

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA DEŽMAN (KOKALJ)

**POVEZANOST IZBRANIH GENSKIH POLIMORFIZMOV S POJAVOM
ATOPIJSKEGA DERMATITISA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATARINA DEŽMAN (KOKALJ)

**POVEZANOST IZBRANIH GENSKIH POLIMORFIZMOV S POJAVOM
ATOPIJSKEGA DERMATITISA**

**ASSOCIATION OF SELECTED GENE POLYMORPHISMS WITH ATOPIC
DERMATITIS**

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Irene Mlinarič Raščan. Praktični del naloge sem izvedla v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko na Kliniki Golnik pod mentorstvom dr. Matija Rijavca. V svoje delo sem vključila vzorce bolnikov in kontrol, ki jih je v okviru svoje doktorske naloge zbrala in opredelila Helena Rupnik, dr. med. na Dermatovenerološki kliniki, UKC Ljubljana.

Na tem mestu bi se za pomoč pri izdelavi magistrske naloge zahvalila vsem zaposlenim v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko na Kliniki Golnik, da so mi omogočili izvajanje praktičnega dela naloge. Hvala mentorjema prof. dr. Ireni Mlinarič Raščan ter dr. Matiju Rijavcu za strokovno podporo pri izdelavi naloge. Hvala Heleni Rupnik, dr. med., da je zbrala klinične vzorce in podatke in mi omogočila delo na njenih kliničnih vzorcih. Hvala Dejanu, staršem, sestri ter bratom za potrpežljivost.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Irene Mlinarič Raščan in somentorja dr. Matija Rijavca.

Študentov lastnoročni podpis

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
KLJUČNE BESEDE.....	IX
KEY WORDS.....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IX

1 UVOD	1
1.1 ATOPIJA IN ATOPIJSKI DERMATITIS	1
1.2 PATOFIZIOLOGIJA IN GENETSKA PREDISPONICIJA AD	3
1.2.1 Kožna pregrada	3
1.2.2 Imunski odziv.....	4
1.3 GENETSKI MODELI DEDOVANJA	5
1.4 ANALIZIRANI GENI IN POLIMORFIZMI.....	6
1.4.1 Inhibitor serinskih proteaz (SPINK 5)	6
1.4.2 Mastocitna himaza 1 (CMA 1).....	7
1.4.3 Interlevkin 18 (IL-18).....	8
1.4.4 Interlevkin 33 (IL-33).....	10
1.4.5 Hitinazi 3 podoben protein 1 (CHI3L1)	11
2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 POPULACIJA BOLNIKOV Z AD IN KONTROLNA SKUPINA.....	14
3.2 IZOLACIJA DNA	15
3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	17
3.3.1 Priprava reakcijske mešanice	17
3.3.2 Alelna diskriminacija	18
3.4 OBDELAVA PODATKOV	20
3.4.1 Hardy-Weinbergovo ravnotežje	20
3.4.2 Statistična analiza.....	21
3.4.3 Označevanje genov na kariotipu	22
4 REZULTATI.....	23
4.1 HARDY-WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE	24
4.2 IZBRANI POLIMORFIZMI IN NJIHOVA POVEZANOST Z AD	24
4.2.1 Frekvence genotipov	25

4.2.2	Inhibitor serinskih proteaz (SPINK 5).....	25
4.2.3	Mastocitna himaza 1 (CMA 1)	29
4.2.4	Interlevkin 18 (IL-18).....	31
4.2.5	Interlevkin 33 (IL-33).....	32
4.2.6	Hitinazi 3 podoben protein 1 (CHI3L1)	33
5	RAZPRAVA.....	36
5.1	HARDY-WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE.....	36
5.2	FREKVENCE GENOTIPOV	36
5.3	IZBRANI POLIMORFIZMI IN NJIHOVA POVEZANOST Z AD	37
5.3.1	Inhibitor serinskih proteaz (SPINK 5).....	37
5.3.2	Mastocitna himaza 1 (CMA1)	38
5.3.3	Interlevkin 18 (IL-18).....	39
5.3.4	Interlevkin 33 (IL-33).....	40
5.3.5	Hitinazi 3 podoben protein 1 (CHI3L1)	41
6	SKLEPI.....	44
7	LITERATURA	45
8	VIRI SLIK	50

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prikaz tipičnega izpuščaja na nogah pri AD	2
Slika 2:	Prikaz tipičnega izpuščaja na licih pri AD	2
Slika 3:	Prikaz plasti celic v koži	3
Slika 4:	Prikaz patofizioloških procesov pri AD	5
Slika 5:	Lega SNP-a rs2303067 v genu <i>SPINK5</i>	7
Slika 6:	Lega SNP-a rs1800875 v genu <i>CMA1</i>	8
Slika 7:	Shema delovanja IL-18	9
Slika 8:	Lega SNP-a rs5744247 v genu <i>IL18</i>	10
Slika 9:	Lega SNP-a rs7025417 v genu <i>IL33</i>	11
Slika 10:	Lega SNP-a rs4950928v genu <i>CHI3L1</i>	12
Slika 11:	ABI PRISM 7500 Real Time PCR System.....	18
Slika 12:	Princip alelne diskriminacije	19
Slika 13:	Prikaz rezultatov alelne diskriminacije	20
Slika 14:	Položaj analiziranih genov na kromosomih	23

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Demografski in klinični podatki sodelujočih	14
Preglednica II: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo alelne diskriminacije	17
Preglednica III: Analizirani geni in pripadajoče oznake ID	22
Preglednica IV: Rezultati testa χ^2 za Hardy-Weinbergovo ravnotežje	24
Preglednica V: Primerjava frekvenc genotipov s podatki iz Ensembla v odstotkih	25
Preglednica VI: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs2303067 v <i>SPINK5</i> pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije.....	25
Preglednica VII: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs2303067 v <i>SPINK5</i> bolnikov z AD glede na izbrane kriterije	27
Preglednica VIII: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs1800875 v <i>CMA1</i> pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije	29
Preglednica IX: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs1800875 v <i>CMA1</i> bolnikov z AD glede na izbrane kriterije.....	30
Preglednica X: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs5744247 v <i>IL18</i> pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije.....	31
Preglednica XI: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs5744247 v <i>IL18</i> bolnikov z AD s kontrolami	31
Preglednica XII: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs7025417 v <i>IL33</i> pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije.....	32
Preglednica XIII: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs7025417 v <i>IL33</i> bolnikov z AD s kontrolami	32
Preglednica XIV: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs4950928 v <i>CHI3L1</i> pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije	33
Preglednica XV: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs4950928 v <i>CHI3L1</i> bolnikov z AD glede na izbrane kriterije	34

POVZETEK

Atopijski dermatitis je najpogosteša vnetna kožna bolezen otrok. Trenutno je po svetu prizadetih okoli dvajset odstotkov otrok in skoraj trije odstotki odraslih, število obolelih pa se še povečuje. Bolezen je zelo kompleksna, saj gre za prepletanje okvar na področju kožne pregrade in na področju mehanizmov imunskega odziva, poleg tega na njen razvoj vplivajo tako genetski kot okoljski dejavniki. To so tudi razlogi, da je genetsko ozadje atopijskega dermatitisa težko opredeliti. Namen magistrske naloge je bil ugotoviti, ali so izbrani polimorfizmi posameznih nukleotidov povezani s pojavom atopijskega dermatitisa ter če so povezani s pojavom bolezni v različnih življenjskih obdobjih in različnim kliničnim potekom. Temu ustrezno smo izbrali skupino analiziranih bolnikov. V raziskavo je bilo vključenih 241 bolnikov z opredeljenim atopijskim dermatitisom (AD) ter 164 zdravih posameznikov. V skupini bolnikov je bila ob začetku izražanja bolezni tretjina stara 2 leti ali manj, tretjina med 3 in 18 let ter tretjina več kot 18 let. S pomočjo metode alelne diskriminacije smo posameznikom določili genotipe. Za analizo smo izbrali polimorfizem v *SPINK5*, saj ima protein SPINK 5 pomembno vlogo v ustremnem delovanju kožne pregrade. Polimorfizme v *CMA1*, *IL18*, *IL33* in *CHI3L1* smo izbrali na podlagi vpletenosti proteinov v mehanizme imunskega odziva, ki so povezani z imunskim dogajanjem pri AD. Potrdili smo povezano rs2303067 v *SPINK5* z zgodnjim izražanjem bolezni ter s težjo obliko bolezni. Rs1800875 v *CMA1* smo povezali z atopijskim dermatitisom, kateremu je pridružena astma. Kot prvi smo rs4950928 v *CHI3L1* povezali z izražanjem bolezni v poznejših letih ter predvidoma z lažjo obliko bolezni. Povezave rs5744247 v *IL18* in rs7025417 v *IL33* s pojavom atopijskega dermatitisa nismo našli.

ABSTRACT

Atopic dermatitis is the most common inflammatory skin disease in children. It currently affects approximately twenty percent of children and almost three percent of adults around the world. The prevalence of affected people is still increasing. Atopic dermatitis is a very complex disease caused by both, defects of skin barrier and defects of immune response mechanisms. Besides there is strong influence on disease development of both genetic and environmental factors. Complexity of disease is therefore the reason that its genetic background is hard to define. The aim of master thesis was to determinate whether chosen polymorphisms are associated to atopic dermatitis occurrence, to different age at onset, and to different patient characteristics. In our study we analysed 241 patients with confirmed atopic dermatitis and 164 healthy individuals as control group. Patient's group included one third of patients with disease onset at age of 2 years or earlier, one third of patients with disease onset at ages between 3 and 18 and one third of patients with onset at age of 19 or later. Selected genotypes were determined with allelic discrimination assay. Polymorphism in *SPINK5* was selected due to role of protein SPINK 5 in proper function of skin barrier. Polymorphisms in *CMA1*, *IL18*, *IL33* and *CHI3L1* were selected based on role of proteins in immune response associated with immune mechanisms in AD. We confirmed that rs2303067 in *SPINK5* is associated with early disease onset and to a more severe course of disease. Rs1800875 in *CMA1* is associated with atopic dermatitis combined with asthma. We were first to discover that rs4950928 in *CHI3L1* is associated with later onset of disease. We have not found the association of rs5744247 in *IL18* and rs7025417 in *IL33* and atopic dermatitis occurrence.

KLJUČNE BESEDE

Atopijski dermatitis

Polimorfizem

Kožna pregrada

Imunski odziv

Začetek bolezni

KEY WORDS

Atopic dermatitis

Polymorphism

Skin barrier

Immune response

Onset

SEZNAM OKRAJŠAV

AD – atopijski dermatitis (*angl. atopic dermatitis*)

CAPN10 - kalpain 10 (*angl. calpain 10*)

celice NK – celice naravne ubijalke (*angl. natural killer cells*)

celice Th – celice T pomagalke (*angl. T helper cells*)

CHI3L1 – hitinazi 3 podobni protein 1 (*angl. chitinase 3-like 1*)

CMA 1 - mastocitna himaza 1 (*angl. mast cell chymase 1*)

DNA – deoksiribonukleinska kislina (*angl. deoxyribonucleic acid*)

FLG – filagrin (*angl. filaggrin*)

HNF4A - hepatocitni nuklearni faktor 4 alfa (*angl. hepatocyte nuclear factor 4 alpha*)

IFN γ – interferon gama (*angl. interferon-gamma*)

IgE – imunoglobulin E (*angl. immunoglobulin E*)

IL – intelevkin (*angl. interleukin*)

MGB – sonda, ki se veže v mali žleb (*angl. minor groove binder*)

qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času (*angl. quantitative polymerase chain reaction*)

RO – razmerje obetov (*angl. odds ratio*)

SNP - polimorfizem posameznega nukleotida (*angl. single nucleotide polymorphism*)

SPINK 5 – inhibitor serinskih proteaz, Kazal tip 5(*angl. serine protease inhibitor, Kazal type 5*)

UV – ultravijolična

1 UVOD

1.1 ATOPIJA IN ATOPIJSKI DERMATITIS

Atopijski dermatitis (AD, tudi atopijski ekcem) je nenalezljiva kronična vnetna kožna bolezen. Bolezen se večinoma izrazi že v otroških letih. Trenutno je v razvitejših državah sveta prizadetih približno 20 % otrok in 1 do 3 % odraslih. Prevalenca še narašča, predvsem v državah v razvoju. Za AD je značilna suha koža, okvara epidermalne bariere funkcije, olajšano vstopanje alergenov v kožo, olajšana bakterijska kolonizacija kože (predvsem s stafilokokom) in pogostejše okužbe kože. Natančnega mehanizma nastanka še ne poznamo, verjetno pa gre za zapleteno interakcijo med dednostjo in dejavniki iz okolja. Bolezen v prvi vrsti močno vpliva na kvaliteto življenja bolnikov, kar pa hkrati predstavlja tudi veliko breme za zdravstvene blagajne (1).

Izraz dermatitis izhaja iz grške besede *derma*, *dermat* – koža, končnica *-itis* pa v medicinskem izrazoslovju prestavlja vnetje. Atopijo lahko definiramo kot osebno oz. družinsko nagnjenost k preobčutljivosti na sicer običajne snovi v okolju, kar se odraža tudi na koži in sluznici. Že ob stiku z majhno količino alergena je povezana s povečano tvorbo imunoglobulinov E (IgE) ter z razvojem simptomov, ki so značilni za astmo, rinokonjunktivitis ali dermatitis. Pogosto so ti alergeni proteini, ki jih zaužijemo s hrano. Atopijske bolezni imajo jasno genetsko ozadje (predispozicijo), saj so mnogo pogostejše med družinskimi člani. Pri kar 80 % parov enojajčnih dvojčkov se bolezen pojavi pri obeh otrocih, v primeru dvojajčnih dvojčkov pa se AD pri obeh pojavi v 30 %. Kljub temu je razlika med pojavnostjo pri enojajčnih in pri dvojajčnih dvojčkih velika, kar kaže na to, da je prisotnih še mnogo dejavnikov, ki vplivajo na pojav bolezni (2).

AD je tako bolezen, pri kateri sta pomembna tako genetska predispozicija kot okoljski dejavniki. Gre za kompleksne procese, pri katerih se prepletajo mehanizmi imunskega odziva ter kožne bariere (2).

V okviru našega raziskovalnega dela smo se osredotočili na genetsko predispozicijo za pojav AD. Kljub temu ne gre zanemariti dejavnikov okolja, ki imajo močno epidemiološko vlogo pri razvoju bolezni.

Koža predstavlja prvo in eno glavnih zaščit našega telesa in ob bolezni se klinični znaki najprej izrazijo ravno na njej. Glede na starost bolnika ločimo tri faze razvoja kliničnih

znakov. V prvih mesecih življenja se bolezen začne izražati kot rumenkasto luščenje kože na lasiču in licih. Vse to spremišča srbečica in kot posledica praskanja na koži ostajajo ranice. Za drugo fazo v času otroških let je značilen pojav izpuščajev, predvsem na udih in hrbtnu. V tretji fazi, v času adolescence in odrasle dobe, se izpuščaji pojavijo še na glavi in vratu. Taka opredelitev faz je sicer groba, saj se pojav kliničnih znakov med posamezniki zelo razlikuje zaradi različne teže bolezni ter hitrosti njenega napredovanja.

