

**Vpliv genov oksidativnega stresa na odziv na anti-TNF terapijo  
pri bolnikih s Crohnovo boleznijo**

**Raziskovalno področje: interdisciplinarno – biologija, zdravstvo (drugo področje)**

**Raziskovalna naloga**

**Avtor:** Aleks Brumec

**Mentor:** mag. Helena Lonjak, dr. Uroš Potočnik, dr. Katja Repnik

**Šola:** Prva gimnazija Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo  
Univerze v Mariboru, Medicinska fakulteta Univerze v Mariboru

**Maribor, 2020**

## KAZALO

POVZETEK .....	1
ABSTRACT .....	1
ZAHVALA.....	2
1 UVOD.....	3
1.1 Raziskovalno vprašanje.....	4
1.2 Hipoteze .....	4
2 TEORETIČNI DEL .....	5
2.1 Kronična vnetna črevesna bolezen.....	5
2.1.1 Crohnova bolezen.....	5
2.2 Geni .....	6
2.2.1 Postopek sinteze genskega produkta .....	7
2.2.2 Regulacija genske ekspresije .....	8
2.2.3 Dedovanje genov .....	8
2.2.4 Mutacije.....	9
2.2.5 Polimorfizmi posameznega nukleotida .....	10
2.3 Genetske bolezni .....	10
2.4 Oksidativni stres.....	11
2.4.1 Reaktivne kisikove spojine in prosti radikali .....	12
2.4.1.1 Vpliv oksidativnega stresa na Crohnovo boleznijo .....	13
2.4.2 <i>CAT</i> gen.....	14
2.4.2.1 Katalaza.....	14
2.4.2.1.1 rs1001179.....	14
2.4.3 <i>SOD2</i> gen.....	15
2.4.3.1 Superoksid dismutaza 2 .....	15
2.4.3.1.1 rs4880.....	15

2.4.3.2	Vpliv ekspresije gena <i>SOD2</i> na TNF $\alpha$ .....	15
2.5	Anti -TNF terapija in adalimumab (Humira®) .....	15
3	PRAKTIČNI DEL .....	16
3.1	Metode dela in material.....	16
3.1.1	Pregled literature in izbor genov .....	16
3.1.2	Bolniki .....	17
3.1.3	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov z orodjem Primer3 .....	18
3.1.4	Genotipizacija in merjenje izražanja genov.....	18
3.1.5	Merjenje izražanja genov – Real-time PCR .....	22
3.1.6	Statistična obdelava podatkov .....	23
4	REZULTATI.....	24
4.1	Vpliv genotipov izbranih SNP-jev na odziv na anti-TNF terapijo.....	24
4.1.1	SNP rs4880 .....	25
4.1.2	SNP rs1001179 .....	26
4.2	Vpliv izražanje genov na odgovor na anti-TNF terapijo.....	32
4.2.1	Izražanje genov glede na IBDQ vrednost pred zdravljenjem.....	32
4.2.1.1	Izražanje <i>SOD2</i> gena.....	32
4.2.1.2	Izražanje <i>CAT</i> gena .....	32
4.2.2	Izražanje genov glede na odziv na anti-TNF terapijo v 4. tednu.....	33
4.2.2.1	Izražanje <i>SOD2</i> gena.....	33
4.2.2.2	Izražanje <i>CAT</i> gena .....	34
4.2.3	Izražanje genov glede na odziv na anti-TNF terapijo v 30. tednu.....	34
4.2.3.1	Gen <i>SOD2</i> .....	34
4.2.3.2	Gen <i>CAT</i> .....	35
5	RAZPRAVA .....	36
5.1	SNP rs4880.....	36

5.2	SNP rs1001179.....	36
5.3	Gen <i>SOD2</i> .....	37
5.4	Gen <i>CAT</i> .....	37
6	DRUŽBENA ODGOVORNOST .....	38
7	ZAKLJUČEK .....	39
8	VIRI IN LITERATURA .....	40

## KAZALO TABEL

Tabela 1:	Primer Punnetovega kvadrata za dedovanje neke lastnosti.....	11
Tabela 2:	Izbrana gena in pripadajoča SNP-ja. ....	17
Tabela 3:	Sekvence začetnih oligonukleotidi za merjenje izražanja izbranih genov ter genotipizacijo SNP-ja.....	18
Tabela 4:	Porazdelitev frekvenc genotipov in alelov izbranih SNP-jev pri analiziranih bolnikih s CD.....	24
Tabela 5:	Število odzivnikov in neodzivnikov glede na genotip SNP-ja rs4880 po tednih ter statistična analiza.....	27
Tabela 6:	Število odzivnikov in neodzivnikom glede na genotip SNP-ja rs1001179 po tednih ter statistična analiza. ....	27
Tabela 7:	Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs4880.....	28
Tabela 8:	Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1001179.....	28
Tabela 9:	Mediana ekspresije genov pred terapijo.....	32
Tabela 10:	Mediana ekspresije obeh genov glede na IBDQ vrednost. ....	33
Tabela 11:	Mediana ekspresij genov v 4. in 30. tednu po pričetku anti-TNF terapije. ....	35

## **KAZALO SLIK**

Slika 1: Primer dedovanja alela za določene bolezni .....	9
Slika 2: Mešanica krvi in pufra PBS nanešenega na Ficoll.....	19
Slika 3: Krvni vzorec, ki je po centrifugiranju razdeljen na štiri faze.....	19

## **KAZALO GRAFOV**

Graf 1: Delež genotipov za vsak SNP .....	25
Graf 2: Vrednost IBDQ za SNP rs4880. ....	29
Graf 3: Vrednost delta IBDQ za SNP rs4880. ....	29
Graf 4: Vrednost deltaIBDQ v 30. tednu po zdravljenju glede na genotip SNP-ja rs4880. ....	30
Graf 5: Vrednost deltaIBDQ v 4. tednu po zdravljenju glede na alel SNP-ja rs4880.....	30
Graf 6: Vrednost IBDQ za SNP rs1001179. ....	31
Graf 7: Vrednost delta IBDQ za SNP rs1001179. ....	31
Graf 8: Izražanje gena SOD2 glede na vrednost IBDQ pred zdravljenjem. ....	33
Graf 9: Izražanje gena CAT glede na odziv oziroma neodziv na anti-TNF terapijo po 4 tednih zdravljenja. ....	34
Graf 10: Primerjava ekspresije genov pri neodzivnikih na anti-TNF terapijo v 4. in 30. tednu po pričetku zdravljenja. ....	35

## **POVZETEK**

Oksidativni stres (OS) je definiran kot motnja v ravnovesju med produkcijo reaktivnih kisikovih spojin (RKS) in zmožnostjo obrambe telesa proti njim z antioksidanti. RKS lahko v telesu povzročijo veliko škode, saj lahko povzročijo nastanek mutacij v molekulah DNA ter posledično vplivajo na nastanek kompleksnih avtoimunskih vnetnih bolezni. V zadnjih letih se za zdravljenje teh bolezni uporablja biološka anti-TNF terapija, pri kateri z inhibitorji citokina TNF stremimo k zmanjšanju vnetnega procesa. Ugotovljeno je bilo, da anti-TNF terapija zniža OS pri bolnikih s Crohnovo boleznijo (CD), ni pa veliko znanega o vplivu genov OS na odgovor na anti-TNF terapijo. Zato je namen naloge raziskati vlogo teh genov pri zdravljenju z anti-TNF terapijo pri bolnikih s CD in ugotoviti ali lahko s pomočjo polimorfizmov v genih za OS ter njihovim izražanjem napovemo odziv bolnikov na anti-TNF terapijo. V raziskavi smo se osredotočili na dva pomembna gena OS, to sta gen za katalazo (*CAT*) in gen za superoksidno dismutazo 2 (*SOD2*), ter njune polimorfizme. Raziskavo smo izvedli na slovenskih bolnikih s CD, ki so bili zdravljeni z anti-TNF učinkovino adalimumab. Ugotovili smo, da je višja ekspresija genov *CAT* in *SOD2* pred zdravljenjem povezana z boljšim dolgoročnim odzivom na anti-TNF terapijo. Z rezultati te raziskovalne naloge smo nakazali na nove potencialne biološke označevalce odziva na anti-TNF terapijo ter razložili vpliv OS pri odgovoru na biološko anti-TNF terapijo pri bolnikih s CD.

**Ključne besede:** Crohnova bolezen, anti-TNF, oksidativni stres

## **ABSTRACT**

Oxidative stress (OS) is defined as a disruption of the balance between production of reactive oxygen species (ROS) and the body's ability to fight them off with antioxidants. ROS can cause a lot of damage in the human body, as it can cause mutations in DNA molecules and subsequently contributes to complex inflammatory autoimmune diseases. In the last years, these conditions have been treated with biological anti-TNF therapy, where we reduce the inflammatory process by using inhibitors of the cytokine TNF. Research shows, that anti-TNF therapy lowers OS in patients with Crohn's disease (CD), but not much is known about the effect of OS genes in the response to anti-TNF therapy. The purpose of our research was to research the role of OS genes in anti-TNF treatment in patients with CD and to find out if by

using polymorphisms in these OS genes and their expression, we can predict the patients' response to anti-TNF therapy. We focused on two important OS genes, these are the catalase gene (*CAT*) and superoxide dismutase 2 gene (*SOD2*) and their polymorphisms. The research was carried out on slovenian patients with CD, who were treated with the anti-TNF medication adalimumab. We found out that higher expression of the genes *CAT* and *SOD2* before treatment is correlated with better long term response to anti-TNF therapy. With the results from our research we managed to hint at new potential biomarkers of response to anti-TNF therapy and managed to explain the effect of oxidative stress in the response to anti-TNF therapy in patients with CD.

**Keywords:** Crohn's disease, anti-TNF, oxidative stress

## **ZAHVALA**

Rad bi se zahvalil Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologije Univerze v Mariboru in Medicinski fakulteti Univerze v Mariboru za priložnost opravljanja te raziskovalne naloge in za vso pomoč in znanja. Zahvalil bi se tudi rad vsem mentorjem, ki so mi pomagali.

## 1 UVOD

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je skupina vnetnih bolezni črevesja. Dve glavni obliki bolezni sta Crohnova bolezen (CD) ter ulcerozni kolitis (UC). Pri CD se lahko vnetje pojavi v katerem koli delu prebavnega trakta, posledica tega pa so abdominalne bolečine, diareja, utrujenost, izguba teže in podhranjenost. Povzroči lahko tudi resne, življenjsko ogrožajoče komplikacije (Ha & Khalil, 2015). Velik problem je prav tako malignost, saj CD poveča tveganje za razvoj raka debelega črevesja (Freeman, 2008).

Terapija za zdravljenje CD vključuje imunosupresive, najpogostejši je metotreksat. Vključuje tudi kortikosteroide, antibiotike, aminosalicilate, tiopurine ter spremembe v dieti. V primeru hujše bolezni ali neodzivnosti na standardno terapijo, pa zdravljenje vključuje tudi biološko oz. anti-TNF terapijo. Problem te terapije pa so močni stranski učinki ter neodzivnost, saj terapija na 30% ljudi nima učinka (Sales – Campos et al., 2015).

Definitivne metode za diagnosticiranje CD ni (Feuerstein & Cheifetz, 2017). Najpogostejša metoda je ileokolonoskopija z biopsijami, ki lahko pokaže prisotnost granulomov (Baumgart & Sandborn, 2012), vendar to ni najbolj učinkovita metoda, saj so granulomi prisotni pri le 60% vzetih vzorcev (Nikolaus & Schreiber, 2007). Napredovanje znanosti in še posebej genetike pa je omogočilo iskanje biomarkerjev, ki bi lahko bili povezani z nastankom bolezni in bi lahko pripomogli k diagnosticiranju bolezni ter tudi izbiri najboljše terapije, saj je odzivnost vsakega posameznika na terapijo odvisna od njegovega genotipa. S tem bi se lahko izognili terapijam, ki bi za posameznika imele hude stranske učinke (Elinghaus et al., 2014).

Reaktivne kisikove spojine (RKS) so produkt celičnega metabolizma, razni okoljski dejavniki pa lahko povzročijo preveliko proizvodnjo le teh, kar lahko vodi v progresivno oksidativno poškodbo celic (temu stanju rečemo oksidativni stres) ter tudi v celično smrt (Sharma et al., 2012). So tudi pomembni celični sporočevalci za razne procese in njihova vloga kot sporočevalci ali povzročitelji oksidativne poškodbe je odvisna od ravnovesja med njihovo produkcijo in razgradnjo z antioksidanti (Sharma et al., 2012).

RKS so po tradicionalnem pogledu povezane z vnetjem in poškodbo tkiv. Smatra se, da je pravilno redoks ravnovesje nujno za vzdrževanje imunskega sistema, ki lahko ščiti pred razvojem avtoimunosti ali pa minimizira poškodbo tkiv (Hoffman & Griffiths, 2018). Nove



študije kažejo, da telo tudi varujejo pred avtoimunostjo, saj je deficit RKS na človeških in živalskih modelih pokazal povezavo s hudimi kroničnimi vnetji (Kienhöfer et al., 2016).

Namen te raziskovalne naloge je ugotoviti ali so ekspresija in genetski polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP, ang. za single nucleotide polymorphism) dveh genov oksidativnega stresa, gena za katalazo (*CAT*) in gena za superoksidno dismutazo 2 (*SOD2*), povezani z odzivom na biološko anti-TNF terapijo<sup>1</sup> pri slovenskih<sup>2</sup> bolnikih s CD.

### 1.1 Raziskovalno vprašanje

S to nalogo smo želeli ugotoviti, kakšna je povezava med geni oksidativnega stresa in odzivnostjo na anti-TNF terapijo, zato je naše glavno vprašanje bilo: **Ali ekspresija katerega izmed izbranih genov oksidativnega stresa ter njihovi genetski polimorfizmi vplivajo na odziv bolnika s CD na anti-TNF terapijo in kako?**

### 1.2 Hipoteze

1. Znižana ekspresija genov je povezana s hujšo obliko bolezni.
2. Ekspresija obeh genov bo imela vpliv na odzivnost na terapijo.
3. Večja kot je ekspresija genov, večja bo učinkovitost terapije.
4. SNP-ja bosta imela vpliv na odzivnost na terapijo.
5. Večji vpliv na odziv bodo imeli homozigoti izbranih SNP-jev.

---

<sup>1</sup> Anti-TNF terapija je ime za vsa biološka zdravila, ki zatrejo delovanje citokina TNF (ang. tumor necrosis factor).

<sup>2</sup> Poudarjeno je slovenskih bolnikih, saj študije kažejo, da se tveganje in prevalenca bolezni razlikuje med različnimi populacijami.

## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 Kronična vnetna črevesna bolezen

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je skupno ime za dve boleznii, to sta Crohnova bolezen (CD) in ulcerozni kolitis (UC). Pri obeh boleznih gre za vnetje prebavnega trakta, razlikujeta pa se po delu trakta, ki je prizadet ter po klinični prezentaciji bolezni. UC prizadene le debelo črevo, medtem, ko pa CD lahko prizadene katerikoli del trakta. Pri CD so med vnetimi deli trakta območja zdravega tkiva, pri UC pa gre za kontinuirno vnetje celotnega debelega črevesja. Glavna razlika je, da UC prizadene le notranje celice črevesja, medtem ko CD lahko prizadene katerikoli sloj črevesne stene. V približno 10% primerov KVČB imajo bolniki znake obeh boleznii, v tem primer je diagnoza neopredeljen kolitis (ang. indeterminate colitis) (Fakhoury et al., 2014). V Združenih državah Amerike je KVČB druga najpogostejša vnetna bolezen in večinoma prizadene ljudi med 15. in 30. letom starosti (Loftus & Sandborn, 2002). KVČB se lahko zdravi na več načinov, vendar bolezen sama po sebi ni ozdravljiva. Glede na intenzivnost simptomov poteka zdravljenje z aminosalicilati, imunosupresivi, antibiotiki ali pa z biološkimi zdravili, med katerimi je najpogostejša anti-TNF terapija. Približno petina ljudi ima močne simptome, ki se pri zdravljenju z zdravili ne izboljšajo (Fakhoury et al., 2014). Slednje, ter stigma, povezana z boleznijo, lahko vodi tudi do raznih oblik depresije pri bolnikih. Študije kažejo, da ima približno 16% bolnikov eno izmed oblik depresije (Wong et al., 2017).

