetiše u citozolu kao protein molekulske mase 25 kDa, a zatim nakon prepoznavanja N-terminalnog mitohondrijalnog signalnog

peptida biva transportovan do mitohondrijalnog matriksa, gde odvajanjem mitohondrijalne ciljne sekvence nastaje protein molekulske mase 22 kDa [54].



Slika 4. Kvaternarna struktura i struktura aktivnog centra MnSOD [54]

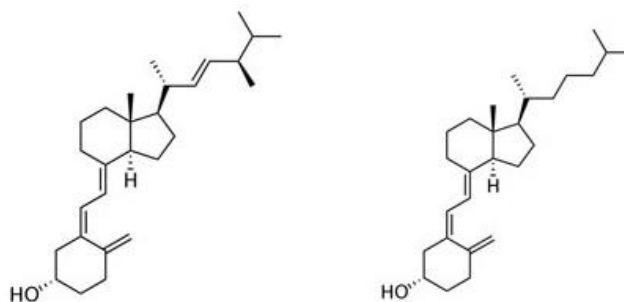
A – Kvaternarna struktura MnSOD, B – struktura aktivnog centra MnSOD

U fiziološkim uslovima respiratorne epitelne ćelije pokazuju visoku ekspresiju MnSOD, dok BA karakteriše oksidativna modifikacija i posledično smanjenje aktivnosti enzima [42,55]. Snižena aktivnost SOD dovodi se u vezu i sa opstrukcijom disajnih puteva, bronhijalnom hiperreaktivnošću, ali i procesom remodelovanja [43].

2.4. Vitamin D

2.4.1. Struktura i metabolizam vitamina D

Vitamin D je liposolubilni sekosteroid koji se u prirodi nalazi u obliku vitamina D₃ (holekalciferol) i vitamina D₂ (ergokalciferol). Vitamin D₂, za razliku od vitamina D₃, ima dvostruku vezu između 22. i 23. ugljenikovog atoma i metil grupu na 24. ugljenikovom atomu bočnog lanca (slika 5).



Slika 5. Struktura vitamina D₂ i D₃

Levo struktura vitamina D₂, desno struktura vitamina D₃

Manje količine vitamina D u organizam se mogu uneti i putem hrane. Većina namirnica, osim morskih riba (haringa, losos, sardine), sadrži male količine vitamina D. U ribama se vitamin D nalazi u obliku vitamina D₃, dok se vitamin D₂ najčešće u industrijskim postupcima dodaje namirnicama u cilju njihovog obogaćivanja vitaminom D [57]. U biljkama i gljivama se vitamin D₂ sintetizira pod uticajem UV zračenja iz biljnog sterola ergosterola. Vitamin D (D₂ i D₃) koji je u organizam unet hranom apsorbira se u tankom crevu, a zatim u enterocitima ugrađuje u hilomikrone, odakle limfotokom dospeva u sistemsku cirkulaciju.

Metabolizam vitamina D odvija se procesima hidroksilacije pod katalitičkim delovanjem enzima koji pripadaju citohrom P450 (CYP) enzimima, a lokalizovani su u endoplazmatskom retikulumu (npr. CYP2R1) ili mitohondrijalnom matriksu (npr. CYP27A1, CYP27B1 i CYP24A1) [56,58]. Obe forme vitamina, i ona sintetisana u koži i ona uneta putem hrane, biološki su neaktivne. One kratko cirkulišu pre nego što ih preuzme masno tkivo, u kome će se deponovati, ili jetra, u kojoj počinje proces aktivacije vitamina D. Prva hidroksilacija se odvija u jetri pod uticajem 25-hidroksilaze (CYP27A1), pri čemu nastaje 25-hidroksi oblik vitamina D (25(OH)D₂ i 25(OH)D₃), a druga u bubrezima delovanjem 1 α -hidroksilaze (CYP27B1), nakon čega nastaje biološki aktivna forma vitamina D, 1,25-dihidroksi oblik (1,25(OH)₂D₂ i 1,25(OH)₂D₃). Dalje se metabolizam vitamina D može nastaviti i delovanjem 24-hidroksilaze (CYP24A1), što kao krajnji produkt daje biološki neaktivnu kalcitriolnu kiselinu. Enzim ima veći afinitet za 1,25(OH)₂D u poređenju sa 25(OH)D, ali i jedan i drugi oblik podležu ovoj hidroksilaciji, koja ima za cilj sprečavanje nagomilavanja toksičnih koncentracija 1,25(OH)₂D i 25(OH)D [56].

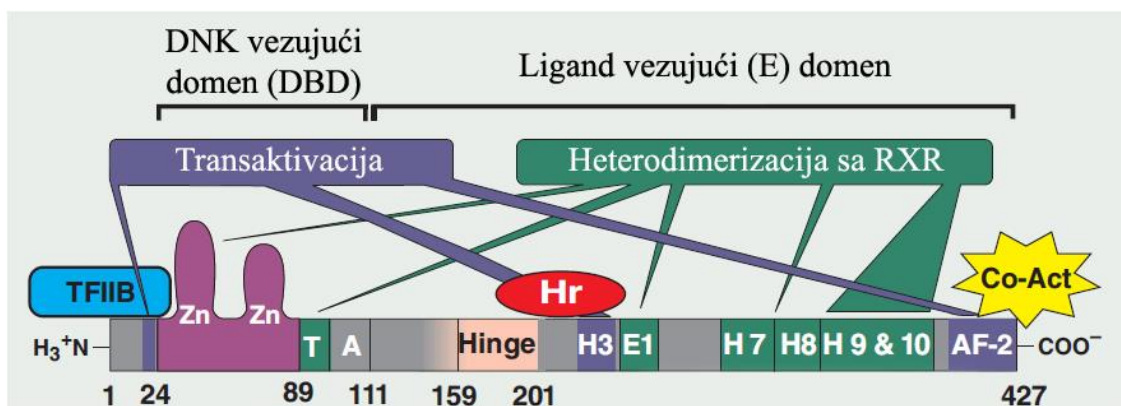
Za razliku od CYP27A1, aktivnost CYP27B1 strogo je kontrolisana delovanjem paratireoidnog hormona (PTH), faktora rasta fibroblasta 23 (engl. Fibroblast Growth Factor 23, FGF23), ali i same aktivne forme vitamina D. Paratireoidni hormon deluje stimulatивно, dok FGF23 i 1,25(OH)₂D deluju inhibitorно na CYP27B1. Nizak nivo fosfora u serumu stimuliše sintezu 1,25(OH)₂D, dok visok nivo fosfora ima suprotni efekat koji primarno ostvaruje stimulacijom FGF23, iako može ispoljavati i direktan uticaj na CYP27B1 [59]. Takođe, visok nivo kalcijuma u serumu, indirektno inhibicijom PTH, smanjuje aktivnost CYP27B1.

Iako je bubreg glavni izvor cirkulišućeg 1,25(OH)₂D, pokazano je da ekspresija CYP27B1 postoji i u drugim tkivima poput epitelnih ćelija kože i pluća, prostate,

endokrinih žlezda (paratireoidna žlezda, tireoidea, ovarijumi, testisi), placente i ćelija imunskog sistema (makrofagi, T i B limfociti, dendritične ćelije). Lokalna sinteza $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dovodi se u vezu sa regulacijom i do 200 gena uključenih u plejotropne efekte koji se pripisuju vitaminu D [57].

2.4.2. Receptor vitamina D

Nakon sinteze u bubrezima aktivna forma vitamina D vezana za vitamin D vezujući protein (engl. Vitamin D Binding Protein, VDBP) transportuje se cirkulacijom do ciljnih ćelija. Svoje biološke efekte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ostvaruje preko receptora visokog afiniteta, receptora vitamina D (engl. Vitamin D Receptor, VDR), koji pripada jedarnom tipu receptora za steroidne hormone. Superfamiliju humanih jedarnih receptora čini 48 članova, a kao i drugi članovi ove superfamilije, i VDR ima ulogu transkripcionog faktora koji se aktivira vezivanjem liganda. Receptor vitamina D sastoji se iz 427 aminokiselina i sadrži dva glavna funkcionalna domena: DNK-vezujući domen (engl. DNA Binding Domain, DBD), koji se nalazi na N-terminalnom kraju, i ligand-vezujući domen (engl. Ligand Binding Domain, LBD) na C-terminalnom kraju [60].



Slika 6. Struktura VDR [61]

H – heliks; Zn – cinkani prsti; Hr – Hr korepresor; Co-Act – koaktivator

Ligand-vezujući domen je odgovoran za visok afinitet vezivanja $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Afinitet za vezivanje liganda nije apsolutni pokazatelj transkripcione aktivnosti ligandom aktiviranog VDR. Naime, specifične promene u ekspresiji unutarćelijskih vezujućih proteina, koji posreduju u dopremanju liganda do VDR i od VDR, mogu da menjaju stepen ligand-VDR asocijacije i disocijacije, a na taj način i polужivot VDR

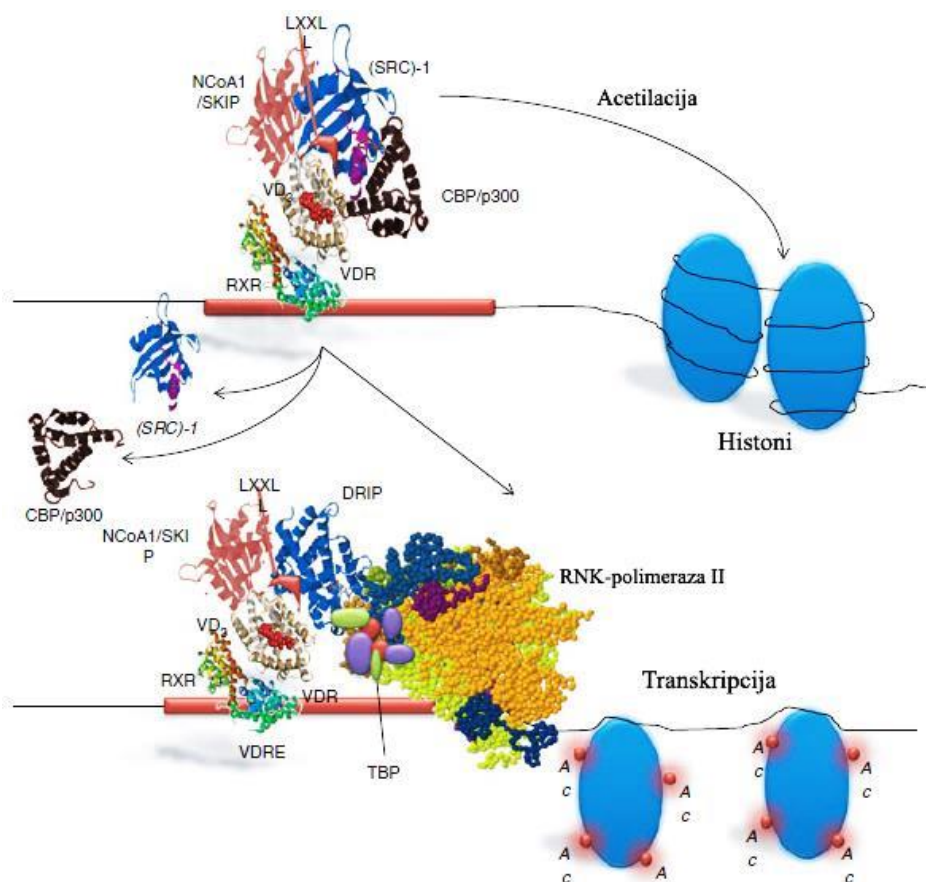
molekula koji je vezivanjem liganda zaštićen od proteozomalne razgradnje [62]. Ligand-vezujući domen je α -helikoidna struktura koja ima površinu za heterodimerizaciju sa RXR (heliks (H) 7, 9 i 10), kao i za transaktivaciju preko interakcije sa koaktivatorima (Co-Act). Mesto za vezivanje koaktivatora u VDR čine H3, H12 i region neposredno uz cinkane prste na N-terminalnom kraju. Humani VDR stvara kompleks i sa transkripcionim faktorom II B (TFIIB), ali i sa korepresorom transkripcije, Hr genskim produktom koji se vezuje za H3 (slika 6) [61]. Nakon vezivanja liganda premeštanje H12 na C-terminalnom kraju ligand vezujućeg domena VDR-a, poznat i kao ligand zavisna aktivaciona funkcija 2 (AF-2), dovodi do glavne konformacione promene u trodimenzionalnoj strukturi VDR-a, koja predstavlja platformu za dalje vezivanje koaktivatora. Konformacione promene trodimenzionalne strukture receptora uslovljavaju pokretanje motornih proteina odgovornih za brzo premeštanje VDR iz citoplazme u jedro [62].

DNK-vezujući domen sadrži DNK-vezujuće motive označene kao cinkani prsti koji su odgovorni za interakciju sa specifičnim DNK sekvencama, elementima koji odgovaraju na vitamin D (engl. Vitamin D Response Elements, VDRE), lokalizovanim u promotornim regionima ciljnih gena na koje deluje $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [62]. Najčešći tip VDRE jeste DR3. On sadrži dve AGGTCA sekvence koje su međusobno razdvojene sa tri nukleotida. Ova sekvenca usmerava VDR-retinoični X receptor (engl. Retinoid X Receptor, RXR) heterodimer do promotornog regiona ciljnog gena, gde se RXR vezuje na 5', a VDR na 3' kraju.

Nakon vezivanja $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ za VDR, receptor podleže heterodimerizaciji sa RXR i vezuje se za VDRE regulišući na taj način transkripciju ciljnih gena [63]. Ligandom pokrenute konformacione promene VDR-RXR heterodimera dovode do odvajanja korepresora jedarnog receptora (engl. Nuclear receptor Co-Repressor, NCoR) i olakšavaju interakciju sa članovima CBP/p300 i p160 familije koaktivatora, uključujući koaktivator steroidnog receptora 1 (engl. Steroid Receptor Co-activators-1, SRC-1), transkripcioni intermedijerni faktor 2 (engl. Transcriptional Intermediary Factor 2, TIF2) i receptorom aktivirani koaktivator 3 (engl. Receptor-Activated Co-activators-3, RAC3) [64].

Ovako aktivirani kompleks pokreće VDR-interreagujući protein (engl. VDR-interacting Protein, DRIP) i druge koregulatorne proteine koji kontrolišu modifikaciju histona, remodelovanje hromatina, vezivanje RNK-polimeraze II i aktivaciju

transkripcije [64]. Acetilisani histoni relaksiraju hromatinsku strukturu čineći DNK dostupnom i dozvoljavaju otpočinjanje transkripcije ciljnih gena (slika 7).

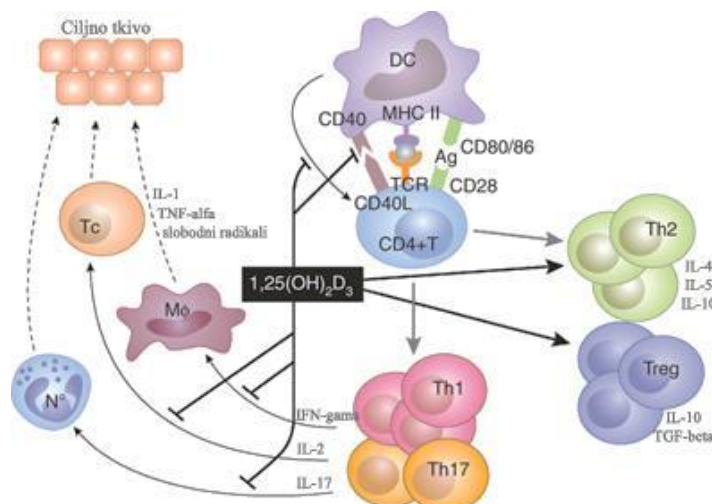


Slika 7. Mehanizam delovanja 1,25(OH)₂D₃ [64]

Primarno mesto ekspresije VDR jesu intestinalne epitelne ćelije i osteoblasti, ali je njegova ekspresija dokazana i u drugim tkivima koja nisu uključena u metabolizam kalcijuma i fosfora. Receptor vitamina D nalazi se u većini ćelija imunskog sistema uključujući monocite, makrofage, dendritične ćelije, ćelije prirodne ubice (NK ćelije), T- i B-limfocite [65]. Aktivacija VDR u ćelijama imunskog sistema dovodi se u vezu sa efektima 1,25(OH)₂D₃ na proliferaciju, diferencijaciju i imunomodulaciju.

2.4.3. Imunomodulatorni efekti vitamina D

Zahvaljujući tome što se CYP27B1 i VDR nalaze i na ćelijama imunskog sistema, vitamin D, osim uloge u homeostazi kalcijuma i fosfora, ispoljava i imunoregulatornu ulogu. Efekti 1,25(OH)₂D na ćelije imunskog sistema prikazani su na slici 8.



Slika 8. Efekti vitamina D u imunskom sistemu [66]

Aktivna forma vitamina D₃ utiče na sazrevanje i funkciju dendritičnih ćelija smanjujući njihovu sposobnost prezentovanja antigena T-limfocitima i povećavajući njihovu toleranciju u stečenom imunskom odgovoru. Naime, 1,25(OH)₂D₃ negativno reguliše diferencijaciju, sazrevanje i imunostimulacioni kapacitet dendritičnih ćelija smanjujući ekspresiju molekula II klase glavnog histokompatibilnog kompleksa (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC), CD40, CD80 i CD86, kao i proteina uključenih u proces njihovog sazrevanja (CD1 i CD83) [64].

Mastociti imaju značajnu ulogu u zapaljenskom i alergijskom odgovoru i jedne su od glavnih efektornih ćelija Th2 odgovora. Eksperimentalni podaci Baroniya (Baroni) i saradnika pokazali su da 1,25(OH)₂D₃ stimuliše apoptozu i inhibira sazrevanje prekursora mastocita [67].

Uticaj 1,25(OH)₂D₃ na makrofage ogleda se u izmeni njihovog odgovora, čime se sprečava oslobađanje citokina i hemokina. Takođe, 1,25(OH)₂D₃ inhibira stvaranje IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i TNF-α od strane monocita [68].

Vitamin D onemogućava proliferaciju i stvaranje imunoglobulina i usporava diferencijaciju prethodnika B-limfocita u plazma ćelije [69]. Takođe, 1,25(OH)₂D₃ inhibira proliferaciju T-limfocita, i to posebno Th1 limfocita odgovornih za stvaranje IFN-γ i IL-2, što sprečava regrutovanje (efekat IFN-γ) i proliferaciju T-limfocita (efekat IL-2) [70]. Smanjeno stvaranje IL-12 stimuliše razvoj Th2 limfocita i povećano stvaranje IL-4, IL-5 i IL-10, koji dalje ispoljavaju inhibicioni efekat na Th1 limfocite. Pod uticajem 1,25(OH)₂D₃ smanjuje se sekrecija IL-23 i IL-6, što inhibira razvoj i

funkciju Th17 ćelija i sekreciju Th17 citokina (IL-17 i IL-21), a stimuliše sazrevanje T-regulatornih limfocita i sintezu antiinflamatornih citokina poput IL-10 [68,71]. Ovakvi efekti ukazuju na to da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ učestvuje u preusmeravanju Th1 prema Th2 fenotipu ograničavajući na taj način moguće oštećenje tkiva posredovano Th1 ćelijskim imunskim odgovorom [72].

S obzirom na to da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ispoljava imunomodulatorne efekte i da je VDR eksprimiran i u disajnim putevima, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ može se smatrati jednim od značajnih faktora koji se dovode u vezu sa patogeneзом BA, ali tačni mehanizmi njegovog delovanja u BA nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedan od mogućih puteva uključivanja vitamina D u patogenezu BA jeste diferencijacija naivnih T-limfocita u T-regulatorne limfocite koji stvaraju IL-10. U humanim T-limfocitima vitamin D nishodno reguliše dendritične ćelije, koje su neophodne za aktivaciju Th2 [73]. Takođe, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ može imati pozitivan uticaj na imunološku funkciju pluća, čime se potencira zaštitni efekat od respiratornih infekcija, koje su česti pokretači astmatičnog odgovora [74]. Terapijski odgovor na glikokortikoide kod steroid-rezistentne BA značajno se popravlja ushodnom regulacijom sinteze IL-10 pod uticajem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [75].

2.4.4. Status vitamina D i bronhijalna astma

Za praćenje statusa vitamina D koristi se određivanje koncentracije $25(\text{OH})\text{D}$, čiji najveći deo predstavlja $25(\text{OH})\text{D}_3$, koji čini 95% cirkulišućeg vitamina D. Strukturne razlike između vitamina D_2 i D_3 uslovljavaju manji afinitet vitamina D_2 prema VDBP, zbog čega je kraće njegovo zadržavanje u plazmi, ali i ograničeno prevođenje u $25(\text{OH})\text{D}$ [56]. Iz ovih razloga primena vitamina D_2 ne dovodi do porasta koncentracije 25-hidroksi oblika vitamina u meri u kojoj se to postiže primenom vitamina D_3 [76]. Naime, vitamin D_3 ima i do 87% veći uticaj na porast i održavanje koncentracije 25-hidroksi oblika u serumu u poređenju sa ekvimolarnim koncentracijama vitamina D_2 [77].