Ne glede na faze, lahko opredelimo tipične klinične značilne za AD, ki so posledica kroničnega vnetja kože. To so izpuščaji, ki se pojavijo predvsem na izpostavljenih delih telesa (udi, vrat, glava), suha koža ter srbečica. Predvsem srbečica je tista, ki vpliva na kakovost življenja bolnikov, saj se čez noč močno poslabša in s tem povzroča pomanjkanje spanja. Poleg tega problem predstavlja tudi praskanje. S tem se namreč odkrijejo telesu lastne molekule, s katerimi celice imunskega odziva sicer niso v stiku. Prepoznajo jih kot tuje telesu, kar lahko privede do t.i. avtoalergijskega AD (5).

Poleg kože so lahko prizadete tudi sluznice, kar vodi v razvoj astme ali alergijskega rinitisa (2).



Slika 1: Prikaz tipičnega izpuščaja na nogah pri AD



Slika 2: Prikaz tipičnega izpuščaja na licih pri AD

Zdravljenje bolezni je simptomatsko, pri čemer je najpomembnejša ustrezna nega kože. Izbira primerne terapije je odvisna od starosti bolnika, teže bolezni, prizadetih delov telesa in pridruženih bolezni. Pomembna je predvsem izbira primerenega zdravila za srbečico. V splošnem se antihistaminiki niso izkazali kot dovolj učinkoviti. Zato se predvsem pri težjih oblikah bolezni uporabljam lokalni in sistemski imunomodulatorji, kot so glukokortikoidi in imunosupresivi (npr. ciklosporin A in takrolimus). Kot uspešna se je izkazala tudi terapija z UV svetlobo, možna pa je tudi aktivacija celic T (npr. alefacept) (2, 27).

Ker je pri predpisovanju in uporabi sistemskih imunomodulatorjev potrebna izredna previdnost, se zdravljenje vedno bolj premika v smer tarčno specifične terapije. Vendar

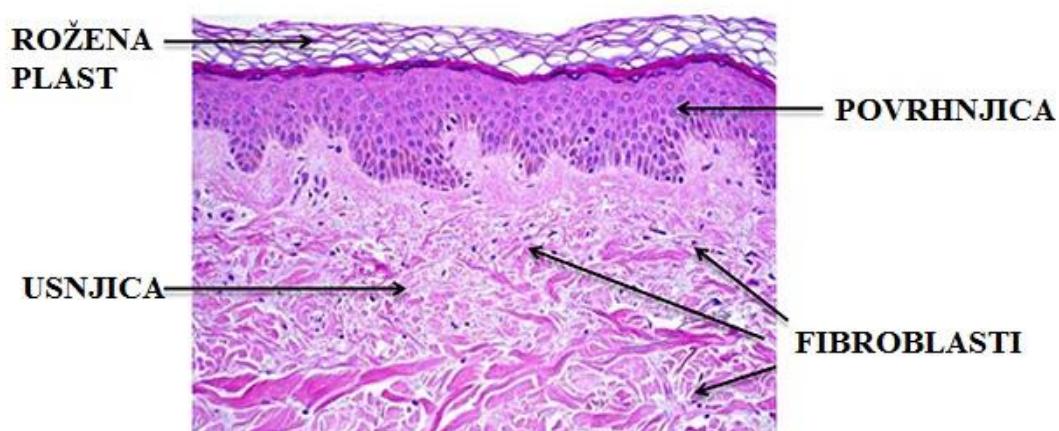
zaradi kompleksnosti bolezni tudi to predstavlja izziv. V fazi razvoja so zdravila, ki so antagonisti različnih molekul, ki so modulatorji ali receptorji s pomembno vlogo pri imunskem odzivu (npr. IL-31, mu-opioidni receptor) (2).

Flohr in Mann (2014) sta v svojem članku povzela zadnjih 5 let raziskav na področju epidemiologije AD. Glavni dejavniki, ki predstavljajo tveganje za razvoj bolezni, so »zahodna« dieta (visok vnos predelane hrane, prekajenega mesa ter nasičenih in nenesičenih maščobnih kislin), izpostavljenost antibiotikom širokega spektra in zmanjšana raznolikost naravne črevesne flore. Prav tako so nekatere študije pokazale, da je pojav AD povezan z debelostjo, pomanjkanjem vadbe ter z onesnaženostjo zraka zaradi prometa (predvsem s povečanimi koncentracijami NO₂ in CO). Tveganje za razvoj AD je manjše ob prisotnosti zaščitnih dejavnikov. Eden glavnih je izpostavljenost UV svetlobi, pomembno je tudi uživanje neprekuhanega in nepredelanega mleka. Tveganje za razvoj AD pri otroku je manjše, če je bila mati med nosečnostjo v stiku z živalmi na kmetiji ter če se je okužila s helminti. V kolikor je otrok v prvem letu življenja izpostavljen visokim koncentracijam endotoksinov, to prav tako deluje kot zaščitni dejavnik. Tveganje je prav tako manjše, če otrok odrašča v okolju, kjer je prisoten tudi pes (1).

1.2 PATOFIZIOLOGIJA IN GENETSKA PREDISPOZICIJA AD

1.2.1 Kožna pregrada

Koža je prvi obrambni mehanizem, ki nas varuje pred vstopom tujih snovi v telo. Zato je njena intaktnost izrednega pomena. Pri tem ima glavno vlogo rožena plast (t.i. stratum corneum), ki predstavlja prvo linijo obrambe.



Slika 3: Prikaz plasti celic v koži

V primeru, da je rožena plast poškodovana ali je zaradi določenih mutacij in spremenjenih oz. okvarjenih genov in s tem proteinov njena funkcija okrnjena, lahko nastopijo hude težave. Prva stvar je nezmožnost zadrževanja in s tem izguba vode. Koža postane suha, kar je tudi eden tipičnih znakov AD. Z izgubo intaktnosti je olajšan vdor tujih snovi iz okolja. To so različni alergeni, haptenci, dražilne snovi ter mikroorganizmi (5). Bolniki z AD so tudi bolj dovzetni za kolonizacijo ali okužbe z mikroorganizmi. Najpogosteje gre za okužbe s *Staphylococcus aureus* in s herpes simplex virusom (6).

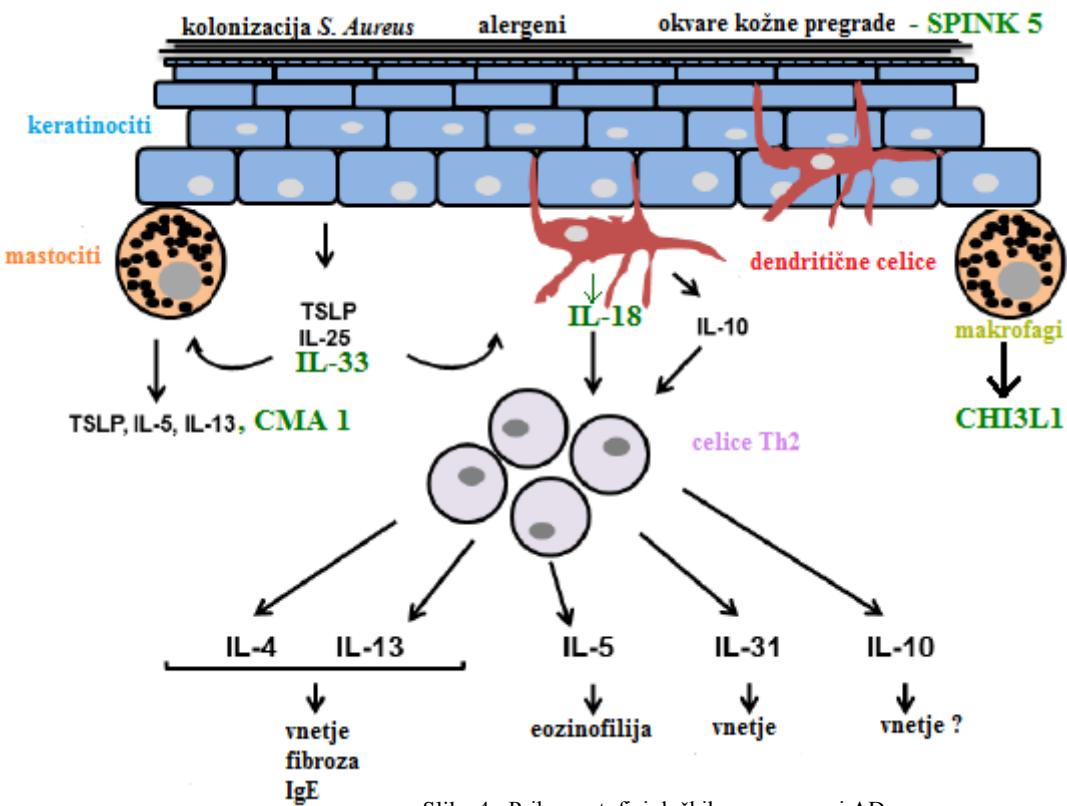
V zadnjem času se raziskave osredotočajo na preučevanje vloge kožne bariere pri pojavu AD. Polimorfizmi v genu za filagrin (*FLG*) so namreč močno povezani s pojavom AD, kar so raziskovalci ugotovili v več neodvisnih raziskavah (2-6). Mutacije v *FLG* so tako povezane z zgodnejšim nastankom bolezni, bolezen se pojavlja v težji obliki in je dolgotrajnejša. Prav tako imajo bolniki z mutacijo v genu za filagrin večjo verjetnost za razvoj astme, alergijskega rinitisa in so pogosteje senzibilizirani (3, 4). Protein SPINK 5 oz. LEKTI (angl. *Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*), za katerega zapis nosi *SPINK5* je pomemben za pravilno delovanje kožne bariere, in sicer uravnava proteolizo in diferenciacijo keratinocitov. V naši nalogi smo raziskovali povezavo med polimorfizmom v tem genu in pojavom AD (7, 8).

1.2.2 Imunski odziv

Za bolnike z AD je značilno, da se izražanje specifičnih IgE začne že ob stiku z majhno količino alergena. V prvi vrsti ima tukaj vlogo kožna pregrada, saj njeno nepravilno delovanje olajša vstop alergenov. Ti alergeni ob stiku z ustreznimi receptorji sprožijo imunski odziv, ki se nanje odzove preko Th-2 diferenciacije. Le-to uravnavajo interlevkini IL-4, IL-10 in IL-13, ki hkrati zmanjšujejo koncentracije antimikrobnih peptidov. S tem so mikrobne okužbe kože pri bolniki z AD še težje obvladljive (5).

Predhodne raziskave so dokazale, da so polimorfizmi v genih, ki kodirajo IL-4, IL-13, TLR 2, TLR 9, FCER1, CMA 1, RANTES, STAT in drugih, povezane s pojavom AD (7).

Ker imajo CMA 1, IL-18, IL-33 in CHI3L1 pomembno vlogo pri imunskejem odzivu, smo v raziskavo vključili polimorfizme posameznih nukleotidov v genih, ki jih kodirajo.



Slika 4: Prikaz patofizioloških procesov pri AD

1.3 GENETSKI MODELI DEDOVANJA

S pomočjo različnih modelov dedovanja opisujemo vpliv posameznega genotipa na fenotip. Alel, ki nosi tveganje za pojav določene bolezni, se lahko podeduje v eni kopiji, v dveh kopijah ali pa podedujemo alel, pri katerem tveganje za pojav bolezni ni povečano. V skladu s tem ločimo naslednje glavne modele dedovanja (kot primer vzemimo, da je alel C divji tip, tveganje za razvoj bolezni ni povečano, in alel T mutiran alel, ki nosi tveganje):

Dominantni model: heterozigoti in homozigoti TT imajo enako tveganje za razvoj bolezni. Že ena kopija alela T je dovolj, da predstavlja tveganje. Tako med seboj primerjamo CC homozigota z združenima genotipoma CT+TT.

Recesivni model: tveganje predstavlja le dve kopiji alela T (genotip TT), genotipa CC in CT pa imata enak učinek. Tako v tem modelu primerjamo homozigota TT z združenima genotipoma CC+CT.

Aditivni model: dve kopiji alela T predstavljata dvakrat večje tveganje kot ena kopija. Vsaka kopija torej spreminja tveganje v aditivni obliki. To pomeni, da ima homozigot TT dvakrat večje tveganje za razvoj bolezni kot heterozigot CT, ta pa nosi večje tveganje od homozigota CC. V tem modelu moramo pri primerjavi upoštevati obtežitev zaradi aditivnosti in primerjamo 2TT+CT z CC (24).

1.4 ANALIZIRANI GENI IN POLIMORFIZMI

1.4.1 Inhibitor serinskih proteaz (SPINK 5)

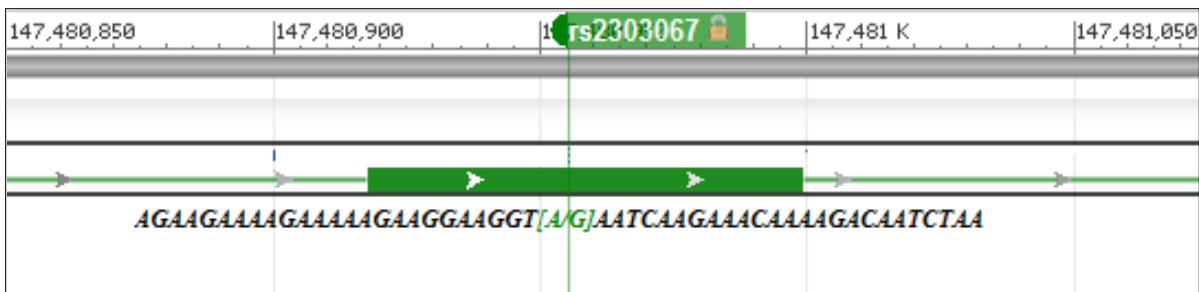
SPINK5 (angl. *serine protease inhibitor, tudi Kazal type 5*) je gen, ki nosi zapis za protein SPINK 5, znan tudi kot protein LEKTI. Je inhibitor serinskih proteaz, ki so odgovorne za cepitev drugih proteinov. Je velika in kompleksna molekula, ki jo encim furin cepi na manjše domene, ki so samostojno aktivne (8).

Protein SPINK 5 se tvori v priželjcu in v koži, kjer je njegova tvorba pomembna predvsem v roženi plasti. Specifične serinske proteaze iz skupine kalikreinov imajo namreč s cepljenjem proteinov eno glavnih vlog pri luščenju in s tem obnavljanju kože, vplivajo pa tudi na diferenciacijo keratinocitov. V kolikor zaradi mutacij v *SPINK5* pride do pomanjkanja ali nepravilnega delovanja proteina, to vpliva na delovanje kožne bariere. Njegova naloga je tudi pomoč pri razvoju limfocitov v priželjcu (7, 9).

Bolezen, ki je povezana z mutacijami v *SPINK5*, je Nethertonov sindrom. Zaradi pomanjkanja LEKTI so serinske proteaze pretirano aktivne. Posledično je rožena plast kože izredno tanka in se hitreje lušči. Mikroorganizimi lažje vstopajo v telo, zato so bolniki običajno tudi atopiki. Velika verjetnost je tudi, da taki bolniki razvijejo astmo in ekceme oz. dermatitis, ki so sicer značilni za AD (9).

Rs2303067

Gen *SPINK5* se nahaja na kromosому 5, na mestu 5q32. Nosi zapis za 9 različnih transkriptov. Obsega 33 eksonov, polimorfizem rs2303067 se nahaja v eksonu 14. starejše oznake za SNP rs2303067 so rs17775367, rs56830970, rs17860505 in rs52832839 (10).