#### 2.1.1 Crohnova bolezen

Ameriška klinika Mayo opisuje CD kot vnetje črevesnega trakta, kjer je lahko prizadet katerikoli del le tega, vendar sta najpogosteje prizadeta ali ileum<sup>3</sup> ali debelo črevo. Vnetje se najpogosteje izrazi v posameznih manjših odsekih črevesja, lahko pa je prizadet tudi celoten trakt. Vnetje, ki ga povzroči CD, se pogosto razširi globoko v tkiva prebavnega trakta. Bolezen je kronična, kar pomeni, da traja celo življenje in ni ozdravljiva, bolniki pa lahko imajo obdobja remisije (obdobja brez simptomov) ter relapse (ponovna ponovitev simptomov). Intenzivnost

---

<sup>3</sup> Ileum – zadnji del tankega črevesja

simptomov se med posamezniki razlikuje, najpogostejši pa so abdominalna bolečina in driska, utrujenost, vročina, ulcerji<sup>4</sup>, izguba apetita in teže ter anemija (Mayo Clinic, 2019).

Pogostost pojavnosti CD se razlikuje glede na starost, raso, veroizpoved in geografsko lokacijo. Najpogosteje se pojavi med 20. in 30. letom starosti, za razliko od UC, ki se najpogosteje pojavi med 30. in 40. letom. V Evropi je pogostost bolezni med 8 in 214 / 100.000 prebivalcev, v Severni Ameriki pa med 44 in 201 / 100.000 prebivalcev, vendar najnovejše študije ocenjujejo pogostost v Severni Ameriki na 201 / 100.000 prebivalcev. CD se pojavlja 20% do 30% pogosteje pri ženskah kot pri moških, vendar se ta razlika v območjih visoke pogostosti CD znatno zmanjša. Raziskave tudi nakazujejo, da je najvišja incidence CD med afro-ameriški otroci. Odrasli hispanci imajo manjšo prevalenco bolezni kot belci, najmanjšo pa imajo Azijci, zlasti Korejci, s prevalenco 5,3 / 100.000 prebivalcev. Visoko prevalenco imajo tudi židovske populacije (Cosnes et al., 2011).

Biokemijsko je CD karakteriziran z vnetjem, ki ga povzroči previsoka produkcija IL-12, IL-17 in IL-23 citokinov v Th1<sup>5</sup> celicah (Uniken Venema et al., 2016). Ta odziv sproži mikrobiota in vodi v produkcijo interferona-  $\gamma$  in TNF- $\alpha$ , kar vodi v poškodbo sluznice (Biasi et al., 2013).

## 2.2 Geni

Geni so odseki DNA, ki kodirajo en genski produkt, torej ali RNA ali beljakovino oz. bolj natančno eno polipeptidno verigo. Kodirajo lahko tudi različne tipe tRNA<sup>6</sup> ter rRNA<sup>7</sup>. Geni, ki kodirajo polipeptide in RNA imenujemo strukturni geni - ti določajo končno strukturo nekaterih končnih genskih produktov, kot so encimi ali RNA. Zraven genov so na DNA še regulatorne sekvence, ki pa signalizirajo začetek in konec strukturnih genov ter nadzirajo njihovo transkripcijo (Lehninger, 1982).

Geni vsebujejo introne in eksone. Eksoni so kodirajoči odseki gena, ki sestavljajo nadaljnjo RNA in se kodirajo v protein, intron pa je nekodirajoč odsek gena, ki se odstrani iz prepisane

---

<sup>4</sup> Ulcer – razjeda v steni prebavne cevi

<sup>5</sup> Th1 – limfocit T, ki pomaga pri vnetnem odzivu

<sup>6</sup> tRNA – RNA, ki prinaša amino kisline na ribosome

<sup>7</sup> rRNA – RNA, ki gradi ribosome

RNA med procesom alternativnega izrezovanja intronov (splicing)<sup>8</sup> med zorenjem končnega RNA produkta (Sorek, 2007).

Geni za pričetek transkripcije potrebujejo promotorsko sekvenco, na katero se povežejo transkripcijski faktorji in pomagajo pri vezavi RNA polimeraze, da ta začne s transkripcijo. Geni, na katerih pogosto poteka transkripcija, imajo promotorsko sekvenco, ki se močno poveže s transkripcijskimi faktorji, ostali geni pa imajo promotorsko sekvenco, ki se šibkeje poveže s transkripcijskimi faktorji, zato na teh genih transkripcija poteka manj pogosto (Alberts et al., 2002).

Velikost človeškega genoma je organizacija The Human Genome Project ocenila med 20.000 in 25.000 genov (The Human Genome Project, 2003), točno število genov pa je neznano (Salzberg, 2018).

### **2.2.1 Postopek sinteze genskega produkta**

V vseh organizmih sta potrebna dva koraka za branje informacije zapisane v genu in sintezo polipeptidne verige. Prvi korak je transkripcija, kjer nastane mRNA, katere sekvenca nukleotidov je komplementarna DNA sekvenci gena, iz katerega se je prepisala. Transkripcijo omogoča encim RNA polimeraza, ki prebere DNA v smeri 3' proti 5' in sintetizira RNA v smeri 5' proti 3'. Za začetek transkripcije mora polimeraza prepoznati promotor, zaradi tega je eden izmed glavnih mehanizmov genske regulacije tudi blokiranje promotorske regije. Drugi korak je translacija, kjer je mRNA uporabljena kot model za sintezo novega proteina. Translacija poteka na ribosomih, ki povezujejo aminokislino v polipeptidne verige s peptidnimi vezmi. Ribosomi berejo genski kod po tri nukleotide naenkrat, v enotah imenovanih kodoni. Vsak kodon kodira eno aminokislino ali pa konec polipeptidne verige (stop kodoni). Ti kodoni se povežejo s tRNA, ki ima antikodon, kateri je komplementaren kodonu. Vsaka tRNA ima specifičen antikodon za eno aminokislino. Ko se tRNA poveže z mRNA, ribosom poveže aminokislino, vezano na tRNA, v polipeptidno verigo (Alberts et al., 2002).

---

<sup>8</sup> Splicing – postopek, kjer se pre-mRNA transkript pretvori v mRNA

### **2.2.2 Regulacija genske ekspresije**

Regulacija genske ekspresije po navadi deluje na ravni RNA biosinteze. Transkripcijski faktorji se specifično vežejo na sekvenco DNA in s tem ali aktivirajo ali inhibirajo transkripcijo. Transkripcijski faktorji lahko delujejo kot aktivatorji, represorji ali oboje, imeli pa bi naj tudi vlogo pri regulaciji epigenoma<sup>9</sup> (Whitaker et al., 2014).

Geni se regulirajo tako, da poteka ekspresija samo v primerih, ko je produkt le-tega gena potreben, saj so za ekspresijo in izgradnjo produkta potrebne razne surovine, ki pa jih v celici ni neomejeno (Alberts et al. 2002). Ekspresija se lahko nadzoruje v katerem koli koraku sinteze produkta (Jacob & Monod, 1961).

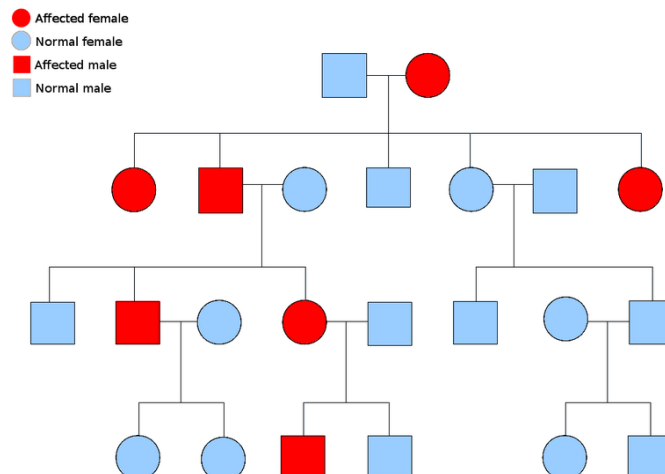
### **2.2.3 Dedovanje genov**

Dedovanje lastnosti, ki jih določa en gen, se deduje po načelih Mendlovega dedovanja z dominantnimi in recisivnimi aleli.

Dedovanje genov v organizmih, ki se spolno razmnožujejo, poteka z združitvijo moških in ženskih gamet, ki so nastale z mejozo. Med mejozo poteka prekrižanje (crossing-over), kjer se odsek DNA na eni kromatidi zamenja z enakim odsekom DNA na homologni, ne sestrski kromatidi, kar poveča genetsko variabilnost potomcev. Kromosomi se nato ločijo in nastanejo posamezne gamete. Te se pri oploditvi združijo in potomec ima nato komplet genov od obeh staršev (obeh gamet), izrazila pa se bo dominantna lastnost oz. gen (Alberts et al., 2002).

---

<sup>9</sup> Epigenom – skupek kemijskih sprememb na DNA in histonih pri organizmu



*Slika 1: Primer dedovanja alela za določene bolezni (Caulton, 2013)*

## 2.2.4 Mutacije

Podvojevanje DNA je večinoma zelo natančno, vendar se napake še vedno lahko zgodijo. Tem napakam pravimo mutacije (Alberts et al. 2002). Majhne mutacije lahko nastanejo med podvojevanjem DNA ali kot posledica poškodbe DNA. Te vključujejo točkovne mutacije, kjer je spremenjena ena baza ter mutacije s spremembo bralnega okvirja (ang. frameshift mutations), kjer pride do ali delecije ali insercije ene baze. Obe obliki mutacije lahko vodita v ali mutacijo s spremenjenim pomenom (ang. missense mutation), kjer se spremeni kodon tako, da kodira drugo aminokislino ali nesmiselno mutacijo, kjer se kodon spremeni v stop kodon pred koncem verige. Vpliv mutacij je lahko tudi manjši. Če se funkcija beljakovine kljub zamenjani aminokislini ne spremeni, govorimo o nevtralni mutaciji, če pa mutacija ustvari novi kodon, ki kodira isto aminokislino, pa govorimo o tih mutaciji (United States National Library of Medicine, 2015). Večje mutacije lahko povzročijo napake v rekombinaciji in lahko povzročijo kromosomske napake. Nastanejo lahko tudi pri popravilu fizičnih poškodb na molekuli DNA, a za celico je pomembneje popraviti poškodbo, kot pa možna posledica mutacije (Alberts et al., 2002).

Večina genskih mutacij je tih, veliko mutacij pa je lahko za organizem smrtnih in te se iz populacij odstranjujejo z naravno selekcijo. Nekatere mutacije so tudi dobre in povečajo zmožnost preživetja organizma in so pomembne za evolucijo vrste (Alberts et al., 2002).

### 2.2.5 Polimorfizmi posameznega nukleotida

Polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP-ji, ang. za single nucleotide polymorphism) so najpogostejša oblika genske variacije v človeškem genomu. Pri SNP-jih se en nukleotid na določenem lokusu razlikuje med populacijo, to razlikovanje pa je prisotno pri več kot 1% populacije. Te variacije se lahko pojavijo približno enkrat na vsakih 100 do 300 nukleotidov in so vzrok za približno 90% genetske raznolikosti med ljudmi. Vplivajo lahko na fenotip oz. na zaznavne lastnosti (npr. barva dlake pri živalih), na našo dovzetnost za razne bolezni in tudi na odzivnost na zdravila (Shastry, 2009).

### 2.3 Genetske bolezni

Genetske bolezni so vse bolezni, ki jih povzročajo spremembe v sekvenci DNA. Ločimo jih na monogenske bolezni, ki jih povzroča mutacija na enem samem genu, poligeneske bolezni, ki jih povzročajo mutacije na večih genih, bolezni, ki nastanejo kot kombinacija genskih mutacij in okolijskih faktorjev (npr. KVČB), ter bolezni, ki so posledica napak v samih kromosomih (npr. sprememba števila kromosomov) (Crespi, 2010).

Raziskave so odkrile, da ima vedno več bolezni vzrok v genetski komponenti. Nekatere bolezni povzročajo mutacije, ki smo jih podedovali od staršev (npr. anemija srpastih celic<sup>10</sup>), druge pa povzročajo mutacije, pridobljene tekom življenja. Teh ne podedujemo, ampak jih dobimo ali po naključju, ali pa zaradi okolijskih faktorjev, kot je npr. kajenje. V to skupino bolezni spadajo tudi nekatera rakasta obolenja.

Dedne bolezni po navadi vključujejo podedovanje enega samega mutiranega gena, ki se nato prenaša iz roda v rod in lahko pri vseh generacijah povzroči ekspresijo bolezni. Princip dedovanja teh bolezni deluje po Mendlovem dedovanju in se najpogosteje prikaže s Punettovim kvadratom (glejte Tabelo 1). Takšne bolezni se lahko dedujejo recesivno ali dominantno. Pri recesivnih boleznih morata biti oba alela mutirana (genotip je recesivni homozigot), pri dominantnih pa je dovolj le en mutiran alel (genotip je lahko ali heterozigot ali dominantni homozigot) (Genetic Alliance, 2009).

---

<sup>10</sup> Anemija srpastih celic – bolezen, ki povzroči nepravilno obliko eritrocitov

*Tabela 1: Primer Punnetovega kvadrata za dedovanje neke lastnosti (A predstavlja dominanten alel, a pa recesivni alel).*

<b>Genotipi</b>	<b>A</b>	<b>a</b>
<b>A</b>	AA	Aa
<b>a</b>	Aa	aa

Poligenske, včasih jim rečemo tudi multifaktorske bolezni, povzročajo kombinacija majhnih sprememb v večih genih, po navadi v kombinaciji z okolijskimi faktorji, ki povzročajo izražanje bolezni. Raziskave kažejo, da so mutacije na večih genih lahko tudi predispozicijski faktorji<sup>11</sup> za vedenjske bolezni, kot je alkoholizem ter tudi za nekatere druge duševne bolezni. Tretja oblika genetskih bolezni so bolezni, ki jih povzročajo sprememba zgradbe ali števila kromosomov – kromosomske mutacije. Te so najpogosteje duplikacija, delecija, inverzija in premestitev oz. translokacija dela kromosoma. Sam gen oz. geni pri teh mutacijah niso mutirani. Genetske bolezni pa lahko povzročajo tudi ne izražanje določenih genov oz. skupine genov (npr. Prader-Willi sindrom<sup>12</sup>) (Genetic Alliance, 2009).

## **2.4 Oksidativni stres**

Oksidativni stres je posledica neravnovesja med produkcijo in akumulacijo reaktivnih kisikovih spojin (RKS) v celicah in tkivih ter zmožnostjo organizma za detoksifikacijo le-teh. RKS imajo vlogo v večih fizioloških procesih, recimo celični signalizaciji in so normalen stranski produkt metabolizma kisika. Različni zunanji stresorji, recimo UV svetloba in ksenobiotiki, močno povečajo produkcijo RKS in vodijo v preveliko količino le-teh v celici in tkivih ter posledično do celične poškodbe. Telo za obrambo proti tem uporablja antioksidante (Pizzino et al., 2017). Številne raziskave kažejo, da je oksidativni stres v različni meri odgovoren za nastanek določenih bolezni, kot so rak, sladkorna bolezen, krvožilne bolezni itd. (Taniyama & Griendling, 2003).