S obzirom na to da se najvećim delom vitamin D sintetiše pod uticajem UV zračenja, koncentracije $25(\text{OH})\text{D}_3$ u serumu variraju zavisno od godišnjeg doba. Takođe, značajan uticaj na koncentraciju $25(\text{OH})\text{D}_3$ imaju i geografska širina, klimatski uslovi, boja kože, način ishrane, količina masnog tkiva. Iako nisu jasno definisane

granice normalnih vrednosti 25(OH)D, smatra se da koncentracija 25(OH)D viša od 30 ng/ml odgovara normalnom statusu vitamina D, dok vrednosti niže od 20 ng/ml ukazuju na postojanje deficita vitamina D [78]. Podaci brojnih studija pokazuju da u više od 50% opšte populacije širom sveta postoji deficit vitamina D, koji se dovodi u vezu sa povećanim rizikom za pojavu različitih oboljenja (hipertenzije, dijabetes melitusa tipa 2, kolorektalnog karcinoma i karcinoma dojke, reumatoidnog artritisa, multiple skleroze, dijabetes melitusa tip 1, autoimunih oboljenja štitne žlezde) [57]. Takođe, niske vrednosti 25(OH)D₃ dovode se u vezu i sa BA, kako kod dece, tako i kod odraslih. Koncentracija 25(OH)D₃ pokazuje korelaciju sa težinom bolesti. Više vrednosti 25(OH)D₃ prate niži stadijum BA i udružene su sa boljom kontrolom simptoma. Niske vrednosti 25(OH)D₃ udružene su i sa sniženim vrednostima FEV1 kod obolelih od BA, što je verovatno posledica izostanka inhibitornog efekta vitamina D na stvaranje MMP, kao i na proliferaciju fibroblasta i sintezu kolagena, a samim tim i na proces remodelovanja, koji je praćen smanjenjem plućne funkcije [79]. Bronhijalnu astmu udruženu sa sniženim vrednostima 25(OH)D₃ prate i češće respiratorne infekcije i egzacerbacije bolesti. Primena vitamina D kod dece uzrasta od 6 do 15 godina smanjila je rizik od sezonske infekcije virusom influence A za 42% i čak za 93% napade BA u poređenju sa placeboom [80]. Viši nivo 25(OH)D₃ obrnuto je proporcionalan vrednostima ukupnog IgE u serumu i broju eozinofila u perifernoj krvi astmatičara, a takođe je udružen i sa manjom potrebom korišćenja antiinflamatorne terapije i manjim brojem hospitalizacija [81].

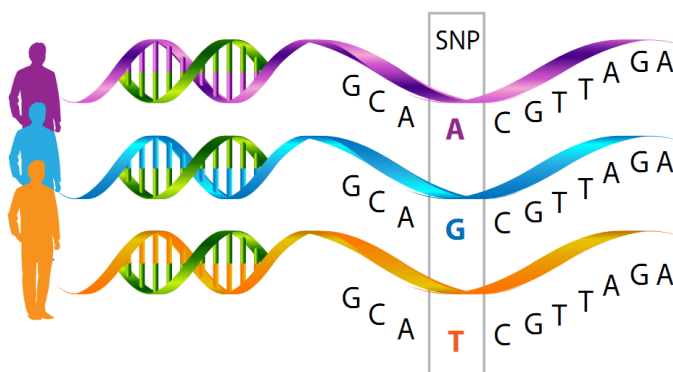
Snižene vrednosti vitamina D udružene su sa povećanom ekspresijom TNF- α , a egzacerbacije teške BA i sa pojačanim oksidativnim stresom usled povećanog stvaranja RVK i smanjene aktivnosti SOD [82,83]. Ovakvi podaci upućuju na to da su povećana ekspresija ovog proinflamatornog citokina i povećan stepen oksidativnog stresa jedan od mogućih puteva kojim nizak nivo vitamina D ispoljava proinflamatorni efekat u BA, a samim tim i jedan od mogućih patogenetskih mehanizama uključenih u nastanak BA.

2.5. Polimorfizmi gena

Pod polimorfizmom se podrazumeva pojava više od jednog alela na genskom lokusu. Polimorfni lokus je mesto na kome postoje najmanje dva alela, svaki frekvencije veće od 1%. Ukoliko je frekvencija alela manja od 1%, takvi se aleli smatraju retkim varijantama [84].

U širem smislu, zavisno od strukture nukleotida, varijante u humanom genomu mogu se podeliti na polimorfizme jednog nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) i strukturne varijante [85]. Pretpostavlja se da je većina genetskih varijanti neutralna, tj. da ne doprinose fenotipskim varijacijama, a njihova frekvencija u humanoj populaciji je posledica slučajnosti [85].

Polimorfizam jednog nukleotida je najčešća genska varijanta u humanoj populaciji koja čini oko 90% svih polimorfizama. Procenjuje se da u humanom genomu ima oko 11 miliona SNP-ova, od čega oko 7 miliona ima učestalost retkog alela (engl. Minor Allele Frequency, MAF) veću od 5% [85]. Ovi polimorfizmi nastaju zamenom jedne baze unutar DNK sekvence i mogu biti lokalizovani u kodirajućem ili nekodirajućem regionu DNK (slika 9) [86]. Smatra se da je oko 10% svih SNP-ova funkcionalno i da mogu dovesti do promena u biološkim procesima. Njihovo prisustvo u kodirajućim sekvencama ne dovodi nužno do promene sekvence aminokiselina u molekulu proteina. Za razliku od SNP-ova lokalizovanih u kodirajućim sekvencama, SNP-ovi lokalizovani u nekodirajućim sekvencama DNK mnogo su češći. Ovi SNP-ovi ne utiču na sintezu proteina, ali mogu uticati na alternativnu obradu transkripta, vezivanje transkripcionih faktora, degradaciju informacione RNK ili na sekvencu nekodirajuće RNK.



Slika 9. Polimorfizam jednog nukleotida

Poznavanje SNP-ova omogućava razumevanje evolucionih procesa na molekularnom nivou dajući podatke o selekciji, mutacijama, migracijama i genetičkom driftu. S obzirom na to da se neki SNP-ovi mogu dovesti u vezu sa pojavom određenih bolesti, njihova identifikacija i poznavanje je od značaja za personalizovanu medicinu i procenu individualne genetske sklonosti ka razvoju određene bolesti. Poseban izazov

predstavljaju takozvane poligenske bolesti, gde je za razvoj određenog fenotipa, uz faktore spoljašnje sredine, značajan i istovremeni uticaj više gena. Ograničavajući faktor u identifikaciji genetskih faktora odgovornih za nastanak ovih bolesti jeste i to što povezanost određenih SNP-ova sa bolešću u jednoj populaciji najčešće nije primenljiva i na pripadnike druge populacije zbog postojećih etničkih razlika [85].

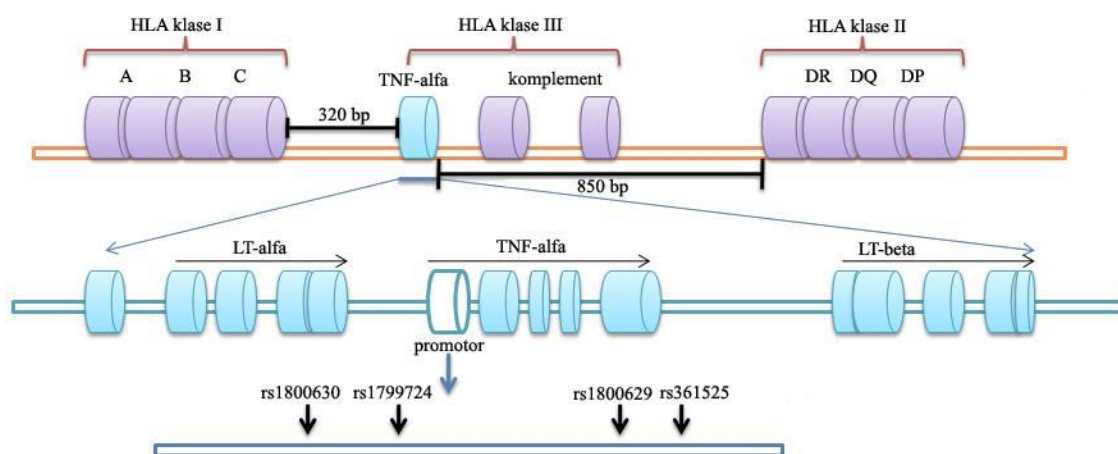
Opšte je prihvaćeno da genetski faktori imaju značajnu ulogu u nastanku BA i smatra se da nasledni faktor ima od 35% do 95% udela u nastanku ove bolesti [87]. U preko 500 dosadašnjih studija ispitivano je više od 200 gena koji bi se mogli dovesti u vezu sa BA. Genomskim studijama asocijacije (engl. Genome Wide Association Studies, GWAS) identifikovano je nekoliko gena ili genskih lokusa koji se mogu dovesti u vezu sa BA: ORMDL3 region hromozoma 17q21, interleukin 33 (IL-33) i njegov receptor (IL-1RL1), timusni stromalni limfopetin (TSLP), MHC region na 6p21, IL-4 i IL-13 [88]. Ipak, i pored činjenice da je u brojnim studijama identifikovan veći broj gena ili genskih lokusa koji se mogu dovesti u vezu sa BA, postoji izrazita heterogenost genetskog rizika u populacijama različite etničke pripadnosti.

2.5.1. Polimorfizam gena za *TNF- α* (rs1800629)

Humani gen za *TNF- α* lokalizovan je na kratkom kraku šestog hromozoma u MHC regionu, između lokusa HLA-B I klase i HLA-DR II klase. Gen za *TNF- α* veličine je oko 3 kb i sastoji se od 4 egzona i 3 introna. Više od 80% zrele *TNF* sekvence koduje se u četvrtom egzonu, dok prvi i drugi egzon gotovo u celini sadrže vodeću peptidnu sekvencu (slika 10) [89].

Gen za *TNF- α* lokalizovan je u veoma polimorfnom regionu, tako da je i u samom *TNF* lokusu identifikovan veliki broj polimorfizama (T-1031C, C-863A, C-857A, C-851T, G-419C, G-376A, G-308A, G-238A, G-162A i G-49A). Polimorfizam rs1800629 (*TNF- α* G-308A) nalazi se u promotoru gena za *TNF- α* . Ovaj polimorfizam se karakteriše postojanjem dve alelne forme: jedne koja ima guanin (G) kao češći alel i druge gde je guanin (G) u položaju -308 zamenjen adeninom (A) i predstavlja ređi alel. Prisustvo ređeg *TNF- α* A alela dovodi se u vezu sa povećanom spontanom ili stimulisanim sekrecijom *TNF- α* u *in vivo* i *in vitro* uslovima [90]. Naime, A alel može dovesti do povećanog afiniteta za vezivanje nuklearnih faktora za *TNF- α* promotor, što za posledicu ima viši nivo transkripcije i povećanu sekreciju *TNF- α* [91]. Takođe,

rs1800629 polimorfizam dovodi se u vezu i sa pojačanim zapaljenskim odgovorom na različite oksidativne agense [91].



Slika 10. TNF- α gen

S obzirom na to da je sekrecija TNF- α genetski regulisana na nivou transkripcije, a da sam rs1800629 utiče na sintezu citokina, njegovo prisustvo se dovodi u vezu sa različitim bolestima. Dosadašnje studije su pokazale povezanost rs1800629 sa autoimunim i zapaljenskim bolestima poput reumatoidnog artritisa, juvenilnog idiopatskog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa, inflamatornih bolesti creva, dijabetes melitusa [90,92]. Podaci o udruženosti rs1800629 sa BA daju veoma kontradiktorne rezultate i dok ga neke studije dovode u vezu sa nastankom BA i težinom bolesti, druge opovrgavaju ovu povezanost [93,94,95,96].

2.5.2. Polimorfizmi gena za enzime antioksidativne zaštite

2.5.2.1. Polimorfizam gena za katalazu (rs7943316)

Humani gen za katalazu nalazi se na jedanaestom hromozomu (11p13) i sastoji se iz 13 egzona i 12 introna. Gen sadrži osam incijacionih tačaka transkripcije, tri CCAAT kutije i tri GC-slične kutije, ali nema TATA kutiju i inicijatornu konsenzusnu sekvencu u promotorskom regionu, što omogućava postojanje više startnih mesta transkripcije [97]. Regulacija ekspresije gena za katalazu značajno utiče na nivo katalaze i regulisana je različitim mehanizmina koji uključuju gama receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma (engl. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

Gamma, PPAR γ), TNF- α , p53 protein i hipermetilaciju CpG ostrva u promotoru gena za katalazu [50].

Među najčešće proučavanim SNP-ovima gena za katalazu jeste rs1001179 (CAT C-262T), koji je lokalizovan u promotoru gena i može imati uticaj na proces transkripcije, i to promenom mesta vezivanja transkripcionih faktora, a time i na bazalnu ekspresiju katalaze u različitim tipovima ćelija [50].

Polimorfizam rs7943316 (CAT A-21T) nalazi se u promotoru gena za katalazu proksimalno od startnog mesta i karakteriše se zamenom adenina (A) timinom (T) na poziciji -21. Ovaj SNP relativno je malo proučavan u poređenju sa drugim polimorfizmima gena za katalazu. Alel T dovodi se u vezu sa povećanim rizikom za nastanak vitiliga, dok je druga studija pokazala da ima zaštitni efekat kod osteonekroze [98,99]. Prema Polonikovu, rs7943316 polimorfizam dovodi se u vezu sa povećanim oksidativnim stresom usled nedovoljne aktivnosti enzima, a samim tim i sa većim rizikom za nastanak BA [100].

2.5.2.2. Polimorfizam gena za mangan-superoksid-dizmutazu (rs4880)

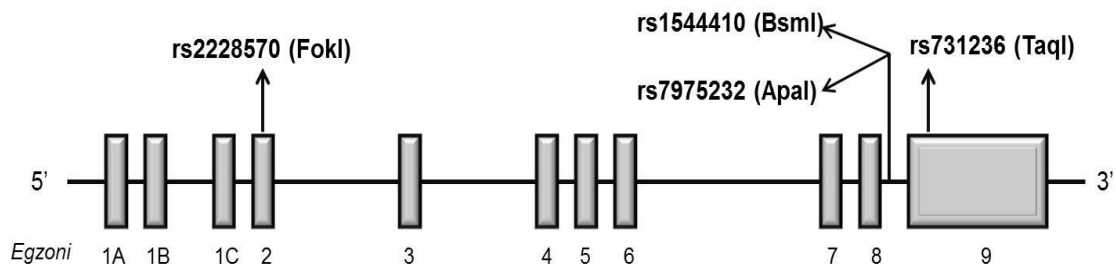
Humani gen za MnSOD nalazi se na šestom hromozomu i sastoji se od 5 egzona i 4 introna. Mestu inicijacije transkripcije prethodi promotorski region bogat GC parovima koji sadrži sedam SP1 i tri AP2 konsenzusne sekvence, a nema TATA i CAAT kutiju, što je karakteristično za takozvane „housekeeping“ gene [101].

Polimorfizam rs4880 (MnSOD Ala16Val) nastaje zamenom citozina (C) timinom (T) na poziciji 16 mitohondrijalne ciljane sekvence (engl. Mitochondrial Targeting Sequence, MTS), što za posledicu ima zamenu alanina (GCT) valinom (GTT). Ovaj položaj odgovara šesnaestoj aminokiselini od početka signalne sekvence ili devetoj aminokiselini u molekulu zrelog proteina, zbog čega se u literaturi sreće i Ala9Val oznaka za rs4880 polimorfizam. U poređenju sa Ala alelom, prisustvo mutiranog Val alela dovodi se u vezu sa smanjenom aktivnošću enzima za 30% do 40%. Naime, u prisustvu Ala alela stvara se α -helikoidna struktura proteina, dok je Val alel odgovoran za stvaranje β -ploče, pa se usled ovakve promene sekundarne strukture remeti translokacija proteina iz citoplazme, gde se sintetiše, u mitohondrijalni matriks gde nastaje aktivna forma enzima, zbog čega se enzim zadržava na nivou unutrašnje mitohondrijalne membrane [102,103]. Takođe, Val alel može biti udružen i sa

smanjenom stabilnošću RNK [104]. Homozigotni mutirani genotip dovodi se u vezu i sa povećanom sintezom proinflamatornih citokina uključujući i TNF- α [105].

2.5.3. Polimorfizmi gena za receptor vitamina D (rs2228570 i rs1544410)

Humani gen za VDR nalazi se na dvanaestom hromozomu na poziciji 12q13-14 i sastoji se od 11 egzona ispresecanih intronima. Na nekodirajućem 5' kraju nalaze se tri egzona (1A, 1B i 1C), dok ostalih osam egzona (egzoni 2–9) koduju strukturni deo VDR genskog produkta (slika 11). Promotorska sekvenca, koja se nalazi ushodno od egzona 1A, bogata je GC parovima i ne sadrži TATA kutiju, ali sadrži mesta za vezivanje SP1 i drugih transkripcionih faktora [106].



Slika 11. VDR gen i lokalizacija najčešćih polimorfizama jednog nukleotida

Na 3' i na 5' kraju gena za VDR identifikovan je veliki broj SNP-ova. Polimorfizam lokalizovan u startnom kodonu egzona 2 na 5' kraju gena za VDR označava se kao rs2228570 ili FokI, prema nazivu restrikcionog enzima. Ovaj polimorfizam nastaje usled zamene timina (T) citozinom (C) u prvom od dva mesta inicijacije transkripcije, zbog čega je ATG zamenjena ACG sekvencom. Naime, kod osoba sa ACG sekvencom transkripcija počinje na drugom ATG mestu, tako da se sintetiše protein koji na N-terminalnom kraju ima tri aminokiseline manje (424 aminokiseline, označava se i kao M4 forma) u odnosu na protein (427 aminokiselina, označava se i kao M1 forma) koji se sintetiše kada transkripcija počinje na prvom ATG mestu [107]. Alel T označava se još i kao f alel, dok C alel odgovara F alelu. Kraći protein pokazuje veću aktivnost u poređenju sa proteinom koji ima 427 aminokiselina, i to do 1,7 puta [107].

Polimorfizam rs1544410 (BsmI) lokalizovan je u 3' netransliranom regionu i nastaje zamenom guanina (G) adeninom (A). Ovaj bialelni polimorfizam karakteriše

postojanje G alela, koji se još označava kao b alel, i A alela, koji se označava i kao B alel. Za razliku od rs2228570 polimorfizma, koji se zbog svog uticaja na sintezu VDR proteina smatra nezavisnim markerom VDR gena, rs1544410 polimorfizam se najčešće proučava u okviru neravnoteže vezanosti sa rs7975232 (ApaI) i rs731236 (TaqI) polimorfizmima. Lokalizovan je između egzona 8 i 9 i ne utiče na strukturu VDR proteina. Ipak, rs1544410 povezan je sa poli(A) mikrosatelitskim ponovcima u 3' netransliranom regionu, što može uticati na stabilnost iRNK i regulaciju transkripcije gena za VDR [108].

2.6. SNP-SNP interakcije

U cilju utvrđivanja genetske osnove kompleksnih bolesti do danas je identifikovan veliki broj polimorfizama. Genomske studije asocijacije fokusirane su uglavnom na otkrivanje pojedinačnih SNP-ova kao faktora koji određuju rizik za razvoj određene bolesti. Ipak, iako su pojedinačni SNP-ovi značajni indikatori genetske komponente kompleksnih bolesti, oni objašnjavaju samo deo genetskog rizika [109]. Identifikacija genskih lokusa udruženih sa bolestima poput bronhijalne astme, hipertenzije, dijabetes melitusa tipa 2 ili multiple skleroze dala je mnogo manje zadovoljavajućih rezultata u poređenju sa bolestima koje se nasleđuju po Mendelovim pravilima, što je verovatno posledica većeg broja lokusa koji su uključeni u nastanak bolesti, nekompletne penetracije i efekata spoljašnje sredine [110]. Upravo činjenica da je efekat jedne genske varijacije verovatno zavisn od neke druge genske varijacije (gen–gen interakcije), ali i faktora spoljašnje sredine (gen–sredina interakcije), predstavlja veoma složen zadatak i veliki izazov u identifikaciji polimorfizama i faktora spoljašnje sredine koji su udruženi sa nastankom ovih bolesti.

Pod interakcijama gena podrazumeva se međusobno dejstvo i uticaj koji geni vrše jedni na druge dovodeći do odgovarajućih promena fenotipa. One se mogu podeliti na interakcije genskih alela, gde aleli jednog gena deluju jedni na druge, i interakcije nealelnih gena, gde geni lokalizovani na različitim parovima hromozoma međusobnom interakcijom dovode do nastanka odgovarajućeg fenotipa. Interakcije nealelnih gena mogu se ispoljiti kao komplementarnost, aditivnost ili epistaza.

U literaturi se SNP–SNP interakcije često sreću i pod nazivima pozitivna interakcija, epistaza ili SNP sinergija [109]. Pojam epistaze je prvi put upotrebio

Bejtson (Beatson) da bi opisao pojavu gde alel na jednom lokusu sprečava alel na drugom lokusu da ispolji svoj efekat [110]. Ovakvom tipu epistaze odgovara nasleđivanje boje očiju, nasleđivanje boje dlake kod pasa, boje krzna kod miševa itd.