Slika 5: Lega SNP-a rs2303067 v genu *SPINK5*

Pri rs2303067 gre za nesmiselno mutacijo, kjer je nukleotid adenozin zamenjan z gvanozinom. Posledica tega je sprememba aminokislinskega zaporedja. Namesto običajnega lizina se tako prepiše glutaminska kislina. S tem pride do spremembe naboja iz pozitivnega v negativnega, kar vodi do spremembe konformacije proteina (10).

V literaturi se SNP največkrat pojavi zapisan kot rs2303067, 1258A>G ali Lys420Glu (10).

1.4.2 Mastocitna himaza 1 (CMA 1)

CMA1 je gen, ki nosi zapis za protein CMA 1 (*angl. mast cell chymase 1*). Ta je serinska proteaza s kimotriptično aktivnostjo. Encim se v visokih koncentracijah nahaja v sekretornih granulah mastocitov in ima pomembno vlogo v procesu vnetja. Sprosti se ob ustreznji aktivaciji mastocitov ter deluje provnetno v sodelovanju s histaminom in triptazo. Pospeši nastajanje različnih mediatorjev, med njimi IL-1 β , sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa ter poveča prepustnost žil v koži (8, 12).

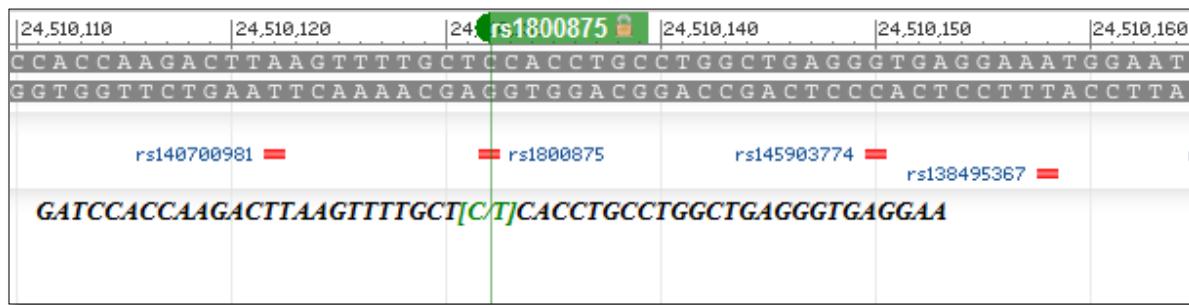
Poleg vloge v procesu vnetja, ima CMA 1 še nekaj pomembnih nalog. Sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa, uravnava izločanje submukoznih žlez in je odgovoren za tvorbo nekaterih vazoaktivnih peptidov (npr. endotelin 1). Poleg angiotenzinske konvertaze je odgovoren za pretvorbo angiotenzina I v vazoaktivni angiotenzin II (8, 11).

Glede na funkcije proteina, so mutacije gena CMA 1 povezane z različnimi bolezenskimi stanji. Motena je kontrola krvnega tlaka, prispevajo tako k patogenezi pri hipertenziji, hipertrofiji srca in pri srčnem popuščanju. Zaradi vloge v teh procesih, je protein CMA 1 tudi ena pomembnih tarč pri zdravljenju srčnožilnih bolezni (11).

Ker ima CMA 1 pomembno vlogo pri delovanju imunskega sistema, se nepravilnosti proteina odražajo tudi na tem področju. Več neodvisnih študij je namreč že dokazalo povezavo različnih polimorfizmov v *CMA1* z atopijskimi boleznimi (12, 13).

Rs1800875

Gen *CMA1* se nahaja na kromosomu 14, na mestu 14q11.2. Nosi zapis za 2 različna transkripta. Obsega 5 eksonov. Drugi imeni za SNP sta še rs56811839 in rs3759636 (10).



Slika 6: Lega SNP-a rs1800875 v genu *CMA1*

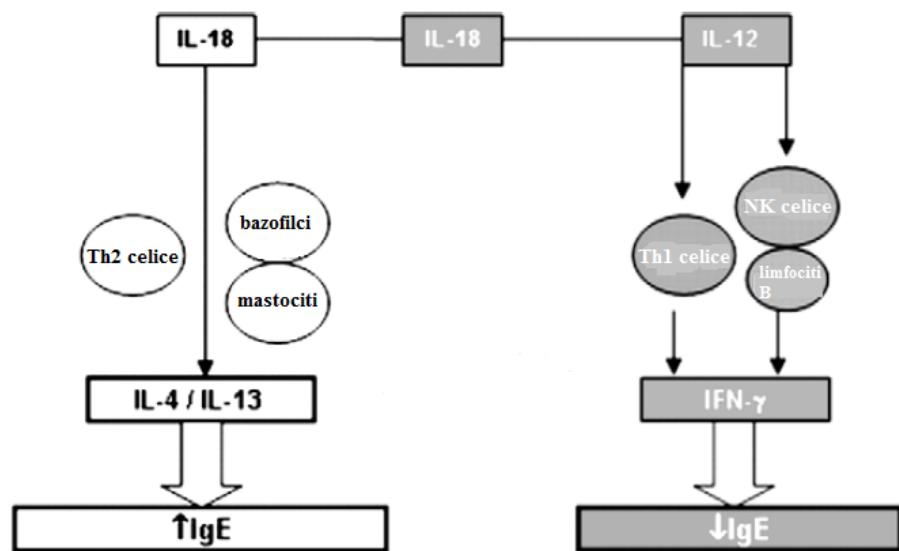
Pri rs1800875 gre za tranzicijo, kjer se nukleotid citozin zamenja s timidinom (10). Neposredne povezave polimorfizma s koncentracijo proteina v raziskavah niso našli. Obstaja povezava med rs1800875 in koncentracijo IgE, iz česar lahko sklepamo, da je imunski odziv burnejši, k čemur bi lahko prispeval tudi CMA 1 (14).

1.4.3 Interlevkin 18 (IL-18)

Gen *IL18* nosi zapis za protein interlevkin 18 (*angl. interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)*). Gre za interferon gama spodbujajoči faktor, ki spada v družino citokinov IL-1. Ima pomembno vlogo v uravnavanju pridobljenega imunskega odziva, saj spodbuja limfocite T in celice naravne ubijalke. Izločajo ga različne imunske celice – monociti, makrofagi in dendritične celice v prekurzorski obliki. Aktiven postane šele po cepitvi s kaspozo 1.

V imunskem odzivu ima dve nasprotujoči si vlogi. Po eni strani s pomočjo IL-12 spodbuja nastanek interferona gama (*angl. interferon gamma; IFN γ*). Le-tega izločajo celice Th-1

pomagalke, limfociti B in celice NK. Na ta način gre za Th-1 posredovan imunski odgovor in v skladu s tem za zaviranje nastanka IgE. Po drugi strani so na živalskih modelih ugotovili, da ob odsotnosti IL-12 spodbuja Th-2 imunski odgovor preko spodbujanja nastanka IL-4 in IL-13. Izločajo ju Th-2 celice, mastociti in bazofilci. S tem je povečana sinteza IgE (15).



Slika 7: Shema delovanja IL-18

Nepravilnosti IL-18 se odražajo tudi pri boleznih. Pri vnetjih se poveča njegova sinteza, raziskave pa so pokazale povezavo različnih mutacij v genu *IL18* z imunske boleznimi (npr. s sladkorno boleznijo in s Chronovo boleznijo). Povezali so jih tudi z avtoimunostjo, atopijo, astmo in povišanimi serumskimi koncentracijami IL-18 pri alergijskih boleznih (25).

Rs5744247

Gen *IL18* se nahaja na kromosому 11, na mestu 11q22.2-q22.3. Gen sestavlja 6 eksonov, izražanje pa uravnava 2 promotorja (eden v eksonu 1 in drugi v eksonu 2). Start kodon je lociran v eksonu 2, polimorfizem rs5744247 pa se nahaja v intronu NM_001243211.1 (10).

Slika 8: Lega SNP-a rs5744247 v genu *IL18*

Pri rs5744247 gre za transverzijo, kjer se nukleotid citozin zamenja z gvanozinom (10). Polimorfizme v regiji 11q22 gena *IL18* so že povezali z atopijo, senzibilizacijo za določene alergene in alergijskim rinitisom (15, 16).

1.4.4 Interlevkin 33 (IL-33)

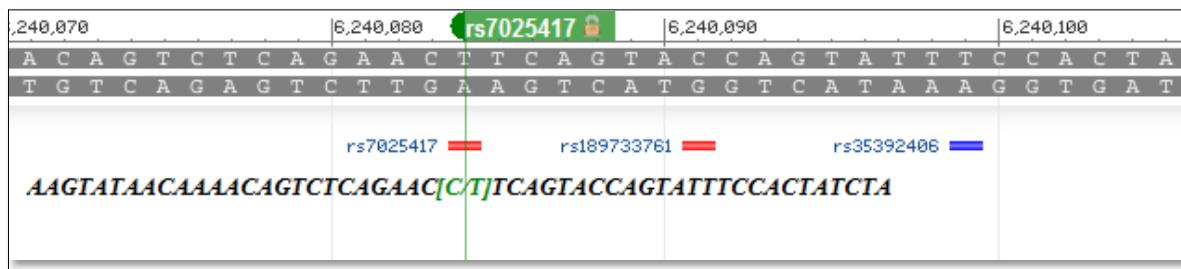
Gen *IL33* nosi zapis za protein interlevkin 33 (*angl. interleukin 33*), ki spada med citokine družine IL-1. Njegova vloga je pomembna v prirojenem imunskem odzivu, kjer spodbuja Th-2 imunski odgovor. To lahko stori neposredno z delovanjem na limfocite Th-2, ali posredno preko polarizacije dendritičnih celic. Njegova vloga je tudi zaščita pred okužbami s helminti (17, 26).

Nahaja se v jedru epitelijskih celic, endotelnih celic in fibroblastov, pa tudi v jedru bazofilcev, eozinofilcev in mastocitov. Sprosti se po celični lizi zaradi nekroze, ki je po navadi posledica vnetja. To lahko nastane zaradi stresa, toksinov ali poškodbe celice. IL-33 se veže na celice Th-2, ki izražajo ST2 receptor (ILC2, *angl. type 2 innate lymphoid cells*) – le ta spada v družino interlevkin 1 receptorjev in ga imenujemo tudi receptor IL1RL1 (*angl. interleukin 1 receptor-like 1*). Ob vezavi IL-33 na ILC2 je spodbujen nastanek IL-5 in IL-13, ki sta prav tako pomembna citokina v imunskem odgovoru Th-2 (26, 28). Poleg vpliva na limfocite T, lahko vpliva na dozorevanje mastocitov (17, 28).

Nepravilnosti, ki so posledica različnih mutacij v *IL33*, so povezane s splenomegalijo, povišanim deležem eozinofilcev ter povišanimi imunoglobulinimi v serumu. V raziskavi, kjer so primerjali izražanje mRNA *IL33* v koži zdravih ljudi ter v koži bolnikov z AD so ugotovili, da so vrednosti v koži bolnikov skoraj desetkrat višje kot vrednosti v koži zdravih. Kljub temu vloga IL-33 v procesu nastanka AD še ni pojasnjena (17).

Rs7025417

Gen *IL33* se nahaja na kromosому 9, na mestu 9p24.1. Obsega 7 eksonov, polimorfizem rs7025417 je lociran v intronski regiji NM_001199640.1 (10).



Slika 9: Lega SNP-a rs7025417 v genu *IL33*

Pri rs7025417 gre za tranzicijo, kjer se nukleotid citozin zamenja s timidinom. Polimorfizem v literaturi najdemo tudi pod oznakama rs56444312 in rs60470172 (10).

1.4.5 Hitinazi 3 podoben protein 1 (CHI3L1)

Gen *CHI3L1* je znan tudi pod imenom *YKL40* in nosi zapis za protein CHI3L1 (*angl. Chitinase 3-like protein 1*) oz. YKL40 (hrustančni glikoprotein 39, *angl. cartilage glycoprotein-39*). Gre za hitinazi 3 podoben protein 1 brez encimskih lastnosti. Izločajo ga aktivirani makrofagi, hondrocyti, sinovialne celice in nevtrofilci (19). Tako pri ljudeh kot pri miših deluje na epitelijске celice dihalnih poti in je v njih mediator vnetja, domnevajo pa, da sodeluje tudi pri preoblikovanju tkiva (18, 19).

Različne polimorfizme gena *CHI3L1* so povezali s sarkoidozo, z astmo, z bronhialno preodzivnostjo in z zmanjšano pljučno funkcijo. Poleg tega so povišane koncentracije proteina v krvnem obtoku dober biomarker za astmo in pljučno funkcijo (19).

Rs4950928

Gen *CHI3L1* se nahaja na kromosому 1, na mestu 1q32.1. Obsega 10 eksonov, polimorfizem rs4950928 pa se nahaja v 5' neprevedeni regiji gena (10).



Slika 10: Lega SNP-a rs4950928 v genu *CHI3L1*

Pri rs4950928 gre za transverzijo, kjer se nukleotid citozin zamenja z gvanozinom. Polimorfizem v literaturi najdemo tudi pod oznako rs60965200 (10).

2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen dela je doprinesti k razumevanju patogeneze AD, pri čemer se osredotočimo na raziskovanje genetskih dejavnikov. Ob začetku dela postavimo delovne hipoteze, ki jih bomo po končani izvedbi alelne diskriminacije ter statistični obdelavi dobljenih rezultatov ovrednotili.

1. Rs2303067 v *SPINK5* je povezan s pojavom AD in z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Povezan je z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa ter z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Povezan je s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
2. Rs1800875 v *CMA1* je povezan s pojavom AD in z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Povezan je z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa ter z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Povezan je s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
3. Rs5744247 v *IL18* je povezan s pojavom AD in z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Povezan je z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa ter z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Povezan je s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
4. Rs7025417 v *IL33* je povezan s pojavom AD in z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Povezan je z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa ter z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Povezan je s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
5. Rs4950928 v *CHI3L1* je povezan s pojavom AD in z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Povezan je z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa ter z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Povezan je s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POPULACIJA BOLNIKOV Z AD IN KONTROLNA SKUPINA

Vzorci in klinični podatki so bili zbrani s strani Helene Rupnik, dr. med. na Dermatovenerološki kliniki, UKC Ljubljana, v okviru doktorskega dela (44). Opredeljenih je bilo 241 bolnikov z atopijskim dermatitisom (AD) ter 164 zdravih posameznikov (kontrol). Pri vseh bolnikih so bili opredeljeni naslednji demografski in klinični podatki: leto rojstva; starost, pri kateri se je bolezen začela izražati (*angl. onset*); hospitalizacija zaradi AD; pridružene bolezni (astma) ter prizadeti deli telesa (lokalizacija) – glava, vrat, trup, zgornje okončine brez dlani, dlani, spodnje okončine brez stopal.