<sup>11</sup> Predispozicijski faktorji – faktorji, ki zvišajo možnost pojava določene bolezni

<sup>12</sup> Prader-Willi sindrom – genska bolezen, ki jo povzročajo spremembe na kromosomu 15



Oksidativni stres je načeloma opisan kot nevaren za človeško telo, vendar bi naj imel terapevtsko vlogo pri zdravljenju bolezni, kot je rak (Pizzino et al., 2017).

#### 2.4.1 Reaktivne kisikove spojine in prosti radikali

Najpogostejše RKS so superoksidni radikali ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksidni radikal ( $\bullet OH$ ) in singletni kisik ( $^1O_2$ ) (Sato et al., 2013). Procesi, kot so proteinska fosforilacija, aktivacija transkripcijskih faktorjev, apoptoza, imuniteta in diferenciacija celic so odvisni od pravilne produkcije RKS (Rajendran et al., 2014). Ko se koncentracija teh poveča, začnejo ti negativno vplivati na celične strukture, kot so proteini, lipidi in nukleinske kisline (Wu et al., 2013).

Največ RKS se ustvari v mitohondrijih med fiziološkimi in patološkimi procesi (Al-Guborv et al., 2012). Ti organeli lahko sicer sami metabolizirajo nekaj nastalih RKS (Hansen et al., 2006), vendar ne vseh (Galsauer & Chandel, 2014).

Celice za metabolizem RKS uporabljajo antioksidantne obrambne mehanizme, ki so večinoma sestavljeni iz encimskih komponent, kot so superoksidna dismutaza (*SOD*), katalaza (*CAT*) in glutation peroksidaza (*GPX*).

Produkcija RKS je razdeljena na encimske in ne encimske reakcije. Encimske reakcije, ki lahko sintetizirajo RKS, so tiste, ki so vključene v dihalno verigo, sintezo prostaglandinov<sup>13</sup>, fagocitozo in sistem citokroma P450<sup>14</sup> (Halliwell, 2007). Superoksidne radikale sintetizirajo NADPH oksidaza, ksantin oksidaza in peroksidaze. Ti potem postanejo del reakcij, ki ustvarijo vodikov peroksid, hidroksidni radikal in druge RKS. Vodikov peroksid naredijo razne oksidaze. Hidroksidni radikal, najreaktivnejši izmed *in vivo* radikalov, nastane z reakcijo med superoksidnim radikalom in vodikovim peroksidom, pri čemer  $Fe^{2+}$  ali  $Cu^+$  delujeta kot katalizatorja (Valko et al., 2004). Ne encimske reakcije so tudi odgovorne za proizvodnjo prostih radikalov in sicer pri reakcijah kisika z organskimi spojinami ali z izpostavljanjem celic sevanju ter pri celičnem dihanju (Genestra, 2007).

Pri nizkih koncentracijah imajo prosti radikali pomembno vlogo za organizem, saj so potrebni za sintezo nekaterih celičnih struktur in pri obrambi organizma pred patogeni. Fagociti recimo

---

<sup>13</sup> Prostaglandini so skupina lipidov, ki delujejo kot celični receptorji

<sup>14</sup> Citokrom P450 – skupina proteinov, ki oksidira razne spojine ter metabolizira razna zdravila v organizmu

sami sintetizirajo in shranjujejo proste radikale, da jih lahko sprostijo ob prisotnosti patogenov (Young & Woodside, 2001). Vloga RKS v telesu je dobro prikazana pri bolnikih z granulomatoznimi boleznimi, saj ti ne morejo proizvajati superoksidnega radikala zaradi napake v sistemu NADPH oksidaze in so zato bolj podvrženi okužbam (Dröge, 2002). Vključeni so tudi v mnoge procese celične signalizacije, saj lahko regulirajo kaskade intracelične signalizacije v večih tipih celic, recimo fibroblastih, endotelijskih celicah, miocitih itd. Najbolj znan prosti radikal, ki sodeluje pri celični signalizaciji, je dušikov oksid (NO), ki je medcelični sporočevalec in je potreben za pravilno modulacijo krvnega pretoka, pri trombozi<sup>15</sup> ter je ključen za normalno nevrnalno aktivnost. Vključen je tudi v nespecifično obrambo telesa (Pacher et al., 2007).

Posledica prevelike količine RKS je odvisna od vrste RKS. Povečana koncentracija hidroksilnega radikala lahko povzroči lipidno peroksidacijo in tako poškoduje celično membrano in lipoproteine. To vodi v sintezo malondialdehida<sup>16</sup> (MDA) in konjugiranih dienov, ki so citotoksični in mutageni. Podobno se lahko zgodi tudi beljakovinom, ki s tem izgubijo svojo funkcijo (Frei, 1994). Oksidativni stres lahko poškoduje tudi DNA in s tem povzroči mutacije (Nishida et al., 2013) ter izgubo epigenetskega materiala (Yasui et al., 2014).

Študije so dokazale vplive prostih radikalov na progresijo in iniciacijo raznih kroničnih vnetnih bolezni, kot je revmatoidni artritis (Mahajan & Tandon, 2004).

#### **2.4.1.1 Vpliv oksidativnega stresa na Crohnovo boleznijo**

Raziskave in klinične študije nakazujejo, da bi oksidativni stres lahko imel vlogo pri razvoju CD, saj lahko povzroči poškodbo sluznice v prebavnem traktu, kar pripomore k vnetju in posledično k prevelikemu imunskemu odzivu, kar povzroči CD. Razni okolijski faktorji, kot so sevanje, kajenje ter ksenobiotiki, lahko v telesu povzročijo oksidativni stres, pri vseh teh je bil tudi dokazan vpliv na razvoj CD, najverjetneje ravno zaradi njihove vloge pri nastanku oksidativnega stresa (Goyette et al., 2007).

Mutacije v genih za antioksidativne oz. biotransformacijske encime lahko povzročijo spremembo v delovanju encima in posledično pripomorejo k nastanku CD (Kosaka et al., 2009).

---

<sup>15</sup> Tromboza – tvorjenje krvnih strdkov, najpogosteje na ranah

<sup>16</sup> Malondialdehid – reaktivni aldehyd, ki je strupen za celice in deluje kot biomarker za oksidativni stres

Gen za encim paraoksonazo<sup>17</sup> (PON) je v študijah pokazal vlogo dovzetnostnega gena za CD in UC . Povišanje aktivnosti gena je pri židovski populaciji v Izraelu delovalo zaščitniško proti KVČB (Karban et al., 2007).

Med vnetjem črevesja pri CD bakterije lažje prodrejo skozi črevesno sluznico. Endotelne celice kot odgovor sprostijo proteina CD40 in CD40L, ki spadata v družino TNF receptorjev. Ta dva proteina lahko nato kostimulirata imunske celice med vnetjem (Senhaji et al., 2015). Proteina CD40 in CD40L bi lahko tako bila biomarkerja za oksidativni stres v endotelnih tkivih.

## **2.4.2 CAT gen**

*CAT* je gen, ki kodira encim katalazo. Nahaja se na 11. kromosomu, na mestu p13 in ima 13 eksonov in 12 intronov (Quan et al., 1986). Gen ima osem iniciacijskih točk transkripcije (Sato et al., 1992).

### **2.4.2.1 Katalaza**

Katalaza ima pomembno vlogo pri dekompoziciji vodikovega peroksida na vodo in kisik ter tako ščiti telo pred oksidativnim stresom. Človeška katalaza spada v skupino monofunkcionalnih katalaz s hemom (Chelikani et al. 2004). Je tetramer štirih polipeptidnih verig in vsebuje štiri heme skupine, ki omogočajo reakcijo z vodikovim peroksidom. Optimalni pH delovanja encima je okoli 7, aktivno območje pa ima med pH 6.8 in 7.5 (Maehly et al. 1954). Je primarno intracelularni encim in največje koncentracije le-tega so v eritrocitih, jetrih in ledvicah (Deisseroth & Dounce, 1970).

#### **2.4.2.1.1 rs1001179**

SNP rs1001179 leži na genu *CAT*. T alel SNP—ja rs1001179 je bil v študijah povezan s slabšo encimsko aktivnostjo (Bastaki et al., 2006), nekateri pa so te rezultate ovrgli (Forsberg et al., 2001).

---

<sup>17</sup> Paraoksonaza – encim, ki ima antioksidativno vlogo

### 2.4.3 *SOD2* gen

*SOD2* je gen, ki kodira encim superoksid dismutazo 2. Leži na 6. kromosomu, na mestu q25.3 in ima 5 eksonov in 4 introne. Gen ima več vezavnih mest za transkripcijske faktorje (Becuwe et al., 2014).

#### 2.4.3.1 Superoksid dismutaza 2

Superoksid dismutaza 2 (*SOD2*), znan tudi kot mangan superoksid dismutaza (*MnSOD*), je encim, ki se poveže s superoksidnimi biprodukci oksidativne fosforilacije in jih pretvori v vodikov peroksid in diatomski kisik (Velarde et al., 2012). Deluje tudi antiapoptotično proti oksidativnemu stresu, ioniziranemu sevanju in vnetnim citokinom (Becuwe et al., 2014).

##### 2.4.3.1.1 rs4880

SNP rs4880 leži na genu *SOD2*. SNP je bil povezan z odzivom na ciklofosamid<sup>18</sup> pri bolnikih z rakom dojke (Glynn et al., 2009), za anti-TNF terapijo pa podatki v literaturi niso na voljo.

#### 2.4.3.2 Vpliv ekspresije gena *SOD2* na TNF $\alpha$

Višja ekspresija *SOD2* gena je pokazala višjo ekspresijo TNF $\alpha$  v celicah. Študije na človeških rakastih<sup>19</sup> linijah so pokazale, da lahko TNF $\alpha$  regulira ekspresijo *SOD2* gena s tem, da njegovo ekspresijo zatira (Zuo et al., 2019).

## 2.5 Anti-TNF terapija in adalimumab (Humira®)

Anti-TNF terapija je zdravljenje z zdravili, ki zavirajo delovanje citokina TNF (ang. tumor necrosis factor). TNF, ali dejavnik tumorske nekroze, je eden izmed telesnih obrambnih mehanizmov. Je prvi citokin, ki se pojavi v krvi po stresu ali poškodbah. Deluje z aktivacijo dveh receptorjev in sicer TNFR1, ki inducira pro-vnetni odziv ter pomaga pri anti-apoptotičnem<sup>20</sup> odzivu. Zato so recimo miši, pri katerih so ta receptor onesposobili, zaščitene

---

<sup>18</sup> Ciklofosamid – kemoterapevtsko zdravilo

<sup>19</sup> Linije so imele ploščatocelični karcinom

<sup>20</sup> Apoptoza – kontrolirana celična smrt

pred mnogimi boleznimi, saj imajo znatno manjši vnetni odziv. Drugi receptor je TNFR2, ki aktivira razne signalne poti. Njegova vloga je pomoč pri obnavljanju telesa ter homeostazi. Miši, pri katerih so ta receptor onesposobili, so imele augmentirano patologijo. To nakazuje na to, da bi lahko bila selektivna blokada TNFR1 celo bolj učinkovita, kot splošna blokada TNF, kar je bilo pri miših tudi dokazano. Terapija se je dokazala za uspešno že v svoji začetni fazi pri zdravljenju revmatoidnega artritisa<sup>21</sup>, še posebej s ko-terapijo z metotreksatom<sup>22</sup> (Monaco et al. 2015).

Adalimumab (tržno ime Humira®) je prišlo v uporabo leta 2002. Adalimumab je človeško monoklonsko TNF $\alpha$  protitelo, ki blokira delovanje TNF $\alpha$ . Uporablja se za zdravljenje revmatoidnega artritisa v kombinaciji z metotreksatom ter za zdravljenje CD, raziskave pa kažejo tudi na možno delovanje pri psoriazi<sup>23</sup>. Stranski učinki za Humiro so v primerjavi z drugimi biološkimi zdravili manjši, najpogostejši je rahlo vnetje v predelu vbrizga zdravila. Humira pa sicer tudi za dvakrat poveča možnost za resne okužbe, najpogostejša je reaktivacija tuberkuloze. Zaradi povišane možnosti za okužbe je priporočeno redno testiranje, zaradi možnosti pancitopenije<sup>24</sup> pa so priporočeni občasni jetrni in krvi testi (Lapadula et al. 2014).

### **3 PRAKTIČNI DEL**

#### **3.1 Metode dela in material**

##### **3.1.1 Pregled literature in izbor genov**

Pred začetkom praktičnega dela smo morali poiskati gene in SNP-je ki sodelujejo pri oksidativnem stresu. Za to smo uporabili brskalnik PubMed. PubMed je brskalnik, ki omogoča dostop do MEDLINE baze podatkov. Z njim lahko iščemo članke, povezane z medicino, zdravstvom ter drugimi biomedicinskimi vedami. Članke lahko iščemo z uporabo terminov, kot so imena in priimki avtorjev, naslovi člankov, ključne besede itd., ter kakršnokoli kombinacijo teh. Vodi ga NCBI (ang. National Centre for Biotechnology Information) (Roberts, 2001).

---

<sup>21</sup> Revmatoidni artritis – avtoimunska bolezen, ki povzroči vnetje sklepov

<sup>22</sup> Metotreksat – zdravilo, ki deluje kot zaviralec imunskega sistema

<sup>23</sup> Psoriaza – avtoimunska bolezen, ki povzroča vnetje kože

<sup>24</sup> Pancitopenija – stanje, kjer je zmanjšano število vseh treh krvničk (eritrocitov, leukocitov in trombocitov)

Z uporabo PubMed-a smo poiskali članke in s preučevanjem le-teh izbrali dva gena, ki imata vlogo pri oksidativnem stresu, prav tako pa sta že pokazala na potencialno vlogo pri odzivu na anti-TNF terapijo. To sta gena *SOD2* in *CAT* (Tabela 2).

Tabela 2: Izbrana gena in pripadajoča SNP-ja.

Gen	Kromosom	SNP	Produkt, ki ga kodira	Vloga produkta
<i>CAT</i>	11	rs1001179	Katalaza	Katalizira dekompozicijo H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v H <sub>2</sub> O in O <sub>2</sub>
<i>SOD2</i>	6	rs4880	Superoksid dismutaza 2	Pomaga pri dekompoziciji superoksidnih radikalov

### 3.1.2 Bolniki

V raziskovalni nalogi smo analizirali 89 bolnikov s CD, ki so bili vključeni v zdravljenje z biološko anti-TNF terapijo z adalimumabom (ADA). Bolnikom je bila odvzeta kri pred začetkom terapije, iz katere smo izolirali DNA za genotipizacijo izbranih polimorfizmov in RNA za merjenje izražanja izbranih genov. Odziv bolnikov na anti-TNF terapijo z ADA se je določal glede na število točk, doseženih po izpolnitvi vprašalnika IBDQ. IBDQ je vprašalnik, ki nam pove, kakšna je kvaliteta življenja bolnika s KVČB. Vprašalnik so izpolnili pred pričetkom zdravljenja ter 4, 12, 20 in 30 tednov po pričetku. Maksimalno število točk, ki jih posameznik lahko doseže pri vprašalniku, je 224 točk. Za potrditev odziva na anti-TNF terapijo je moralo biti število točk vprašalnika nad 170, ali pa razlika med IBDQ točkami pred začetkom zdravljenja ter po določenem tednu zdravljenja večja od 22 (delta IBDQ).