Bejtsonova (Beatson) definicija epistaze odnosi se na epistazu u užem smislu i slična je konceptu koji se koristi u biologiji i molekularnoj genetici da bi se ispitala interakcija između proteina [111]. Pod epistazom u širem smislu podrazumevaju se svi oblici interakcije nealelnih gena.

Drugu definiciju epistaze predložio je Fišer (Fisher) 1918. godine i ona se odnosi na odstupanje od aditivne kombinacije različitih lokusa na njihov uticaj na fenotip [112]. Za razliku od Bejtsonove definicije, ova definicija je bliža statističkoj definiciji interakcije, a proizilazi iz linernog modela koji opisuje odnos između prediktivnih faktora [113]. Fišerova definicija se najčešće koristi u populacionoj genetici.

Epistaza i genska interakcija se u stvari odnose na različite aspekte istog fenomena, gde se termin epistaza odnosi pre svega na statističke karakteristike, ali ne ukazuje nužno na biohemijsku interakciju između genskih produkata i prevashodno se koristi u populacionoj genetici.

Optimalni algoritam za utvrđivanje SNP–SNP interakcija podrazumevao bi da su SNP-ovi međusobno udaljeni (postoji mala neravnoteža vezanosti ili je nema) i da je jedan od SNP-ova sigurni uzročnik odgovarajućeg fenotipa, što se retko sreće. S druge strane, nedostatak posmatranja uticaja pojedinačnih SNP-ova jeste taj što se zanemaruje njihov udruženi efekat, gde oni pojedinačno mogu imati mali uticaj, ali se on značajno može pojačati u prisustvu drugog SNP-a ili više njih. Stoga ispitivanje istovremenog uticaja više SNP-ova na određeni fenotip ima veliki značaj.

U literaturi se za utvrđivanje genskih interakcija može pronaći relativno veliki broj različitih metoda: metoda smanjenja dimenzionalnosti (engl. Multifactor-Dimensionality Reduction, MDR), Bajesove (Bayesian) mreže, algoritmi zasnovani na teoriji informacija (ARACNE), algoritmi zasnovani na mašinskom učenju (neuronske mreže, metod nosećih vektora, metod slučajnih šuma) [114,115,116].

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Inflamacija, oksidativni stres i imunomodulacija mogu biti značajni patogenetski faktori u nastanku bronhijalne astme. I pored toga što su poznati brojni faktori spoljašnje sredine koji mogu pokrenuti ili provocirati bolest, precizni genetski mehanizmi nisu u potpunosti razjašnjeni. Imajući u vidu činjenicu da se broj obolelih tokom vremena sve više povećava, a da je patogeneza bolesti još uvek nedovoljno razjašnjena, ciljevi ovog istraživanja su sledeći:

1. utvrditi učestalost genotipova i alela rs1800629 (TNF- α G-308A), rs7943316 (CAT A-21T), rs4880 (MnSOD Ala16Val), rs2228570 (FokI) i rs1544410 (BsmI) genskih polimorfizama kod obolelih od BA i zdravih ispitanika;
2. utvrditi postojanje razlike u distribuciji genotipova i alela analiziranih polimorfizama kod pacijenata i zdravih ispitanika;
3. utvrditi postojanje razlike u distribuciji genotipova i alela analiziranih polimorfizama u odnosu na pol ispitanika;
4. analizirati učestalost haplotipova i diplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR u ispitivanim grupama i utvrde razlike u njihovoj distribuciji;
5. odrediti koncentraciju 25(OH)D₃ u grupi obolelih od BA i zdravih ispitanika;
6. utvrditi uticaj rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR na koncentraciju 25(OH)D₃ u grupi obolelih od BA i zdravih ispitanika;
7. utvrditi udruženi efekat ispitivanih polimorfizama na pojavu bronhijalne astme;
8. utvrditi rizik za nastanak BA u prisustvu heterozigotnih i homozigotnih mutiranih genotipova i alela svih ispitivanih polimorfizama, kao i rizik u prisustvu haplotipova i diplotipova polimorfizama na genu za VDR.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 174 ispitanika koji su podeljeni u dve grupe:

a) prvu grupu je činilo 79 ispitanika (32 muškarca i 47 žena) obolelih od bronhijalne astme, starosti od 18 do 74 godine (prosečna starost $47,48 \pm 15,81$ godina), lečenih na Klinici za plućne bolesti i tuberkulozu Knez Selo Kliničkog centra u Nišu. Dijagnoza bronhijalne astme postavljena je u skladu sa smernicama Globalne inicijative za astmu [3];

b) drugu grupu je činilo 95 zdravih ispitanika (46 muškarca i 49 žena) odgovarajućeg pola i starosti (prosečna starost $44,81 \pm 16,78$ godine). Kriterijumi za uključivanje u istraživanje bili su odsustvo prethodne istorije bronhijalne astme i/ili atopije, kao i drugih akutnih i hroničnih bolesti.

4.2. Metode

Molekularno-genetičko istraživanje sprovedeno je u Laboratoriji za funkcionalnu genomiku i proteomiku Naučnoistraživačkog centra za biomedicinu Medicinskog fakulteta u Nišu. U eksperimentalnom radu korišćeni su plazma i genomska DNK izolovana iz leukocita pune krvi pacijenata obolelih od bronhijalne astme i zdravih ispitanika dobijene punkcijom kubitalne vene pri rutinskom laboratorijskom pregledu. U epruvetu koja je kao antikoagulans sadržala EDTA venepunkcijom je uzeto 3 ml krvi od čega je 200 μ l korišćeno za izolaciju DNK, a ostatak za izdvajanje plazme.

4.2.1. Izdvajanje plazme

Uzorak krvi je centrifugiran pet minuta na 3000 rpm pri temperaturi od 4 °C, nakon čega je izdvojena plazma koja je do izvođenja eksperimenta čuvana u zamrzivaču na temperaturi od -80 °C.

4.2.2. Izolacija DNK

Izolacija DNK iz leukocita periferne krvi izvedena je korišćenjem komercijalnog seta za izolaciju DNK QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Izolovana DNK čuvana je u zamrzivaču na temperaturi od -20 °C do početka daljeg rada.

4.2.3. Lančana reakcije polimerizacije

Lančanom reakcijom polimerizacije umnožavani su segmenati DNK u okviru kojih se nalazi SNP ispitivanog gena i to: rs1800629, rs7943316, rs4880, rs2228570 i rs1544410.

Tabela 1. Sastav reakcione smeše za lančanu reakciju polimerizacije

Sastav reakcione smeše	Finalna koncentracija	Sastav smeše za ukupnu zapreminu od 25 µl
Voda	/	varijabilno
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix*	1X	12,5 µl
F prajmer (10 µM)	0,5 µM	1,25 µl
R prajmer (10 µM)	0,5 µM	1,25 µl
DNK	50 ng	varijabilno

*KAPA2G Fast HotStart ReadyMix sadrži KAPA2G Fast HotStart DNK polimerazu, KAPA2G Fast HotStart PCR pufer, dNTP-ove (0.2 mM svakog 1X dNTP-a), 1X MgCl₂ (1.5 mM) i stabilizatore

Tabela 2. Sekvence prajmera korišćenih za određivanje genskih polimorfizama

Polimorfizam	Sekvence prajmera
rs1800629	F 5'-AGG CAA TAG GTT TTGA GGG CCAT-3'
	R 5'-ACA CTC CCC ATC CTC CCT GCT-3'
rs7943316	F 5'-AAT CAG AAG GCA GTC CTC CC-3'
	R 5'-TCG GGG AGC ACA GAG TGT AC-3'
rs4880	F 5'-CCA GCA GGC AGC TGG CAC CG -3'
	R 5'-TCC AGG GCG CCG TAG TCG TAG G -3'
rs2228570	F 5'-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT-3'
	R 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3'
rs1544410	F 5'-GGA CCT GTG GCA ACC AAG ACT -3'
	R 5'-GCC CGC AAG AAA CCT CAA ATA -3'

Za PCR reakciju korišćen je KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, SAD). Umnožavanje segmenta DNK, za svaki od ispitivanih gena ponaosob, izvršeno je u reakcionoj smeši zapremine 25 μ l kojoj je dodato 50 ng/ μ l DNK i po 10 μ M svakog prajmera iz odgovarajućeg seta prajmera (tabela 1). Korišćene su prethodno poznate sekvence prajmera [117,118]. Sastav reakcione smeše prikazan je u tabeli 1, a sekvence oligonukleotida koji su korišćeni kao prajmeri u PCR reakcijama date su u tabeli 2.

Za izvođenje lančane reakcije polimerizacije korišćen je PCR aparat SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, Inc, SAD). Uslovi odvijanja PCR reakcije prikazani su u tabeli 3.

Tabela 3. Uslovi odvijanja lančane reakcije polimerizacije

	Temperatura [°C]	Vreme [s]	
Inicijalna denaturacija	95	120	
Denaturacija	95	15	35 ciklusa
Hibridizacija	*	15	
Elongacija	72	15	
Finalna ekstenzija	72	30	

* Temperature hibridizacije su se razlikovale u zavisnosti od analiziranog polimorfizma.

4.2.4. Elektroforeza na agaroznom gelu

Uspešnost PCR amplifikacije proveravana je metodom elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Za pripremanje 2% agaroznog gela korišćeni su 1,2 g agaroze (Serva, Nemačka) i 60 ml 1X TBE pufera sledećeg sastava: 0,89 M Tris-HCl, 0,89 M borna kiselina, 0,5 M EDTA pH 8,0. Elektroforeza se odvijala u istom puferu u trajanju od 30 minuta, odnosno 90 minuta za VDR rs1544410 polimorfizam, pri struji jačine 100 mA i naponu 100 V. Nakon završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru etidijum bromida u trajanju od 30 minuta, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora (MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje veličine PCR produkata korišćen je marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka).

4.2.5. Određivanje dužine restrikcionih fragmenata

Nakon verifikacije PCR produkata na agaroznom gelu izvršena je restrikciona digestija primenom odgovarajućih FastDigest (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka) restrikcionih endonukleaza, enzima koji prepoznaju specifičnu palindromsku sekvencu i hidrolizom fosfodiesterarskih veza DNK daju fragmente odgovarajuće dužine (tabela 4). Reakcionu smešu za reakcije restrikcione digestije činili su: 2 µl 10X FastDigest pufera, 0,1 µl odgovarajućeg restrikcionog enzima, 5 µl PCR produkta i voda do ukupne zapremine od 10 µl. Reakcija se odvijala u vodenom kupatilu pet minuta na temperaturi od 37 °C.

Tabela 4. Restrikcioni enzimi korišćeni za određivanje ispitivanih polimorfizama

Polimorfizam	Restrikcioni enzim	Palindromske sekvence
rs1800629	NcoI	5'...C↓C A T G G...3' 3'...G G T A C↑C...5'
rs7943316	HinfI	5'...G↓A N T C...3' 3'...C T N A↑G...5'
rs4880	AgeI (BshTI)	5'...A↓C C G G T...3' 3'...T G G C C↑A...5'
rs2228570	FokI	5'...G G A T G (N) ₉ ↓...3' 3'...C C T A C (N) ₁₃ ↑...5'
rs1544410	Mva1269I (BsmI)	5'...G A A T G C N↓...3' 3'...C T T A C↑G N ...5'

4.2.6. Poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

Identifikacija dobijenih restrikcionih fragmenata izvršena je na 8% poliakrilamidnom gelu, odnosno 6% poliakrilamidnom gelu za VDR rs1544410 polimorfizam. Poliakrilamidni gel se dobija polimerizacijom akrilamida i bisakrilamida uz primenu odgovarajućih katalizatora. Proces polimerizacije u reakcionoj smeši odvija se istovremenim dodavanjem 10% amonijumpersulfata (APS) i N,N,N',N'-tetrametenitilendiamin (TEMED) u 30% rastvor akrilamida (29:1 akrilamid: N'N'-metilenbisakrilamid u vodi).

Elektroforeza se odvijala u 1X TBE puferu u trajanju od 80 minuta pri struji jačine 20 mA i naponu 120 V. Nakon završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru

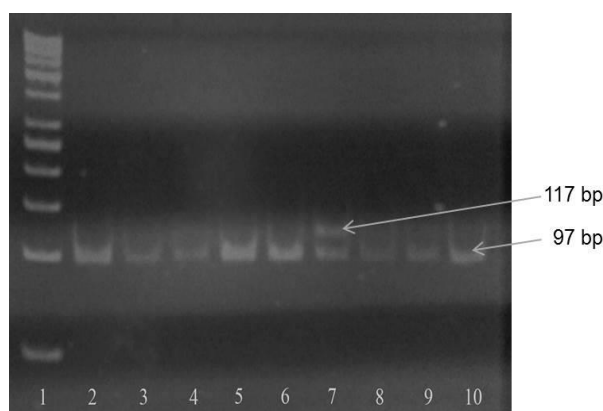
etidijum bromida u trajanju od 30 minuta, a zatim je izvršena vizuelizacija pod UV svetlošću transiluminatora (MacroVue UVis-20 Transilluminator, Hoefer Inc., Holliston, MA, SAD). Za određivanje dužine restrikcionih fragmenata korišćen je marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Nemačka). Veličine restrikcionih fragmenata za ispitivane polimorfizme prikazane su u tabeli 5.

Tabela 5. Aleli i veličina odgovarajućih restrikcionih fragmenata za ispitivane polimorfizme

Polimorfizam	Alel	Veličina restrikcionih fragmenata
rs1800629	G	97 bp i 20 bp
	A	117 bp
rs7943316	A	177 bp i 73 bp
	T	250 bp
rs4880	Ala	74 bp i 17 bp
	Val	91 bp
rs2228570	f (T)	196 bp i 69 bp
	F (C)	265 bp
rs1544410	b (G)	654 bp i 76 bp
	B (A)	730 bp

4.2.7. Analiza fragmenata dobijenih PCR-RFLP metodom

Analizom dužine restrikcionih fragmenata utvrđen je genotip za svaki od ispitivanih polimorfizama.



Slika 12. Poliakrilamidna gel elektroforeza za TNF- α rs1800629 polimorfizam

Kolona1 – marker; kolone 2-6 i 8-10 – GG genotip; kolona 7 – GA genotip

Polimorfizam rs1800629. Homozigotni, normalni (divlji, engl. *Wild Type*) genotip GG predstavljen je prisustvom dva fragmenta veličine 97 bp i 20 bp, dok u prisustvu dva polimorfna alela nastaje AA genotip, koji se na agaroznom gelu vidi kao jedinstveni fragment veličine 117 bp. Prisustvo sva tri fragmenta (117 bp, 97 bp i 20 bp) odgovara heterozigotnom GA genotipu (slika 12).

Polimorfizam rs7943316. Homozigotni normalni AA genotip karakteriše se prisustvom dva fragmenta veličine 177 bp i 73 bp, dok jedan fragment veličine 250bp odgovara homozigotnom mutiranom TT genotipu. Heterozigotni AT genotip predstavljen je prisustvom tri fragmenta veličine 250 bp, 177 bp i 73 bp.



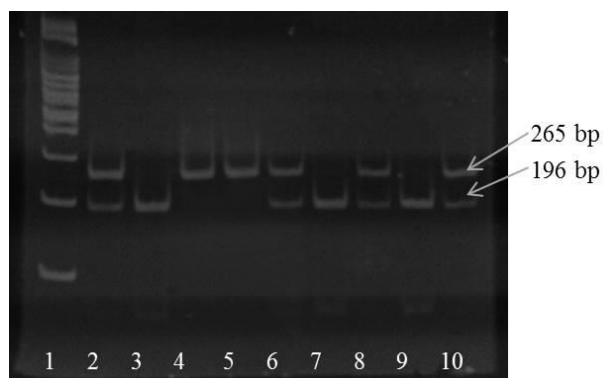
Slika 13. Poliakrilamidna gel elektroforeza za MnSOD rs4880 polimorfizam

Kolona 1 – marker; kolone 2, 3, 8, 9 – AlaVal genotip; kolone 5-7 – AlaAla genotip;
kolona 4 – ValVal genotip

Polimorfizam rs4880. Dva fragmenta veličine 74 bp i 17 bp odgovaraju homozigotnom normalnom AlaAla genotipu, a jedinstveni fragment veličine 91 bp homozigotnom mutiranom ValVal genotipu. Heterozigotni AlaVal genotip registrovan je u prisustvu sva tri fragmenta 91 bp, 74 bp i 17 bp (slika 13).

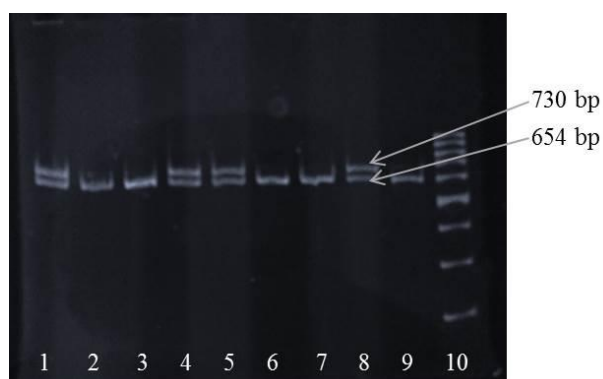
Polimorfizam rs2228570. Fragment veličine 265 bp odgovara homozigotnom divljem genotipu ff (TT), dok homozigotnom mutiranom FF (CC) genotipu odgovara prisustvo dva fragmenta veličine 196 bp i 69 bp. Heterozigotni Ff (CT) genotip predstavljen je prisustvom sva tri fragmenta 265 bp, 196 bp i 69 bp (slika 14).

Polimorfizam rs1544410. Normalni bb (GG) genotip karakteriše se prisustvom fragmenata veličine 654 bp i 76 bp, a homozigotni mutirani BB (AA) genotip prisustvom fragmenta veličine 730 bp. Heterozigotni bB (GA) genotip registrovan je u prisustvu tri fragmenta veličine 730 bp, 654 bp i 76 bp (slika 15).



Slika 14. Poliakrilamidna gel elektroforeza za VDR rs2228570 polimorfizam

Kolona 1 – marker; kolone 4, 5 – ff genotip; kolone 2, 6, 8, 10 – Ff genotip; kolone 3, 7, 9 – FF genotip



Slika 15. Poliakrilamidna gel elektroforeza za VDR rs1544410 polimorfizam

Kolone 1, 4, 5, 8 – Bb genotip; kolone 2, 3, 6, 7, 9 – bb genotip; kolona 10 – marker

4.2.8. Merenje koncentracije 25-hidroksi vitamina D_3

Koncentracija 25(OH) D_3 u plazmi pacijenata obolelih od bronhijalne astme i zdravih ispitanika određivana je primenom tečne hromatografije visokih performansi (engl. High-Performance Liquid Chromatography, HPLC).

U 500 μ l acetonitrila dodato je 500 μ l uzorka plazme, a zatim nakon vorteksiranja i 1 ml heksana. Nakon centrifugiranja pet minuta na 8000 rpm izdvojeno je 900 μ l supernatanta. Posle uparavanja supernatanta, suvi ostatak je rastvoren u 100 μ l acetonitrila. Za hromatografsko određivanje koncentracije 25(OH) D_3 korišćeno je 50 μ l prethodno pripremljenog uzorka. Hromatografska analiza urađena je na tečnom hromatografu Agilent 1200 SL serije (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, SAD) korišćenjem kolone Purospher STAR RP-18e, 150x4,6 mm, 5 μ m (Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka). Mobilnu fazu činila je smeša acetonitrila i metanola u odnosu

9:1 sa protokom od 1ml/min. Temperatura kolone podešena je na 40 °C, a hromatogram je registrovan na 265 nm.

4.3. Statistička obrada podataka

Za utvrđivanje učestalosti genotipova i alela ispitivanih polimorfizama, kao i eventualno odstupanje od Hardy–Vajnbergovog (Hardy–Weinberg) ekvilibrijuma, kod obolelih od bronhijalne astme i zdravih ispitanika korišćen je Hi-kvadrat (χ^2) test, odnosno Fišerov test tačne verovatnoće kada je broj uzoraka bio manji od pet.

Procena rizika za oboljevanje od bronhijalne astme određivana je unakrsnim odnosom šansi (engl. Odds Ratio, OR) i 95% intervala poverenja (engl. Confidence Interval, CI).

Koncentracija 25(OH)D₃ u plazmi izražena je kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Statistička značajnost razlika vrednosti između obolelih i zdravih ispitanika određivana je Studentovim t-testom za dva nezavisna uzorka.

Vrednosti p manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

Dobijeni rezultati obrađeni su primenom kompjuterskog programa SPSS verzija 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Za detekciju interakcija više polimorfizama korišćena je MDR metoda, koja omogućava da interakcije budu detektovane čak i u relativno malom skupu podataka. Metoda MDR predstavlja neparametarsku alternativu tradicionalnim statističkim metodama kao što je logistička regresija, koja se pokazala neefikasnom za detekciju epistaze. Kod MDR-a smanjenje dimenzionalnosti postiže se tako što se genotipovi sa više lokusa dele u dve grupe, sa visokim i niskim rizikom za pojavu bolesti, i formira se nova jednodimenzionalna promenljiva koja predstavlja kombinaciju genotipova za koju se procenjuje sposobnost predikcije statusa bolesti [119].