Preglednica I: Demografski in klinični podatki sodelujočih

	Bolniki z AD	Kontrole
Starost, leta, povprečje (SD)	23,5 (12,2)	41,7 (20,2)
Moški spol, število (%)	75 (31,1)	103 (62,8)
Začetek bolezni, leta, povprečje (SD)	12,5 (13,3)	
Začetek bolezni, 0 do \leq 2 leti, število (%)	85 (35,3)	
Začetek bolezni, > 2 do \leq 8 let, število (%)	32 (13,3)	
Začetek bolezni, > 8 do \leq 18 let, število (%)	47 (19,5)	
Začetek bolezni, > 18 let, število (%)	77 (32,0)	
Lokalizacija		
Glava, število (%)	142 (58,9)	
Vrat, število (%)	107 (44,4)	
Trup, število (%)	88 (36,5)	
Zgornje okončine brez dlani, število (%)	193 (80,1)	
Dlani, število (%)	60 (24,9)	
Spodnje okončine brez stopal, število (%)	127 (52,7)	
Hospitalizacija, število (%)	83 (34,4)	
Astma, število (%)	57 (23,7)	

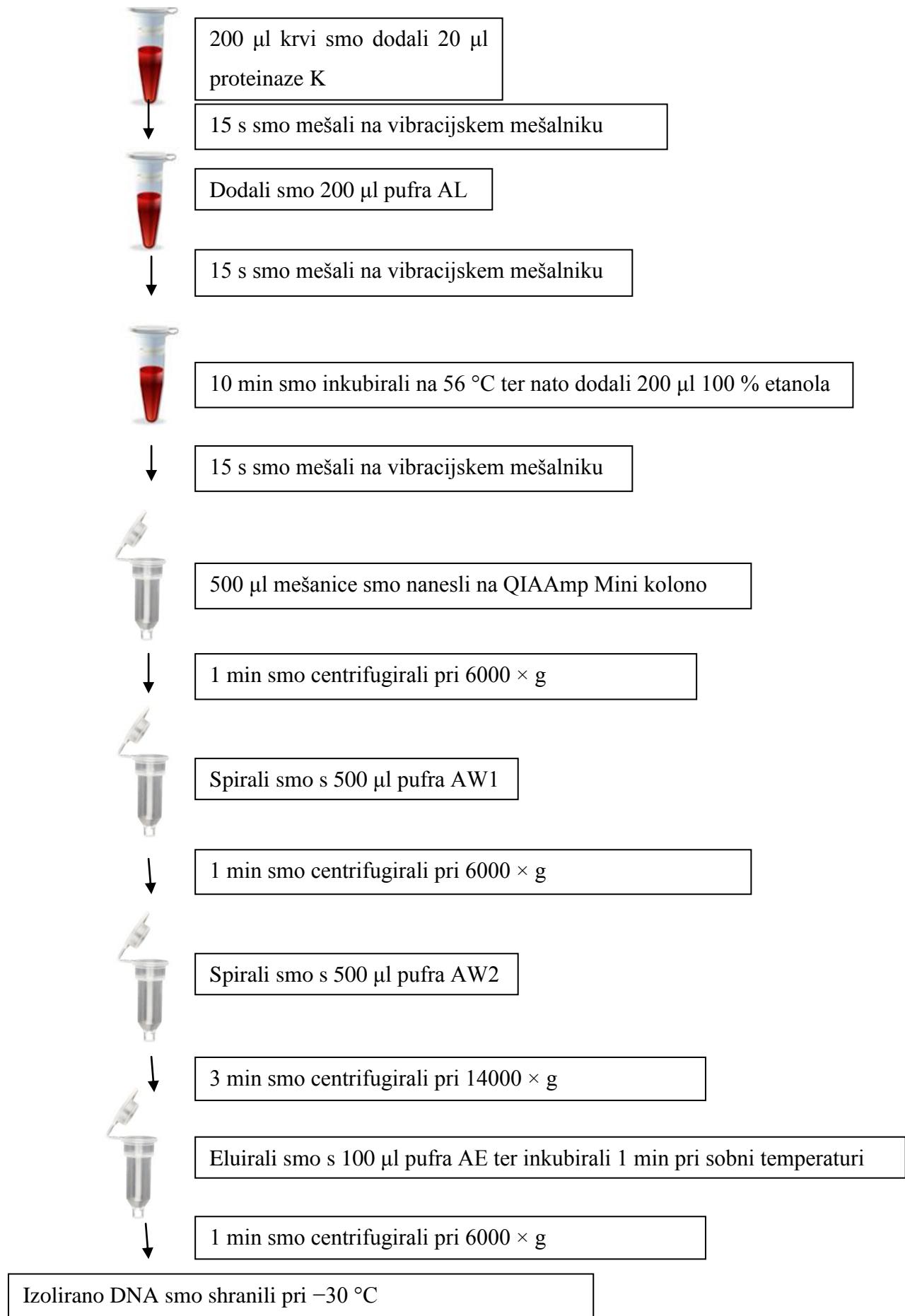
3.2 IZOLACIJA DNA

Za namene doktorske naloge Helene Rupnik je iz polne krvi, odvzete v epruvete z EDTA, že bila izolirana DNA iz prej omenjenih vzorcev. S samo metodo izolacije DNA smo se seznanili tako, da smo izolirali DNA iz 120 vzorcev polne venske krvi za namene drugih študij.

Za izolacijo DNA smo uporabili komplet QIAAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Nemčija). Postopek smo izvajali po naslednjem protokolu, prikazan je tudi na shemi 1 (33).

1. 200 µl polne krvi smo odpipetirali v 1,5 ml mikrocentrifugirko.
2. Dodali smo 20 µl proteinaze K in nato 15 s mešali na vibracijskem mešalniku.
3. Dodali smo 200 µl pufra AL in 15 s mešali na vibracijskem mešalniku.
4. Mešanico smo 10 min inkubirali pri 56 °C in kratko centrifugirali, da smo odstranili kapljice na pokrovčku.
5. Dodali smo 200 µl 100 % etanola in 15 s mešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo kratko centrifugirali.
6. QIAAmp Mini kolono smo namestili na zbiralno mikrocentrifugirko ter nato nanjo nanesli 500 µl mešanice. Centrifugirali smo pri $6000 \times g$ 1 min. Kolono smo nato prestavili na čisto zbiralno mikrocentrifugirko.
7. Na kolono smo nato dodali 500 µl pufra AW1 ter centrifugirali pri $6000 \times g$ 1 min. Kolono smo nato prestavili na čisto zbiralno mikrocentrifugirko.
8. Na kolono smo dodali 500 µl pufra AW2 ter centrifugirali pri $14000 \times g$ 3 min. Kolono smo nato namestili na čisto zbiralno mikrocentrifugirko.
9. Na kolono smo dodali 100 µl pufra AE, inkubirali 1 min pri sobni temperaturi ter nato centrifugirali pri $6000 \times g$ 1 min.
10. Vzorce izolirane DNA smo shranili pri -30°C (33).

Shema 1: Postopek izolacije DNA



3.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Verižna reakcija s polimerazo (PCR – *angl. polymerase chain reaction*) je metoda, s pomočjo katere pomnožujemo DNA oz. njene odseke. Pri verižni reakciji s polimerazo v realnem času (*angl. real time-PCR ali qPCR – quantitative PCR*) detekcija poteka hkrati s pomnoževanjem, poleg tega vzorec ne potrebuje post-PCR obdelave, kar prepreči kontaminacijo.

Princip qPCR je enak principu PCR, s tem da tu v reakcijsko mešanico vključimo še sredstvo za detekcijo. V našem primeru so bile to alelna specifične hidrolizirajoče sonde, označene z dvema fluorescentnima barvilo ma. Eno je služilo kot reporter (FAM, VIC), drugo kot dušilec (MGB) (20, 21, 22).

3.3.1 Priprava reakcijske mešanice

Material

Fast Advanced Master Mix (2 ×)

SNP Genotyping Assay Mix (20 ×)

Voda brez nukleaz (Nuclease free water)

Mikrotitrskra plošča, centrifuga, mehanske pipete, nastavki za pipete, vibracijski mešalnik.

Postopek

Pripravili smo reakcijsko mešanico iz 2 × Fast Advanced osnovne zmesi PCR (Applied Biosystems), zmesi 20 × SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), ki je bil specifičen za določanje tarčnega alela, ter vode brez nukleaz. Sestava reakcijske mešanice je navedena v preglednici II.

Preglednica II: Sestava reakcijske mešanice za reakcijo alelne diskriminacije

Reagent	Ena reakcija (volumen)	Reakcijska mešanica (volumen)
Fast Advanced Master Mix (2x)	2,75 µl	275 µl
SNP Genotyping Assay Mix (20x)	0,275 µl	27,5 µl
Voda brez nukleaz	1,975 µl	197,5 µl

Po 5 µl reakcijske mešanice smo nanesli v vsako od vdolbinic mikrotitrsko ploščo ter v ustrezeno vdolbinico dodali po 0,5 µl izolirane DNA v pufru AE. Dodali smo še negativno kontrolo NTC, kjer smo namesto DNA v vdolbinico dodali vodo brez nukleaz. Na ploščo smo nalepili zaščitno folijo, ki preprečuje izhlapevanje vzorcev ter jo stresali v stresalniku Eppendorf Mix Mate pri 500 vrtljajih/min 1 min. Ploščo smo nato centrifugirali v aparatu Eppendorf 5810R pri 515 × g 2 min.

Tako pripravljeno ploščo smo vstavili v napravo ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Sequence DeteCTion System opremljen s programsko opremo SDS version 1.3.0), ki je prikazan na sliki 11 .

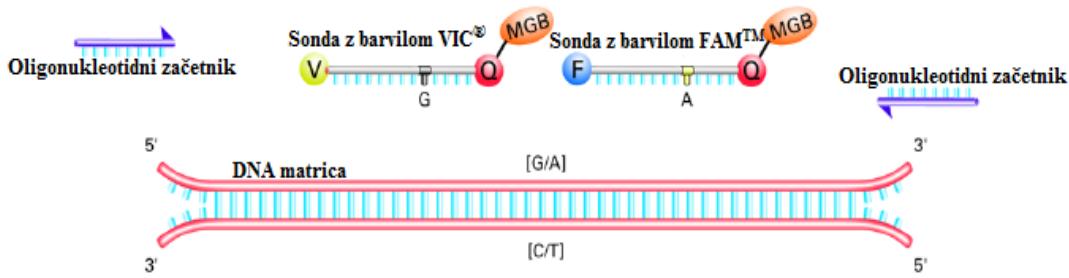


Slika 11: ABI PRISM 7500 Real Time PCR System

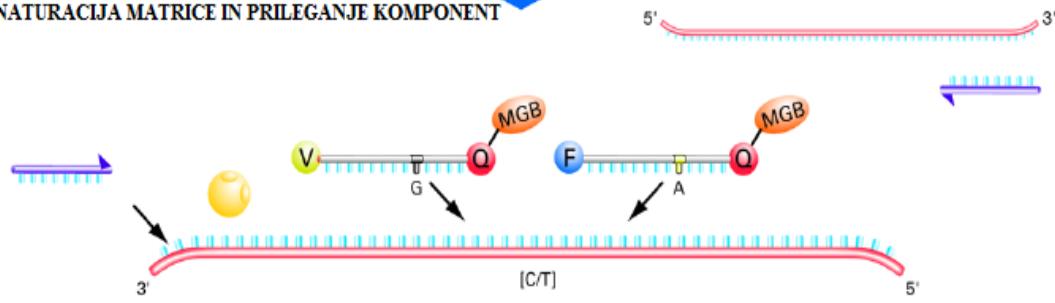
3.3.2 Alelna diskriminacija

Metoda alelne diskriminacije nam omogoča detekcijo genetskih variant v preiskovanih zaporedjih. V reakcijski mešanici sta dva para oligonukleotidnih začetnikov in dve sondi. Sondi se komplementarno prilegata na različni zaporedji – ena na zaporedje divjega tipa in druga na zaporedje z mutiranim aleлом. Razlika je samo v enem nukleotidu. Nanju sta vezani različni fluorescentni reporterski barvili. V našem primeru je bilo na eno sondu vezano barvilo VIC® in na drugo barvilo FAM™. Z merjenjem porasta intenzitete fluorescence enega in drugega barvila smo pridobili informacije o homozigotnem ali heterozigotnem stanju genetske variante (23).

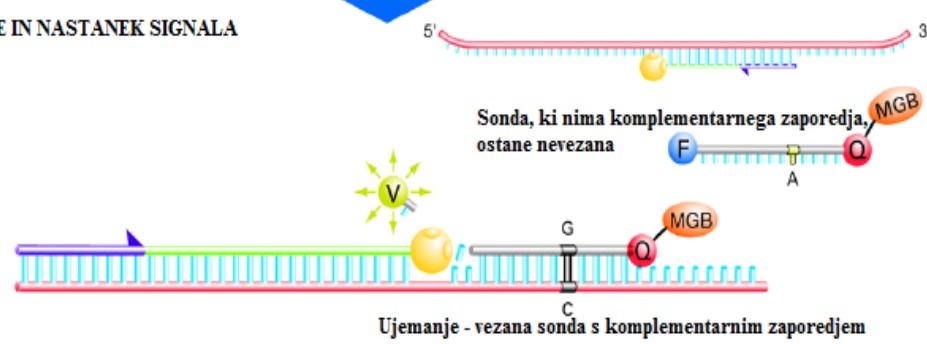
1. SESTAVINE REAKCIJSKE ZMESI IN DNA MATRICA



2. DENATURACIJA MATRICE IN PRILEGANJE KOMPONENT

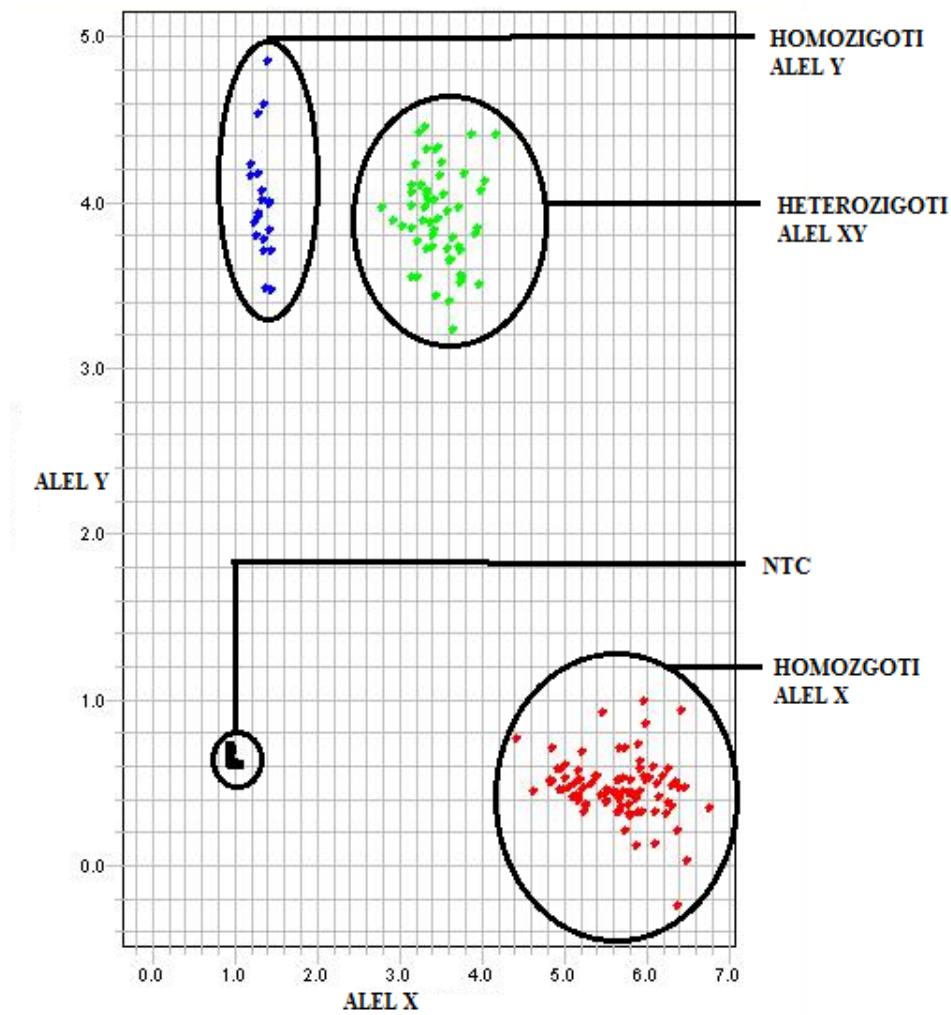


3. PODALJŠEVANJE IN NASTANEK SIGNALA



Slika 12: Princip alelne diskriminacije

Po končani reakciji so se nam rezultati s pomočjo programske opreme SDS version 1.3.0 izrisali kot je prikazano na sliki 13 (23).