### 3.1.3 Načrtovanje začetnih oligonukleotidov z orodjem Primer3

Oligonukleotidi so majhni odseki nukleinskih kislin, narejeni v laboratoriju in so v obliki enojne vijačnice. Mi smo jih uporabljali za PCR reakcije, kjer se dvojna vijačnica DNA prekine in tako nastaneta dve enojno vijačni DNA verigi, na katere se nato komplementarno vežejo začetni oligonukleotidi, ki označujejo začetek in konec DNA verige, ki jo želimo pomnožiti (Lehninger, 1982) (Yang et al., 2018). Začetne oligonukleotide smo načrtali za merjenje izražanja genov *CAT*, *SOD2* in referenčnega gena *B2M* ter za genotipizacijo SNP-ja rs4880 (Tabela 3). Za načrtovanje smo uporabili prosto dostopno spletno orodje Primer3.

Tabela 3: Sekvence začetnih oligonukleotidi za merjenje izražanja izbranih genov ter genotipizacijo SNP-ja.

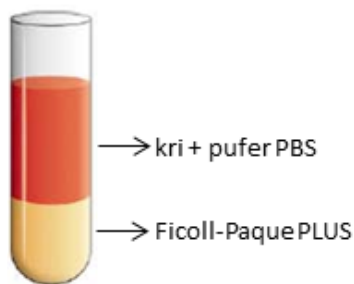
<i>Gen/SNP</i>	Oznaka začetnega oligonukleotida	Sekvenca (5'→3')	Metoda
<i>SOD2</i>	<i>SOD2</i> _NM_000636.3 (1)	AAGTACCAGGAGGCGTTGG	Merjenje ekspresije gena - qPCR
	<i>SOD2</i> _NM_000636.3 (2)	TGAACTTCAGTGCAGGCTGA	
<i>CAT</i>	<i>CAT</i> _NM_001752.3 (1)	TCATCAGGGATCCCATATTGTT	Merjenje ekspresije gena - qPCR
	<i>CAT</i> _NM_001752.3 (2)	CCTTCAGATGTGTCTGAGGATTT	
<i>B2M</i>	<i>B2M</i> _NM_004048.2 (1)	TTCTGGCCTGGAGGCTATC	Merjenje ekspresije gena - qPCR
	<i>B2M</i> _NM_004048.2 (2)	TCAGGAAATTTGACTTTCCATTC	
<i>SOD2/rs4880</i>	<i>SOD2</i> _rs4880 (1)	GCTGTGCTTTCTCGTCTTCA	Genotipizacija - HRM
	<i>SOD2</i> _rs4880 (2)	CCGTAGTCGTAGGGCAGGT	

### 3.1.4 Genotipizacija in merjenje izražanja genov

Genotipizacijo smo opravljali na DNA molekulah, merjenje izražanja genov pa na RNA molekulah, ki smo jih z reverzno transkripcijo prepisali v komplementarno DNA (cDNA). Oboje smo izolirali iz levkocitov bolnikov s CD, zdravljenih z anti-TNF terapijo z adalimumabom (ADA), ki so bili na voljo v biobanki Centra za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru. Izolacija DNA in RNA je potekala po naslednjem protokolu.

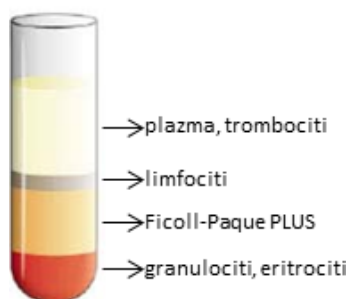
### Zbiranje limfocitov:

Pri izolaciji limfocitov smo začeli s pripravo vzorca. Kri, ki je bila odvzeta v epruveto z EDTA, smo prenesli v novo sterilno centrifugirko ter dodali pufer PBS<sup>25</sup>. Raztopino smo dobro premešali. V novo sterilno centrifugirko smo nalili Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare)<sup>26</sup>, na katerega smo previdno in počasi ob steni nalivali celotno suspenzijo krvi in PBS-a. Paziti smo morali, da se raztopina ni pomešala s Ficoll-om, kot prikazuje spodnja slika (Slika 2).



*Slika 2: Mešanica krvi in pufera PBS nanešenega na Ficoll (Avtor, 2019).*

Centrifugirko smo nato centrifugirali. Po centrifugiranju smo dobili vzorec, razdeljen na štiri faze, ki so vidne na sliki (Slika 4): eritrocite, Ficoll, limfocite in krvno plazmo.



*Slika 3: Krvni vzorec, ki je po centrifugiranju razdeljen na štiri faze (Avtor, 2019).*

Krvno plazmo smo odstranili, drugo fazo z limfociti pa smo s pipeto prenesli v sterilno centrifugirko, katerim smo nato dodali pufer PBS. Raztopino smo nato centrifugirali. Po koncu

---

<sup>25</sup> PBS – pufer, ki vsebuje dinatrijev hidrogenfosfat, natrijev klorid ter občasno kalijev klorid in kalijev dihidrogenfosfat.

<sup>26</sup> Ficol – raztopina polisaharida, ki se uporablja za ločevanje krvi.



centrifugiranja smo supernatant odsesali, limfocite pa shranili v zmrzovalnik pri  $-80^{\circ}\text{C}$  do njihove nadaljnje uporabe.

#### Izolacija DNA:

DNA smo izolirali s TRI reagentom (Sigma-Aldrich), pri čemer smo limfocite najprej lizirali z zaporednim pipetiranjem v TRI reagentu ter dodali kloroform. Po dodatku kloroforma in centrifugiranju, se mešanica loči v 3 faze, vodna faza vsebuje RNA, vmesna faza DNA in organska faza proteine. Po odstranitvi vodne faze za izolacijo RNA, smo DNA precipitirali iz vmesne in organske faze tako, da smo dodali absolutni etanol. Mikrocentrifugirko smo nato vorteksirali in pustili stati na sobni temperaturi 2 – 3 min. Nato smo mešanico centrifugirali. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in ga shranili pri  $4^{\circ}\text{C}$  za izolacijo proteinov. Pelet DNA smo dvakrat sprali v natrijevem citratu / 10% etanolu in dobro vorteksirali. Med vsakim spiranjem smo pustili pelet DNA stati z občasnim mešanjem. Sledilo je centrifugiranje. Supernatant smo z odlivanjem zavrgli. Pelet DNA smo sprali v 75% etanolu, vzorce smo ponovno centrifugirali in supernatant po koncu centrifugiranja zavrgli. Pelet DNA smo nato posušili na zraku in ga raztopili v vodi. Raztopljeno DNA smo shranili na  $4^{\circ}\text{C}$  v hladilniku.

#### Izolacija RNA:

Vodno fazo z RNA smo prenesli v mikrocentrifugirko in dodali izopropanol. Mešanico smo nato inkubirali 10 min pri sobni temperaturi, nato pa jo centrifugirali pri  $4^{\circ}\text{C}$  in hitrosti 12.000 x g, pri čemer je na dnu nastal bel pelet. Supernatant smo odstranili, dodali 75% raztopino etanola, mešanico vorteksirali in nato centrifugirali pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo ponovno odlili, ostanek pa posušili v eksikatorju. Suh vzorec smo raztopili v sterilni vodi in ga shranili na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Genotipizacija izbranih polimorfizmov

Genotipizacija naših vzorcev je obsegala tri tehnike in sicer verižno reakcijo s polimerazo oz. PCR (ang. polymerase chain reaction), analiza talilne krivulje visoke ločljivosti (HRM, ang. za high resolution melting) ter gelsko elektroforezo za SNP rs4880, medtem ko smo podatke za SNP rs1001179 pridobili iz banke genotipov Centra za humano molekularno genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru.

PCR je tehnika, kjer z encimom polimeraza, začetnimi oligonukleotidi, prostimi nukleotidi in toplotnim ciklizatorjev eksponentno podvajamo našo DNA oz. njen odsek. Sama reakcija poteka v večih ciklih, vsak cikel pa ima tri korake – prvi je denaturacija, kjer dvignemo temperaturo na okoli 95°C, saj se pri tej temperaturi vodikove vezi v dvojni vijačnici prekinajo, nato se temperatura zniža in se na posamezno verigo vežejo začetni oligonukleotidi. Temperatura se nato spet dvigne na 72°C in encim polimeraza poišče mesto, kjer so se na verigo vezali začetni nukleotidi ter prične z izgradnjo komplementarne verige s tem, da dodaja proste nukleotide v smeri 5' proti 3'. Ti koraki se ponovijo 30 do 40 krat (Garibyan & Avashia, 2014). HRM je tehnika, kjer s postopnim gretjem DNA povzročimo prekinitev vezi med verigama DNA. Pri HRM merimo v realnem času kdaj se prekinitev vezi zgodi z uporabo fluorescentnih barvil, ki se povežejo z dvojno vijačno DNA in pri tem fluorescirajo. Ko se dvojne vezi med DNA prekinajo pri določeni temperaturi, barvilo neha fluorescirati. Signal merimo s pomočjo aparature za PCR v realnem času (qPCR). Jakost fluorescence v realnem času izpiše v obliki grafa oz. talilne krivulje, iz katere lahko ugotovimo genotip vzorca.

Gelska elektroforeza je tehnika, s katero lahko ločimo posamezne dele makromolekul (DNA, RNA in proteine) glede na njihovo velikost in naboj (Lee et al., 2012). Za gelsko elektroforezo smo pripravili 2% agarozni gel, narejen iz agaroze, pufru TBE<sup>27</sup> in vode. Vse skupaj smo pomešali v erlenmajerici in segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se ni vsa agarosa raztopila. V to raztopino agaroze smo dodali še barvilo – etidijev bromid, da smo lahko produkte PCR nadalje vizualizirali pod UV lučjo. Celotno raztopino smo nato vlili v modele in dodali glavničke, ki so naredili žepke, v katere bomo lahko nanegli naše vzorce. Ko se je gel strdil, smo ga položili v elektroforezno kadičko s TBE pufrom, v žepke smo nanegli vzorce, ki smo jih obarvali z barvilom in dodali tudi velikostni standard<sup>28</sup> ter skozi gel spustili električni tok (120 V). Gel smo v aparaturi pustili približno 20 do 30 minut, nato smo ga poslikali pod UV svetlobo.

Iz slik smo nato ugotavljali uspešnost PCR reakcije ter vzorce genotipizirali glede na velikost nastalega produkta. Pomagali smo si z velikostnim standardom, ki nam je povedal približno velikost produkta.

---

<sup>27</sup> TBE – pufer, ki vsebuje Tris bazo, borovo kislino in EDTA

<sup>28</sup> Velikostni standard – skupek fragmentov DNA z znano velikostjo

### 3.1.5 Merjenje izražanja genov – Real-time PCR

Za merjenje izražanja genov smo najprej izolirano RNA prepisali v komplementarno cDNA z reverzno transkripcijo. Izražanje genov smo zmerili na vzorcih bolnikov pred začetkom terapije z adalimumabom. Ekspresijo smo izmerili s tehniko kvantitativnega PCR v realnem času (qPCR).

Reverzna transkripcija je metoda, s katero lahko mRNA prepíšemo v komplementarno cDNA. To smo storili z uporabo kompleta za reverzno transkripcijo High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™). V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1 µg izolirane RNA ter dodali še pufer, mešanico dNTP-jev, encim reverzno transkriptazo, začetne oligonukleotide in sterilno vodo, tako kot je navedeno v protokolu proizvajalca. Reverzna transkripcija je potekala po naslednjem protokolu:

- 10 min pri 25°C
- 120 min pri 37°C
- 5 sekund pri 85 °C.

Vzorci nastale cDNA smo nato 20x razredčili ter jih napipetirali na plošče za qPCR. Reakcijo smo izvedli z uporabo LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) in pripadajočimi začetnimi oligonukleotidi (Tabela 3). V aparaturi je potekla PCR reakcija, pri tem pa smo po vsakem ciklu spremljali oddano fluorescenco. Reakcija je potekala po naslednjem temperaturnem programu na aparaturi LightCycler 480 (Roche):

- začetna denaturacija: 95 °C, 10 min
- pomnoževanje: 40 ciklov
  - 95 °C, 15 s
  - 53°C, 30 s (*CAT*) oz. 60°C, 30 s (*SOD2* in *B2M*)
  - 72 °C, 30 s
- taljenje visoke ločljivosti:
  - 95 °C, 10 s
  - 65 °C, 1 min
  - do 97 °C v koraku 5 °C
- hlajenje: 40 °C, 10 s

Na začetku produkt fluorescira šibkeje kot ozadje, v nekem trenutku pa preseže fluorescenco ozadja – preseže prazno vrednost. Temu sledi faza pomnoževanja in nato faza platoja – pomnoževanje se tukaj konča. Ker smo v vsakem ciklu izmerili fluorescenco produkta, dobimo po reakciji graf odvisnosti fluorescence od števila ciklov – amplifikacijska krivulja.

#### Postopek izračuna izražanja genov:

Izražanje genov smo določili z metodo relativne kvantifikacije, kjer tarčni gen kvantificiramo relativno na referenčni gen, ki se konstantno izraža v vseh celicah. Ta metoda, imenovana tudi  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metoda (Livak & Schmittgen, 2001), se uporablja za izračun relativnih sprememb v izražanju genov, ki jih določimo iz qPCR reakcije. Pri izračunu potrebujemo vrednost Ct (ang. threshold cycle – prazna vrednost). Izražanje smo izračunali po naslednjih korakih. Izračunamo razliko med Ct(tarčni gen) in Ct(referenčni gen), kar predstavlja vrednost  $\Delta Ct$ . Kot kalibrator smo uporabili povprečno vrednost vseh meritev, tako da smo v naslednjem koraku izračunali vrednost  $\Delta\Delta Ct$  kot razliko med  $\Delta Ct$  in povprečni  $\Delta Ct$ . Relativno količino izražene genov smo nato izrazili kot  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **3.1.6 Statistična obdelava podatkov**

Podatke smo statistično obdelali s programskim paketom SPSS (verzija 26). S tem programom lahko opravljamo razne statistične analize npr. korelacijske in regresijske metode, opisno statistične metode in še druge. S SPSS programom smo analizirali rezultate genotipizacije in ekspresije genov. Za asociacijsko analizo smo uporabili Fisherjev natančni test. Za vsak SNP smo tako dobili p-vrednost in razmerje obetov (OR). Nivo izražanja genov smo ovrednotili z neparametričnim Mann-Whitney U testom.

## 4 REZULTATI

V okviru naloge smo analizirali 89 bolnikov s CD, za katere smo genotipizirali dva izbrana SNP-ja ter izmerili izražanje izbranih genov OS, ter oboje korelirali z odzivom na anti-TNF terapijo z ADA, ki smo ga določili s pomočjo vprašalnika IBDQ.