U slučaju manjeg broja uzoraka, koristi se tehnika unakrsne validacije (eng. cross-validation), kojom se ulazni podaci dele na skup podataka za treniranje (kalibraciju) i testiranje (predikciju). Skup podataka za kalibraciju koristi se za dobijanje optimalnog modela, koji se potom primenjuje na skupu za predikciju. Podela podataka na skup za kalibraciju i predikciju izvodi se metodom slučajnog uzorka, pri čemu se isti podaci nikada ne koriste istovremeno i za treniranje i za testiranje modela. U radu je korišćena desetostruka unakrsna validacija, gde su ulazni podaci podeljeni u deset jednakih delova, pri čemu je devet delova korišćeno za trening, a testiranje

modela je vršeno na preostalom desetom delu. Procedura unakrsne validacije se zatim ponavlja deset puta, tako da se svaki skup podataka koristi jednom za testiranje. Kao mera performanse modela koristi se tačnost, koja predstavlja aritmetičku sredinu za svih deset validacija. Drugi značajan parametar za izbor najboljeg modela jeste konzistentnost unakrsne validacije (engl. Cross-Validation Consistency, CVC), koja treba da iznosi najmanje 9/10 za desetostruku unakrsnu validaciju [119]. Za statističku obradu i grafički prikaz podataka korišćen je besplatni MDR softver¹.

¹ MDR softver je besplatan i može se preuzeti na stranici
<http://www.multifactor dimensionality reduction.org>

5. REZULTATI

5.1. Analiza rs1800629 polimorfizma gena za TNF- α

Raspodela genotipova rs1800629 polimorfizma u ispitivanim grupama ne odstupa od Hardy–Vajnbergovog pravila ($p>0,05$). U ispitivanim grupama najzastupljeniji je homozigotni GG genotip (72,2% u grupi obolelih od BA i 73,7% u kontrolnoj grupi), dok je heterozigotni GA genotip registrovan kod 27,8% obolelih od BA i 25,33% zdravih ispitanika. S obzirom na to da je AA genotip registrovan kod samo jednog ispitanika kontrolne grupe, analiziran je zajedno sa heterozigotnim GA genotipom. Raspodela genotipova i alela kod obolelih od BA nije pokazala statistički značajne razlike u poređenju sa zdravim ispitanicima (tabela 6).

Tabela 6. Raspodela genotipova i alela rs1800629 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi

rs1800629		BA n (%)	Kontrola n (%)	χ^2	p
Genotip	GG	57 (72,2)	70 (73,7)	0,051	0,821
	GA+AA	22 (27,8)	25 (27,3)		
Alel	G	136 (86,1)	164 (86,3)	0,004	0,948
	A	22 (13,9)	26 (13,7)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika

Tabela 7. Raspodela genotipova rs1800629 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Genotip		χ^2	p
		GG n (%)	GA+AA n (%)		
Muški	BA	25 (78,1)	7 (21,9)	0,182	0,670
	Kontrola	34 (73,9)	12 (26,1)		
Ženski	BA	32 (68,1)	15 (31,9)	0,337	0,562
	Kontrola	36 (73,5)	13 (26,5)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika

Raspodela genotipova rs1800629 polimorfizma prema polu u ispitivanim grupama prikazana je u tabeli 7, dok je raspodela alela prikazana u tabeli 8. Analizom dobijenih rezultata nisu utvrđene značajne razlike u raspodeli genotipova i alela između obolelih od BA i zdravih ispitanika istog pola (tabela 8).

Tabela 8. Raspodela alela rs1800629 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Alel		χ^2	p
		G n (%)	A n (%)		
Muški	BA	57 (89,1)	7 (10,9)	0,157	0,692
	Kontrola	80 (87,0)	12 (13,0)		
Ženski	BA	79 (84,0)	15 (16,0)	0,105	0,746
	Kontrola	84 (85,7)	14 (14,3)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika

5.2. Analiza polimorfizama gena za enzime antioksidativne zaštite

5.2.1. Polimorfizam rs7943316 gena za katalazu

Raspodela genotipova rs7943316 polimorfizma u ispitivanim grupama ne odstupa od Hardy–Vajenbergovog pravila ($p>0,05$). U ispitivanim grupama najzastupljeniji je T alel (69,6% kod obolelih od BA i 70,5% kod zdravih ispitanika), dok je A alel prisutan kod 30,4% obolelih od BA i 29,5% ispitanika kontrolne grupe. Analiza raspodele genotipova i alela nije pokazala statistički značajne razlike između ispitivanih grupa (tabela 9).

Tabela 9. Raspodela genotipova i alela rs7943316 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi

rs7943316		BA n (%)	Kontrola n (%)	χ^2	df	p
Genotip	AA	5 (6,3)	6 (6,3)	0,059	2	0,971
	AT	38 (48,1)	44 (46,3)			
	TT	36 (45,6)	45 (47,4)			
Alel	A	48 (30,4)	56 (29,5)	0,034	1	0,854
	T	110 (69,6)	134 (70,5)			

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika df – stepen slobode (engl. degrees of freedom)

Tabela 10. Raspodela genotipova rs7943316 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Genotip			χ^2	p
		AA n (%)	AT n (%)	TT n (%)		
Muški	BA	3 (9,4)	18 (56,3)	11 (34,4)	1,469	0,480
	Kontrola	2 (4,3)	23 (50,0)	21 (45,7)		
Ženski	BA	2 (4,3)	20 (42,6)	25 (53,2)	0,670	0,715
	Kontrola	4 (8,2)	21 (42,9)	24 (49,0)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika

Raspodela genotipova rs7943316 polimorfizma u odnosu na pol prikazana je u tabeli 10. Razlike u raspodeli genotipova između obolelih od BA i zdravih ispitanika, kako muškog ($\chi^2=1,469$; $df=2$; $p=0,480$), tako i ženskog pola ($\chi^2=0,670$; $df=2$; $p=0,715$), nisu statistički značajne. Takođe, nisu utvrđene razlike u učestalosti A i T alela kod muškaraca, odnosno žena obolelih od BA u poređenju sa zdravim ispitanicima istog pola (tabela 11).

Tabela 11. Raspodela alela rs7943316 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Alel		χ^2	p
		A alel n (%)	T alel n (%)		
Muški	BA	24 (37,5)	40 (62,5)	1,140	0,286
	Kontrola	27 (29,3)	65 (70,7)		
Ženski	BA	24 (25,5)	70 (74,5)	0,396	0,529
	Kontrola	29 (29,6)	69 (70,4)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika

5.2.2. Analiza rs4880 polimorfizma gena za mangan-superoksid-dizmutazu

Raspodela genotipova rs4880 polimorfizma u ispitivanim grupama ne pokazuje odstupanje od Hardy–Vajenbergovog pravila ($p>0,05$). Od ukupno 79 ispitanika obolelih od BA kod 21,5% registrovan je AlaAla genotip, kod 58,2% AlaVal i kod 20,3% ValVal genotip. U kontrolnoj grupi jednako su zastupljeni AlaAla i AlaVal genotipovi sa po 46,3%, dok je ValVal genotip prisutan kod 7,4% ispitanika.

Raspodela genotipova rs4880 polimorfizma pokazala je statistički značajne razlike između obolelih od BA i zdravih ispitanika (tabela 12). Naime, genotipovi sa

mutiranim Val alelom značajno su češći kod astmatičara u poređenju sa ispitanicima kontrolne grupe, dok je homozigotni AlaAla genotip značajno češći kod zdravih ispitanika u poređenju sa obolelima od BA ($\chi^2=11,649$; $df=1$; $p=0,001$).

U kontrolnoj grupi najzastupljeniji je Ala alel sa 69,5%, dok je u grupi obolelih registrovan kod 50,6% ispitanika. Mutirani Val alel zastupljen je sa 30,5% kod zdravih ispitanika, odnosno sa 49,4% u grupi obolelih od BA. Razlika u učestalosti alela između obolelih od BA i zdravih ispitanika takođe je statistički značajna (tabela 12).

Tabela 12. Raspodela genotipova i alela rs4880 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi

rs4880		BA n (%)	Kontrola n (%)	χ^2	df	p*
Genotip	AlaAla	17 (21,5)	44 (46,3)	14,166	2	0,001
	AlaVal	46 (58,2)	44 (46,3)			
	ValVal	16 (20,3)	7 (7,4)			
Alel	Ala	80 (50,6)	132 (69,5)	12,862	1	<0,001
	Val	78 (49,4)	58 (30,5)			

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p<0,05$); df – stepen slobode (engl. degrees of freedom)

Raspodela genotipova rs4880 polimorfizma prema polu prikazana je u tabeli 13. Statistički značajne razlike u raspodeli genotipova postoje između obolelih od BA i zdravih ispitanika muškog pola. Kod zdravih ispitanika AlaAla genotip je značajno češći u odnosu na druge genotipove u poređenju sa obolelima od BA ($\chi^2=6,723$; $df=1$; $p=0,01$).

Tabela 13. Raspodela genotipova rs4880 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Genotip	BA n (%)	Kontrola n (%)	χ^2	df	p*
Muški	AlaAla	5 (15,6)	20 (43,5)	12,028 [#]	2	0,002[#]
	AlaVal	18 (56,3)	24 (52,2)			
	ValVal	9 (28,1)	2 (4,3)			
Ženski	AlaAla	12 (25,5)	24 (49,0)	5,627	2	0,060
	AlaVal	28 (59,6)	20 (40,8)			
	ValVal	7 (14,9)	5 (10,2)			

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p<0,05$); df – stepen slobode (engl. degrees of freedom); [#] – Fišerov test tačne verovatnoće

Razlike u učestalosti alela statistički su značajne, kako kod obolelih od BA muškog, tako i ženskog pola, u poređenju sa zdravim ispitanicima istog pola (tabela 14).

Tabela 14. Raspodela alela rs4880 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Alel		χ^2	p^*
		Ala alel n (%)	Val alel n (%)		
Muški	BA	28 (43,8)	36 (56,3)	10,396	0,001
	Kontrola	64 (69,6)	28 (30,4)		
Ženski	BA	52 (55,3)	42 (44,7)	4,052	0,044
	Kontrola	68 (69,4)	30 (30,6)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p < 0,05$)

5.3. Analiza polimorfizama gena za receptor vitamina D

Raspodela genotipova ispitivanih polimorfizama na genu za VDR ne odstupa od Hardy–Vajnbergovog pravila ($p > 0,05$).

5.3.1. Polimorfizam rs2228570

U kontrolnoj grupi najzastupljeniji je FF genotip sa 70,5%. Heterozigotni Ff genotip je zastupljen sa 27,4%, a homozigotni ff genotip sa svega 2,1%. U grupi obolelih od BA genotipovi FF i Ff zastupljeni su sa 46,8%, odnosno 45,6%, dok je ff genotip registrovan kod 7,6% ispitanika.

Tabela 15. Raspodela genotipova i alela rs2228570 polimorfizma gena za VDR u BA i kontrolnoj grupi

rs2228570		BA n (%)	Kontrola n (%)	χ^2	df	p^*
Genotip	ff	6 (7,6)	2 (2,1)	10,743 [#]	2	0,004 [#]
	Ff	36 (45,6)	26 (27,4)			
	FF	37 (46,8)	67 (70,5)			
Alel	f	48 (30,4)	30 (15,8)	10,560	1	0,001
	F	110 (69,6)	160 (84,2)			

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; df – stepen slobode (engl. degrees of freedom); *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p < 0,05$); [#] - Fišerov test tačne verovatnoće

Između obolelih od BA i zdravih ispitanika postoji statistički značajna razlika u raspodeli genotipova rs2228570 polimorfizma gena za VDR ($p=0,004$; tabela 15).

Učestalost alela takođe pokazuje statistički značajne razlike između obolelih od BA i zdravih ispitanika ($\chi^2=10,560$; $df=1$; $p=0,001$). Alel F je zastupljen sa 84,21% kod ispitanika kontrolne grupe i 69,62% kod obolelih od BA, dok je f alel registrovan kod 15,79% zdravih ispitanika i 30,38% astmatičara.

Tabela 16. Raspodela genotipova rs2228570 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Genotip		χ^2	p^*
		ff + Ff n (%)	FF n (%)		
Muški	BA	20 (62,5)	12 (37,5)	10,342	0,001
	Kontrola	12 (26,1)	34 (73,9)		
Ženski	BA	22 (46,8)	25 (53,2)	1,441	0,230
	Kontrola	33 (67,3)	16 (32,7)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p<0,05$)

Raspodela genotipova rs2228570 polimorfizma prema polu prikazana je u tabeli 16. S obzirom na to da kod zdravih ispitanika muškog pola nijedan od ispitanika nije nosilac ff genotipa, ovaj genotip je analiziran zajedno sa heterozigotnim Ff genotipom. Analizom je utvrđena statistički značajna razlika u raspodeli genotipova kod obolelih od BA muškog pola u poređenju sa zdravim ispitanicima istog pola ($\chi^2=10,342$; $df=1$; $p=0,001$). Takođe, kod ispitanika muškog pola postoji statistički značajna razlika u učestalosti alela (tabela 17).

Tabela 17. Raspodela alela rs2228570 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Alel		χ^2	p^*
		f alel n (%)	F alel n (%)		
Muški	BA	24 (37,5)	40 (62,5)	12,717	<0,001
	Kontrola	12 (13,0)	80 (87,0)		
Ženski	BA	24 (25,5)	70 (74,5)	1,441	0,230
	Kontrola	18 (18,4)	80 (81,6)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p<0,05$)

Kod pripadnika ženskog pola nisu utvrđene razlike, ni u raspodeli genotipova ($\chi^2=2,122$; $df=2$; $p=0,346$; tabela 17), ni u učestalosti alela između obolelih od BA i zdravih ispitanika (tabela 17).

5.3.2. Polimorfizam rs1544410

Raspodela genotipova i alela rs1544410 polimorfizma gena za VDR ne razlikuju se značajno između obolelih od BA i zdravih ispitanika (tabela 18).

Tabela 18. Raspodela genotipova i alela rs1544410 polimorfizma u BA i kontrolnoj grupi

		BA n (%)	Kontrola n (%)	χ^2	<i>df</i>	<i>p</i>
Genotip	bb	28 (35,4)	38 (40,0)	2,248	2	0,325
	Bb	40 (50,6)	38 (40,0)			
	BB	11 (13,9)	19 (20,0)			
Alel	b	96 (60,8)	114 (60,0)	0,021	1	0,885
	B	62 (39,2)	76 (40,0)			

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; *df* – stepen slobode (engl. degrees of freedom)

Razlike u raspodeli genotipova prema polu nisu statistički značajne kod ispitanika muškog ($\chi^2=1,061$; $df=2$; $p=0,588$), odnosno ženskog pola ($\chi^2=1,445$; $df=2$; $p=0,485$) u poređenju sa zdravim ispitanicima istog pola (tabela 19).

Tabela 19. Raspodela genotipova rs1544410 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Genotip			χ^2	<i>p</i>
		bb n (%)	Bb n (%)	BB n (%)		
Muški	BA	10 (31,3)	17 (53,1)	5 (15,6)	1,061	0,588
	Kontrola	18 (39,1)	19 (41,3)	9 (19,6)		
Ženski	BA	18 (38,8)	23 (48,9)	6 (12,8)	1,445	0,485
	Kontrola	20 (40,8)	19 (38,8)	10 (20,4)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika

Takođe, raspodela alela kod ispitanika muškog, odnosno ženskog pola ne razlikuje se značajno u odnosu na ispitanike kontrolne grupe istog pola (tabela 20).

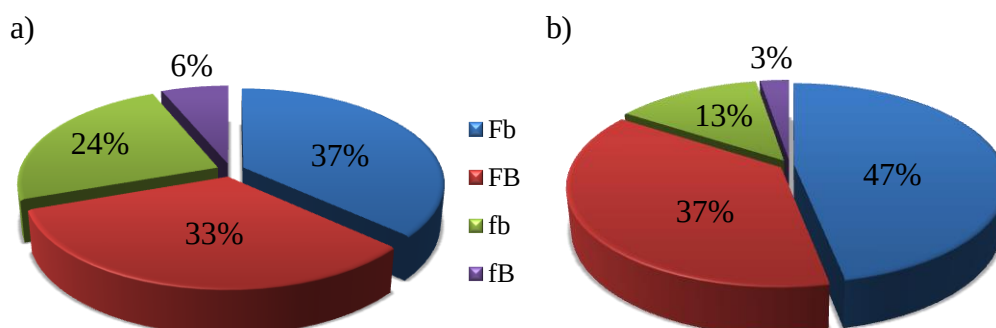
Tabela 20. Raspodela alela rs1544410 polimorfizma prema polu u BA i kontrolnoj grupi

Pol	Grupa	Alel		χ^2	p
		b alel n (%)	B alel n (%)		
Muški	BA	37 (57,8)	27 (42,2)	0,061	0,806
	Kontrola	55 (59,8)	37 (40,2)		
Ženski	BA	59 (62,8)	35 (37,2)	0,133	0,715
	Kontrola	59 (60,2)	39 (39,8)		

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika

5.3.3. Analiza haplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za receptor vitamina D

Za polimorfizme rs2228570 i rs1544410 gena za vitamin D receptor registrovana su četiri haplotipa: Fb, FB, fb i fB. Raspodela haplotipova prikazana je na grafikonu 1. U ispitivanim grupama najzastupljeniji je Fb haplotip sa 47% u kontrolnoj i 37% u grupi obolelih od BA.



Grafikon 1. Raspodela haplotipova na genu za VDR

a) BA, b) kontrolna grupa

Između obolelih od BA i zdravih ispitanika postoje statistički značajne razlike u raspodeli haplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR ($\chi^2=10,972$; $df=3$; $p=0,012$). Kod obolelih od BA u poređenju sa ispitanicima kontrolne grupe zabeležena je statistički značajno veća zastupljenost fb haplotipa u odnosu na ostale haplotipove (tabela 21).

Tabela 21. Analiza haplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR u BA i kontrolnoj grupi

Haplotip	BA	Kontrola	<i>p</i> *
fb	38	25	0,009
fB	10	5	0,091
Fb	58	89	0,057
FB	52	71	0,387

BA – bronhijalna astma; *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p < 0,05$)

5.3.4. Analiza diplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za receptor vitamina D

Za rs2228570 i rs1544410 polimorfizme gena za VDR registrovano je 9 diplotipova. U grupi obolelih od BA najzastupljeniji je FfBb diplotip sa 25,3%, dok su u grupi zdravih ispitanika najčešći diplotipovi FFBb sa 28,4% i FFbb sa 27,4%. U kontrolnoj grupi nisu registrovani ffBb i ffBB diplotipovi. Diplotipovi koji su bili zastupljeni sa manje od 5% u odnosu na ukupan broj diplotipova za datu grupu nisu uključeni u analizu. U poređenju sa zdravim ispitanicima kod obolelih od BA značajno je češći FfBb diplotip ($p=0,018$; tabela 22).

Tabela 22. Analiza diplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR u BA i kontrolnoj grupi

Diplotip	BA n (%)	Kontrola n (%)	<i>p</i> *
ffbb	2 (2,5)	2 (2,1)	NR
ffBb	2 (2,5)	0 (0)	NR
ffBB	2 (2,5)	0 (0)	NR
Ffbb	12 (15,2)	10 (10,5)	0,357
FfBb	20 (25,3)	11 (11,6)	0,018
FfBB	4 (5,1)	5 (5,3)	0,953
FFbb	14 (17,7)	26 (27,4)	0,132
FFBb	18 (22,8)	27 (28,4)	0,398
FFBB	5 (6,3)	14 (14,7)	0,077

BA – bronhijalna astma; n – broj ispitanika; *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p < 0,05$); NR – nije računato

5.4. Procena rizika za oboljevanje od bronhijalne astme u odnosu na ispitivane polimorfizme

Dobijeni rezultati pokazuju da je rizik za oboljevanje od BA statistički značajno veći kod nosilaca heterozigotnog AlaVal (OR=2,7; $p=0,004$) i homozigotnog mutiranog ValVal genotipa (OR=5,9; $p<0,001$) u poređenju sa nosiocima homozigotnog AlaAla genotipa rs4880 polimorfizma gena za MnSOD (tabela 23). Rizik za oboljevanje od BA statistički je značajno niži u prisustvu FF genotipa (OR=0,184; $p=0,027$) u odnosu na ff genotip rs2228570 polimorfizma gena za VDR (tabela 23). Genotipovi rs1800629, rs7943316 i rs1544410 polimorfizama nemaju uticaja na rizik za nastanak bolesti.