Slika 13: Prikaz rezultatov alelne diskriminacije

3.4 OBDELAVA PODATKOV

3.4.1 Hardy-Weinbergovo ravnotežje

Hardy-Weinbergovo ravnotežje (*angl. Hardy-Weinberg equilibrium; HWE*) je pojav, pri katerem je v določeni populaciji razmerje med pogostnostjo alelov in pogostnostjo genotipov konstantno. Načelo velja ob odsotnosti mutacij, nenaključnega parjenja, migracij in selekcije. V začetku dvajsetega stoletja sta ga prvič opisala G. H. Hardy in Wilhelm Weinberg ter s tem postavila pomemben mejnik v zgodovini populacijskih študij. Omogoča namreč izračun pričakovane pogostnosti genotipov v populaciji ter primerjavo z opazovanimi pogostnostmi, kar je danes eden prvih korakov pri analizi populacij. Za večino populacij držijo pričakovane pogostnosti, lahko pa pride tudi do odstopanj.

Če je p pogostnost alela A in q pogostnost alela a za bialelni lokus, potem v skladu s HWE pričakovana pogostnost za AA genotip AA je p^2 , za AA genotip AA je $2pq$ in za AA genotip AA je q^2 . Vsota deležev vseh treh genotipov mora biti torej ena.

S testom HWE danes tako lahko preverjamo kakovost genetskih študij, pri čemer ta predvideva, da je vzorčenje genotipov oseb v študiji naključno iz splošne populacije (34).

3.4.2 Statistična analiza

Test χ^2

Test χ^2 uporabljammo pri statističnih analizah. Na podlagi hipoteze pričakujemo določene rezultate, ki jih s pomočjo testa χ^2 primerjamo z dobljenimi rezultati ter ugotavljammo ali se ti med seboj razlikujejo. Naši osnovni hipotezi priredimo ničelno hipotezo, katero vzamemo kot resnično. Test izvajamo s pomočjo kontingenčne tabele, v kateri so s številom neodvisnih pogostnosti določene stopinje prostosti. Te vplivajo na obliko porazdelitve. V kolikor zavrnemo ničelno hipotezo, posledično velja osnovna hipoteza. V nalogi smo test χ^2 uporabili za izračun HWE. Izbrali smo 5 % stopnjo tveganja, kar pomeni, da je interval zaupanja 95 % (29).

Relativno tveganje in razmerje obetov

V našem primeru so bili izidi binarni (je vpliv/ni vpliva) in morali smo ugotoviti kolikšna je povezava med skupinama. Za to se uporablja relativno tveganje (RR) in razmerje obetov (RO). Pri relativnem tveganju najprej določimo tveganje v vsaki skupini (tveganje p_1 v prvi skupini in tveganje p_2 v drugi skupini). RR je razmerje med tveganjem v obeh skupinah. Vsak izid s tveganjem p ima nasprotni izid s tveganjem $(1-p)$. Razmerje teh dveh števil so obeti $p/(1-p)$, razmerje obetov pa je kvocient med obeti v dveh skupinah. Pri vrednostih $1 < \Theta < \infty$, so obeti za nek dogodek v prvi skupini večji kot v drugi skupini.

S programom GraphPad Prism 5 smo s Fisherjevim eksaktnim testom izračunali vrednosti p , razmerje obetov in interval zaupanja (35).

3.4.3 Označevanje genov na kariotipu

Analizirane gene smo želeli predstaviti v preglednejši obliki in smo jih vrisali v kromosomsko karto s pomočjo bioinformacijskega orodja v podatkovni zbirki Ensembl (10).

V podatkovni bazi NCBI (36) smo pridobili identifikacijske oznake (ID) posameznih genov, ki so prikazane v preglednici III.

Preglednica III: Analizirani geni in pripadajoče oznake ID

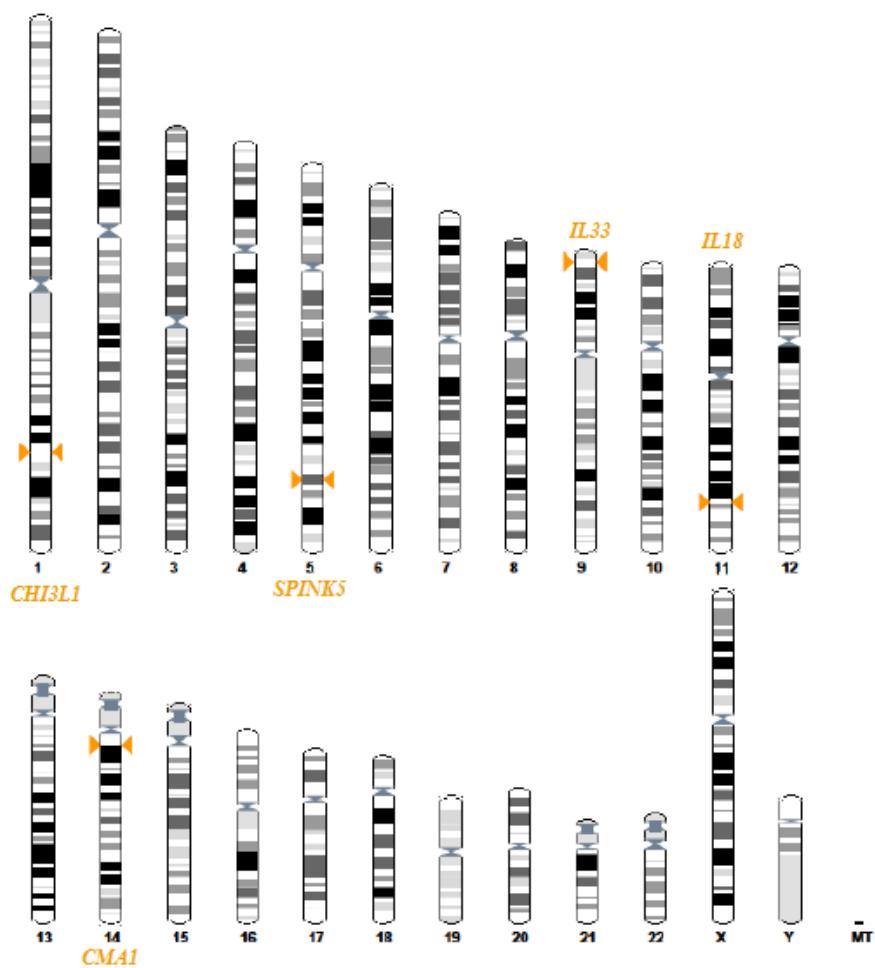
Gen	ID	Lega na kromosomu	Oznaka rs analiziranega polimorfizma
<i>SPINK5</i>	11005	5q32	rs2303067
<i>CMA1</i>	1215	14q11.2	rs1800875
<i>IL18</i>	3606	11q22.2-q22.3	rs5744247
<i>IL33</i>	90865	9p24.1	rs7025417
<i>CHI3LI</i>	1116	1q32.1	rs4950928

V spletnem brskalniku smo odprli domačo stran Ensembl ter izbrali genom »Human«. Izbrali smo ikono »View karyotype« ter ohranili izbiro »Whole genome«. V stranskem seznamu smo nato izbrali »Manage your data« in v nadalnjem stranskem seznamu »Features on Karyotype«. V prostor za »ID(s)« smo vpisali številke ID genov ter izbrali želen prikaz rezultatov (barva in oblika). S klikom na gumb »Show features« smo dobili prikazane rezultate, ki smo jih izvozili v obliki datoteke .png. Rezultati so prikazani na sliki 14 v poglavju Rezultati.

4 REZULTATI

Analizirali smo 5 SNP-jev na petih različnih genih. Ti bi lahko bili značilno povezani s pojavom AD v različnih življenjskih obdobjih, s prizadetimi različnimi deli telesa, s potrebo po hospitalizaciji zaradi bolezni ali s pridruženo astmo. Izbrane SNP-je smo določili 241 bolnikom z diagnozo AD ter natančno opredeljenimi kliničnimi podatki in 164 zdravim posameznikom (kontrolam).

V raziskavo so bili vključeni polimorfizmi v naslednjih genih: rs2303067 v *SPINK5*, rs1800875 v *CMA1*, rs5744247 v *IL18*, rs7025417 v *IL33* in rs4950928 v *CHI3L1*. Z metodo alelne diskriminacije smo vsakemu posamezniku določili alelne variante SNP-jev. S pomočjo bioinformacijskega orodja v Ensemblu smo na kromosomski karti prikazali analizirane gene, kar je prikazano na sliki 14.



Slika 14: Položaj analiziranih genov na kromosmih

4.1 HARDY-WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE

Hardy-Weinbergovo ravnotežje smo izračunali s statističnim testom χ^2 ($\alpha=0,05$, SP=1). Pri izbranih pogojih je mejna kritična vrednost 3,84. Rezultati so prikazani v preglednici IV.

Preglednica IV: Rezultati testa χ^2 za Hardy-Weinbergovo ravnotežje

<i>SPINK 5</i>	<i>CMA 1</i>	<i>IL 18</i>	<i>IL 33</i>	<i>CHI3L1</i>
rs2303067	rs1800875	rs5744247	rs7025417	rs4950928
χ^2	2,70	0,16	0,14	0,80
				0,26

Vrednosti χ^2 so pri vseh analiziranih genotipih manjše od mejne kritične vrednosti 3,84. To pomeni, da so vsi genotipi porazdeljeni v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem.

4.2 IZBRANI POLIMORFIZMI IN NJIHOVA POVEZANOST Z AD

Vsakemu posamezniku, vključenemu v študijo, smo z metodo alelne diskriminacije določili genotipe. Znotraj skupine bolnikov z AD smo nato določili pogostnosti genotipov glede na izbrane kriterije: starost, pri kateri se je bolezen začela izražati (*angl. onset*); hospitalizacija zaradi AD; pridružene bolezni (astma) ter prizadeti deli telesa (lokalizacija). Pogostnosti genotipov bolnikov z AD in kontrol ter pogostnosti genotipov glede na zgoraj omenjene kriterije so prikazane v naslednjih preglednicah: rs2303067 v *SPINK5* (preglednica VI), rs1800875 v *CMA1* (preglednica VIII), rs5744247 v *IL18* (preglednica X), rs7025417 v *IL33* (preglednica XII) in rs4950928 v *CHI3L1* (preglednica XIV).

Statistično smo ovrednotili povezanost posameznega polimorfizma s pojavom atopijskega dermatitisa glede na zgoraj navedene kriterije. Združili smo genotipe ter med seboj primerjali njihove pogostnosti. Določili smo vrednosti p, razmerja obetov (RO) ter intervale zaupanja (IZ). Rezultati so prikazani v naslednjih preglednicah: rs2303067 v *SPINK5* (preglednica VII), rs1800875 v *CMA1* (preglednica IX), rs5744247 v *IL18* (preglednica XI), rs7025417 v *IL33* (preglednica XIII) in rs4950928 v *CHI3L1* (preglednica XIV).

V preglednicah smo zaradi preglednosti prikazali samo rezultate, ki so po statističnem vrednotenju izkazali povezanost posameznega polimorfizma s pojavom AD.

4.2.1 Frekvence genotipov

Združene frekvence bolnikov in kontrol naših genotipov smo primerjali s podatki v zbirki Ensembl (10). Primerjane frekvence so izbrane iz evropske populacije (EUR).

Preglednica V: Primerjava frekvenc genotipov s podatki iz Ensembla v odstotkih

	<i>SPINK 5</i> rs2303067			<i>CMA1</i> rs1800875			<i>IL18</i> rs5744247			<i>IL33</i> rs7025417			<i>CHI3LI</i> rs4950928		
Genotip	AA	AG	GG	CC	CT	TT	CC	CG	GG	CC	CT	TT	CC	CG	GG
Rezultati(%)	25	56	19	22	49	29	1	14	85	2	27	71	60	36	4
EUR (%)	27	54	19	25	52	23	1	18	81	5	37	58	66	29	5

4.2.2 Inhibitor serinskih proteaz (SPINK 5)

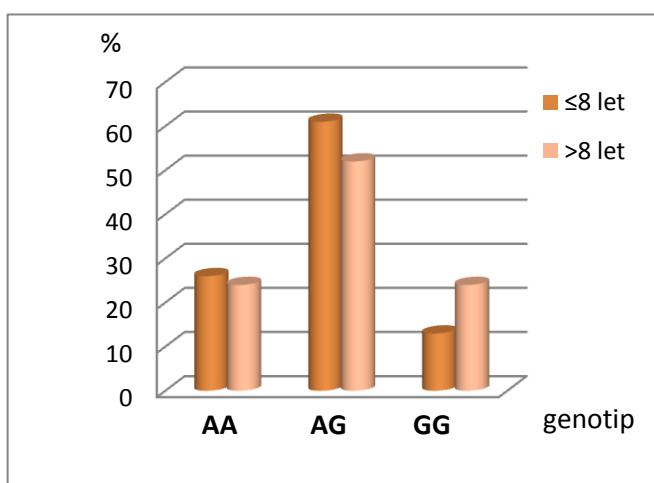
Preglednica VI: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs2303067 v *SPINK5* pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije

		Število (%)			
		AA	AG	GG	
AD		60 (25)	136 (56)	45 (19)	
KONTROLE		36 (22)	83 (51)	45 (27)	
ZAČETEK		21 (25)	50 (59)	14 (16)	
≤ 2 leti		39 (25)	86 (55)	31 (20)	
> 2 leti		30 (26)	72 (61)	15 (13)	
≤ 8 let		30 (24)	64 (52)	30 (24)	
> 8 let		42 (26)	95 (58)	27 (16)	
≤ 18 let		18 (23)	41 (54)	18 (23)	
> 18 let					
LOKALIZACIJA		43 (27)	90 (57)	25 (16)	
Prizadeti vsaj trije deli telesa		17 (21)	46 (55)	20 (24)	
Prizadeti manj kot trije deli					
PRIDRUŽENE		Astma	14 (24)	33 (58)	10 (18)
BOLEZNI		Brez astme	46 (25)	103 (56)	35 (19)
HOSPITALIZACIJA		Hospitalizacija	26 (32)	46 (56)	10 (12)
		Brez hospitalizacije	35 (22)	88 (56)	34 (22)

Pogostnosti genotipov polimorfizma rs2303067 kažejo, da sta genotipa AA in AG pogostejša pri bolnikih z AD, genotip GG pa pri kontrolni skupini. Pogostnost genotipa GG je v primerjavi s kontrolno skupino precej manjša v skupinah, kjer se bolezen začne izražati v mlajših letih. Največja razlika se kaže pri obolenosti do osmega leta starosti, kar je razvidno tudi v grafu 1. Pogostnost genotipa GG je prav tako precej manjša pri skupini bolnikov, ki imajo prizadete vsaj tri dele telesa.