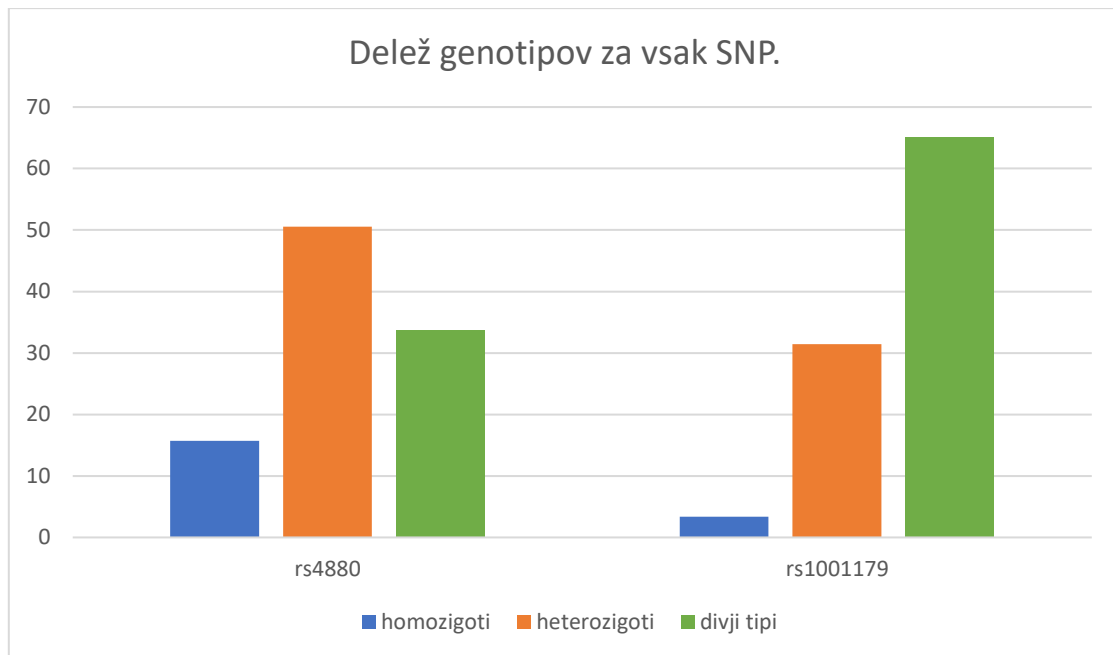
### 4.1 Vpliv genotipov izbranih SNP-jev na odziv na anti-TNF terapijo

Uspešno smo genotipizirali 89 posameznikov, rezultati genotipizacije za oba SNP-ja pa se skladajo z evropskim povprečjem. Rezultati genotipizacije za SNP-ja rs4880 in rs1001179 pri slovenskih bolnikih s CD so predstavljeni v Tabeli 4 ter Grafu 1. Frekvence genotipov so bile za oba analizirana SNP-ja v Hardy-Weinbergovem ravnovesju.

Tabela 4: Porazdelitev frekvenc genotipov in alelov izbranih SNP-jev pri analiziranih bolnikih s CD

SNP ID	Gen	Število uspešno genotipiziranih posameznikov	Genotipi			Alela	
			Homozigoti	Heterozigoti	Divji tip	C	T
rs4880	SOD2	89	CC	CT	TT	C	T
			14 (15.73%)	45 (50.56%)	30 (33.70%)	41%	59%
rs1001179	CAT	89	AA	AG	GG	A	G
			3 (3.37%)	28 (31.46%)	58 (65.17%)	19.1%	80.1%

Graf 1: Delež genotipov za vsak SNP



Analizirali smo povezavo med genotipom izbranih SNP-jev in odzivom na anti-TNF terapijo. Odziv smo določili na podlagi točk, doseženih po izpolnitvi IBDQ vprašalnika in sicer smo odziv pripisali tistim, ki so dosegli število točk vprašalnika nad 170, ali pa je bila razlika med IBDQ točkami pred začetkom zdravljenja ter po določenem tednu zdravljenja večja od 22 (delta IBDQ). Če tega niso dosegli, smo tem pripisali neodziv. Nadalje smo analizirali povezavo med genotipi izbranih SNP-jev in odzivom glede na vrednosti IBDQ in delta IBDQ.

#### 4.1.1 SNP rs4880

Za SNP rs4880 je bilo skupno genotipiziranih 89 vzorcev, od katerih je bilo 14 homozigotov, 45 heterozigotov in 30 posameznikov z divjim tipov (Tabela 4 in Graf 1). V Tabeli 5 je prikazano število odzivnikov in neodzivnikov glede na genotip SNP-ja ter statistična analiza, narejena za genotipske modele (recesivni in dominantni model). Statistično signifikantne povezave tukaj nismo uspeli dokazati, smo pa opazili slabši odziv pri posameznikih z divjim tipom (genotip TT) v 4. tednu po začetku zdravljenja ADA za ta SNP.

Pri analizi glede na vrednosti IBDQ in delta IBDQ zaradi majhnega števila analiziranih posameznikov statistično signifikantne povezave nismo ugotovili, smo pa opazili trend, da alel C oz. genotip CC in CT pripomorejo k boljšemu tako kratkoročnemu (po 4. tednih zdravljenja)

kot dolgoročnemu (po 30. tednih zdravljenja) odzivom na anti-TNF terapijo. Rezultati te analize so prikazani v Tabeli 7 in Grafih 2, 3, 4 in 5.

#### **4.1.2 SNP rs1001179**

Za SNP rs1001179 je bilo skupno genotipiziranih 89 vzorcev, od katerih so 3 bili homozigoti, 28 jih je bilo heterozigotov in 58 divjih tipov (Tabela 4 in Graf 1). V Tabeli 5 je prikazano število odzivnikov in neodzivnikov za ta SNP glede na genotip ter statistična analiza, narejena za genotipske modele (recesivni in dominantni model). Dokazali nismo nobene statistično signifikantne povezave, vendar smo opazili, da imajo divji tipi in heterozigoti rahlo boljši odziv na terapijo kot homozigoti, vendar zaradi zelo majhnega števila homozigotov, tega ne moremo potrditi. Nadalje smo naredili še analizo glede na vrednosti IBDQ in delta IBDQ. Analiza je prikazana v Tabeli 8 ter Grafih 6 in 7. Statistično signifikantne povezave ali trendov nismo opazili.

Tabela 5: Število odzivnikov in neodzivnikov glede na genotip SNP-ja rs4880 po tednih ter statistična analiza.

			odzivniki	neodzivniki	odzivniki	neodzivniki	odzivniki	neodzivniki	odzivniki	neodzivniki
		0. teden	4. teden		12. teden		20. teden		30. teden	
SNP	Genotip	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
rs4880	CC	14 (15.7%)	10 (71.43%)	4 (28.57%)	8 (66.67%)	4 (33.33%)	7 (63.64%)	4 (36.36%)	9 (81.82%)	2 (18.18%)
	CT	45 (50.6%)	29 (67.44%)	14 (32.56%)	32 (74.42%)	11 (25.58%)	23 (69.70 %)	10 (30.30%)	27 (79.41%)	7 (20.59%)
	TT	30 (33.7%)	13 (54.17%)	11 (45.83%)	14 (63.64%)	8 (36.36%)	14 (70%)	6 (30%)	16 (72.73%)	6 (27.27%)
CC+CT proti TT		p	0.310		0.582		1.000		0.542	
		OR	0.545		0.656		1.089		0.667	
		95% CI	0.205-1.451		0.229-1.879		0.346-3.431		0.203-2.189	
CC proti CT+TT		p	0.760		0.744		0.728		1.000	
		OR	0.672		1.211		1.321		0.735	
		95% CI	0.190-2.371		0.325-4.504		0.339-5.155		0.141-3.839	

Tabela 6: Število odzivnikov in neodzivnikom glede na genotip SNP-ja rs1001179 po tednih ter statistična analiza.

			odzivniki	neodzivniki	odzivniki	neodzivniki	odzivniki	neodzivniki	odzivniki	neodzivniki
		0. teden	4. teden		12. teden		20. teden		30. teden	
SNP	Genotip	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
rs1001179	AA	3 (3.4%)	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	/	1 (33.33%)	2 (66.67%)	2 (100%)	/
	AG	28 (31.5%)	18 (72%)	7 (28%)	16 (66.67%)	8 (33.33%)	13 (61.90%)	8 (38.10%)	15 (68.18%)	7 (31.82%)
	GG	58 (65.2%)	33 (61.11%)	21 (38.89%)	36 (72%)	14 (28%)	30 (75%)	10 (25%)	35 (81.40%)	8 (18.60%)
AA+AG proti GG		p	0.469		0.795		0.178		0.368	
		OR	0.662		1.286		2.143		1.801	
		95% CI	0.246-1.1782		0.468-3.532		0.726-6.323		0.560-5.794	
AA proti AG+GG		p	1.000		1.000		0.228		1.000	
		OR	1.821		1.182		4.778		1.040	
		95% CI	0.110-30.250		0.102-13.718		0.407-56.075		0.985-1.098	



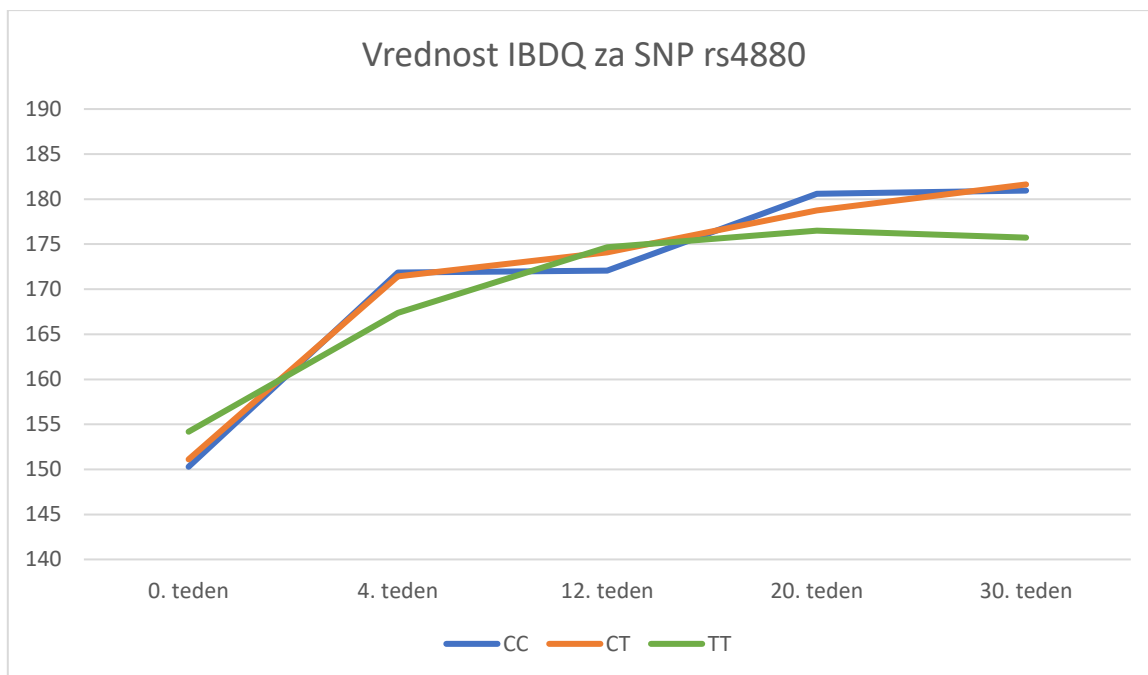
Tabela 7: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs4880.

rs4880			IBDQ	IBDQ	delta IBDQ	IBDQ	delta IBDQ	IBDQ	delta IBDQ	IBDQ	delta IBDQ
			0. teden	4. teden		12. teden		20. teden		30. teden	
		CC	150.29	171.86	21.57	172.07	21.9	180.61	29.79	180.95	29.77
		CT	151.11	171.44	20.09	174.09	24.23	178.74	24.95	181.63	31.19
		TT	154.18	167.36	12.29	174.67	14.84	176.5	14.55	175.72	16.29
	<i>CC + CT vs TT</i>	p-vrednost	0.737	0.605	0.162	0.866	0.262	0.524	0.214	0.526	0.091
	<i>TT + CT vs CC</i>	p-vrednost	0.720	0.662	0.339	0.720	0.983	0.557	0.520	0.832	0.868
	<i>C vs. T</i>	p-vrednost	0.678	0.566	0.155	0.768	0.467	0.458	0.244	0.588	0.227

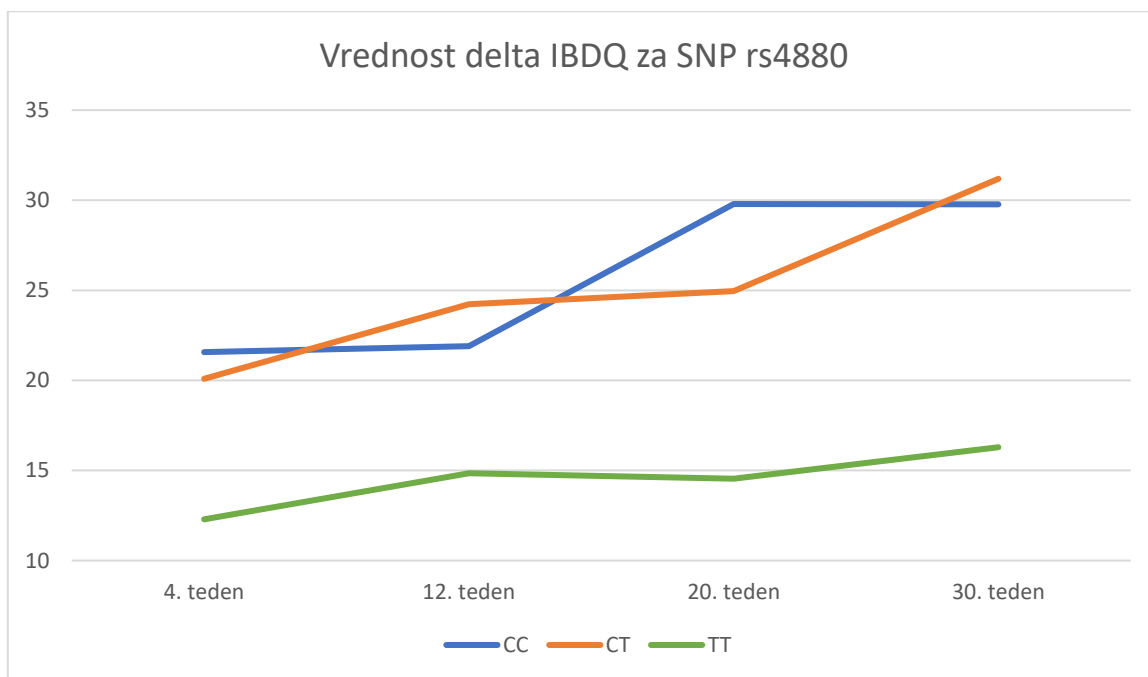
Tabela 8: Vrednosti IBDQ in delta IBDQ glede na genotip po tednih zdravljenja ter statistična analiza za SNP rs1001179.

rs1001179			IBDQ	IBDQ	delta IBDQ	IBDQ	delta IBDQ	IBDQ	delta IBDQ	IBDQ	delta IBDQ
			0. teden	4. teden		12. teden		20. teden		30. teden	
		AA	148	179.17	26.17	174.22	26.22	162	14	185.5	32.5
		AG	147.89	169.92	22.64	168.21	21.54	173.55	24.35	177.15	31.3
		GG	154.41	170.15	15.66	176.68	20.83	182.11	22.46	180.54	23.6
	<i>AA + AG vs GG</i>	p-vrednost	0.450	0.920	0.270	0.420	0.820	0.147	0.808	0.189	0.450
	<i>GG + AG vs AA</i>	p-vrednost	0.667	0.808	0.517	0.782	0.631	0.341	0.561	0.883	0.569
	<i>A vs G</i>	p-vrednost	0.429	0.875	0.251	0.433	0.718	0.116	0.673	0.277	0.408

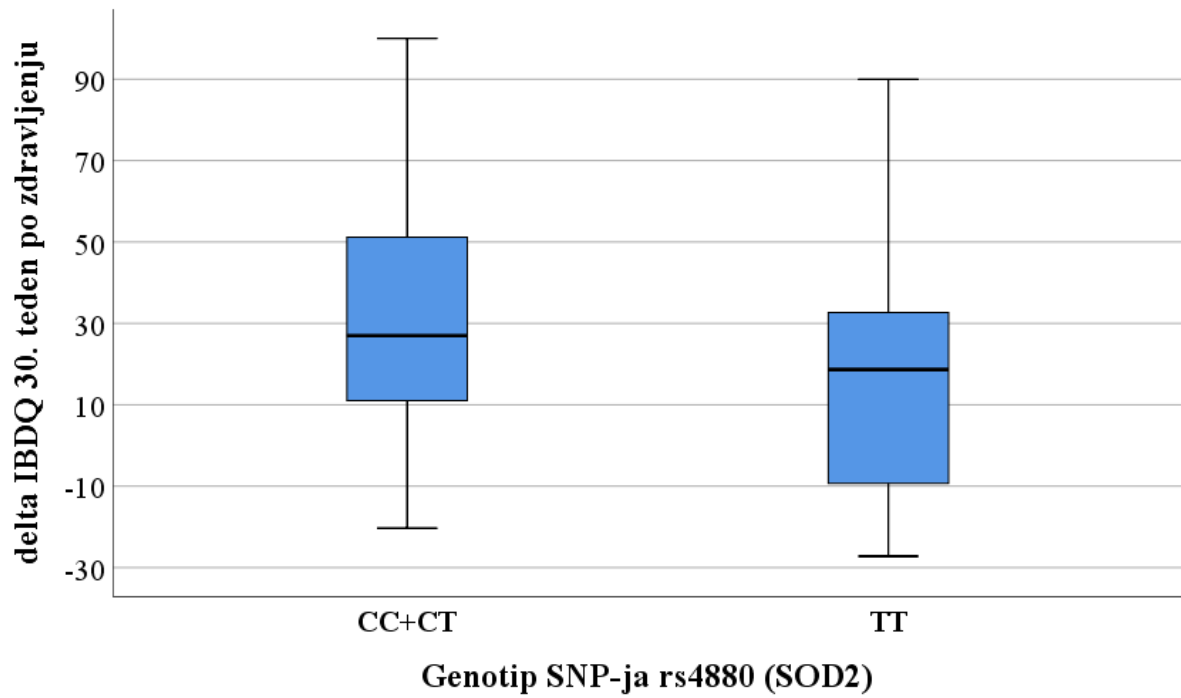
Graf 2: Vrednost IBDQ za SNP rs4880.