Tabela 23. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na genotip ispitivanih polimorfizama

SNP	Genotip	BA	Kontrola	OR	95% CI	p^*
rs1800629	GG	57	70	1	1	Ref.
	GA	22	24	1,126	0,573-2,213	0,731
	AA	0	1	/	/	/
	GA+AA	22	25	1,081	0,552-2,115	0,821
rs7943316	AA	5	6	1	1	Ref.
	AT	38	44	1,036	0,293-3,667	0,956
	TT	36	45	0,96	0,271-3,402	0,950
	AA+TT	74	89	0,998	0,293-3,401	0,997
rs4880	AlaAla	17	44	1	1	Ref.
	AlaVal	46	44	2,706	1,349-5,426	0,004
	ValVal	16	7	5,916	2,071-16,903	<0,001
	AlaVal+ValVal	62	51	3,146	1,608-6,157	0,001
rs2228570	ff	6	2	1	1	Ref.
	Ff	36	26	0,462	0,086-2,471	0,357
	FF	37	67	0,184	0,035-0,958	0,027
	Ff+FF	73	93	0,262	0,051-1,335	0,085
rs1544410	bb	28	38	1	1	Ref.
	Bb	40	38	1,429	0,738-2,764	0,289
	BB	11	19	0,786	0,323-1,911	0,594
	Bb+BB	51	57	0,824	0,444-1,527	0,537

BA – bronhijalna astma; OR – unakrsni odnos šansi (engl. Odds Ratio, OR); CI – interval poverenja (engl. Confidence Interval, CI); *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p<0,05$); Ref. – referentni genotip

Tabela 24. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na alele ispitivanih polimorfizama

SNP	Alel	BA	Kontrola	OR	95% CI	p*
rs1800629	G	136	164	1	1	Ref.
	A	22	26	1,02	0,554-1,881	0,948
rs7943316	A	48	56	1	1	Ref.
	T	110	134	0,958	0,604-1,518	0,854
rs4880	Ala	80	132	1	1	Ref.
	Val	78	58	2,219	1,431-3,441	<0,001
rs2228570	f	48	30	1	1	Ref.
	F	110	160	0,430	0,256-0,720	0,001
rs1544410	b	96	114	1	1	Ref.
	B	62	76	0,969	0,629-1,491	0,885

BA – bronhijalna astma; OR – unakrsni odnos šansi (engl. Odds Ratio, OR); CI – interval poverenja (engl. Confidence Interval, CI); *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p < 0,05$); Ref. – referentni alel

U odnosu na alele ispitivanih polimorfizama statistički značajno veći rizik za nastanak BA postoji kod nosilaca Val alela rs4880 polimorfizma u poređenju sa nosiocima Ala alela, dok je F alel (OR=0,430; $p=0,001$) rs2228570 polimorfizma gena za VDR udružen sa smanjenim rizikom za nastanak bolesti u odnosu f alel (tabela 24). Aleli rs1800629, rs7943316 i rs1544410 polimorfizama nemaju uticaja na rizik za nastanak bolesti.

Tabela 25. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na haplotipove ispitivanih polimorfizama gena za VDR

Haplotip	BA	Kontrola	OR	95% CI	p*
fb	38	25	1	1	Ref
fB	10	5	1,316	0,402-4,309	0,65
Fb	58	89	0,429	0,234-0,784	0,005
FB	52	71	0,482	0,260-0,894	0,02

BA – bronhijalna astma; OR – unakrsni odnos šansi (engl. Odds Ratio, OR); CI – interval poverenja (engl. Confidence Interval, CI); *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p < 0,05$); Ref. – referentni haplotip

Nosioci Ff (OR=0,429; $p=0,005$) i FB (OR=0,482; $p=0,02$) haplotipova rs2228570 i rs1544410 polimorfizama gena za VDR imaju manji rizik za razvoj BA u poređenju sa nosiocima fb haplotipa (tabela 25). Diploipovi polimorfizama gena za VDR nemaju uticaja na rizik za nastanak BA (tabela 26).

Tabela 26. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na diplotipove ispitivanih polimorfizama gena za VDR

Diplo-tip	BA	Kontrola	OR	95% CI	<i>p</i> *
ffbb	2	2	1	1	Ref.
ffBb	2	0	/	/	/
ffBB	2	0	/	/	/
Ffbb	12	10	1,2	0,142-10,119	0,867
FfBb	20	11	1,818	0,224-14,751	0,572
FfBB	4	5	0,8	0,076-8,474	0,853
FFbb	14	26	0,538	0,086-4,245	0,552
FFBb	18	27	0,667	0,086-5,172	0,697
FFBB	5	14	0,357	0,039-3,256	0,349

BA – bronhijalna astma; OR – unakrsni odnos šansi (engl. Odds Ratio, OR); CI – interval poverenja (engl. Confidence Interval, CI); *statistički značajne vrednosti su podebljane ($p < 0,05$); Ref. – referentni diplotip

Procena rizika za razvoj BA u odnosu na pol ispitanika i alele (tabela 27), odnosno pol ispitanika i genotipove (tabela 28) ispitivanih polimorfizama nije pokazala značajne razlike kod ispitanika muškog u odnosu na ispitanike ženskog pola.

Tabela 27. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na pol i alele ispitivanih polimorfizama

SNP	Alel	BA		Kontrola		OR _a	95% CI	<i>p</i>
		M	Ž	M	Ž			
rs1800629	G	57	79	80	84	1	1	Ref.
	A	7	15	12	14	1,392	0,391-4,948	0,61
rs7943316	A	24	24	27	29	1	1	Ref.
	T	40	70	65	69	1,771	0,700-4,477	0,227
rs4880	Ala	28	52	64	68	1	1	Ref.
	Val	36	42	28	30	0,623	0,256-1,516	0,297
rs2228570	F	40	70	80	80	1	1	Ref.
	f	24	24	12	18	0,381	0,133-1,088	0,071
rs1544410	b	37	59	55	59	1	1	Ref.
	B	27	35	37	39	0,827	0,346-1,976	0,67

BA – bronhijalna astma; OR_a – unakrsni odnos šansi prema polu i alelima; Ref. – referentni alel; M – muški pol; Ž – ženski pol

Tabela 28. Rizik za oboljevanje od BA u odnosu na pol i genotip ispitivanih polimorfizama

SNP	Genotip	BA		Kontrola		OR _a	95% CI	p
		M	Ž	M	Ž			
rs1800629	GG	25	32	34	36	1	1	Ref.
	GA	7	15	12	12	1,773	0,440-7,133	0,42
	AA	/	/	/	1	/	/	/
	GA+AA	7	15	12	13	1,636	0,410-6,526	0,485
rs7943316	AA	3	2	2	4	1	1	Ref.
	AT	18	20	23	21	3,651	0,267-49,892	0,332
	TT	11	25	21	24	5,966	0,429-82,947	0,184
	AT+TT	29	45	44	45	4,552	0,357-57,956	0,243
rs4880	AlaAla	5	12	20	24	1	1	Ref.
	AlaVal	18	28	24	20	0,933	0,216-4,035	0,926
	ValVal	9	7	2	5	0,156	0,016-1,490	0,107
	AlaVal+ValVal	27	35	26	25	0,674	0,164-2,767	0,584
rs2228570	FF	12	25	34	33	1	1	Ref.
	Ff	16	20	12	14	0,499	0,134-1,860	0,300
	ff	4	2	0	2	/	/	/
	Ff+ff	20	22	12	16	0,384	0,107-1,378	0,142
rs1544410	bb	10	18	18	20	1	1	Ref.
	Bb	17	23	19	19	0,835	0,218-3,159	0,792
	BB	5	6	9	10	0,667	0,111-4,014	0,658
	Bb+BB	22	29	28	29	0,786	0,224-2,761	0,786

Ref. – referentni genotip; OR_a – unakrsni odnos šansi prema polu i genotipu; Ref. – referentni genotip; M – muški pol; Ž – ženski pol

5.5. SNP–SNP interakcije

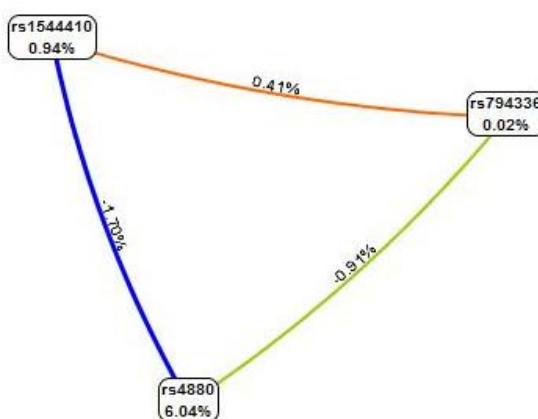
Tabela 29 prikazuje izbor najboljih modela za SNP–SNP interakcije. U razmatranje su uzeti samo modeli sa tačnošću iznad 0,55 i CVC iznad 9/10, koje se smatraju graničnim vrednostima za validnost modela [119].

Tabela 29. Rezultati MDR analize za SNP–SNP interakcije

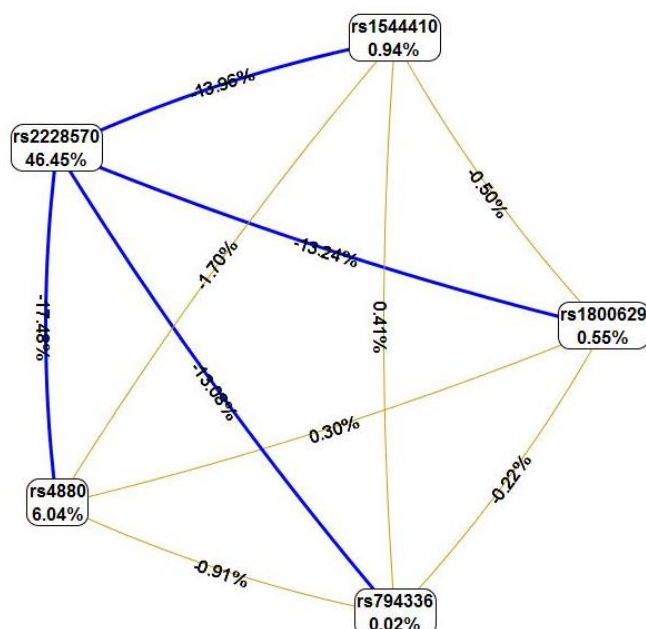
Model	Tačnost	CVC
rs7943316, rs4880	0,600	10/10
rs7943316, rs4880, rs1544410	0,579	10/10
rs1800629, rs7943316, rs4880, rs2228570, rs1544410	0,743	10/10

CVC – konzistentnost unakrsne validacije (engl. Cross-Validation Consistency)

Na slikama 16 i 17 prikazani su dijagrami uzajamne interakcije za model sa tri odnosno pet SNP-ova. Dijagram za model sa tri polimorfizma (rs7943316, rs4880, rs1544410) pokazuje da rs1544410 polimorfizam ima pozitivan (sinergistički) efekat interakcije sa rs794336 polimorfizmom (veza je prikazana narandžastom bojom). Veze predstavljene plavom bojom između rs1544410 i rs4880 i zelenom bojom između rs4880 i rs794336 polimorfizama ukazuju na negativan (redundantni) efekat interakcije.

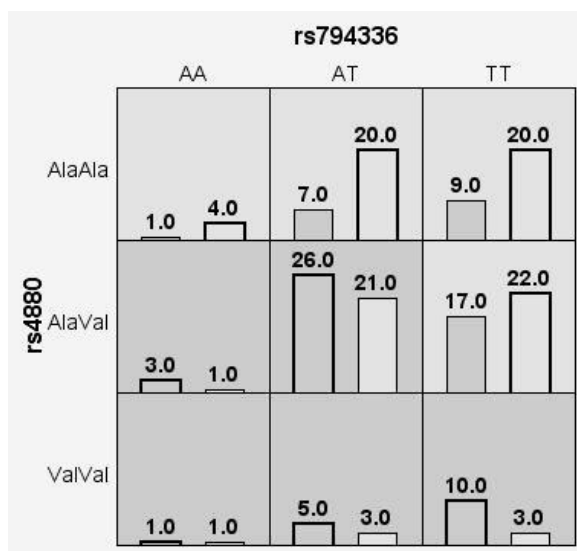


Slika 16. Dijagram SNP–SNP interakcije za model sa tri polimorfizma
narandžsta boja – synergistički efekat, plava i zelena boja – redundantni efekat

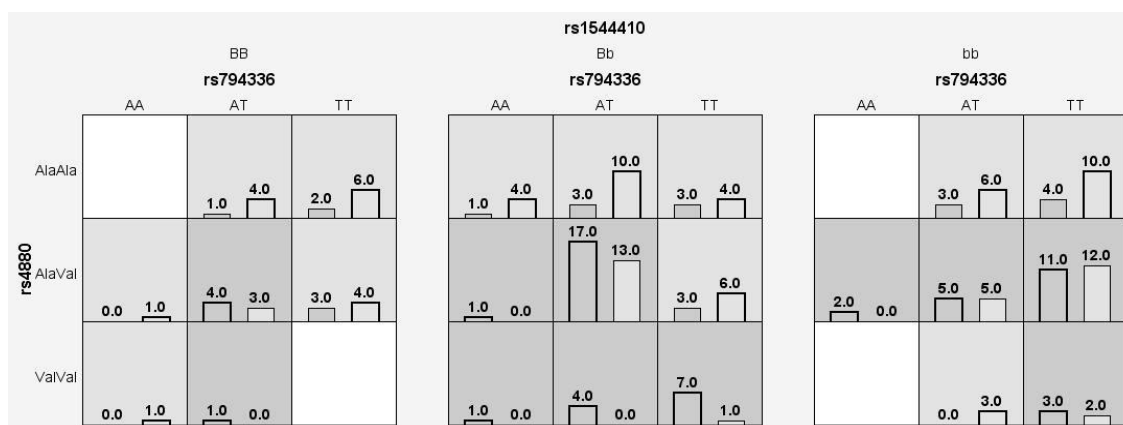


Slika 17. Dijagram SNP–SNP interakcije za model sa pet polimorfizama
plava boja – redundantni efekat, braon boja – međusobna nezavisnost

Dijagram za model sa pet polimorfizama (rs1800629, rs7943316, rs4880, rs2228570, rs1544410) pokazuje da rs2228570 ima redundantni efekat sa svim ostalim polimorfizmima u modelu. Veze prikazane braon bojom ukazuju na međusobnu nezavisnost polimorfizama u modelu (slika 17).



Slika 18. Raspodela genotipova visokog i niskog rizika za najbolji model interakcije dva SNP-a
tamnosivi kvadrat – veći rizik; svetlosivi kvadrat – manji rizik; levi stubac u kvadratu – oboleli od BA;
desni stubac u kvadratu – zdravi ispitanici



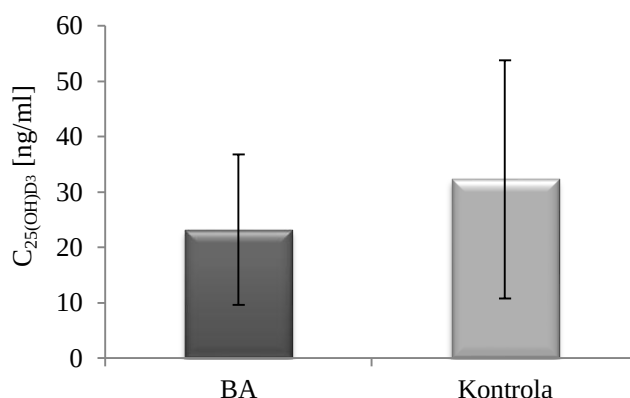
Slika 19. Raspodela genotipova visokog i niskog rizika za najbolji model interakcije tri SNP-a
tamnosivi kvadrat – veći rizik; svetlosivi kvadrat – manji rizik; levi stubac u kvadratu – oboleli od BA;
desni stubac u kvadratu – zdravi ispitanici

Slika 18 pokazuje distribuciju genotipova za najbolji model interakcije sa dva polimorfizma. Tamna polja ukazuju na visoko rizičnu kombinaciju genotipova za nastanak BA (npr. AlaVal+AT), dok svetlo siva polja ukazuju na nisko rizičnu

kombinaciju genotipova (npr. AlaVal+TT). Levi stubičasti dijagram u svakom polju odnosi se na obolele od BA, a desni na zdrave ispitanike. Visina stubičastog dijagrama proporcionalna je broju uzoraka u svakoj grupi. Na identičan način tumače se i rezultati sa slike 19, koja pokazuje raspodelu genotipova za najbolji model interakcije sa tri polimorfizma.

5.6. Koncentracija 25-hidroksi vitamina D₃ u plazmi

Srednja vrednost koncentracije 25(OH)D₃ u plazmi iznosila je 23,18±13,87 ng/ml u grupi obolelih od BA, odnosno 32,27±21,99 ng/ml u kontrolnoj grupi. U ispitivanim grupama nisu utvrđene statistički značajne razlike između srednjih vrednosti koncentracije 25(OH)D₃ u plazmi ($p=0,101$; grafikon 2).

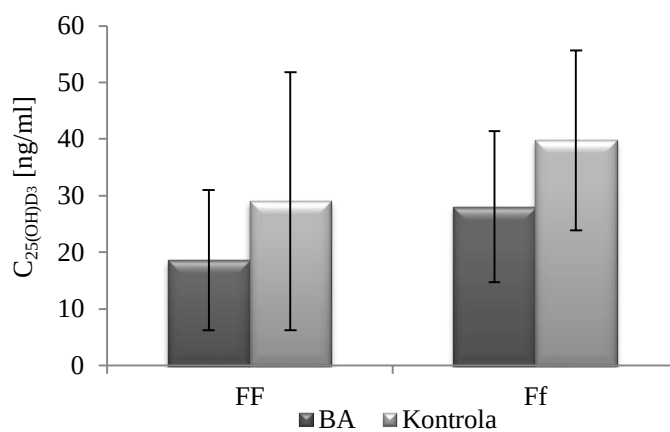


Grafikon 2. Koncentracija 25(OH)D₃ u plazmi kod obolelih od BA i u kontrolnoj grupi

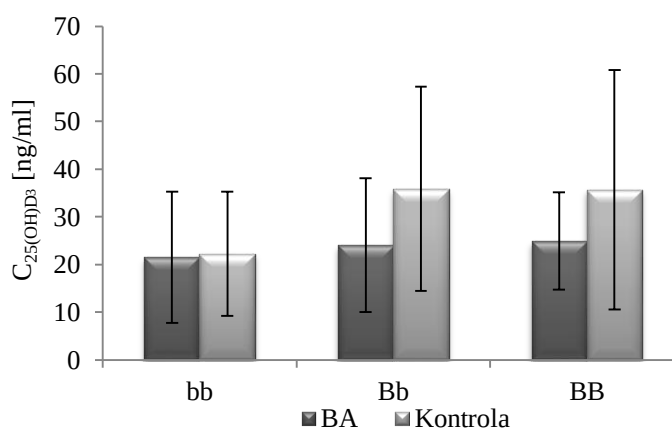
5.6.1 Koncentracija 25-hidroksi vitamina D₃ u odnosu na polimorfizme gena za VDR

Na grafikonima 3 i 4 prikazane su koncentracije 25(OH)D₃ u odnosu na rs2228570 i rs1544410 polimorfizme gena za VDR kod obolelih od BA i zdravih ispitanika. Kako u kontrolnoj grupi nijedan od ispitanika odabranih za određivanje koncentracije 25(OH)D₃ u plazmi nije imao ff genotip prikazane su samo koncentracije 25(OH)D₃ za FF i Ff genotipove.

Srednje vrednosti koncentracije 25(OH)D₃ ne razlikuju se značajno između obolelih od BA i zdravih ispitanika nosilaca određenog genotipa ($p>0,05$).



Grafikon 3. Koncentracija 25-hidroksi vitamina D₃ u plazmi kod obolelih od BA i u kontrolnoj grupi u odnosu na rs2228570 polimorfizam gena za VDR



Grafikon 4. Koncentracija 25(OH)D₃ u plazmi kod obolelih od BA i u kontrolnoj grupi u odnosu na rs1544410 polimorfizam gena za VDR

6. DISKUSIJA

6.1. Polimorfizam rs1800629 gena za TNF- α

Zapaljenje kao glavna karakteristika BA posredovano je složenom mrežom citokina, signalnih proteina, koji regulišu brojne biološke funkcije uključujući i imunološki odgovor i zapaljenje. Citokini u BA učestvuju u pokretanju zapaljenske reakcije, ali i njenom održavanju dajući joj hronični karakter. Svoje efekte ostvaruju vezivanjem za receptore na ciljnim ćelijama pokrećući na taj način niz kaskadnih reakcija čiji je krajnji efekat ushodna i/ili nishodna regulacija gena i transkripcionih faktora. Glavni izvor citokina uključenih u patogenezu BA jesu zapaljenske ćelije, neutrofili i makrofagi, ali ih stvaraju i strukturne ćelije poput epitelnih i glatkomišićinih ćelija disajnih puteva.

Faktor nekroze tumora- α pripada proinflamatornim citokinima. Pored mastocita i makrofaga koji su primarni izvor TNF- α , u respiratornom traktu ga mogu stvarati i druge ćelije uključujući i eozinofile, epitelne ćelije, neutrofile i T-limfocite. On je uključen u sve faze patogeneze BA, počev od pokretanja zapaljenske reakcije i indukcije bronhijalne hiperreaktivnosti, sve do procesa remodelovanja, koji prati hroničnu astmu. U sputumu, bronhoalveolarnom lavatu i uzorcima biopsije pluća obolelih od BA registrovana je povećana koncentracija TNF- α [120].

Polimorfizam rs1800629 spada u najčešće proučavane polimorfizme gena za TNF- α . Ovaj bialelni polimorfizam nastaje zamenom guanina adeninom u položaju -308 gena za TNF- α , a s obzirom na to da je lokalizovan u kodirajućem regionu gena, ovaj polimorfizam se smatra funkcionalnim. Naime, prisustvo A alela dovodi se u vezu sa većom transkripcijom gena i povećanom spontanom ili stimulisanom sekrecijom TNF- α u *in vivo* i *in vitro* uslovima koja je posledica većeg afiniteta za vezivanje nuklearnih faktora za TNF promotor [91,121]. U *in vitro* uslovima u B ćelijskoj liniji A alel se pokazao kao mnogo snažniji aktivator transkripcije u poređenju sa G alelom [122].