Pri primerjavi pogostnosti med skupinama bolnikov z AD, ki imajo oz. nimajo pridružene astme, ni bistvenih razlik.

Pogostnosti genotipov kažejo tudi razlike pri bolnikih z AD, ki so bili hospitalizirani zaradi bolezni. Genotip AA je pogostejši pri bolnikih, ki so bili zaradi AD hospitalizirani, genotip GG pa je pogostejši pri bolnikih, ki niso bili hospitalizirani.



Graf 1: Prikaz pogostnosti posameznega genotipa po letih

Graf prikazuje pogostnosti posameznega genotipa po letih. Razvidno je, da sta frekvenci genotipov AA in AG večji v skupini bolnikov z začetkom bolezni do vključno osmih let starosti. Nasprotno je frekvanca genotipa GG večja v skupini bolnikov z začetkom bolezni po osmem letu starosti.

Preglednica VII: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs2303067 v *SPINK5* bolnikov z AD glede na izbrane kriterije.

		<i>p</i>	RO(IZ)
GENETSKI MODEL		AA+AG vs GG	AA vs GG
AD/ KONTROLE		<i>p</i> = 0,039 <i>I,65 (1,03-2,64)</i>	NS
ZAČETEK	≤ 2 leti/kontrole	NS	NS
	≤ 2 leti/ >2 leti	NS	NS
	> 2 leti/kontrole	NS	NS
	≤ 8 let/kontrole	<i>p</i> = 0,003 2,57 (1,35-4,88)	<i>p</i> = 0,025 2,50 (1,17-5,34)
	≤8 let/ >8 let	<i>p</i> = 0,031 2,17 (1,10-4,23)	NS
	>8 let/kontrole	NS	NS
	≤18 let/kontrole	<i>p</i> = 0,023 1,92 (1,12-3,28)	<i>p</i> = 0,051 1,94 (1,01-3,74)
	≤18 let/ >18 let	NS	NS
	>18 let/kontrole	NS	NS
LOKALIZACIJA	Prizadeti vsaj trije deli telesa/kontrole	<i>p</i> = 0,015 2,01 (1,16-3,48)	<i>p</i> = 0,032 2,15 (1,11-4,16)
	Prizadeti vsaj trije deli telesa/manj kot 3	NS	NS
	Manj kot 3/kontrole	NS	NS
PRIDRUŽENE BOLEZNI	Astma/kontrole	NS	NS
	Astma/brez astme	NS	NS
	Brez astme/kontrole	NS	NS
HOSPITALIZACIJA	Hospitalizacija/kontr.	<i>p</i> = 0,009 2,72 (1,29-5,74)	<i>p</i> = 0,009 3,25 (1,39-7,61)
	Hospitalizacija/ brez hospitalizacije	NS	<i>p</i> = 0,039 2,53 (1,06-6,02)
	Brez hosp./kontrole	NS	NS

RO – razmerje obetov; IZ – interval zaupanja; NS – ni statistično značilne razlike

Pri polimorfizmu alela rs2303067 se kaže statistično značilna razlika med bolniki z AD in med kontrolno skupino ($p = 0,039$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma).

Polimorfizem je pri bolnikih z AD povezan s starostjo, pri kateri pride do izražanja bolezni. Statistično značilna je razlika med kontrolno skupino in med skupino, pri kateri se je bolezen začela izražati pri 8 letih ali manj ($p = 0,003$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma). Pri primerjavi skupine, pri kateri se je bolezen začela izražati pri 8 letih ali manj s skupino, pri kateri se je bolezen začela izražati pri več kot 8 letih, je razlika statistično značilna ($p = 0,031$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma). Kontrolna skupina in skupina, pri kateri se je bolezen začela izražati pri 18 letih ali manj se prav tako statistično razlikujeta ($p = 0,023$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma).

Polimorfizem rs2303067 je pri bolnikih z AD povezan tudi z izražanjem bolezni na različnih delih telesa. Bolniki, ki imajo prizadete vsaj tri dele telesa se statistično značilno razlikujejo od kontrolne skupine ($p = 0,015$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma in $p = 0,032$ pri primerjavi genotipa AA z genotipom GG). Najbolj je izražena prizadetost izpostavljenih delov telesa – glave, vratu in dlani. Statistično značilna je razlika med kontrolno skupino in med skupino, pri kateri se klinični znaki kažejo na glavi ($p = 0,005$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma in $p = 0,011$ pri primerjavi genotipa AA z genotipom GG). Pri primerjavi skupine z izražanjem kliničnih znakov na glavi s skupino, pri kateri se klinični znaki na glavi ne izražajo, je razlika prav tako statistično značilna ($p = 0,043$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma in $p = 0,029$ pri primerjavi genotipa AA z genotipom GG). Skupina, pri kateri se klinični znaki izražajo na vratu, se statistično značilno razlikuje od kontrolne skupine ($p = 0,034$ pri primerjavi genotipa AA z genotipom GG). Statistično značilna razlika se kaže pri primerjavi skupine, pri kateri se bolezen izraža na dlaneh, s kontrolno skupino ($p = 0,033$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma).

Polimorfizem rs2303067 ni statistično značilno povezan z AD in z astmo kot pridruženo boleznijo.

Statistično značilne razlike so pri primerjavi skupine bolnikov, ki je bila zaradi bolezni hospitalizirana s kontrolno skupino ($p = 0,009$ pri primerjavi genotipa GG z združenima ostalima genotipoma) ter s skupino, ki zaradi bolezni ni bila hospitalizirana ($p = 0,039$ pri primerjavi genotipa AA z genotipom GG).

4.2.3 Mastocitna himaza 1 (CMA 1)

Preglednica VIII: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs1800875 v *CMA1* pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije

		Število (%)		
		CC	CT	TT
AD		53 (22)	119 (49)	69 (29)
KONTROLE		29 (18)	77 (47)	58 (35)
ZAČETEK	≤2 leti	19 (22)	40 (47)	26 (31)
	>2 leti	34 (22)	79 (51)	43 (27)
	≤8 let	27 (23)	53 (45)	37 (32)
	>8 let	26 (21)	65 (53)	32 (26)
	≤18 let	38 (23)	78 (48)	48 (29)
	>18 let	15 (19)	41 (53)	21 (28)
LOKALIZACIJA	Prizadeti vsaj trije deli	32 (20)	81 (51)	45 (29)
	Prizadeti manj kot trije deli	21 (25)	38 (46)	24 (29)
PRIDRUŽENE	Astma	12 (21)	20 (35)	25 (44)
BOLEZNI	Brez astme	41 (22)	99 (54)	44 (24)
HOSPITALIZACIJA	Hospitalizacija	18 (22)	35 (42)	30 (36)
	Brez hospitalizacije	35 (22)	83 (53)	39 (25)

Pri primerjavi pogostnosti genotipov med skupino bolnikov z AD in kontrolno skupino ni bistvenih razlik. Prav tako ni razlik pri primerjavi skupin z različno prizadetostjo delov telesa. Genotip TT je pogostejši pri skupini bolnikov s pridruženo astmo v primerjavi s kontrolno skupino. Na drugi strani je pogostnost genotipa TT v primerjavi s kontrolno skupino manjša v skupini, ki zaradi bolezni ni bila hospitalizirana.

Preglednica IX: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs1800875 v *CMA1* bolnikov z AD glede na izbrane kriterije.

GENETSKI MODEL		<i>p</i>	
		RO(IZ)	CC+CT vs TT
	AD/kontrole	NS	NS
PRIDRUŽENE	Astma/kontrole	NS	NS
BOLEZNI	Astma/brez astme	<i>p</i> = 0,007 0,40 (0,22-0,75)	NS
	Brez astme/kontrole	<i>p</i> = 0,025 1,74 (1,09-2,78)	NS
HOSPITALIZACIJA	Hospitalizacija/kontr.	NS	NS
	Hosp./ brez hosp.	NS	NS
	Brez hosp./kontrole	<i>p</i> = 0,052 1,66 (1,02-2,68)	NS

RO – razmerje obetov; IZ – interval zaupanja; NS – ni statistično značilne razlike

Polimorfizem alela rs1800875 ne kaže statistično značilnih razlik pri primerjavi skupine bolnikov s kontrolno skupino. Na drugi strani je pri pojavu AD povezan s hkratnim izražanjem astme. Statistično značilna je razlika med skupinama bolnikov z astmo in brez nje (*p* = 0,007 pri primerjavi genotipa TT z združenima ostalima genotipoma) ter pri primerjavi bolnikov brez astme s kontrolno skupino (*p* = 0,025 pri primerjavi genotipa TT z združenima ostalima genotipoma).

Pri primerjavi skupine, ki zaradi bolezni ni bila hospitalizirana, s kontrolno skupino, razlika ni statistično značilna (*p* = 0,052 pri primerjavi genotipa TT z združenima ostalima genotipoma), vendar razlika v pogostnosti med skupinama nakazuje trend vpliva.

Pri primerjavi ostalih genotipov ni statistično značilnih razlik med skupinami z začetkom bolezni pri različnih starostih ter med skupinami s prizadetimi različnimi deli telesa.

4.2.4 Interlevkin 18 (IL-18)

Preglednica X: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs5744247 v *IL18* pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije

		Število (%)		
		CC	CG	GG
AD		2 (1)	34 (14)	204 (85)
KONTROLE		1 (1)	23 (14)	139 (85)
ZAČETEK	≤2 leti	0 (0)	11 (13)	74 (87)
	>2 leti	2 (1)	23 (15)	130 (84)
	≤8 let	0 (0)	17 (15)	99 (85)
	>8 let	2 (1)	17 (14)	105 (85)
	≤18 let	1 (1)	22 (13)	140 (86)
	>18 let	1 (1)	12 (16)	64 (83)
LOKALIZACIJA	Prizadeti vsaj trije deli	1 (1)	23 (14)	134 (85)
	Prizadeti manj kot trije deli	1 (1)	11 (14)	70 (85)
PRIDRUŽENE	Astma	0 (0)	6 (11)	51 (89)
BOLEZNI	Brez astme	2 (1)	28 (15)	153 (84)
HOSPITALIZACIJA	Hospitalizacija	0 (0)	11 (13)	72 (87)
	Brez hospitalizacije	2 (1)	23 (15)	131 (84)

Pogostnosti genotipov ne kažejo nobenega trenda naraščanja ali upadanja v primerjavi kontrolne skupine in bolnikov z AD. Najpogostejši genotip je GG. Prav tako ni bistvenih razlik pri primerjavi pogostnosti znotraj ostalih skupin.

Preglednica XI: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs5744247 v *IL18* bolnikov z AD s kontrolami.

Genetski model	p RO(IZ)		
	CC vs CG+GG	GG vs CC+CG	CC vs GG
AD/kontrole	NS	NS	NS

RO – razmerje obetov; IZ – interval zaupanja; NS – ni statistično značilne razlike

Povezava med pogostnostjo genotipov polimorfizma rs5744247 v *IL 18* in pojavom AD ni statistično značilna.

4.2.5 Interlevkin 33 (IL-33)

Preglednica XII: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs7025417 v *IL33* pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije

		Število (%)		
		CC	CT	TT
AD		6 (2)	65 (27)	170 (71)
KONTROLE		2 (1)	49 (30)	113 (69)
ZAČETEK	≤2 leti	4 (5)	19 (22)	62 (73)
	>2 leti	2 (1)	46 (30)	108 (69)
	≤8 let	4 (3)	27 (23)	86 (74)
	>8 let	2 (1)	38 (31)	84 (68)
	≤18 let	5 (3)	45 (27)	114 (70)
	>18 let	1 (1)	20 (26)	56 (73)
LOKALIZACIJA	Prizadeti vsaj 3 deli	6 (4)	43 (27)	109 (69)
	Prizadeti manj kot 3 deli	0 (0)	22 (27)	61 (73)
PRIDRUŽENE	Astma	3 (5)	18 (32)	36 (63)
BOLEZNI	Brez astme	3 (2)	47 (25)	134 (73)
HOSPITALIZACIJA	Hospitalizacija	2 (2)	17 (21)	64 (77)
	Brez hospitalizacije	4 (3)	47 (30)	106 (67)

Pogostnosti genotipov ne kažejo nobenega trenda naraščanja ali upadanja v primerjavi kontrolne skupine in bolnikov z AD. Najpogostejši genotip je TT. Prav tako ni bistvenih razlik pri primerjavi pogostnosti znotraj ostalih skupin.

Preglednica XIII: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs7025417 v *IL33* bolnikov z AD s kontrolami.

Genetski model	p RO(IZ)		
	CC vs CT+TT	TT vs CC+CT	CC vs TT
AD/kontrole	NS	NS	NS

RO – razmerje obetov; IZ – interval zaupanja; NS – ni statistično značilne razlike

Povezava med pogostnostjo genotipov polimorfizma rs7025417 v *IL 33* in pojavom AD ni statistično značilna.

4.2.6 Hitinazi 3 podoben protein 1 (CHI3L1)

Preglednica XIV: Pogostnosti genotipov polimorfizma rs4950928 v *CHI3L1* pri bolnikih z AD glede na izbrane kriterije

		Število (%)		
		CC	CG	GG
AD		146 (60)	86 (36)	9 (4)
KONTROLE		114 (70)	45 (27)	5 (3)
ZAČETEK	≤2 leti	58 (68)	22 (26)	5 (6)
	>2 leti	88 (56)	64 (41)	4 (3)
	≤8 let	74 (63)	36 (31)	7 (6)
	>8 let	72 (58)	50 (40)	2 (2)
	≤18 let	100 (61)	56 (34)	8 (5)
	>18 let	46 (60)	30 (39)	1 (1)
LOKALIZACIJA	Prizadeti vsaj trije deli	99 (63)	51 (32)	8 (5)
	Prizadeti manj kot trije deli	47 (57)	35 (42)	1 (1)
PRIDRUŽENE	Astma	35 (61)	21 (37)	1 (2)
BOLEZNI	Brez astme	111 (58)	65 (34)	16 (8)
HOSPITALIZACIJA	Hospitalizacija	53 (64)	27 (32)	3 (4)
	Brez hospitalizacije	93 (59)	58 (37)	6 (4)

Pogostnosti genotipov polimorfizma rs4950928 kažejo, da je alel G pogostejši v skupini bolnikov z AD, pri katerih se bolezen začne izražati v starejših letih. Iz pogostnosti genotipov glede na prizadete dele telesa je razvidno, da je pogostnost genotipa CC glede na kontrolno skupino manjša v skupini s prizadetimi manj kot tremi deli telesa. Alel G se kaže kot pogostejši v skupini bolnikov z AD, ki nimajo astme.

Preglednica XV: Vrednosti p, razmerje obetov in interval zaupanja pri primerjavi pogostnosti združenih genotipov rs4950928 v *CHI3L1* bolnikov z AD glede na izbrane kriterije.