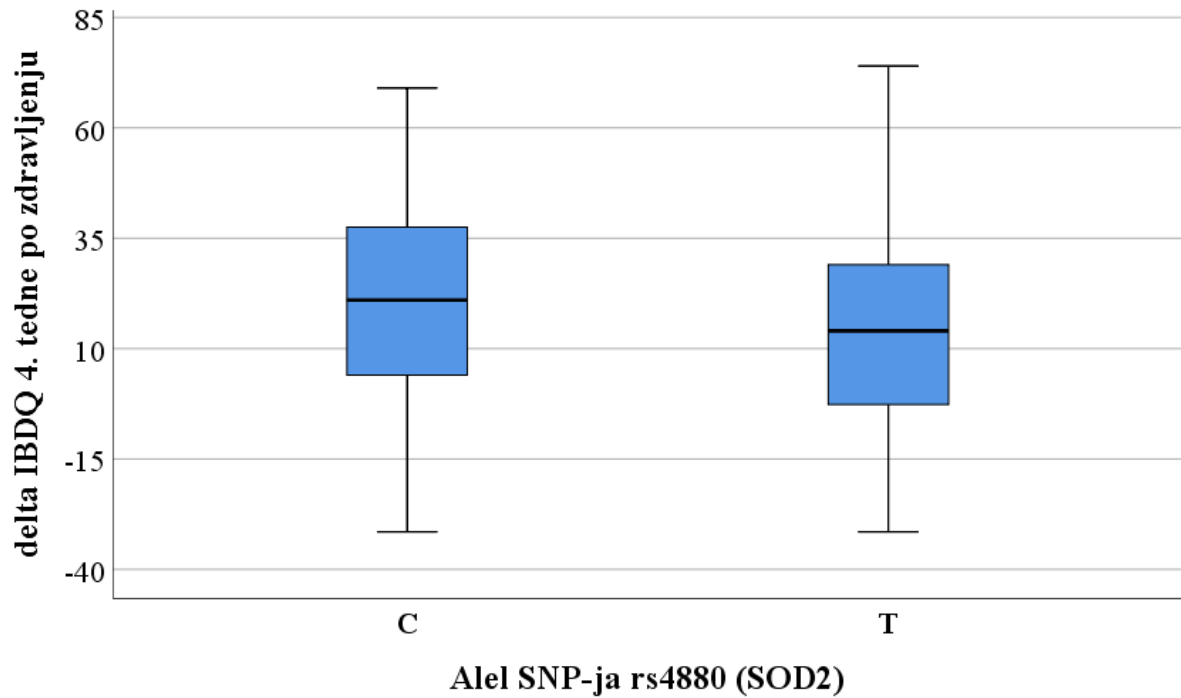
Graf 3: Vrednost delta IBDQ za SNP rs4880.



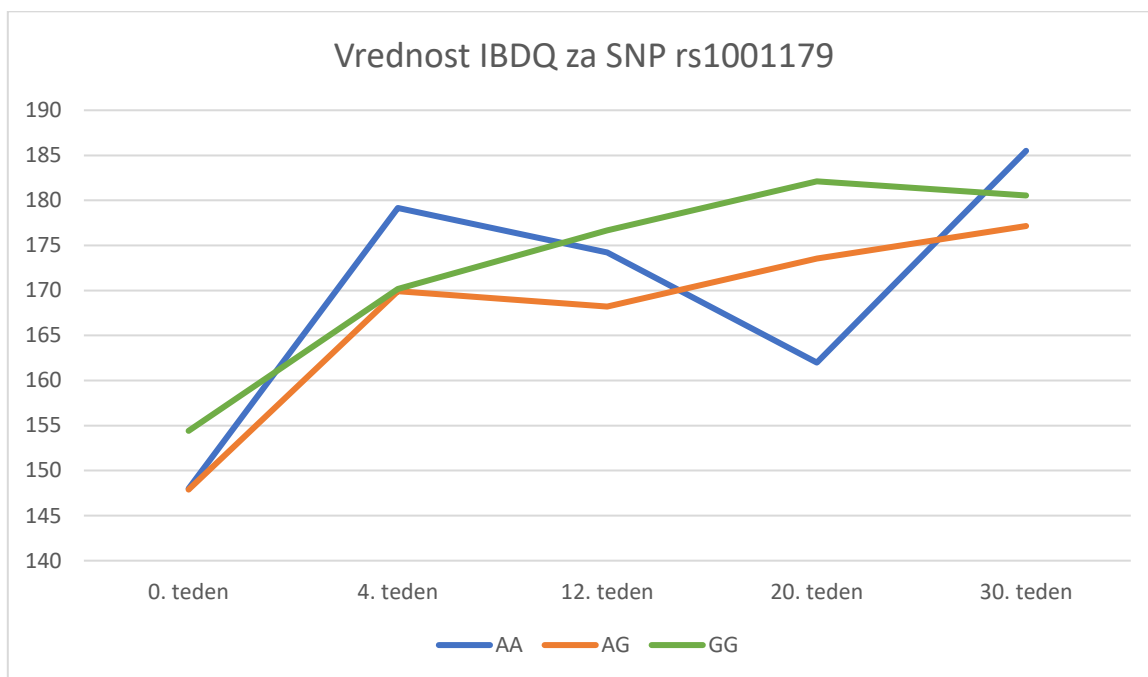
Graf 4: Vrednost deltaIBDQ v 30. tednu po zdravljenju glede na genotip SNP-ja rs4880.



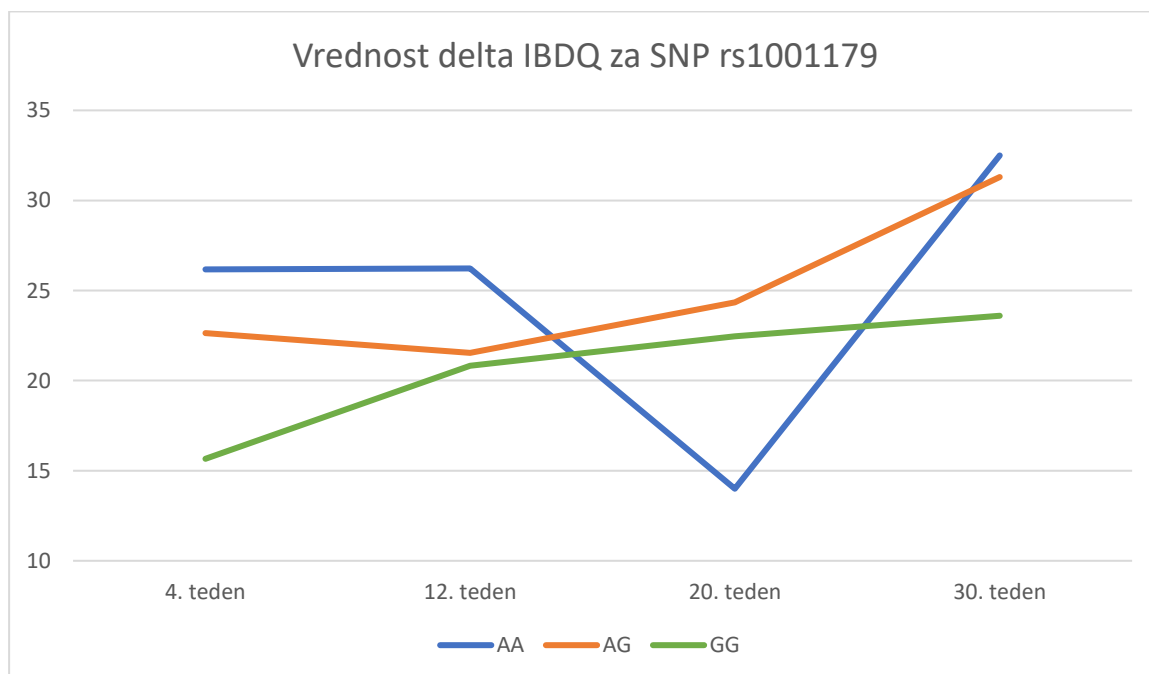
Graf 5: Vrednost deltaIBDQ v 4. tednu po zdravljenju glede na alel SNP-ja rs4880.



Graf 6: Vrednost IBDQ za SNP rs1001179.



Graf 7: Vrednost delta IBDQ za SNP rs1001179.



## 4.2 Vpliv izražanje genov na odgovor na anti-TNF terapijo

Izražanje genov smo izmerili v krvnih limfocitih bolnikov s Crohnovo boleznijo pred aplikacijo anti-TNF terapije. Mediana izražanja obeh genov pred terapijo je prikazana v Tabeli 9.

Tabela 9: Mediana ekspresije genov pred terapijo.

<i>Gen</i>	Mediana ekspresije pred terapijo
<i>SOD2</i>	1.041
<i>CAT</i>	1.134

### 4.2.1 Izražanje genov glede na IBDQ vrednost pred zdravljenjem

Da bi ugotovili povezavo med izražanjem genov in obliko bolezni, torej kako močne simptome imajo bolniki, smo jih razdelili na dve skupini, in sicer na tiste, ki so imeli IBDQ vrednost pred anti-TNF terapijo višjo od 170 in tiste, ki so imeli IBDQ vrednost pred anti-TNF terapijo nižjo od 170. Prva skupina je predstavljala bolnike z blažjo obliko bolezni, druga pa bolnike z resnejšo obliko.

#### 4.2.1.1 Izražanje *SOD2* gena

Pri primerjavi izražanja gena *SOD2* z IBDQ vrednostjo bolnikov pred zdravljenjem smo ugotovili, da imajo bolniki z višjo ekspresijo gena načeloma blažjo obliko bolezni, bolniki z nižjo ekspresijo pa hujšo obliko. Mediana ekspresije bolnikov je prikazana v Tabeli 10 ter v Grafu 8. Tukaj smo se uspeli približati statistično signifikantni p-vrednosti ( $p = 0.147$ ).

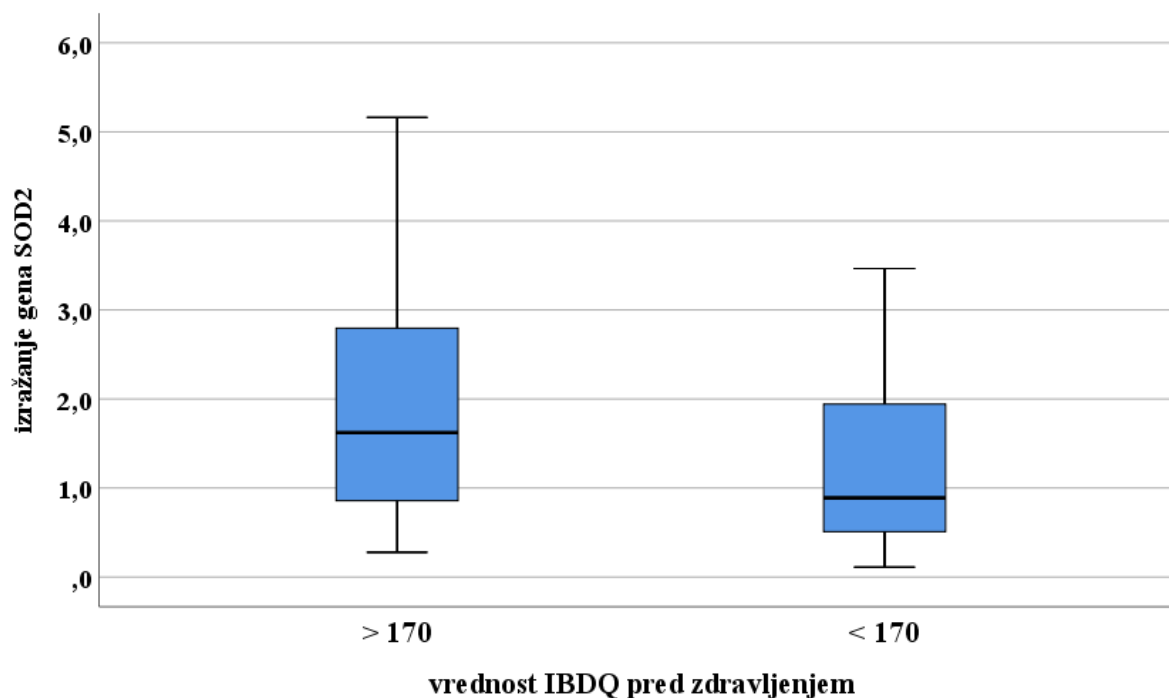
#### 4.2.1.2 Izražanje *CAT* gena

Podobno kot za *SOD2* gen smo tudi tukaj opazili, da je višja ekspresija gena *CAT* povezana z blažjo obliko bolezni, nižja ekspresija pa s hujšo obliko, kljub temu pa nismo uspeli doseči statistično signifikantne razlike ( $p = 0.231$ ). Mediana ekspresije je prikazana v Tabeli 10.

Tabela 10: Mediana ekspresije obeh genov glede na IBDQ vrednost.

Gen	IBDQ >170	IBDQ <170
<i>SOD2</i>	1.578	1.104
<i>CAT</i>	1.599	1.015

Graf 8: Izražanje gena *SOD2* glede na vrednost IBDQ pred zdravljenjem.



#### 4.2.2 Izražanje genov glede na odziv na anti-TNF terapijo v 4. tednu

Nadalje smo analizirali povezavo med izražanjem izbranih genov in odzivom na terapijo. Pri posameznikih z boljšim odzivom na anti-TNF terapijo po 4. tednih zdravljenja smo ugotovili nižjo ekspresijo obeh genov pred zdravljenjem.