Imajući u vidu navedene uloge TNF- α u patogenezi BA, kao i to da je A alel udružen sa povećanom sintezom ovog citokina, može se očekivati da je među obolelima od BA veća zastupljenost A alela, kao i heterozigotnog GA i homozigotnog mutiranog AA genotipa. Ipak, i pored toga što je sproveden veliki broj studija koje su ispitivale povezanost rs1800629 polimorfizma sa BA, dobijeni rezultati su veoma kontradiktorni. Razlog tome može biti i različita etnička pripadnost ispitanika. Naime, raspodela genotipova i alela rs1800629 polimorfizma pokazuje značajne varijacije u zavisnosti od ispitivane populacije. Dosadašnje populacione analize su pokazale da su oko 60-70% Kavkazijanaca nosioci GG genotipa, dok se AA genotip javlja u svega oko 1,5-3% ispitanika [123].

Rezultati ove studije pokazuju da je u zdravoj populaciji najzastupljeniji GG genotip sa 73,7%, dok je AA genotip registrovan kod svega oko 1% zdravih ispitanika. Slično, i kod obolelih od BA najveću učestalost ima GG genotip sa 72,2%, dok AA genotip nije registrovan u grupi obolelih. Heterozigotni GA genotip registrovan je kod 27,8% obolelih od BA i 25,33% zdravih ispitanika. Ovakva raspodela genotipova rs1800629 polimorfizma ne pokazuje značajne razlike između obolelih od BA i zdravih ispitanika, a takođe ne postoje značajne razlike u raspodeli genotipova u odnosu na pol ispitanika. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima studije sprovedene u češkoj i makedonskoj populaciji [96,124]. Luis (Louis) i saradnici su, takođe, potvrdili da rs1800629 polimorfizam nije udružen sa nastankom BA, kao ni sa težinom bolesti u kavaskoj populaciji, a slični rezultati su dobijeni i u studiji sprovedenoj u iranskoj populaciji [95,125]. Suprotno ovim rezultatima nekoliko drugih studija je potvrdilo povezanost rs1800629 polimorfizma sa nastankom BA [93,94,126,127,128].

Prema Šinu (Shin) i saradnicima, u korejskoj populaciji genotipovi rs1800629 polimorfizma koji sadrže A alel (GA i AA) imaju značajno manju zastupljenost kod obolelih od BA u poređenju sa zdravim ispitanicima, što upućuje na protektivni efekat ovog polimorfizma i manji rizik za nastanak BA u prisustvu A alela [129]. Takođe, G alel udružen je sa nastankom BA u australijskoj populaciji dečijeg uzrasta [130]. Suprotno ovim, rezultati drugih studija ukazuju na udruženost BA sa prisustvom A alela rs1800629 polimorfizma [93,126], i to posebno kod pacijenata sa srednjeteškim u poređenju sa lakim oblikom BA [127].

Rezultati ove studije pokazuju da u ispitivanim grupama G alel ima veću učestalost (86,1% kod obolelih od BA i 86,3% u kontrolnoj grupi) u poređenju sa A

alelom (13,9% kod obolelih od BA i 13,7% zdravih ispitanika), ali ova razlika nije statistički značajna. Takođe, nema razlike u distribuciji alela rs1800629 polimorfizma u odnosu na pol.

Procena rizika za nastanak BA u odnosu na genotipove i alele rs1800629 polimorfizma pokazala je da rizik nije veći ni kod nosilaca GA ili AA genotipa u odnosu na nosioce GG genotipa, ni kod nosilaca A alela u poređenju sa nosiocima G alela u našoj populaciji. Takođe, iako se prema epidemiološkim podacima BA češće javlja kod žena, rezultati ove studije pokazuju da pol nema uticaja na rizik za razvoj BA kod nosilaca GA i AA genotipa u odnosu na GG genotip, kao i kod nosilaca A alela u poređenju sa nosiocima G alela. Albuquerki (Albuquerque) i saradnici su, međutim, pokazali da nosioci GG genotipa imaju i do pet puta veći rizik za razvoj BA [130], dok prema Aokiju i saradnicima A alel nosi veći rizik za nastanak BA i kod Kavkazijanaca i kod pripadnika azijske populacije [131]. Ipak, prema rezultatima novijih metaanaliza veći rizik za nastanak bolesti imaju nosioci A alela, a stratifikovanom analizom na osnovu etničke pripadnosti pokazano je da značajno veći rizik za nastanak bolesti postoji kod pripadnika azijske populacije, ali ne i kod Kavkazijanaca [132,133].

Velika kontradiktornost rezultata do danas sprovedenih studija može se pripisati etničkim razlikama, ali svakako treba uzeti u obzir i druge faktore koji utiču na nastanak i tok bolesti, dok različiti rezultati sprovedenih metaanaliza u velikoj meri zavise i od izbora studija koje su uključene u metaanalizu. Imajući u vidu da se BA ubraja u takozvane kompleksne bolesti i da njen tačan patogenetski mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, od značaja bi bilo sprovođenje novih studija koje bi uključivale veliki broj ispitanika različitih etničkih grupa, ali i istovremeno ispitivale udruženi uticaj više različitih, kako genetskih faktora, tako i faktora spoljašnje sredine.

6.2. Polimorfizmi gena za enzime antioksidativne zaštite

U fiziološkim uslovima RVK imaju ulogu u ćelijskoj signalizaciji, apoptozi, regulaciji imunskog odgovora, diferencijaciji i procesu starenja [134].

Pluća su izložena kako RVK egzogenog porekla (aerozagađenje, duvanski dim, alergeni, mikroorganizmi), tako i RVK endogenog porekla, koje nastaju u enzimskim procesima kao deo zapaljenskog i imunskog odgovora na različite patogene ili iritanse. Primarnim izvorom RVK u plućima smatra se NADPH oksidaza fagocita.

Ukoliko nivo stvorenih RVK nadvlada antioksidativni odbrambeni sistem organizma, zbog povećane produkcije RVK i/ili smanjene antioksidativne odbrane, dolazi do pojave oksidativnog stresa i posledičnog oštećenja ćelija. Oksidativni stres u BA pojačava postojeće zapaljenje posredstvom različitih proinflamatornih medijatora, povećava bronhijalnu hipereaktivnost, stimuliše bronhospazam i povećava sekreciju mukusa [49].

Polimorfizmi jednog nukleotida na genima za enzime antioksidativne zaštite dovode se u vezu sa smanjenom aktivnošću enzima, narušavanjem ravnoteže i smanjenjem antioksidativne odbrane, što uz činjenicu da su pluća izložena visokim koncentracijama RVK može biti jedan od značajnih faktora u patogenezi BA.

6.2.1. Polimorfizam rs7943316 gena za katalazu

Zajedno sa drugim enzimima antioksidativne zaštite, superoksid-dizmutazom i glutation-peroksidazom, katalaza čini prvu liniju odbrane organizma od oksidativnog stresa štiteći ga od toksičnih efekata vodonik-peroksida, koji se pod njenim uticajem razgrađuje do molekuskog kiseonika i vode.

Eksperimentalni podaci pokazuju da je aktivnost katalaze čak 50% manja u bronhoalveolarnom lavatu astmatičnih pluća u poređenju sa zdravim kontrolama, što je posledica oksidativne modifikacije proteina, ali ne i smanjenja ukupne količine enzima [42,51]. Eritrociti dece obolele od BA, takođe, imaju manju aktivnost katalaze u poređenju sa zdravim ispitanicima [52].

Rezultati ove studije pokazuju da rs7943316 nije udružen sa BA. U ispitivanim grupama najzastupljeniji je TT genotip sa 45,57% kod obolelih od BA i 47,37% kod zdravih ispitanika. Heterozigotni AT genotip prisutan je kod 48,1% obolelih i 46,31% zdravih ispitanika, dok je u ispitivanim grupama AA genotip zastupljen sa po 6,3%. Učestalost alela je podjednaka u obe ispitivane grupe, gde je T alel registrovan kod oko 70%, a A alel kod oko 30% ispitanika. Raspodela genotipova i učestalost alela ne pokazuju razlike u odnosu na pol ispitanika, a takođe ne postoji uticaj ispitivanog polimorfizma na rizik za nastanak BA u našoj populaciji.

U populaciji Kavkazijanaca AT genotip je nešto češći u poređenju sa TT genotipom, dok AA genotip ima najmanju frekvenciju, što je u skladu sa rezultatima ove studije [118]. Takođe, slična raspodela genotipova i alela rs7943316 polimorfizma

postoji i u ruskoj populaciji i Tamil populaciji južne Indije [100,135]. Suprotno ovim rezultatima u kineskoj populaciji najzastupljeniji je AA genotip sa 56,3%, dok je TT genotip zastupljen sa 8,1% [98].

Mak i saradnici su pokazali da rs7943316 polimorfizam nije udružen sa BA, kao i da ne postoji uticaj ispitivanog polimorfizma na aktivnost katalaze [136]. Suprotno, u studiji Polonikova i saradnika AA genotip značajno je češći kod obolelih od BA u odnosu na zdrave ispitanike, a takođe učestalost A alela značajno je veća kod obolelih u poređenju sa zdravim ispitanicima [100]. Polonikov i saradnici sugerišu da se ovaj polimorfizam dovodi u vezu sa povećanim oksidativnim stresom usled nedovoljne aktivnosti enzima, a samim tim i većim rizikom za nastanak BA [100].

S obzirom na mali broj dostupnih studija i kontradiktorne dosadašnje rezultate, kao i nedovoljno podataka o uticaju rs7943316 polimorfizma na aktivnost enzima, od značaja bi bila dalja istraživanja u cilju utvrđivanja funkcionalnog efekta ovog polimorfizma u BA.

6.2.2. Polimorfizam rs4880 gena za mangan-superoksid-dizmutazu

Superoksid-dizmutaza jeste metaloenzim koji katalizuje reakciju dizmutacije $O_2^{\bullet -}$ do O_2 i H_2O_2 i smatra se prvom linijom odbrane od toksičnih efekata RVK-a. Mangan zavisna SOD je mitohondrijalni enzim koji se primarno sintetiše u citozolu, a zatim nakon prepoznavanja N-terminalnog mitohondrijalnog signalnog peptida biva transportovan do mitohondrijalnog matriksa, gde odvajanjem mitohondrijalne ciljne sekvence nastaje funkcionalni protein.

Polimorfizam rs4880 nastaje zamenom citozina (C) timinom (T) na poziciji 16 mitohondrijalne ciljne sekvence, što za posledicu ima zamenu alanina (GCT, Ala) valinom (GTT, Val). U poređenju sa Ala alelom, prisustvo mutiranog Val alela dovodi se u vezu sa smanjenom aktivnošću enzima za 30% do 40%, a samim tim i smanjenom odbranom od štetnog delovanja oksidativnih agenasa. Prema podacima iz literature, aktivnost SOD značajno je niža kod novootkrivenih pacijenata sa BA u odnosu na zdrave ispitanike [137].

Dosadašnje studije pokazuju da raspodela Ala alela varira od 11–30% u japanskoj i kineskoj populaciji do 41–62% kod Kavkazijanaca [136]. Zastupljenost Ala alela u kineskoj populaciji značajno je niža u poređenju sa populacijama Litvanaca,

Finaca i Šveđana [138]. Naši podaci pokazuju da je Ala alel u srpskoj populaciji prisutan kod 69,5% zdravih ispitanika i 50,6% obolelih od BA. Raspodela alela kod obolelih od BA pokazuje statistički značajnu razliku u poređenju sa zdravim ispitanicima. Takođe, i razlika u učestalosti alela u odnosu na pol statistički je značajna, kako kod obolelih od BA ženskog, tako i muškog pola, u odnosu na zdrave ispitanike odgovarajućeg pola.

Rezultati ove studije pokazuju i statistički značajnu razliku u raspodeli genotipova rs4880 polimorfizma. U grupi obolelih od BA najzastupljeniji je heterozigotni AlaVal genotip sa 58,2%, dok su homozigotni AlaAla i ValVal genotipovi zastupljeni sa 21,5%, odnosno 20,3%. U grupi zdravih ispitanika AlaAla i AlaVal genotipovi imaju podjednaku zastupljenost sa po 46,3%, dok je ValVal genotip zastupljen sa svega 7,4%. Alel Val predstavlja faktor rizika za razvoj BA. Naime, rizik za razvoj BA veći je 2,7 puta kod nosilaca heterozigotnog AlaVal genotipa, a 5,9 puta kod nosilaca homozigotnog mutiranog ValVal genotipa u odnosu na nosioce AlaAla genotipa. Takođe, prisustvo Val alela nosi 2,2 puta veći rizik za nastanak bolesti u odnosu na Ala alel. Prisustvo Val alela dovodi do promene sekundarne strukture proteina (dolazi do formiranja β ploče umesto α heliksa koji se formira u prisustvu Ala alela), što otežava transport prekursorne forme enzima iz citoplazme u mitohondrije. Ovako izmenjeni enzim zadržava se na unutrašnjoj membrani mitohondrija, a to za posledicu ima smanjeno stvaranje aktivnog MnSOD tetramera u mitohondrijalnom matriksu, a samim tim i neefikasnu antioksidativnu zaštitu usled smanjene aktivnosti samog enzima [103]. Takođe, ekspresija Val alela može uticati i na stabilnost mRNK [103].

Genotip ValVal se dovodi u vezu sa bronhijalnom hiperreaktivnošću, a u *in vitro* uslovima i sa smanjenom aktivnošću enzima [139]. Takođe, profesionalni oblik astme izazvan diizocijanatom udružen je sa Val alelom rs4880 polimorfizma [140]. Prema Maku i saradnicima, rs4880 polimorfizam nije udružen sa BA u kineskoj populaciji, ali Ala alel ispoljava zaštitni efekat smanjujući rizik za pojavu bolesti kod nepušača i osoba atopijske konstitucije [136]. Kod dece tajvanske populacije ređi alel nosi veći rizik za razvoj bolesti, dok u turskoj populaciji dece ne postoji udruženost rs4880 polimorfizma sa BA [141,142]. Studije u češkoj i finskoj populaciji nisu potvrdile udruženost rs4880 polimorfizma sa BA [143,144].

S obzirom na to da se sinteza RVK povećava u zapaljenju disajnih puteva, ali i da same RVK mogu pokrenuti zapaljensku reakciju, disfunkcija ili inaktivacija MnSOD može predstavljati značajan faktor u nastanku BA. Imajući u vidu kontradiktornost rezultata dosadašnjih studija, od značaja bi bilo sprovođenje novih studija u cilju ispitivanja uticaja polimorfizama drugih enzima antioksidativne zaštite i njihovog uticaja na oksidativni status kod obolelih od BA, ali i proučavanje gen–gen interakcija, kao i interakcija sa faktorima spoljašnje sredine.

6.3. Polimorfizmi gena za receptor vitamina D

Vitamin D je liposolubilni vitamin koji svoje biološke efekte ostvaruje vezivanjem za VDR. Iako su primarno mesto ekspresije VDR-a intestinalne epitelne ćelije i osteoblasti, njegova ekspresija je dokazana i u drugim tkivima koja nisu uključena u metabolizam kalcijuma i fosfora. Činjenica da se VDR nalazi u većini ćelija imunskog sistema uključujući monocite, makrofage, dendritične ćelije, NK ćelije, T- i B-limfocite, dovodi se u vezu sa efektima $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na proliferaciju, diferencijaciju i imunomodulaciju [65]. Upravo je njegov imunomodulatorni efekat razlog zbog koga se vitamin D dovodi u vezu sa BA.

Na genu za receptor vitamina D identifikovan je veliki broj SNP-ova. Značaj njihovog ispitivanja proizilazi iz činjenice da su neki od njih, poput rs2228570 polimorfizma, funkcionalni, odnosno da imaju uticaj na sintezu VDR proteina i koncentraciju vitamina D, dok drugi, poput rs1544410, mogu uticati na stabilnost iRNK.

6.3.1. Polimorfizam rs2228570

Polimorfizam rs2228570 na genu za receptor vitamina D lokalizovan je na prvom ATG kodonu egzona 2 i sadrži FokI restrikciono mesto (f ili T alel). U odsustvu restrikcionog mesta nastaje F (C) alel zbog čega transkripcija počinje na drugom ATG mestu. U ovom slučaju sintetiše se protein koji na N-terminalnom kraju ima tri aminokiseline manje i označava se i kao M4 forma (424 aminokiseline), dok kada transkripcija počinje na prvom ATG mestu, nastaje M1 forma proteina (427 aminokiselina) [107].

Zastupljenost F alela se razlikuje u zavisnosti od etničke pripadnosti i kreće se od 53% do 60,7% u kineskoj, japanskoj i populaciji Kavkazijanaca, dok je kod Afroamerikanaca zastupljen sa oko 80% [145,146]. Podaci iz literature takođe upućuju na veću učestalost FF u poređenju sa ff genotipom [147]. Prema rezultatima ove studije F alel je zastupljen sa 84,2% u zdravoj populaciji, a sa 69,62% kod obolelih od BA. Genotip FF registrovan je kod 70,53% zdravih ispitanika i 46,84% astmatičara, dok je homozigotni mutirani ff genotip prisutan kod 2,11% zdravih ispitanika i 7,59% obolelih od BA. Za razliku od zdravih ispitanika ženskog pola, kod ispitanika muškog pola nije registrovan ff genotip. Raspodela alela i genotipova statistički se značajno razlikuje između obolelih od BA i ispitanika kontrolne grupe, a značajne razlike postoje i kod ispitanika muškog pola obolelih od BA u odnosu na zdrave ispitanike istog pola. Takođe, haplotip fb i diplotip FfBb značajno su češći kod astmatičara u poređenju sa zdravim ispitanicima.

Rezultati ove studije pokazuju da F alel ima zaštitni efekat na pojavu BA. Naime, nosioci F alela imaju 2,3 puta manji rizik za razvoj BA u poređenju sa f alelom. Takođe, nosioci FF genotipa imaju 5,3 puta manji rizik za razvoj BA u odnosu na nosioce ff genotipa. Slično tome, haplotipovi rs2228570 i rs1544410 polimorfizama koji sadrže F alel, Fb i FB nose oko dva puta manji rizik za pojavu astme u odnosu na fb haplotip.

Prema studiji [148], F alel i FF genotip imaju zaštitni efekat na pojavu astme kod ispitanika čija je koncentracija 25(OH)D₃ niska, dok je u studijama [149,150] pokazano da F alel nosi 1,5 puta veći rizik za nastanak astme u populaciji Tunišana, i 2,68 puta u egipatskoj populaciji.

Suprotno našim rezultatima, iako postoji udruženost rs2228570 polimorfizma sa BA u populaciji Tunišana, frekvencija FF genotipa je značajno viša kod astmatičara u odnosu na zdrave ispitanike [149]. Studije sprovedene u kineskoj Han populaciji nisu pokazale povezanost rs2228570 polimorfizma sa BA [146,151,152].

Razlike u rezultatima sprovedenih studija mogu biti posledica ne samo različite etničke pripadnosti, već i činjenice da se gen–gen i gen–sredina interakcije razlikuju među populacijama. Većina dostupnih studija, koje su proučavale rs2228570 polimorfizam gena za VDR i BA, sprovedena je u azijskoj populaciji, što može biti jedan od razloga suprotnosti rezultata u odnosu na rezultate ove studije. S obzirom na to

da ff forma rezultuje sintezom kraćeg proteina, čija je aktivnost manja u odnosu na onu koja nastaje pod uticajem FF varijante, veća učestalost FF genotipa kod zdravih osoba može biti i posledica evolucione adaptacije u humanoj populaciji [153]. Prisustvo f alela udruženo je sa smanjenom ekspresijom VDR nakon izlaganja kalcitriolu, a pretpostavlja se da M4 forma proteina ima veći kapacitet da indukuje ekspresiju CYP24A1 gena u odnosu na M1 formu [154,155].

6.3.2. Polimorfizam 1544410

Polimorfizam rs1544410 gena za receptor vitamina D lokalizovan je u 3' netransliranom regionu i nastaje zamenom guanina (G) adeninom (A). Ovaj bialelni polimorfizam karakteriše postojanje G alela, koji se još označava kao b alel, i A alela, koji se označava i kao B alel. Polimorfizam je lokalizovan između egzona 8 i 9 i ne utiče na strukturu VDR proteina. Ipak, rs1544410 povezan je sa poli(A) mikrosatelitskim ponovcima u 3' netransliranom regionu, što može uticati na stabilnost iRNK i regulaciju transkripcije gena za VDR [108].

Rezultati ove studije pokazuju da je b alel prisutan kod oko 60% ispitanika, kako zdravih, tako i obolelih od BA. Prema podacima iz literature b alel je kod Kavkazijanaca zastupljen sa 52,9–57,7%, u kineskoj populaciji sa 91,7%, u korejskoj sa 91,1% i japanskoj sa 87,4% [146]. Raspodela alela i genotipova rs1544410 polimorfizma u našoj populaciji ne pokazuje značajne razlike između obolelih od BA i zdravih ispitanika, kao ni među astmatičarima muškog, odnosno ženskog pola, u poređenju sa zdravim ispitanicima istog pola. Heterozigotni bB i homozigotni mutirani BB genotip i mutirani B alel rs1544410 polimorfizma gena za VDR nemaju uticaja na rizik za razvoj BA u našoj populaciji.