Genetski model	p		
	RO(IZ)	CG+GG vs CC	GG vs CC
AD/kontrole	NS	NS	NS
ZAČETEK			
≤2 leti/kontrole	NS	NS	NS
≤2 leti/ >2 leti	NS	NS	NS
>2 leti/kontrole	<i>p</i> = 0,020 1,76 (1,11-2,79)	NS	NS
≤8 let/kontrole	NS	NS	NS
≤8 let/ >8 let	NS	NS	NS
>8 let/kontrole	<i>p</i> = 0,048 1,65(1,01-2,68)	NS	NS
≤18 let/kontrole	NS	NS	NS
≤18 let/ >18 let	NS	NS	NS
>18 let/kontrole	NS	NS	NS
LOKALIZACIJA	Prizadeti vsaj trije deli/kontrole	NS	NS
	Prizadeti vsaj trije deli/manj kot trije deli	NS	NS
	Prizadeti manj kot trije deli /kontrole	<i>p</i> = 0,049 1,75 (1,01-3,02)	NS
PRIDRUŽENE BOLEZNI	Astma/kontrole	NS	NS
	Astma/brez astme	NS	NS
	Brez astme/kontrole	<i>p</i> = 0,027 1,66 (1,07-2,58)	<i>p</i> = 0,022 3,29 (1,16-9,28)

RO – razmerje obetov; IZ – interval zaupanja; NS – ni statistično značilne razlike

Polimorfizem alela rs4950928 je pri bolnikih z AD povezan s starostjo, pri kateri pride do izražanja bolezni. Statistično značilna je razlika med kontrolno skupino ter skupino, pri kateri se je bolezen začela izražati pri več kot dveh letih ($p = 0,020$ pri primerjavi genotipa CC z združenima ostalima genotipoma). Prav tako je statistično značilna razlika med

kontrolno skupino ter skupino, pri kateri se je bolezen začela izražati pri več kot osmih letih ($p = 0,048$ pri primerjavi genotipa CC z združenima ostalima genotipoma).

Polimorfizem alela rs4950928 je pri bolnikih z AD prav tako povezan z izražanjem bolezni na različnih delih telesa. Pri primerjavi kontrolne skupine s skupino bolnikov, ki imajo prizadete manj kot tri dele telesa, obstaja statistično značilna razlika ($p = 0,049$ pri primerjavi genotipa CC z združenima ostalima genotipoma).

Statistično značilna je tudi razlika pri primerjavi kontrolne skupine s skupino bolnikov, ki nima astme ($p = 0,027$ pri primerjavi genotipa CC z združenima ostalima genotipoma in $p = 0,022$ pri primerjavi genotipa CC z genotipom GG).

5 RAZPRAVA

V okviru raziskovalne naloge smo analizirali pet izbranih polimorfizmov v petih različnih genih. Ugotavljali smo njihovo povezavo s pojavom AD v različnih življenjskih obdobjih, s prizadetimi različnimi deli telesa, s hospitalizacijo zaradi bolezni ali s pridruženo astmo. Izbrane SNP-je smo določili 241 bolnikom z diagnozo AD ter natančno opredeljenimi kliničnimi podatki. Polimorfizme smo določili tudi 164 zdravim posameznikom (kontrolam).

Polimorfizma v *SPINK5* in v *CMA1* sta bila izbrana na podlagi predhodnih študij. Polimorfizmi v *IL18*, *IL33* in *CHI3L1* pa so bili izbrani predvsem na podlagi študij v povezavi z astmo in alergijo (atopijskim statusom). Njihova vpletenost v imunsko dogajanje je povezana tudi z imunskim dogajanjem pri AD.

Za potrditev vzročnih bolezenskih genov pri AD so potrebne številne potrditvene študije, saj gre pri bolezni za prepletanje kompleksnih procesov, ki vplivajo na pravilno delovanje kožne bariere in imunskega odziva, pri čemer imajo pomembno vlogo tudi okoljski dejavniki.

5.1 HARDY-WEINBERGOVO RAVNOTEŽJE

Porazdeljenost vseh izbranih polimorfizmov v skladu s HWE kaže, da je porazdelitev skladna s pričakovano. To na eni strani kaže na odsotnost mutacij, nenaključnega parjenja, migracij in selekcije. Na drugi strani je to tudi potrditev, da smo za analizo izbrali ustrezni vzorec iz populacije.

5.2 FREKVENCE GENOTIPOV

Frekvence genotipov v naši študiji so za polimorfizme rs2303067 v *SPINK5*, rs1800875 v *CMA1*, rs5744247 v *IL 18*, in rs4950928 v *CHI3L1* primerljive s frekvencami v bazi podatkov Ensembl, v katero so vključeni podatki iz populacije EUR. Frekvence za polimorfizem rs7025417 v *IL33* se nekoliko razlikujejo. Vzrok za to so lahko razlike v starosti, premajhno število analiziranih bolnikov ali razlike v drugih lastnostih med izbranima populacijskima vzorcema.

5.3 IZBRANI POLIMORFIZMI IN NJIHOVA POVEZANOST Z AD

5.3.1 Inhibitor serinskih proteaz (SPINK 5)

SPINK 5 ima kot inhibitor serinskih proteaz pomembno vlogo pri obnavljanju kože. Z njihovim zaviranjem uravnava luščenje kože ter njen obnavljanje. Njegovo nepravilno izražanje ima za posledico prekomerno delovanje serinskih proteaz, kar vpliva na celovitost kožne pregrade ter na olajšan prehod alergenov v globlje plasti kože (9).

Nishio in sod. (2003) so odkrili povezavo polimorfizma rs2303067 v *SPINK5* s pojavom AD v britanski in v japonski populaciji (37). To so potrdili tudi rezultati našega raziskovalnega dela s statistično značilno razliko med skupino bolnikov z AD in kontrolno skupino.

Kabesch in sod. (2004) so ugotovili, da alel A predstavlja tveganje za pojav AD (38). To potrjujejo tudi rezultati našega raziskovalnega dela, saj so največje statistične razlike ravno pri primerjavi genotipa GG z združenima genotipoma AA in AG ter genotipa AA z genotipom GG. Alel G se tako kaže kot zaščitni.

Rezultati različnih študij polimorfizma rs2303067 so si sicer precej nasprotujoči, saj so Kabesch in sod. (2004) povezavo našli le med skupino bolnikov z AD, ki je imela hkrati tudi astmo, ne pa s skupino bolnikov le z AD (38). Naši rezultati na drugi strani ne kažejo povezave rs2303067 s skupino bolnikov, ki imajo poleg AD tudi astmo, ampak samo z bolniki, ki imajo le AD.

Študije rs2303067 so se večinoma izvajale izključno na otroški populaciji, saj se AD začne izražati kar pri 60 % otrok v času prvih dveh let po rojstvu. Do 11. leta starosti se pri 65 % obolelih že pojavi remisija (7). V naši študiji smo namenoma zajeli skupino bolnikov z večjim starostnim razponom. Vključili smo tudi bolnike z začetkom izražanja AD v poznejših letih, saj nas je zanimala ravno povezava z začetkom pojava AD. Ugotovili smo, da je polimorfizem povezan le s pojavom AD v zgodnejših letih življenja, predvsem z začetkom izražanja do osmega leta starosti.

Kosunoki in sod. (2005) so skupini japonskih otrok z AD določili težo bolezni (blaga, zmerna, huda, zelo huda) glede na smernice, ki jih je postavila študijska skupina, ustanovljena s strani japonskega Ministrstva za zdravje, delo in socialno skrb. Ugotovili so, da je polimorfizem rs2303067 povezan s težjimi oblikami bolezni pri otrocih, mlajšimi od 10 let (39). Sama teža bolezni v naši študiji ni bila opredeljena po nobenem kriteriju.

Sklepamo lahko, da so bolniki, pri katerih se je bolezen začela izražati v zgodnejših letih, zaradi bolezni dlje in zato bolj prizadeti. Prav tako so naši rezultati pokazali povezavo polimorfizma s hospitalizacijo zaradi bolezni ter s prizadetim večimi deli telesa, kar bi lahko nakazovalo na težjo obliko bolezni.

Pomen okvarjene celovitosti kožne pregrade za pojav AD je bil poudarjen pri odkritju mutacij filagrina. V različnih študijah so različne mutacije *FLG* povezali s pojavom AD. Statistično močne so bile predvsem povezave z zgodnjim pojavom AD ter povezave z AD, kateremu je pridružena astma (5, 6). Glede na rezultate študij mutacij *FLG* ter naše rezultate polimorfizma *SPINK5* lahko sklepamo, da so okvare kožne pregrade povezane z olajšanim vstopom alergenov in posledično s hitro močno reakcijo imunskega sistema nanje. Polimorfizmi proteinov kožne pregrade so tako povezani z zgodnjim pojavom AD ter s težjo obliko bolezni. Različne študije na miših z izbitim genom za filagrin potrjujejo, da pride do alergijske senzibilizacije zaradi poškodovane kožne pregrade. S tem se sprožita tako lokalni kot sistemski imunski odgovor (6).

Želja in cilj raziskovalcev za prihodnost je, da bi na podlagi genotipizacije v *SPINK5* lahko napovedali nadaljnji razvoj in težo bolezni. S preventivnimi ukrepi bi tako lahko poskušali omiliti potek bolezni (38). Največji izziv je znanje o genetskih predispozicijah prenesti na področje večjega razumevanja molekularnih mehanizmov v patogenezi AD. Cilj tega je razvoj novih tarčnih terapij. V povezavi s tem se v prihodnosti poudarja tudi pomen farmakogenetike, ki bi lahko z ustrezno izbiro zdravljenja na podlagi genotipizacije predstavljal pomemben del preventive zapletov in slabšanja bolezni. (40).

5.3.2 Mastocitna himaza 1 (CMA 1)

Mastocitna himaza 1 je serinska proteaza s kimotriptično aktivnostjo, ki ima pomembno vlogo v procesu vnetja. Deluje provnetno v sodelovanju s histaminom in triptazo ter pospeši nastajanje različnih vnetnih mediatorjev, med njimi IL-1 β , sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa ter poveča prepustnost žil v koži (8, 12).

Weidinger in sod. (2005) so v okviru študije na nemški populaciji odraslih našli močno povezavo polimorfizma rs1800875 z AD (13). Naši rezultati ne kažejo povezave polimorfizma s samim AD, ugotovili smo povezavo med rs1800875 in skupino bolnikov, ki ima AD pridruženo še astmo. Rezultati Weidingerja in sod. (2005) na drugi strani ne kažejo povezave med polimorfizmom in astmo. Razlika med našimi rezultati ter med

rezultati Weidingerja in sod. (2005) lahko izhaja iz različno oblikovanih skupin analiziranih bolnikov. Naši bolniki so predstavniki vseh starostnih skupin, medtem ko so Weidinger in sod. (2005) analizirali le bolnike med 25. in 74. letom starosti, začetek izražanja bolezni pa ni podan (13).

Chien in sod. (2007) v svojem članku navajajo, da so na Japonskem tri različne raziskovalne skupine analizirale izbrani polimorfizem. Od tega sta dve skupini (analizirana ena skupina odraslih in ena skupina otrok) potrdili povezavo rs1800875 s pojavom AD, tretja pa ne (analizirana skupina otrok in mladih odraslih) (12).

Britanska raziskovalna skupina za razliko od nas ni našla statistično značilne povezave med polimorfizmom in skupino odraslih z astmo in z AD (12). Razlika je zopet lahko posledica starostno različno oblikovanih skupin analiziranih bolnikov.

V nobenem od člankov ni bila analizirana statistična povezava med izbranim polimorfizmom in hospitalizacijo zaradi AD. Naši rezultati sicer niso statistično značilni, vendar frekvence genotipov nakazujejo trend, da je alel C zaščitni, alel T pa rizični.

Raziskave polimorfizmov v *CMA1* se zaradi narave proteina, ki sodeluje v Th-2 imunskega odgovoru, povezujejo s koncentracijami celotnih in specifičnih IgE. V okviru našega raziskovalnega dela teh podatkov nismo imeli podanih za vse bolnike, zato te povezave nismo mogli vrednotiti. Pred tem so to povezavo vrednotile raziskovalne skupine, ki so prišle do nasprotujočih si rezultatov. Mao in sod. (1998) so našli povezavo polimorfizma rs1800875 z AD pri bolnikih z nizko koncentracijo celotnih IgE, Tanaka in sod. (1999) so našli povezavo med visokimi koncentracijami celotnih IgE in skupino bolnikov, ki ima AD in astmo (13). Rezultati raziskovalne skupine Weidingerja in sod. (2005) ne kažejo povezave polimorfizma s koncentracijo IgE (13).

5.3.3 Interlevkin 18 (IL-18)

IL-18 spodbuja limfocite T in celice naravne ubijalke. V imunskega odziva ima dve nasprotujoči si vlogi, saj po eni sodeluje v Th-1 posredovanem imunskega odgovora in v skladu s tem za zavira nastanek IgE. Po drugi strani so na živalskih modelih ugotovili, da lahko spodbuja Th-2 imunski odgovor preko spodbujanja nastanka IL-4 in IL-13. Ravno njegova vloga v imunskega odziva je bila ključna za vključitev polimorfizma v študijo (15).

V okviru našega raziskovalnega dela nismo našli povezave med polimorfizmom rs5744247 in pojavom AD. Polimorfizme v *IL18* so sicer Kruse in sod. (2003) predhodno že povezali s pojavom AD, s povečanimi koncentracijami celotnih IgE in s specifično senzibilizacijo (16). Kasneje so Novak in sod. (2005) potrdili povezavo z AD in z višjimi koncentracijami celotnih IgE (15). Harada in sod. (2009) so odkrili močno povezavo polimorfizma rs5744247 s stopnjo izražanja astme, povezavo s povišanimi serumskimi koncentracijami IL-18 ter s povečano transkripcijo *IL18* v mastocithih, stimuliranimi z lipopolisaharidom (25).

Naši rezultati so lahko s predhodnimi študijami neskladni zaradi različno oblikovanih analiziranih skupin bolnikov. V ostalih študijah začetek izražanja AD ni podan, analizirane pa so starostno zelo homogene skupine. Možni vzroki za razlike so tudi drugačno genetsko ozadje analiziranih bolnikov, premajhno število analiziranih oseb, lahko pa polimorfizem res ni povezan s pojavom AD.

5.3.4 Interlevkin 33 (IL-33)

IL-33 je pomemben v prirojenem imunskejem odzivu, kjer spodbuja Th-2 imunski odgovor in s tem tvorbo IgE (17, 26). Veže se na receptor ST2 celic ILC2, ki tako pri miših kot pri ljudeh z izločanjem IL-5 in IL-33 spodbujajo kožno vnetje. Salimi in sod. (2013) so pokazali, da je celic ILC2 značilno več v vzorcih biopsij kože bolnikov z AD v primerjavi z zdravimi kontrolami. IL-33 so nato poleg IL-25 in TSLP identificirali kot glavni signal za njihovo aktivacijo. To IL-33 postavlja v vlogo pomembnega modulatorja vnetja pri AD (28).

Pomen polimorfizma rs7025417 v mehanizmih imunskega odziva pri vnetnih kožnih boleznih so pokazali tudi Meephansan in sod. (2013) (41). V naši raziskavi povezave med analiziranim polimorfizmom in AD nismo našli, so pa Tamagawa-Mineoka in sod. (2014) našli povezavo med povišanimi serumskimi koncentracijami IL-33 in AD na japonski populaciji (42).

V literaturi se rs7025417 pojavlja predvsem v povezavi z astmo, saj so Prefontaine in sod. (2009) dokazali povezavo polimorfizma z astmo (43). Ker je astma lahko pridružena tudi AD, nas je zanimala povezava polimorfizma s pojavom AD, vendar le-te nismo našli.

Naši rezultati so lahko s predhodnimi študijami neskladni zaradi različno oblikovanih analiziranih skupin bolnikov. Frekvence genotipov skupine analiziranih bolnikov so se

razlikovale od frekvenc v podatkovni bazi Ensembl, kar je lahko vzrok za neujemanje rezultatov. Poleg tega je bila ena od študij izvedena na japonski populaciji, kjer so tudi velike razlike v pogostnosti genotipov glede na našo skupino (CC: 36 %, CT: 36 %, TT: 28 %) (10).