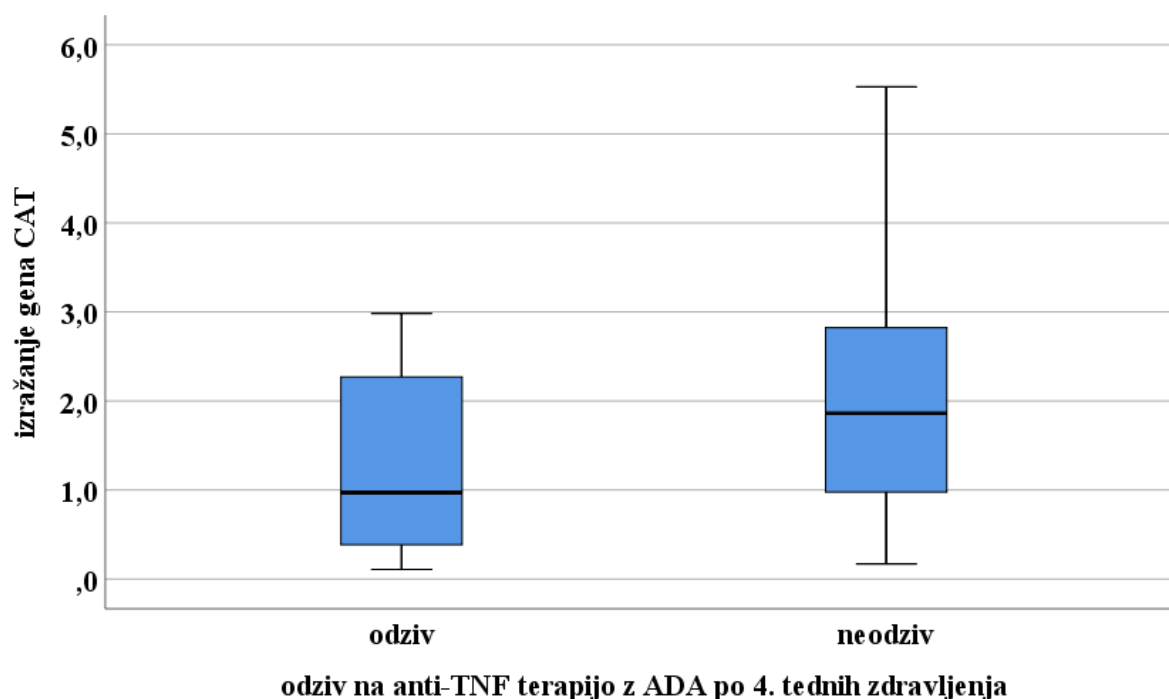
##### 4.2.2.1 Izražanje *SOD2* gena

Bolniki z nižjo ekspresijo *SOD2* gena pred zdravljenjem so imeli 4 tedne po začetku zdravljenja boljši odziv v primerjavi z bolniki z višjo ekspresijo. Vrednosti mediane ekspresije so podane v Tabeli 11.

#### 4.2.2.2 Izražanje *CAT* gena

Bolniki, ki so imeli nižjo ekspresijo *CAT* gena pred zdravljenjem so prav tako imeli 4 tedne po začetku zdravljenja boljši odziv na terapijo v primerjavi z bolniki z višjo ekspresijo ( $p = 0.154$ ). Vrednosti mediane ekspresije so podane v Tabeli 11 in Grafu 9

Graf 9: Izražanje gena *CAT* glede na odziv oziroma neodziv na anti-TNF terapijo po 4 tednih zdravljenja.<sup>29</sup>



#### 4.2.3 Izražanje genov glede na odziv na anti-TNF terapijo v 30. tednu

Za oba gena smo zasledili povezavo med ekspresijo genov in dolgoročnim odzivom na anti-TNF terapijo po 30. tednih.

##### 4.2.3.1 Gen *SOD2*

Ekspresija gena *SOD2* je bila pri bolnikih, ki so se na anti-TNF terapijo po 30. tednih dobro odzvali, znatno višja kot pri bolnikih, ki se nanjo niso. Rezultati median so predstavljeni v Tabeli 11.

<sup>29</sup> ADA je krajšava za adalimumab

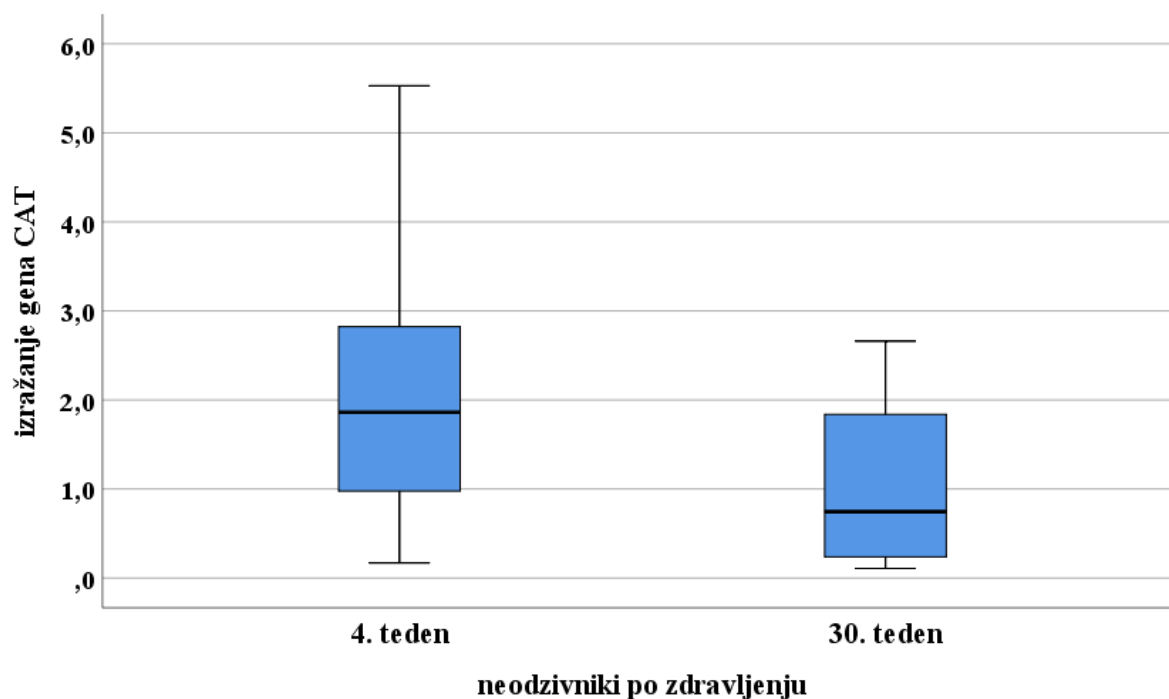
#### 4.2.3.2 Gen CAT

Podobno kot pri genu *SOD2* je bila ekspresija gena *CAT* tudi višja pri bolnikih, ki so se na anti-TNF terapijo dobro odzvali, kot pri bolnikih, ki se nanjo niso. Mediane ekspresije genov so podane v Tabeli 11, primerjava ekspresije gena *CAT* pri neodzivnikih v 4. tednu in 30. tednu pa v Grafu 10.

Tabela 11: Mediana ekspresij genov v 4. in 30. tednu po pričetku anti-TNF terapije.

	Ekspresija gena <i>SOD2</i> po 4. tednih	Ekspresija gena <i>SOD2</i> po 30. tednih	Ekspresija gena <i>CAT</i> po 4. tednih	Ekspresija gena <i>CAT</i> po 30. tednih
<i>Odzivniki</i>	0.906	1.283	0.971	1.427
<i>Neodzivniki</i>	1.607	0.881	1.862	0.744

Graf 10: Primerjava ekspersije genov pri neodzivnikih na anti-TNF terapijo v 4. in 30. tednu po pričetku zdravljenja.





## 5 RAZPRAVA

V raziskovalni nalogi smo analizirali vpliv izražanja dveh genov oksidativnega stresa ter njunih polimorfizmov na odziv na anti-TNF terapijo z ADA pri slovenskih bolnikih s CD. Analizirali smo SNP rs1001179 na genu *CAT*, SNP rs4880 na genu *SOD2* ter ekspresijo teh dveh genov. Pomembnejših statistično značilnih povezav med SNP-ji in odzivom na anti-TNF terapijo zaradi majhnega števila analiziranih posameznikov nismo ugotovili, smo pa zasledili očiten vpliv ekspresije genov *CAT* in *SOD2* na odziv na anti-TNF terapijo, saj so imeli bolniki z višjo ekspresijo genov *CAT* in *SOD2* pred terapijo boljši dolgoročni odziv na terapijo.

### 5.1 SNP rs4880

Za SNP rs4880 smo uspešno genotipizirali 89 posameznikov. Frekvence genotipov za analiziran SNP so znašale 14.43% za genotip CC, 46.39% za genotip CT in 30.93% za genotip TT, ter so primerljive z evropskim povprečjem.

Za SNP rs4880 nismo uspeli dokazati statistično signifikantne povezave, vendar smo opazili, da so kljub primerljivim začetnim vrednostim IBDQ med vsemi genotipi, imeli bolniki z genotipom TT skozi celotno 30. tedensko opazovalno obdobje zdravljenja z anti-TNF terapijo, nižje delta IBDQ vrednosti in posledično slabši odziv v primerjavi z bolniki z genotipom CC ali CT (Tabela 7 in Grafa 4 & 5). To bi lahko nakazovalo na morebitno vlogo alela C kot biomarkerja za boljšo odzivnost na anti-TNF terapijo. Študij, ki bi raziskovale povezavo med tem SNP-jem in odzivnostjo na anti-TNF terapijo nismo zasledili. Pred kratkim je bila objavljena študija, ki je raziskovala vpliv SNP-ja rs4880 na odziv na antidepresive, vendar niso našli povezave (Ait Tayeb et al., 2020). Glede na trend, ki smo ga zaznali v naši študiji, to je, da imajo posamezniki z alelom C boljši odziv na anti-TNF terapijo, bi bilo ponovno študijo smiselno napraviti na večjem vzorcu.

### 5.2 SNP rs1001179

Tudi za ta SNP smo uspešno genotipizirali 89 posameznikov. Ker je frekvenca genotipa AA zelo majhna, smo v skupini naših bolnikov imeli izmed vseh posameznikov le 3 (3.4%) posameznike s tem genotipom. Bolnikov z genotipom AG je bilo 28 (31.4%), bolnikov z genotipom GG pa 58 (65.2%). Frekvence genotipov so primerljive z evropskim povprečjem.

Tako kot za SNP rs4880, tudi za SNP rs1001179 statistično signifikantne povezave nismo dokazali, smo pa opazili, da imajo bolniki z genotipom GG višjo IBDQ vrednost pred začetkom zdravljenja, kar bi lahko nakazovalo na možno zaščitno vlogo tega SNP-ja pri CD v smislu blažje oblike bolezni. Zaradi višje začetne vrednosti IBDQ so spremembe v delta IBDQ pri posameznikih z genotipom GG bile sicer manjše kot pri posameznikih z genotipom AG ali AA, a so vrednosti IBDQ v 30. tednu zdravljenja bile primerljive (Tabela 8 in Grafa 6 in 7). V 20. tednu je viden velik upad IBDQ in delta IBDQ za genotip AA (Tabela 8 ter Graf 7), vendar je ta rezultat zaradi majhnega števila tega genotipa nenatančen in irelevanten. Drugih študij, ki bi raziskovale povezavo med tem SNP-jem in odzivnostjo na anti-TNF terapijo nismo zasledili.

### 5.3 Gen *SOD2*

Ekspresijo genov smo izmerili vsem 89 posameznikom pred pričetkom zdravljenja z anti-TNF terapijo. Ugotovili smo več zanimivih povezav in sicer, da je višja ekspresija gena *SOD2* povezana z blažjo obliko same bolezni (Tabela 10 in Graf 8), kar sovpada tudi z rezultati študije Zuo et al., kjer so ugotovili, da lahko citokin TNF $\alpha$  zatre gen *SOD2*, kar posledično pomeni, da imajo bolniki s hujšo obliko bolezni, k čemu spada tudi višja količina TNF $\alpha$ , nižjo ekspresijo samega gena (mediani sta 1.578 za blažjo in 1.104 za hujšo obliko). Druga zanimiva povezava je, da imajo posamezniki z boljšim odzivom na anti-TNF terapijo po 4. tednih zdravljenja nižjo ekspresijo gena *SOD2* pred zdravljenjem (mediana = 0.906). Ugotovitev je smiselna, saj imajo posamezniki z nižjim izražanjem gena *SOD2* opaženo hujšo obliko bolezni, zato je po pričetku terapije večja verjetnost za izboljšanje (Tabela 11). Tretja zanimiva povezava, ki smo jo odkrili je, da imajo boljši odzivniki po 30. tednih zdravljenja višjo ekspresijo gena *SOD2* pred zdravljenjem (mediana = 1.283) v primerjavi z neodzivniki na anti-TNF terapijo (mediana = 0.881) (Tabela 12). To nakazuje na možno vlogo tega gena pri pozitivnem dolgoročnem odzivu na zdravljenje.

### 5.4 Gen *CAT*

Tudi za gen *CAT* smo ekspresijo izmerili vsem 89 posameznikom pred pričetkom zdravljenja z anti-TNF terapijo. Povezave med ekspresijo tega gena in odzivom na anti-TNF terapijo so bile podobne kot pri genu *SOD2*, le da smo opazili povprečno višjo ekspresijo tega gena. Tako kot pri genu *SOD2*, smo tudi za gen *CAT* opazili, da je višja ekspresija tega gena povezana z blažjo

obliko bolezni (mediani sta 1.599 za blažjo in 1.015 za hujšo obliko) (Tabela 10). Tudi v 4. tednu po pričetku zdravljenja smo opazili podobne rezultate kot pri genu *SOD2*, in sicer bolniki z nižjo ekspresijo gena *CAT* pred zdravljenjem (mediana = 0.971) so se na terapijo odzvali bolje kot bolniki z višjo ekspresijo gena *CAT* (mediana = 1.862) (Tabela 11 in Graf 9). Rezultati v 30. tednu po pričetku anti-TNF terapije spet sovpadajo z rezultati gena *SOD2* in namigujejo na povezavo med bolniki z višjo ekspresijo gena (mediana = 1.427) in boljšim dolgoročnim odzivom na terapijo.

## 6 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Raziskovalne inštitucije, kot sta Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo in Medicinska fakulteta imata velik vpliv na družbo, saj v svojem izobraževalnem in raziskovalnem delu obravnavata pomembne družbene probleme ter jih poskušata reševati na družbeno-odgovoren način. S tem poskušata lajšati probleme današnjega modernega sveta, kar je nam, kot prebivalcem, v interes. Pri svojem delu se morajo takšne inštitucije zavedati tudi svojega vpliva na okolje in se morajo ravnati kar se le da okolju prijazno.

Pri nalogi smo se specifično dotaknili medicinskega področja, natančneje personalizirane medicine, ki bo v prihodnosti omogočala bolj ekonomičen in učinkovit pristop zdravljenja Crohnove bolezni. Rezultati raziskav kot je ta pripomorejo k razvoju kvalitetnih in klinično uporabnih diagnostičnih bioznačevalcev, ki bodo pripomogli k učinkovitejšemu zdravljenju bolnikov, preprečevanju hudih poslabšanj bolezni in stranskih učinkov, zmanjšanemu izostanku iz šole oz. z dela ter zmanjšanju stroškov zdravljenja. Pripomogli bodo tudi pri razumevanju vpliva oksidativnega stresa za anti-TNF terapijo in s tem k boljši optimizaciji zdravljenja.

## 7 ZAKLJUČEK

Namen naše raziskovalne naloge je bil poiskati povezavo med SNP-ji izbranih genov oksidativnega stresa ter njihovo ekspresijo in odzivnostjo na anti-TNF terapijo pri bolnikih s Crohново boleznijo. To povezavo smo ugotavljali z genotipizacijo SNP-jev, z merjenjem ekspresije genov in določanjem odziva na anti-TNF terapijo z uporabo IBDQ vprašalnika.