U kineskoj populaciji rs1544410 polimorfizam nije udružen sa BA, što je u skladu sa rezultatima ove studije [146,152]. Ipak, suprotno rezultatima ove studije, Malami i saradnici su pokazali da postoji značajna razlika u distribuciji genotipova između dece obolele od BA i ispitanika kontrolne grupe [149]. Naime, B alel značajno povećava rizik za razvoj BA, a kod homozigotnih nosilaca B alela rizik je 2,5 puta veći. U populaciji Tunišana haplotipovi sa b alelom (bAT i bat) imaju zaštitni efekat na pojavu BA. Rezultati metaanalize [148] pokazuju da postoji značajna povezanost rs1544410 polimorfizma sa BA i značajno veći rizik za nastanak bolesti kod nosilaca

BB genotipa. Ipak, ove rezultate treba posmatrati sa rezervom zbog činjenice da su u metaanalizu bile uključene samo tri studije koje su sprovedene u kineskoj i populaciji Tunišana. Prema Punu (Poon) i saradnicima, b alel je udružen sa astmom i atopijom kod ispitanika francusko-kanadskog porekla [156].

Sprovedene studije pokazuju veoma nekonzistentne rezultate, što može biti posledica razlika u etničkoj pripadnosti ispitanika uključenih u studije, ali i različitoj izloženosti faktorima spoljnjeg sredine. S obzirom na to da je rs1544410 polimorfizam povezan sa poly-A mikrosatelitskim ponovcima, u predstojećim istraživanjima bi bilo od značaja ispitati i polimorfizam dužine poly-A repa i ekspresiju VDR gena kako bi se dobili dodatni podaci o uticaju rs1544410 polimorfizma gena za VDR u BA.

6.4. Status vitamina D

Za praćenje statusa vitamina D koristi se određivanje koncentracije 25(OH)D čiji najveći deo predstavlja 25(OH)D₃, koji čini 95% cirkulišućeg vitamina D. Iako nisu jasno definisane granice normalnih vrednosti 25(OH)D, smatra se da koncentracija 25(OH)D viša od 30 ng/ml (75 nmol/l) odgovara normalnom statusu vitamina D [78]. Koncentracije 25(OH)D između 20 i 30 ng/ml smatraju se niskim, dok koncentracije niže od 20 ng/ml ukazuju na nedostatak vitamina D [157].

Prema rezultatima ove studije, srednja vrednost koncentracije 25(OH)D₃ u plazmi niža je kod obolelih od BA u poređenju sa vrednostima kod zdravih ispitanika (23,18±13,87 ng/ml u grupi obolelih od BA, odnosno 32,27±21,99 ng/ml u kontrolnoj grupi). Ipak, razlika u koncentraciji 25(OH)D₃ ne pokazuje statističku značajnost. Normalan status vitamina D registrovan je kod 40,91% zdravih ispitanika i 45,45% obolelih od BA. Koncentraciju 25(OH)D₃ između 20 i 30 ng/ml imalo je 22,73% ispitanika kontrolne grupe i 13,64% obolelih od BA, dok je nedostatak vitamina D registrovan kod 36,36% zdravih ispitanika i 40,91% obolelih od BA.

Relativno niska koncentracija 25(OH)D₃ i kod zdravih ispitanika delimično može biti posledica činjenice da su uzorci krvi za analizu uzeti u zimskom periodu godine. Naime, Srbija se nalazi na geografskoj širini od 44° severno, a na geografskim širinama iznad 37° severno i ispod 37° južno sunčevo zračenje nije dovoljno da bi se u zimskom periodu godine sintetisala dovoljna količina vitamina D u koži [158]. Sezonske varijacije koncentracije 25(OH)D između zime i leta mogu biti i do 25 nmol/l

[159]. Jovičić i saradnici su prethodno pokazali da u našoj populaciji 68,5% ispitanika ima koncentraciju 25(OH)D nižu od 50 nmol/l (25 ng/ml), dok je kod 25,1% ispitanika ona niža od 25 nmol/l (10 ng/ml) [160]. Osim nedovoljnog izlaganja suncu, i navike u ishrani mogu biti jedan od uzroka niže koncentracije 25(OH)D₃. Naime, najbolji izvor vitamina D u hrani su ribe severnih mora, koje su u našoj tradicionalnoj ishrani malo zastupljene. Takođe, i biološki faktori poput pigmentacije kože, indeksa telesne mase, malapsorpcije masti i godina života mogu imati uticaj na status vitamina D.

Saglasno sa rezultatima ove studije, Menon i saradnici i Tusen (Thuesen) i saradnici nisu potvrdili postojanje razlike u koncentraciji 25(OH)D između obolelih BA i zdravih ispitanika [161,162], dok rezultati nekoliko drugih studija ukazuju na značajno niži nivo 25(OH)D kod obolelih od BA u poređenju sa zdravim ispitanicima [163,164,165,166]. Takođe, nekoliko studija ukazuju i na vezu između koncentracije 25(OH)D i plućne funkcije merene FEV1 i FVC vrednostima, kao i da su niže koncentracije 25(OH)D povezane sa težim oblicima BA [167,157]. Ipak, još uvek nije u potpunosti jasno da li je povezanost koncentracije 25(OH)D sa stepenom težine bolesti posledica specifičnijeg načina života i režima ishrane astmatičara ili se nedostatak vitamina D javlja nezavisno od astme, ali ispoljava negativni uticaj na težinu i kontrolu bolesti [157].

Pored faktora spoljašnje sredine uticaj na status vitamin D mogu imati i genetski faktori. Smatra se da polimorfizam rs2228570 na genu za receptor vitamina D može uticati na sintezu proteina. Naime, u prisustvu F alela nastaje kraći protein koji ima veći afinitet za vezivanje aktivne forme vitamina D i do 1,7 puta u poređenju sa proteinom koji nastaje u prisustvu „divljeg” alela [107]. Takođe, kraći protein efikasnije vezuje TFIIB i ima veći transkripcioni potencijal [153]. Polimorfizam rs1544410 ne utiče direktno na sintezu proteina, ali može uticati na stabilnost iRNK i regulaciju transkripcije gena za VDR [108].

Rezultati ove studije nisu pokazali statistički značajne razlike u koncentraciji 25(OH)D u odnosu na genotipove ispitivanih polimorfizama kod obolelih od BA i zdravih ispitanika, što je u skladu sa rezultatima Malmija (Maalmi) i saradnika [149]. Prema studiji [148], homozigotni FF i ff genotipovi imaju zaštitni efekat u grupi ispitanika sa niskom koncentracijom 25(OH)D (0-24 ng/ml), a prema nemačkoj porodičnoj studiji koja je proučavala astmu, nivo vitamina D se, takođe, dovodi u vezu sa VDR polimorfizmima [168].

S obzirom na to da metabolizam vitamina D podrazumeva nekoliko enzimskih reakcija uključenih u njegovu aktivaciju, transport i degradaciju, a i da je za signalne puteve posredovane receptorom neophodno i nekoliko kofaktora, verovatno je da niska koncentracija vitamina D nije posredovana samo varijacijama u genu za receptor vitamina D. Takođe, različita etnička pripadnost, geografski položaj, ali i način života mogu uticati na status vitamina. Otuda bi bilo od značaja sprovođenje opsežnijih studija koje bi istovremeno pratile uticaj više genetskih faktora i faktora spoljašnje sredine na status vitamina D.

6.5. SNP–SNP interakcije

Genetska osnova kompleksnih bolesti poput BA veoma je složena ne samo zbog činjenice da veći broj gena može imati ulogu u nastanku bolesti već i zbog mogućih međusobnih interakcija većeg broja gena, ali i njihove interakcije sa faktorima spoljašnje sredine. Iako pojedinačni SNP-ovi predstavljaju značajne indikatore genetske komponente ovih bolesti, oni objašnjavaju samo deo genetskog rizika [109].

Poznato je da je rs1800629 polimorfizam gena TNF- α udružen sa povećanom sintezom TNF- α koja može biti praćena i povećanom sintezom RVK [91]. Takođe, u BA postoji oksidativna modifikacija i posledično smanjenje aktivnosti MnSOD [42,55]. Smanjena aktivnost enzima javlja se i u prisustvu Val alela rs4880 polimorfizma, koji se dovodi u vezu i sa povećanom sintezom proinflamatornih citokina uključujući i TNF- α , što uz povećanu sintezu RVK vodi neefikasnoj antioksidativnoj zaštiti [103,105]. Vitamin D3 se smatra mogućim protivzapaljenskim agensom koji smanjuje sintezu TNF- α i blokira sintezu RVK, kao i aktivaciju NF- κ B puta u fagocitima u *in vitro* uslovima, dok u respiratornim epitelnim ćelijama nishodno reguliše ekspresiju TNF- α i NF- κ B [157]. Polimorfizmi rs2228570 i 1544410 na genu za receptor vitamina D mogu uticati na sintezu VDR proteina, a time i na status vitamina D. Imajući sve navedeno u vidu, može se pretpostaviti da bi polimorfizmi na ovim genima mogli imati udruženi efekat na razvoj BA.

U bronhijalnoj astmi je pokazano postojanje interakcije između IL13 i IL4RA, IL13 R130Q, kao i ADRB2 R16G i STAT6 C1570T polimorfizama [169,170]. Takođe, i interakcija polimorfizama STAT-6 G2964A, STAT-4 T90089C i IFN- γ T874A

povećava rizik za razvoj BA [171]. U literaturi ne postoje istraživanja o uzajamnom dejstvu polimorfizama gena za TNF- α , katalazu, MnSOD i receptor vitamina D.

Analizom SNP–SNP interakcija detektovana su tri modela interakcija između ispitivanih polimorfizama. Model sa dva polimorfizma (rs7943316, rs4880) pokazao je da nosioci ValVal genotipa u kombinaciji sa bilo kojim od genotipova rs7943316 polimorfizma imaju veći rizik za razvoj BA, dok je rizik nizak kod nosilaca AlaAla genotipa bez obzira na genotip rs7943316 polimorfizma. Analizom modela sa tri polimorfizma (rs7943316, rs4880, rs1544410) utvrđeno je da rs1544410 polimorfizam gena za VDR ima pozitivan (sinergistički) efekat interakcije sa rs7943316 polimorfizmom gena za katalazu na pojavu BA, dok rs4880 polimorfizam ima redundantan efekat sa rs1544410 i rs7943316 polimorfizmima. U modelu interakcije svih pet ispitivanih polimorfizama (rs1800629, rs7943316, rs4880, rs2228570, rs1544410) pokazan je redundantan efekat interakcije rs2228570 sa ostalim polimorfizmima u modelu, dok su ostala četiri polimorfizma nezavisna.

Redundantni efekat gena podrazumeva da dva ili više gena imaju istu funkciju pa se u slučaju mutacije na jednom od gena ne javljaju promene u fenotipu, dok istovremene mutacije u svim redundantnim genima dovode i do odgovarajućih fenotipskih promena. Redundantni geni se sreću kod postojanja „rezervnih“ kopija važnih gena, što omogućava obavljanje određene funkcije čak iako je jedan gen mutiran. S druge strane, sinergistički efekat podrazumeva da je efekat istovremenog dejstva više različitih gena veći nego zbirni uticaj pojedinačnih gena.

Iako rs1544410 i rs7943316 polimorfizmi gena za VDR i katalazu pojedinačno nisu pokazali povezanost sa BA, u ovom modelu oni ispoljavaju sinergistički efekat. Suprotno tome, rs4880 i rs2228570 polimorfizmi, posmatrani pojedinačno, pokazuju statistički značajnu udruženost sa BA, ali ne postoji njihov sinergistički efekat. Ovakvi rezultati pokazuju da se efekti pojedinačnih SNP-ova mogu razlikovati od udruženih efekata više polimorfizama, što upućuje na značaj ispitivanja međusobne interakcije gena.

7. ZAKLJUČAK

U doktorskoj disertaciji je ispitivan uticaj polimorfizama gena za TNF- α (rs1800629), enzime antioksidativne zaštite (rs7943316 gena za katalazu i rs4880 gena za mangan-superoksid-dizmutazu) i receptor vitamina D (rs2228570 i rs1544410), kao i rizik za nastanak bolesti u prisustvu ispitivanih polimorfizama. Takođe, određivana je koncentracija vitamina D kod obolelih od BA i zdravih ispitanika i ispitivan uticaj SNP–SNP interakcija na pojavu bronhijalne astme.

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

- Raspodela genotipova i alela rs1800629, polimorfizma gena za TNF- α , rs7943316 gena za katalazu i rs1544410 gena za receptor vitamina D ne pokazuje statistički značajnu razliku između obolelih od BA i zdravih ispitanika.
- Kod obolelih od BA postoji statistički značajno veća učestalost heterozigotnog AlaVal i homozigotnog ValVal genotipa, kao i mutiranog Val alela rs4880 polimorfizma gena za MnSOD u poređenju sa zdravim ispitanicima.
- Raspodela genotipova i alela rs2228570 polimorfizma gena za receptor vitamina D pokazuje statistički značajne razlike između obolelih od BA i ispitanika kontrolne grupe.
- Stratifikovana analiza u odnosu na pol pokazuje statistički značajne razlike u distribuciji genotipova rs4880 i rs2228570 polimorfizama između obolelih od BA muškog i zdravih ispitanika odgovarajućeg pola. Takođe, raspodela alela rs4880 i rs2228570 polimorfizama pokazuje statistički značajne razlike između obolelih od BA muškog, odnosno ženskog pola i zdravih ispitanika odgovarajućeg pola.
- Haplotip fb i diplotip FfbB rs2228570 i rs1544410 polimorfizama značajno su češće zastupljeni kod obolelih od BA.
- Koncentracija vitamina D ne razlikuje se značajno između obolelih od BA i zdravih ispitanika.
- Polimorfizmi gena za receptor vitamina D rs2228570 i rs1544410 nemaju uticaj na koncentraciju vitamina D kod obolelih od BA i zdravih ispitanika.

- Rizik za razvoj BA veći je 2,7 puta kod nosilaca AlaVal i 5,9 puta kod nosilaca ValVal genotipova rs4880 polimorfizma gena za MnSOD u poređenju sa nosiocima AlaAla genotipa. Alel Val nosi 2,2 puta veći rizik za razvoj BA u poređenju sa Ala alelom.
- Genotip FF i alel F ispoljavaju zaštitni efekat i nose 5,3 puta, odnosno 2,3 puta manji rizik za nastanak BA u odnosu na ff genotip, odnosno f alel.
- Haplotipovi sa F alelom rs2228570 polimorfizma (Fb i FB) nose oko 2 puta manji rizik za razvoj BA u poređenju sa fb haplotipom.
- Analizom SNP–SNP interakcija detektovana su tri modela interakcija između ispitivanih polimorfizama. Utvrđeno je da rs1544410 polimorfizam gena za VDR ima pozitivan (sinergistički) efekat interakcije sa rs794336 polimorfizmom gena za katalazu na pojavu BA. U modelu interakcije svih pet ispitivanih polimorfizama pokazan je redundantni efekat interakcije.

Polimorfizmi rs4880 gena za MnSOD i rs2228570 mogu poslužiti kao molekularni markeri procene rizika za razvoj BA. S obzirom na to da bronhijalna astma pripada kompleksnim bolestima na čiji razvoj može uticati veliki broj kako genetskih, tako i faktora spoljašnje sredine, otkrivanje novih genskih markera bolesti je od značaja za individualni terapijski pristup pacijentu, ali i razumevanje genetske osnove bolesti. Praćenje polimorfizama na genu za receptor vitamina D i statusa vitamina D omogućilo bi praćenje obolelih od BA u cilju procene terapijske opravdanosti primene vitamina D kod obolelih od BA. Tome bi značajno doprinele i nove studije koje bi ispitivale veći broj polimorfizama na genu za VDR uz praćenje ekspresije VDR, kao i uticaja faktora spoljašnje sredine.

8. LITERATURA

1. Buist AS. Definitions, Epidemiology, and Genetics of Asthma and COPD. In Barnes PJ, Drazen JM, Rennard SI, Thomson NC, editors. Asthma and COPD. San Diego: Elsevier Ltd; 2009. p. 3-7.
2. Đorđević D. Bronhijalna astma Niš: Prof. dr Dragan Đorđević; 2001.
3. Global Initiative for Asthma (GINA). [Online].; 2014. Available from: <http://www.ginasthma.org/>.
4. Warner JO. Development of Asthma in Early Life. In Castro M, Kraft M, editors. Clinical Asthma. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2008. p. 14-21.
5. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. Eur Respir Mon. 2003; 23: 84–113.
6. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. Nat Rev Immunol. 2008; 8(3): 193-204.
7. Busse WW, Lemanske RFJ. Asthma. N Engl J Med. 2001; 344(5): 350-62.
8. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. Nature. 2008; 454(7203): 445-54.
9. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. Mutat Res. 2010; 690(1-2): 24–39.
10. Maddox L, Schwartz DA. The pathophysiology of asthma. Annu Rev Med. 2002; 53: 477-98.
11. Ying S, Humbert M, Q M, Pfister R, Menz G, Gould HJ, et al. Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. J Allergy Clin Immunol. 2001; 107(4): 686-92.

12. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N Engl J Med*. 1989; 320: 271–7.
13. Beeh KM, Ksoll M, Buhl R. Elevation of total serum immunoglobulin E is associated with asthma in nonallergic individuals. *Eur Respir J*. 2000; 16: 609–14.
14. Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2010; 11(7): 577–84.
15. Holgate ST, Holloway J, Wilson S, Bucchieri F, Puddicombe S, Davies DE. Epithelial-mesenchymal communication in the pathogenesis of chronic asthma. *Proc Am Thorac Soc*. 2004; 1(2): 93–8.
16. Chung KF. Cytokines. In Barns PJ, Drazen JM, Rennard SI, Thomson NC, editors. *Asthma and COPD*. San Diego: Elsevier Ltd; 2009. p. 327-341.
17. Chung KF, J BP. Cytokines in asthma. *Thorax*. 1999; 54: 825–57.
18. Hansbro PM, E KG, Foster PS. Cytokine/anti-cytokine therapy - novel treatments for asthma? *Br J Pharmacol*. 2011; 163(1): 81-95.
19. Mahajan S, Mehta AA. Role of Cytokines in Pathophysiology of Asthma. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 5(1): 1-4.
20. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*. 2012; 24(6): 1297-305.
21. Walsh G. Cytokines: interleukins and tumour necrosis factor. In Walsh G, editor. *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2003. p. 246-53.
22. Russo C, Polosa R. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(2): 135-42.
23. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012; 119(3): 651-65.
24. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 ; 10(1): 45-65.

25. Chan FK. The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function. *Ann Rheum Dis*. 2000; 59(Suppl 1): i50–3.
26. Takada H, Chen NJ, Mirtsos C, Suzuki S, Suzuki N, Wakeham A, et al. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(11): 4026-33.
27. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001; 11(9): 372-7.
28. Gupta S. A decision between life and death during TNF- α -induced signaling. *J Clin Immunol*. 2002; 22(4): 185-94.
29. Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res*. 2005; 15(1): 36-42.
30. Park YC, Ye H, Hsia C, Segal D, Rich RL, Liou HC, et al. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell*. 2000; 101(7): 777-87.
31. Keatings VM, O'Connor BJ, Wright LG, Huston DP, Corrigan CJ, Barnes PJ. Late response to allergen is associated with increased concentrations of tumor necrosis factor α and IL-5 in induced sputum. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 99: 693–8.
32. van Overveld FJ, Jorens PG, Rampart M, de Backer W, Vermeire PA. Tumour necrosis factor stimulates human skin mast cells to release histamine and tryptase. *Clin Exp Allergy*. 1991; 21: 711-4.
33. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF α in pulmonary pathophysiology. *Respir Res*. 2006; 7: 125.
34. Thomas PS. Tumour necrosis factor- α : The role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunology and Cell Biology*. 2001; 79: 132–40.
35. Thomas PS, Yates DH, Barnes PJ. Tumor necrosis factor- α increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir*

- Crit Care Med. 1995; 152(1): 76-80.
36. Thomas PS, Heywood G. Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. *Thorax*. 2002; 57(9): 774-8.
37. Schwingshackl A, Duszyk M, Brown N, Moqbel R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase -9 on stimulation with TNF alpha. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 104: 983-9.
38. Berry M, Brightling C, Pavord I, Wardlaw A. TNF-alpha in asthma. *Curr Opin Pharmacol*. 2007; 7(3): 279-82.
39. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2): 89-96.
40. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Halliwell B, Gutteridge J, editors. New York: New York: Oxford University Press Inc.; 2010.
41. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5): 981-90.
42. Comhair SA, Erzurum SC. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(1): 93-124.
43. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*. 2006; 111(2): 476-94.
44. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. 2008; 30(3): 279-89.
45. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol*. 1983; 97: 52-61.
46. Ökrös Z, Endreffy E, Novak Z, Maroti Z, Monostori P, Varga IS, et al. Changes in NADPH oxidase mRNA level can be detected in blood at inhaled corticosteroid treated asthmatic children. *Life Sci*. 2012; 91(19-20): 907-11.