5.3.5 Hitinazi 3 podoben protein 1 (CHI3L1)

CHI3L1 je hitinazi 3 podoben protein 1 brez encimskih lastnosti. Deluje na epitelijske celice dihalnih poti in je v njih mediator vnetja. Domnevajo, da sodeluje tudi pri preoblikovanju tkiva (18, 19).

Polimorfizem rs4950928 je bil predhodno analiziran predvsem v okviru študij astme, šele kasneje so ga začeli povezovati tudi z atopijo. Naši rezultati v splošnem ne kažejo povezave polimorfizma z AD. Tudi Ratchke in sod. (2009) niso našli povezave med polimorfizmom rs4950928 in atopijo. Ista raziskovalna skupina je našla povezavo med polimorfizmom rs4950928 in alergijsko astmo, kjer je bila le-ta definirana kot astma z zvišanimi specifičnimi IgE (18).

V okviru našega raziskovalnega dela nismo našli neposredne povezave med polimorfizmom in astmo. Ravno nasprotno – ugotovili smo, da se skupina bolnikov, ki ima AD in hkrati nima astme, statistično značilno razlikuje od kontrolne skupine.

Ratchke in sod. (2009) so študijo izvajali samo na odraslih, v našo študijo pa so bili vključeni tudi otroci. Zaradi manjkajočih podatkov o začetku izražanja bolezni v skupini, ki so jo analizirali Ratchke in sod. (2009), težko sklepamo o vzrokih za razlike med rezultati (18).

Naši rezultati kažejo, da je polimorfizem rs4950928 povezan s pojavom AD v pozrem otroštvu, ne pa z zgodnjim pojavom bolezni. Prav tako je polimorfizem povezan z manj prizadetimi deli telesa. Pri tem se alel C kaže kot zaščitni, alel G pa kot rizični. Razlike med frekvencami posameznih genotipov pri skupini bolnikov z AD in kontrolno skupino nakazujejo trend, da je alel C povezan z manjšo potrebo po hospitalizaciji zaradi AD. Teže bolezni po točkovjanju sicer nismo vrednotili, vendar naši rezultati kot prvi nakazujejo, da je polimorfizem rs4950928 povezan z lažjo obliko bolezni v smislu manj prizadetih delov telesa ter z začetkom izražanja bolezni v poznejših letih. Za potrditev rezultatov bi bilo v prihodnosti smiselno analizo ponoviti še na skupini bolnikov z začetkom izražanja bolezni po 18. letu.

Pri vsem tem ne smemo pozabiti, da ima za razvoj bolezni pomembno vlogo tudi okolje, kar. To je razvidno v primeru diabetesa tipa 2, ki se prav tako pojavi v poznejšem življenjem obdobju. V osnovi je prisotna genetska predispozicija, sam pojav in razvoj bolezni pa je nato močno odvisen od okolja. Do sedaj so z diabetesom tipa 2 povezali polimorfizme v *CAPN10* (*kalpain 10*, angl. *calpain 10*) in *HNF4A* (*hepatocitni nuklearni faktor 4 alfa*, angl. *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) (32). Razvoj bolezni je nato odvisen od življenjskega sloga posameznika. Velik pomen imata pri tem gibanje in prehrana (31, 32). Tu ne smemo zanemariti dejstva, da genetsko ozadje pri diabetesu tipa 2 predstavljajo polimorfizmi v več različnih genih. Monogenske oblike diabetesa so zelo redke – gre za neonatalni diabetes mellitus (NDM) in za diabetes, ki je sicer značilen za mlade, vendar se izrazi v odrasli dobi (angl. *maturity-onset diabetes of the young* – MODY) (31).

Če povzamemo – rezultati naše raziskave kažejo na genetske predispozicije, povezane z dvema različnima oblikama AD. Pri prvi obliki gre za povezavo polimorfizma rs2303067 v *SPINK5* z zgodnjim izražanjem bolezni, s prizadetimi več deli telesa ter s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD. Okvara v kožni pregradi ima tako veliko vlogo pri razvoju AD – ta se namreč razvije takoj in v težji obliki. Olajšan vstop alergenov in pogostejše kožne okužbe ves čas predstavljajo dražljaje, katerih posledice bolnikom močno otežujejo življenje.

Druga oblika je povezana s polimorfizmom rs4950928 v *CHI3L1*. AD se začne izražati kasneje in prizadetih je manj delov telesa. Kljub temu da v tem primeru bolezen poteka v blažji obliki, je za bolnike neprijetna in predstavlja dodatno breme za zdravstveno blagajno. Okvare v mehanizmih imunskega odziva se tako izrazijo kasneje. Predvidevamo, da je za to potreben določen dejavnik ali kombinacija dejavnikov v okolju, ki sprožijo imunski odgovor, ki vodi do razvoja AD.

AD bi glede na genetsko ozadje lahko primerjali s psoriazo. Pri obeh boleznih so različne genetske predispozicije povezane z različnim začetkom izražanja bolezni. Pri psoriazi je pri bolnih z zgodnjim izražanjem bolezni močan faktor človeški levkocitni antigen razreda 1 (HLA-Cw6), medtem ko pri kasnejšem izražanju ni tako izrazit. Za obliko, ki se začne izražati kasneje, je značilno, da bolniki že predhodno ali sočasno zbolijo za diabetesom tipa 2, srčnožilnimi boleznimi, hipertigliceridemijo ali se spopadajo z debelostjo (30). To kaže na pomembne vplive okolja, ki lahko vplivajo na začetek izražanja bolezni, kot to predvidevamo pri AD.

Glede na to bi bilo v prihodnosti smiselno dodatno analizirati genetsko ozadje oblike AD, ki se izrazi kasneje, saj vemo, da je precej manj pogosta kot oblika, ki se izrazi zgodaj. Pri tem bi bilo pomembno zbrati čim več informacij o okoljskih dejavnikih, ki bi lahko vplivali na pojav AD.

6 SKLEPI

Ob začetku dela smo postavili delovne hipoteze, ki jih ovrednotimo in jih na osnovi pridobljenih podatkov v naši nalogi potrdimo ali zavrnemo:

1. Rs2303067 v *SPINK5* je povezan s pojavom AD in z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Povezan je z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa, ni pa povezan z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Povezan je s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
2. Rs1800875 v *CMA1* ni povezan s pojavom AD in ni povezan z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Ni povezan z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa, je pa povezan z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Ni povezan s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
3. Rs5744247 v *IL18* ni povezan s pojavom AD in ni povezan z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Ni povezan z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa in ni povezan z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Ni povezan s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
4. Rs7025417 v *IL33* ni povezan s pojavom AD in ni povezan z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Ni povezan z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa ter ni povezan z obliko bolezni, kateri je pridružena astma. Ni povezan s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.
5. Rs4950928 v *CHI3L1* ni povezan s pojavom AD in ni povezan z začetkom izražanja bolezni v zgodnjem obdobju življenja. Povezan je z začetkom izražanja bolezni v kasnejših letih. Ni povezan z izražanjem kliničnih znakov na treh ali več delih telesa, ampak z izražanjem na manj kot treh delih telesa. Ni povezan z obliko bolezni, kateri je pridružena astma, ampak z obliko, kateri astma ni pridružena. Ni povezan s potrebo po hospitalizaciji zaradi AD.

7 LITERATURA

1. Flohr C, Mann J: New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy* 2014; 69: 3-16.
2. Darsow U, Raap U, Ständer S: Itch: mechanisms and treatment. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK200925/> (Dostopano maj 2014).
3. Margolis DJ, Apter AJ, Gupta J, Hoffstad O, Papadopoulos M, Campbell LE, Sandilands A, McLean I, Rebbeck TR, Mitra N: The persistence of atopic dermatitis and filaggrin (FLG) mutations in a US longitudinal cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2012. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.008> (Dostopano maj 2014).
4. Rijavec M, Rupnik H: Vloga filagrina in kožne pregrade pri atopijskem dermatitisu. *Pljučnik* 2014; marec: 6.
5. Bieber T: Mechanisms of disease Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2008; 358: 1483-1494.
6. Boguniewicz M, Leung DYM: Atopic Dermatitis: A Disease of Altered Skin Barrier and Immune Dysregulation. *Immunol Rev.* 2011; 242: 233–246.
7. Bieber T: Atopic dermatitis 2.0: from the clinical phenotype to the molecular taxonomy and stratified medicine. *Allergy* 2012; 67: 1475–1482.
8. Kiyohara C, Tanaka K, Miyake Y: Genetic Susceptibility to Atopic Dermatitis. *Allergology International* 2008. URL: www.jsaweb.jp. (Dostopano april 2014).
9. Genes: *SPINK5*. URL: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SPINK5> (Dostopano maj 2014).
10. Ensembl. URL: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens (Dostopano april, maj, junij, julij 2014).
11. CMA1. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=1215
(Dostopano maj 2014).

12. Chien YH, Hwu WL, Chiang BL: The Genetics of Atopic Dermatitis. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2007; 33: 178-190.
13. Weidinger S, Rümmler L, Klopp N, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Fischer G, Holle R, Gauger A, Schäfer T, Jakob T, Ollert M, Behrendt H, Wichmann HE, Ring J, Illig T: Association study of mast cell chymase polymorphisms with atopy. *Allergy* 2005; 60: 1256-1261.
14. Jin C, Ma H, Lin Y, Wang J, Xiang M: Association between SNP rs1800875, serum chymase and immunoglobulin E levels in patients with coronary heart disease. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2011; 12: 660-667.
15. Novak N, Kruse S, Potreck J, Maintz L, MD, Jenneck C, Weidinger S, MD, Fimmers R, Bieber T: Single nucleotide polymorphisms of the IL18 gene are associated with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 828-833.
16. Kruse S, Kuehr J, Moseler M, Kopp MV, Kurz T, Deichmann KA, Foster PS, Mattes J: Polymorphisms in the *IL18* gene are associated with specific sensitization to common allergens and allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 117-122.
17. Brandt EB, Sivaprasad U: Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2011; 2: 3. URL: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9899.1000110> (Dostopano junij 2014).
18. Rathcke CN, Holmkvist J, Husmoen LLN, Hansen T, Pedersen O, Vestergaard H, Linneberg A: Association of Polymorphisms of the CHI3L1 Gene with Asthma and Atopy: A Populations-Based Study of 6514 Danish Adults. *PLoS ONE* 2009. URL: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0006106> (Dostopano julij 2014).
19. Gene cards. URL: <http://www.genecards.org/> (Dostopano maj, junij, julij 2014).
20. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6: 986-999.

21. Valasek MA, Repa JJ: The power of real-time PCR. *Advan in Physiol Edu* 2005; 29: 151-159.
22. Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J: 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acid Research* 2000; 28: 655-661
23. Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System: Allelic discrimination Getting Started Guide. Applied Biosystems 2010: 2-16.
24. Lettre G, Lange C, Hirschhorn JN: Genetic model testing and statistical power in population-based association studies of quantitative traits. *Genet Epidemiol.* 2007; 31: 358-362.
25. Harada M, Obara K, Hirota T, Yoshimoto T, Hitomi Y, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Taniguchi M, Higashi N, Fukutomi Y, Nakanishi K, Nakamura Y, Tamari M: A Functional Polymorphism in IL-18 Is Associated with Severity of Bronchial Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 1048-1055.
26. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB: Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews Immunology* 2010; 10: 103-110.
27. Amvive®. URL:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm086009.pdf> (Dostopano avgust 2014).
28. Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiaik D, Wang X, Huang LC, Johnson D, Scanlon ST, McKenzie ANJ, Fallon PG, Ogg GS: A role for IL-25 and IL-33–driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* 2013; 210: 2939-2950.
29. Chi square test. URL: <http://math.hws.edu/javamath/ryan/ChiSquare.html> (Dostopano april 2014).

30. Petrou I: Psoriasis in seniors: Late-onset disease demonstrates different genetic factors than early-onset. URL: <http://dermatologytimes.modernmedicine.com/dermatology-times/news/tags/dermatology/psoriasis-seniors-late-onset-disease-demonstrates-different?page=full> (Dostopano september 2014).
31. Monogenic Forms of Diabetes: Neonatal Diabetes Mellitus and Maturity-onset Diabetes of the Young. URL:
http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/mody/Monogenic_Diabetes_508.pdf
(Dostopano september 2014).
32. The Genetic Landscape of Diabetes. URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1665/> (Dostopano september 2014).
33. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. QiaGen 2012: 5-24; 26-29.
34. Li M, Li C: Assessing departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the presence of disease association. Genet Epidemiol. 2008; 32: 589-599.
35. Stare J: Relativno tveganje in razmerje obetov. Zdravniški vestnik 1998; 67: 297-299.
36. NCBI. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Dostopano april 2014).
37. Nishio Y, Noguchi E, Shibusaki M, Kamioka M, Ichikawa E, Ichikawa K, Umebayashi Y, Otsuka F, Arinami T: Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. Genes and Immunity 2003; 4: 515–517.
38. Kabesch M, Carr D, Weilandw SK , von Mutius E: Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample. Clin Exp Allergy 2004; 34: 340–345.
39. Kusunoki T, Okafuji I, Yoshioka T, Saito M, Nishikomori R, Heike T, Sugai M, Shimizu A, Nakahata T: SPINK5 polymorphism is associated with disease severity and

food allergy in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 636-638.

40. Brown SJ, Irwin McLean WHI: Eczema Genetics: Current State of Knowledge and Future Goals. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129: 543–552.

41. Meephansan J: Expression of IL-33 in the epidermis: The mechanism of induction by IL-17. *Journal of Dermatological Science* 2013; 71: 107-114.

42. Tamagawa-Mineoka R, Okuzawa Y, Masuda K, Katoh N: Increased serum levels of interleukin 33 in patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2014; 70: 882-888.

43. Préfontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko A J, Lemière C, Martin JG, Hamid Q: Increased expressin of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth misle. *The Journal of Immunology* 2009; 180: 2443-2449.

44. Rupnik H, Rijavec M, Korošec P: Filaggrin loss-of-function mutations are not associated with atopic dermatitis that develops in late childhood or adulthood. *Br J Dermatol.* 2014: doi: 10.1111/bjd.13477. [Epub ahead of print].

8 VIRI SLIK

Slika 1: Atopic Dermatitis Picture. URL:

<http://hardinmd.lib.uiowa.edu/dermnet/dermatitisatopic4.html> (Dostopano september 2014).

Slika 2: Atopic Dermatitis (Atopic Eczema). URL: <http://doctorv.ca/medical-conditions/eczema-and-dry-skin/atopic-dermatitis/> (Dostopano september 2014).

Slika 3: Basic Anatomy of the Skin. URL: <http://www.naturallyhealthyskin.org/anatomy-of-the-skin/basic-anatomy-of-the-skin-epidermis-dermis-stratum-corneum-fibroblasts/> (Dostopano september 2014).

Slika 4: vir 17

Slika 5: vir 10

Slika 6: vir 10

Slika 7: vir 15

Slika 8: vir 10

Slika 9: vir 10

Slika 10: vir 10

Slika 11: ABI 7500/7500 Fast PCR. URL: <http://www.gzbyco.com/msg.php?id=18> (Dostopano september 2014).

Slika 12: vir 33

Slika 13: vir 33

Slika 14: vir 10