-
47. Monteseirín J. Neutrophils and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(5): 340-54.
48. Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol*. 2003; 36(1): 95-109.
49. Cho YS, Moon H. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010; 2(3): 183-7.
50. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)*. 2014; 60(4): 153-67.
51. Ghosh S, Janocha AJ, Aronica MA, Swaidani S, Comhair SA, Xu W, et al. Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation. *J Immunol*. 2006; 176(9): 5587-97.
52. Novak Z, Nemeth I, Gyurkovits K, Varga SI, Matkovics B. Examination of the role of oxygen free radicals in bronchial asthma in childhood. *Clin Chim Acta*. 1991; 201: 247-51.
53. Miller AF. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol*. 2004; 8(2): 162-8.
54. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1804(2): 263-74.
55. Comhair SA, Xu W, Ghosh S, Thunnissen FB, Almasan A, Calhoun WJ, et al. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. *Am J Pathol*. 2005; 166(3): 663-74.
56. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol*. 2014; 21(3): 319-29.
57. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The “sunshine” vitamin. *J Pharmacol Pharmacother*. 2012; 3(2): 118-26.
58. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular
-

- actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998; 78(4): 1193-231.
59. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D. *Bonekey Rep.* 2014; 3: 497.
60. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011; 25(4): 543-59.
61. Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, et al. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev.* 2008; 66(10 Suppl): S98-112.
62. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289(1): F8-28.
63. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Review: Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine.* 2010; 77: 552-7.
64. Di Rosa M, Malaguarnera M, Nicoletti F, Malaguarnera L. Vitamin D₃: a helpful immuno-modulator. *Immunology.* 2011; 134(2): 123-39.
65. Marques CD, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte AL. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50(1): 67-80.
66. Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int.* 2010; 78(2): 140-5.
67. Baroni E, Biffi M, Benigni F, Monno A, Carlucci D, Carmeliet G, et al. VDR-dependent regulation of mast cell maturation mediated by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(1): 250-62.
68. Aranow C. Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med.* 2011; 59(6): 881-886.
69. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007; 179: 1634-47.
70. Bikle D. Nonclassic Actions of Vitamin D. *Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94(1): 26-34.

-
71. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 97: 93–101.
 72. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010; 39(2): 365–379.
 73. Paul G, Brehm JM, Alcorn JF, Holguín F, Aujla SJ, Celedón JC. Vitamin D and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185(2): 124-32.
 74. Huang H, Porpodis K, Zarogoulidis P, Domvri K, Giouleka P, Papaiwannou A, et al. Vitamin D in asthma and future perspectives. *Drug Des Devel Ther.* 2013; 7: 1003-13.
 75. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, et al. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest.* 2006; 116(1): 146-55.
 76. Tripkovic L, Lambert H, Hart K, Smith CP, Bucca G, Penson S, et al. Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(6): 1357-64.
 77. Heaney RP, Recker RR, Grote J, Horst RL, Armas LA. Vitamin D3 is more potent than vitamin D2 in humans. *J Clin End Metab.* 2011; 93: 447-52.
 78. Zold E, Barta Z, Bodolay E. Vitamin D Deficiency And Connective Tissue Disease. In Litwack G, editor. *Vitamins and the Immune System.* San Diego: Elsevier Inc.; 2011. p. 261-6.
 79. Damera G, Fogle HW, Lim P, Goncharova EA, Zhao H, Banerjee A, et al. Vitamin D inhibits growth of human airway smooth muscle cells through growth factor-induced phosphorylation of retinoblastoma protein and checkpoint kinase 1. *Br J Pharmacol.* 2009; 159(6): 1429-41.
 80. Urashima M, Segawa T, Okazaki M, Kurihara M, Wada Y, Ida H. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(5): 1255-60.

-
81. Sandhu MS, Casale TB. The role of vitamin D in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010; 105(3): 191-9.
 82. Lan N, Luo G, Yang X, Cheng Y, Zhang Y, Wang X, et al. 25-hydroxyvitamin D3-deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. *PLoS One.* 2014; 9(11): e111599.
 83. Agrawal T, Gupta GK, Agrawal DK. Vitamin D deficiency decreases the expression of VDR and prohibitin in the lungs of mice with allergic airway inflammation. *Exp Mol Pathol.* 2012; 93(1): 74-81.
 84. Turnpenny P, Ellard S. Emerijevi osnovi medicinske genetike. 13th ed. Jelovac M, editor. Beograd: Data Status; 2009.
 85. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(4): 241-51.
 86. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998; 8(12): 1229-31.
 87. Ober C, Yao TC. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev.* 2011; 242(1): 10-30.
 88. Slager RE, Li X, Meyers DA, R BE. Genetics and Asthma. In Bernstein JA, Levy ML, editors. *Clinical Asthma - Theory and Practice.* Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2014. p. 21-28.
 89. García-Castillo J, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J. Molecular cloning and expression analysis of tumor necrosis factor alpha from a marine fish reveal its constitutive expression and ubiquitous nature. *Immunogenetics.* 2002; 54(3): 200-7.
 90. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(3): 163-72.
 91. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leuk Biol.*

- 1999; 66(4): 562-6.
92. Basic J, Pavlovic D, Jevtovic-Stoimenov T, Vojinovic J, Susic G, Stojanovic I, et al. Etanercept reduces matrix metalloproteinase-9 level in children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis and TNF-alpha-308GG genotype. *J Physiol Biochem*. 2010; 66(2): 173-80.
93. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, Hopkins PJ, Hall JM. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha-308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10(1): 82-5.
94. Li Kam Wa TC, Mansur AH, Britton J, Williams G, Pavord I, Richards K, et al. Association between TNF- α -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism and bronchial hyperreactivity in asthma. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29(9): 1204-8.
95. Louis R, Leyder E, Malaise M, Bartsch P, Louis E. Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor alpha-308 polymorphism gene. *Eur Respir J*. 2000; 16(4): 604-8.
96. Bucková , D , HL, Vasků A, Znojil V, Vácha J. Lack of association between atopic asthma and the tumor necrosis factor alpha-308 gene polymorphism in a Czech population. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2002; 12(3): 192-7.
97. Quan F, Korneluk RG, Tropak MB, Gravel R. Isolation and characterization of human catalase gene. *Nucleic Acids Res*. 1986; 14: 5321-35.
98. Liu L, Li C, Gao J, Li K, Zhang R, Wang G, et al. Promoter variant in the catalase gene is associated with vitiligo in Chinese people. *J Invest Dermatol*. 2010; 130(11): 2647-53.
99. Kim TH, Hong JM, Oh B, Cho YS, Lee JY, Kim HL, et al. Genetic association study of polymorphisms in the catalase gene with the risk of osteonecrosis of the femoral head in the Korean population. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; 16(9): 1060-6.
100. Polonikov AV, Ivanov VP, Solodilova MA, Kozhuhov MA, Panfilov VI. Tobacco Smoking, Fruit and Vegetable Intake Modify Association Between -21A>T Polymorphism of Catalase Gene and Risk of Bronchial Asthma. *Journal of*

- Asthma. 2009; 46(3): 217–24.
101. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(3): 337–49.
102. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 226: 561–5.
103. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Cepanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*. 2003; 13: 145–57.
104. Mikhak B HDJ, Spiegelman D, Platz EA, Wu K, Erdman JWJ, Giovannucci E. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism, interactions with carotenoid levels and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2008; 29(12): 2335–40.
105. Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson IK. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene*. 2012; 501(2): 89–103.
106. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol*. 1997; 11(8): 1165–79.
107. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004; 338(2): 143–56.
108. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clin Immunol*. 2009; 133(2): 276–81.
109. Curk T, Rot G, Zupan B. SNPsyn: detection and exploration of SNP-SNP interactions. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39(Web Server issue): W444–9.

-
110. Cordell HJ. Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(20): 2463-8.
111. Bateson W. *Mendel's Principles of Heredity* Cambridge: Cambridge University Press; 1909.
112. Fisher RA. The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh.* 1918; 32: 399–433.
113. Chen CCM. Bayesian methodology for genetics of complex diseases. PhD [dissertation] Queensland: Queensland University of Technology: Available from: QUT ePrints; 2010.
114. Gui J, Moore JH, Kelsey KT, Marsit CJ, Karagas MR, Andrew AS. A novel survival multifactor dimensionality reduction method for detecting gene-gene interactions with application to bladder cancer prognosis. *Hum Genet.* 2011; 129(1): 101-10.
115. Koo CL, Liew M, Mohamad MS, Salleh AH. A review for detecting gene-gene interactions using machine learning methods in genetic epidemiology. *Biomed Res Int.* 2013;: 2013:432375.
116. Wang J, Davidson B, Tian T. Systems Biology Studies of Gene Network and Cell Signaling Pathway in Cancer Research. In Shen B, editor. *Bioinformatics for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Complex Diseases.* New York: Springer; 2013. p. 109-129.
117. Jevtovic-Stoimenov T , Kocic G , Pavlovic D , Macukanovic-Golubovic L , Marjanovic G , Djordjevic V , et al. Polymorphisms of tumor-necrosis factor- α - 308 and lymphotoxin- α + 250: possible modulation of susceptibility to apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma mononuclear cells. *Leuk Lymphoma.* 2008; 49(11): 2163-9.
118. Ukkola O , Erkkilä PH , Savolainen MJ , Kesän YA. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Intern Med.* 2001; 249(5): 451-9.
-

-
119. Hahn L, Ritchie MD, Moore JH. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*. 2003; 19(3): 376-82.
120. Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Ghosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006; 35: 488–95.
121. Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol*. 1998; 113(3): 401-6.
122. Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 2000; 12(2): 110-9.
123. Demeter J, Porzsolt F, Rämisch S, Schmid M, Messer G. Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in hairy cell leukaemia. *Br J Haematol*. 1997; 97(1): 132-4.
124. Trajkov D, Mirkovska-Stojkovikj J, Arsov T, Petlichkovski A, Strezova A, Efinska-Mladenovska O, et al. Association of cytokine gene polymorphisms with bronchial asthma in Macedonians. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2008; 7(3): 143-56.
125. Kamali-Sarvestani E, Ghayomi MA, A N. Association of TNF-alpha -308 G/A and IL-4 -589 C/T gene promoter polymorphisms with asthma susceptibility in the south of Iran. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007; 17(6): 361-6.
126. Moffatt M, Cookson WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(4): 551-4.
127. Chagani T PPD, Zhu S, Weir TD, Bai TR, Behbehani NA, Fitzgerald JM, et al. Prevalence of tumor necrosis factor- α and angiotensin converting enzyme polymorphisms in mild/moderate and fatal/near-fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160(1): 278-82.
-

-
128. Kumar A, Gupta V, Changotra H, Sarin BC, Sehajpal PK. Tumor necrosis factor – α and transforming growth factor - β 1 polymorphisms in bronchial asthma. *Indian J Med Sci.* 2008; 62: 323-30.
129. Shin HD, Park BL, Kim LH, Jung JH, Wang HJ, Kim YJ, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(4): 397-403.
130. Albuquerque RV, Hayden CM, Palmer LJ, Laing IA, Rye PJ, Gibson NA, et al. Association of polymorphisms within the tumor necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28: 578-84.
131. Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T, et al. An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. *J Hum Genet.* 2006; 51(8): 677-85.
132. Zhang Y, Zhang J, Tian C, Xiao Y, He C, Li X, et al. The -308 G/A polymorphism in TNF- α gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis. *J Clin Immunol.* 2011; 31(2): 174-85.
133. Yang G, Chen J, Xu F, Bao Z, Yao Y, Zhou J. Association between tumor necrosis factor- α rs1800629 polymorphism and risk of asthma: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(6): e99962.
134. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell.* 2012; 48(2): 158-67.
135. Lourdhu Mary A, Nithya K, Isabel W, Angeline T. Prevalence of catalase (-21 A/T) gene variant in south Indian (Tamil) population. *Biomed Res Int.* ;2014:894237. 2014;; 894237.
136. Mak JC, Leung HC, Ho SP, Ko FW, Cheung AH, Ip MS, et al. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clin Exp Allergy.* 2006; 36(4): 440-7.
137. Yang LL, Huang MS, Huang CC, Wang TH, Lin MC, Wu CC, et al. The association between adult asthma and superoxide dismutase and catalase gene activity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; 156(4): 373-80.
-

-
138. Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Kucinskas V, Saha N, Beckman G. Ethnic variation in the mitochondrial targeting sequence polymorphism of MnSOD. *Hum Hered.* 1999; 49(4): 190-3.
139. Siedlinski M, van Diemen CC, Postma DS, Vonk JM, Boezen HM. Superoxide dismutases, lung function and bronchial responsiveness in a general population. *Eur Respir J.* 2009; 33(5): 986-92.
140. Yucesoy B, Johnson VJ, Lummus ZL, Kissling GE, Fluharty K, Gautrin D, et al. Genetic variants in antioxidant genes are associated with diisocyanate-induced asthma. *Toxicol Sci.* 2012; 129(1): 166-73.
141. Kuo Chou TN, Li YS, Lue KH, Liao CF, Lin CY, Tzeng PR, et al. Genetic polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with childhood asthma. *J Asthma.* 2010; 47(5): 532-8.
142. Gurel A, Tomac N, Yilmaz HR, Tekedereli I, Akyol O, Armutcu F, et al. The Ala-9Val polymorphism in the mitochondrial targeting sequence (MTS) of the manganese superoxide dismutase gene is not associated with juvenile-onset asthma. *Clin Biochem.* 2004; 37(12): 1117–20.
143. Holla LI, Kankova K, Vasku A. Functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene in patients with asthma. *Clin Biochem.* 2006; 39(3): 299-302.
144. Kinnula VL, Lehtonen S, Koistinen P, Kakko S, Savolainen M, Kere J, Ollikainen V, Laitinen T: Two functional variants of the superoxide dismutase genes in Finnish families with asthma. *Thorax.* 2004; 59(2): 116–9.
145. Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D. The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res.* 1997; 12: 1043–48.
146. Fang WL, Gao LB, Liang WB, Xue H, Bai P, Lv ML, et al. Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in chinese population with asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2009; 8(3): 141-7.
-

-
147. Minamitani K, Takahashi Y, Minagawa M, Yasuda T, Niimi H. Difference in height associated with a translation start site polymorphism in the vitamin D receptor gene. *Pediatr Res*. 1998; 44(5): 628-32.
148. Tizaoui K, Berraies A, Hamdi B, Kaabachi W, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with asthma risk: systematic review and updated meta-analysis of case-control studies. *Lung*. 2014; 192(6): 955-65.
149. Maalmi H, Sassi FH, Berraies A, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in Tunisian children: A case control study. *Hum Immunol*. 2013; 74(2): 234-40.
150. Ismail MF, Elnady HG, Fouda EM. Genetic variants in vitamin D pathway in Egyptian asthmatic children: a pilot study. *Hum Immunol*. 2013; 74(12): 1659-64.
151. Li F, Jiang L, Willis-Owen SA, Zhang Y, Gao J. Vitamin D binding protein variants associate with asthma susceptibility in the Chinese Han population. *BMC Med Genet*. 2011; 12: 103.
152. Saadi A, Gao G, Li H, Wei C, Gong Y, Liu Q. Association study between vitamin D receptor gene polymorphisms and asthma in the Chinese Han population: a case-control study. *BMC Med Genet*. 2009; 10: 71.
153. Jurutka PW, Remus LS, Whitfield GK, Thompson PD, Hsieh JC, Zitzer H. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol Endocrinol*. 2000; 14(3): 401-20.
154. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhäger JC, Pols HA, et al. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52(2): 211-6.
155. Roff A, Wilson RT. A novel SNP in a vitamin D response element of the CYP24A1 promoter reduces protein binding, transactivation, and gene expression.
-

- J Steroid Biochem Mol Biol. 2008; 112(1-3): 47-54.
156. Poon AH, Laprise C, Lemire M, Montpetit A, Sinnett D, Schurr E, et al. Association of vitamin D receptor genetic variants with susceptibility to asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170(9): 967-73.
157. Korn S, Hübner M, Jung M, Blettner M, Buhl R. Severe and uncontrolled adult asthma is associated with vitamin D insufficiency and deficiency. *Respir Res*. 2013; 14(1): 25.
158. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81(3): 353-73.
159. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, B DVH. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, B DVH, editors.: National Academies Press (US); 2011.
160. Jovičić S, Ignatović S, Kangrga R, Beletić A, Mirković D, Majkić-Singh N. Comparison of three different methods for 25(oh)-vitamin d determination and vitamin D status in general population – Serbian experience. *Journal of Medical Biochemistry*. 2012; 31(4): 347–57.
161. Menon J, Maranda L, Nwosu BU. Serum 25-hydroxyvitamin D levels do not correlate with asthma severity in a case-controlled study of children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2012; 25(7-8): 673-9.
162. Thuesen BH, Skaaby T, Husemoen LL, Fenger M, Jørgensen T, Linneberg A. The association of serum 25-OH vitamin D with atopy, asthma, and lung function in a prospective study of Danish adults. *Clin Exp Allergy*. 2015; 45(1): 265-72.
163. Montero-Arias F, Sedó-Mejía G, Ramos-Esquivel A. Vitamin d insufficiency and asthma severity in adults from Costa Rica. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2013; 5(5): 283-8.
164. Li F, Peng M, Jiang L, Sun Q, Zhang K, Lian F, et al. Vitamin D deficiency is associated with decreased lung function in Chinese adults with asthma. *Respiration*. 2011; 81(6): 469-75.

-
165. Kolokotroni O, Papadopoulou A, Middleton N, Kouta C, Raftopoulos V, Nicolaidou P, et al. Vitamin D levels and status amongst asthmatic and non-asthmatic adolescents in Cyprus: a comparative cross-sectional study. *BMC Public Health*. 2015; 15: 48.
166. Pillai DK, Iqbal SF, Benton AS, Lerner J, Wiles A, Foerster M, et al. Associations between genetic variants in vitamin D metabolism and asthma characteristics in young African Americans: a pilot study. *J Investig Med*. 2011; 59(6): 938-46.
167. Black PN, Scragg R. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. *Chest*. 2005; 128(6): 3792-8.
168. Wjst M, Altmüller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, André E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res*. 2006; 7: 60.
169. Chan IH, Leung TF, Tang NL, Li CY, Sung YM, Wong GW, et al. Gene-gene interactions for asthma and plasma total IgE concentration in Chinese children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(1): 127-33.
170. Leung TF, Chan IH, Wong GW, Li CY, Tang NL, Yung E, et al. Association between candidate genes and lung function growth in Chinese asthmatic children. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37(10): 1480-6.
171. Li Y, Wu B, Xiong H, Zhu C, Zhang L. Polymorphisms of STAT-6, STAT-4 and IFN-gamma genes and the risk of asthma in Chinese population. *Respir Med*. 2007; 101(9): 1977-81.

BIOGRAFIJA

Milena Despotović je rođena 25.10.1978. godine u Boru. Diplomirala je 13.12.2007. godine na Medicinskom fakultetu u Nišu na smeru Medicina sa prosečnom ocenom 9,24. Školske 2007/2008. godine upisala je akademske doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu, smer Molekularna medicina.

Usavršavala se na Medicinskom fakultetu Karlovog univerziteta u Pragu 2006. i na Medicinskom fakultetu UPJŠ Jozef Šafarik u Košicama 2002. i 2009. godine. Dobitnik je stipendije Nacionalnog programa za podršku mobilnosti studenata, istraživača i univerzitetskih nastavnika Republike Slovačke SAIA-NSP (National Scholarship Programme of the Slovak Republic - Programme for the Support of Mobility of Students, PhD Students, University Teachers and Researchers).

Milena Despotović je od 2011. godine angažovana kao istraživač na projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije broj III41018 i TR31060.

Od oktobra 2009. godine zaposlena je na Katedri za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu, a 2011. godine je izabrana u zvanje asistenta za užu naučnu oblast Biohemija.

Milena Despotović je autor i koautor 8 radova u časopisima međunarodnog značaja i 16 saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog značaja iz uže naučne oblasti.



Универзитет у Нишу

Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

Полиморфизми гена укључених у инфламаторне, антиоксидативне и имунорегулаторне процесе код оболелих од бронхијалне астме

која је одбрањена на Медицинском факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 14. 12. 2015.

Аутор дисертације: Милена Деспотовић

Потпис аутора дисертације:

Milena Despotovic



Универзитет у Нишу

Изјава 2.

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНОГ И ЕЛЕКТРОНСКОГ
ОБЛИКА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: Милена Деспотовић

Наслов дисертације: Полиморфизми гена укључених у инфламаторне,
антиоксидативне и имунорегулаторне процесе код оболелих од бронхијалне
астме

Ментор: проф. др Татјана Јевтовић Стоименов

Изјављујем да је штампани облик моје докторске дисертације истоветан
електронском облику, који сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум
Универзитета у Нишу.

У Нишу, 14.12.2015.

Потпис аутора дисертације:

Милена Деспотовић



Универзитет у Нишу

Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Полиморфизми гена укључених у инфламаторне, антиоксидативне и имунорегулаторне процесе код оболелих од бронхијалне астме

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 14.12.2015.

Аутор дисертације: Милена Деспотовић

Потпис аутора дисертације:

Милена Деспотовић