Ugotovili smo, da C alel SNP-ja rs 4880 na genu *SOD2* prispeva k boljšemu odzivu na anti-TNF terapijo ter da je GG genotip SNP-ja rs1001179 na genu *CAT* povezan z blažjim potekom same Crohnove bolezni. Teh povezav statistično nismo mogli potrditi, delno zaradi majhnega števila vzorcev, kot tudi same frekvence izbranih polimorfizmov v slovenski populaciji, smo pa kljub temu zaznali zanesljiv trend, ki bi ga bilo smiselno preveriti na večjem številu vzorcev.

Pri analizi ekspresiji genov *SOD2* in *CAT* glede na odziv na zdravljenje z anti-TNF terapijo v obdobju 30 tednov, smo ugotovili, da se bolniki z nižjo ekspresijo obeh genov pred pričetkom zdravljenja bolje odzovejo na anti-TNF terapijo na krajši rok, bolniki z višjo ekspresijo pa bolje na dolgi rok.

Ugotovitve raziskovalne naloge nakazujejo na pomemben vpliv genov oksidativnega stresa in njihovih polimorfizmov na potek Crohnove bolezni in na odgovor na biološko anti-TNF terapijo ter posledično pomembno prispevajo k razvoju personalizirane medicine, s katero bomo v prihodnosti lahko prilagodili terapijo na posameznika oz. na njegov genotip, ter s tem izboljšali kvaliteto življenja bolnikov s Crohново boleznijo in tudi bolnikov s sorodnimi boleznimi.

V teku raziskovalne naloge smo uspeli nakazati možnost potrditve prvih treh hipotez, četrte in pete hipoteze pa nismo uspeli potrditi.

Študije, ki bi raziskovale vpliv genov oksidativnega stresa na odziv na biološko terapijo, niso na voljo. Zato naši rezultati, kljub statistično ne signifikantnim povezavam, nakazujejo na potrebno po nadaljnjih raziskavah vpliva genov oksidativnega stresa na biološko anti-TNF terapijo.

## 8 VIRI IN LITERATURA

Ait Tayeb, AEK., Becquemont, L., El-Asmar, K., Mahmoudi, K., Colle, R., Trabado, S., Gressier, F., Feve, B., Corruble, E., & Verstuyft, C. (2020). SOD2 genetic polymorphism (rs4880) has no impact on 6-month response to antidepressant treatment and inflammatory biomarkers in depressed patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2020 Jan 6. doi: 10.1111/bcpt.13385.

Alberts, B, Johnson A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K, Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Fourth ed.). New York: Garland Science. ISBN: 978-0-8153-3218-3.

Al-Gubory, K. H., Garrel, C., Faure, P., & Sugino, N. (2012, December). Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reproductive BioMedicine Online*, Vol. 25, pp. 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.08.004>

Alliance, G., & Screening Services, T. N. Y.-M.-A. C. for G. and N. (2009). *Understanding Genetics. In Understanding Genetics: A New York, Mid-Atlantic Guide for Patients and Health Professionals.* Pridobljeno iz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304754>

Alzoghbi, M. A. (2013). Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 19, pp. 6540–6547. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i39.6540>

Bastaki, M., Huen, K., Manzanillo, P., Chande, N., Chen, C., Balmes, J. R., ... Holland, N. (2006). Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and CATalase in humans. *Pharmacogenetics and Genomics*, 16(4), 279–286. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c>

Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2007, May 12). Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, Vol. 369, pp. 1641–1657. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60751-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60751-X)

Becuwe, P., Ennen, M., Klotz, R., Barbieux, C., & Grandemange, S. (2014). Manganese superoxide dismutase in breast cancer: From molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 77, pp. 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.026>

- Betteridge, D. J. (2000). *What is oxidative stress? Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(2 Suppl 1), 3–8. [https://doi.org/10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3)
- Biasi, F., Leonarduzzi, G., Oteiza, P. I., & Poli, G. (2013). *Inflammatory bowel disease: Mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets. Antioxidants and Redox Signaling*, 19(14), 1711–1747. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4530>
- CAT CATalase [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI. (n.d.). Pridobljeno 12. januarja, 2020, od <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=847>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004, January). *Diversity of structures and properties among CATalases. Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 61, pp. 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Choukour, M., Kivits, J., Baker, A., Baumann, C., Guillemin, F., & Peyrin-Biroulet, L. (2019, January 2). *Personalised medicine in inflammatory bowel diseases: a patient survey. Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Vol. 54, p. 135. <https://doi.org/10.1080/00365521.2018.1555280>
- Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., & Cortot, A. (2011). *Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology*, 140(6), 1785-1794.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>
- Crespi, B. J. (2010). *The origins and evolution of genetic disease risk in modern humans. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206(1), 80–109. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05707.x>
- Crohn's disease - Symptoms and causes - Mayo Clinic*. (n.d.). Pridobljeno 11. Januarja, 2020, od <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/crohns-disease/symptoms-causes/syn-20353304>
- Dai, S., & Long, Y. (2015). *Genotyping Analysis Using an RFLP Assay. In Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) (Vol. 1245, pp. 91–99)*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_7)
- Deisseroth, A., & Dounce, A. L. (1970). *CATalase: Physical and chemical properties, mechanism of CATalysis, and physiological role. Physiological Reviews*, Vol. 50, pp. 319–375. <https://doi.org/10.1152/physrev.1970.50.3.319>
- Dröge, W. (2002). *Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews*, Vol. 82, pp. 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

- Dröge, W. (2002). *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiological Reviews*, Vol. 82, pp. 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Ellinghaus, D., Bethune, J., Petersen, B.-S., & Franke, A. (2015). *The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis – status quo and beyond*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 50(1), 13–23. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.990507>
- Fakhoury, M., Negrulj, R., Mooranian, A., & Al-Salami, H. (2014). *Inflammatory bowel disease: Clinical aspects and treatments*. *Journal of Inflammation Research*, Vol. 7, pp. 113–120. <https://doi.org/10.2147/JIR.S65979>
- Feuerstein, J. D., & Cheifetz, A. S. (2017, July 1). *Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management*. *Mayo Clinic Proceedings*, Vol. 92, pp. 1088–1103. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2017.04.010>
- Forsberg, L., Lyrenäs, L., de Faire, U., & Morgenstern, R. (2001). *A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human CATalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood CATalase levels*. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(5), 500–505. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00487-1](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00487-1)
- Freeman, H. J. (2008). *Colorectal cancer risk in Crohn's disease*. *World Journal of Gastroenterology*, 14(12), 1810–1811. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.1810>
- Frei, B. (1994). *Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action*. *The American Journal of Medicine*, 97(3 SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(94)90292-5)
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). *Polymerase chain reaction*. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Genestra, M. (2007, September). *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants*. *Cellular Signalling*, Vol. 19, pp. 1807–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.04.009>
- Georgi, B., Voight, B. F., & Bućan, M. (2013). *From Mouse to Human: Evolutionary Genomics Analysis of Human Orthologs of Essential Genes*. *PLoS Genetics*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003484>
- Gerdes, S. Y., Scholle, M. D., Campbell, J. W., Balázs, G., Ravasz, E., Daugherty, M. D., ... Osterman, A. L. (2003). *Experimental determination and system level analysis of essential*

- genes in *Escherichia coli* MG1655. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5673–5684. <https://doi.org/10.1128/JB.185.19.5673-5684.2003>
- Glasauer, A., & Chandel, N. S. (2014, November 1). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 92, pp. 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.017>
- Goyette, P., Labbé, C., Trinh, T. T., Xavier, R. J., & Rioux, J. D. (2007). Molecular pathogenesis of inflammatory bowel disease: Genotypes, phenotypes and personalized medicine. *Annals of Medicine*, Vol. 39, pp. 177–199. <https://doi.org/10.1080/07853890701197615>
- Hansen, J. M., Go, Y.-M., & Jones, D. P. (2006). NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL COMPARTMENTATION OF OXIDATIVE STRESS AND REDOX SIGNALING. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46(1), 215–234. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141122>
- Harwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
- Ho, F., & Khalil, H. (2015). Crohn's disease: A clinical update. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, Vol. 8, pp. 352–359. <https://doi.org/10.1177/1756283X15592585>
- Hoffmann, M. H., & Griffiths, H. R. (2018, September 1). The dual role of Reactive Oxygen Species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 125, strani 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.016>
- Jacob, F., Monod, J. (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins". *J Mol Biol.* 3 (3): 318–356. doi:10.1016/S0022-2836(61)80072-7. PMID 13718526.
- Johnston, S. L. (2007). Biologic therapies: what and when? *Journal of Clinical Pathology*, 60(1), 8–17. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.032300>
- Joseph Sambrook & David W. Russel (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-576-7.
- Karban, A., Hartman, C., Eliakim, R., Waterman, M., Nesher, S., Barnett-Griness, O., & Shamir, R. (2007). Paraoxonase (PON)1 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(10), 2707–2715. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9700-5>



- Kienhöfer, D., Boeltz, S., & Hoffmann, M. H. (2016). Reactive oxygen homeostasis - the balance for preventing autoimmunity. *Lupus*, 25(8), 943–954. <https://doi.org/10.1177/0961203316640919>
- Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M., & Žák, A. (2014). Human CATalase, its polymorphisms, regulation and changes of Its activity in different diseases. *Folia Biologica (Czech Republic)*, Vol. 60, pp. 153–167. Charles University.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002, November). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantifiCATion. *Toxicologic Pathology*, Vol. 30, pp. 620–650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>
- Kosaka, T., Yoshino, J., Inui, K., Wakabayashi, T., Kobayashi, T., Watanabe, S., ... Watanabe, M. (2009). Involvement of NAD(P)H:Quinone oxidoreductase 1 and superoxide dismutase polymorphisms in ulcerative colitis. *DNA and Cell Biology*, 28(12), 625–631. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0877>
- Lapadula, G., Marchesoni, A., Armuzzi, A., Blandizzi, C., Caporali, R., Chimenti, S., ... Salvarani, C. (2014, January 1). Adalimumab in the Treatment of Immune-Mediated Diseases. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, Vol. 27, pp. 33–48. <https://doi.org/10.1177/03946320140270S103>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62). <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lehninger, A. L. (1982). *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc. ISBN: 0-087901-136-X
- Liu, J. Z., & Anderson, C. A. (2014). Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 28(3), 373–386. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2014.04.009>
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2019). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408
- Loftus, E. V., & Sandborn, W. J. (2002). Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 31(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(01\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(01)00002-4)

- Maehly, A. C. (2006). *The Assay of CATalases and Peroxidases*. <https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>
- Mahajan, A., & Tandon, V. R. (n.d.). *ANTIOXIDANTS AND RHEUMATOID ARTHRITIS*.
- Molodecky, N. A., Soon, I. S., Rabi, D. M., Ghali, W. A., Ferris, M., Chernoff, G., ... Kaplan, G. G. (2012). *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. *Gastroenterology*, 142(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>
- Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P., & Feldmann, M. (2015). *Anti-TNF therapy: past, present and future*. *International Immunology*, 27(1), 55–62. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu102>
- Nikolaus, S., & Schreiber, S. (2007). *Diagnostics of Inflammatory Bowel Disease*. *Gastroenterology*, 133(5), 1670–1689. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.001>
- Nishida, N., Arizumi, T., Takita, M., Kitai, S., Yada, N., Hagiwara, S., ... Kudo, M. (2013). *Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis*. *Digestive Diseases*, 31(5–6), 459–466. <https://doi.org/10.1159/000355245>
- Overbergh, L., Giulietti, A., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2003). *The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantifiCATION of cytokine gene expression*. *Journal of Biomolecular Techniques*, 14(1), 33–43.
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007, January). *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. *Physiological Reviews*, Vol. 87, pp. 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., ... Bitto, A. (2017). *Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Quan, F., Korneluk, R. G., Tropak, M. B., & Gravel, R. A. (1986). *Isolation and characterization of the human CATalase gene*. *Nucleic Acids Research*, 14(13), 5321–5335. <https://doi.org/10.1093/nar/14.13.5321>
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ... Nishigaki, I. (2014, September 25). *Antioxidants and human diseases*. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 436, pp. 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>

- Roberts, R. J. (2001). *PubMed Central: The GenBank of the published literature. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), 381–382. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.381>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. A. (1988). *Primer-directed enzymatic amplifiCATION of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Sales-Campos, H., Basso, P. J., Alves, V. B. F., Fonseca, M. T. C., Bonfá, G., Nardini, V., & Cardoso, C. R. B. (2015). *Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Vol. 48, pp. 96–107. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143774>
- Salzberg, S. L. (2018, August 20). *Open questions: How many genes do we have? BMC Biology*, Vol. 16. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0564-x>
- Sato, H., Shibata, M., Shimizu, T., Shibata, S., Toriumi, H., Ebine, T., ... Suzuki, N. (2013). *Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. Neuroscience*, 248, 345–358. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.06.010>
- Sato, K., Ito, K., Kohara, H., Yamaguchi, Y., Adachi, K., & Endo, H. (1992). *Negative regulation of CATalase gene expression in hepatoma cells. Molecular and Cellular Biology*, 12(6), 2525–2533. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.6.2525>
- Senhaji, N., Kojok, K., Darif, Y., Fadainia, C., & Zaid, Y. (2015). *The contribution of CD40/CD40L axis in inflammatory bowel disease: An update. Frontiers in Immunology*, Vol. 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00529>
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). *Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Shastry, B. S. (2009). *SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1\_1*
- Söderlund, S., Brandt, L., Lapidus, A., Karlén, P., Broström, O., Löfberg, R., ... Askling, J. (2009). *Decreasing Time-Trends of Colorectal Cancer in a Large Cohort of Patients With Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology*, 136(5), 1561–1567. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.064>

- Sorek, R. (2007). "The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences". *RNA*, *13* (10): 1603–8. doi:10.1261/rna.682507. PMC 1986822. PMID 17709368.
- Taniyama, Y., & Griending, K. K. (2003, December). *Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms*. *Hypertension*, Vol. 42, pp. 1075–1081. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F>
- The Human Genome Project | NHGRI. (n.d.). Pridobljeno 11. Januarja, 2020, od <https://www.genome.gov/human-genome-project>
- The Human Genome Project FAQ | NHGRI. (n.d.). Pridobljeno 11. Januarja, 2020, od <https://www.genome.gov/human-genome-project/Completion-FAQ>
- Torres, J., Mehandru, S., Colombel, J. F., & Peyrin-Biroulet, L. (2017, April 29). Crohn's disease. *The Lancet*, Vol. 389, pp. 1741–1755. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31711-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31711-1)
- Tu, Z., Wang, L., Xu, M., Zhou, X., Chen, T., & Sun, F. (2006). Further understanding human disease genes by comparing with housekeeping genes and other genes. *BMC Genomics*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-31>
- Uniken Venema, W. T. C., Voskuil, M. D., Dijkstra, G., Weersma, R. K., & Festen, E. A. M. (2017, January 1). The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. *Journal of Pathology*, Vol. 241, pp. 146–158. <https://doi.org/10.1002/path.4817>
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *266*(1–2), 37–56. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89>
- Velarde, M. C., Flynn, J. M., Day, N. U., Melov, S., & Campisi, J. (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by SOD2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging*, *4*(1), 3–12. <https://doi.org/10.18632/aging.100423>
- What kinds of gene mutations are possible? - Genetics Home Reference - NIH. (n.d.). Pridobljeno 11. Januarja, 2020, od <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/possiblemutations>
- Whitaker, J, W, Chen, Z, Wang, W. (2014). Predicting the Human Epigenome from DNA Motifs. *Nature Methods*. doi:10.1038/nmeth.3065

- Wong, J. J., Sceats, L., Dehghan, M., Wren, A. A., Sellers, Z. M., Limketkai, B. N., ... Park, K. T. (2018). Depression and Health Care Use in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis*. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy145>
- Wu, J. Q., Kosten, T. R., & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>
- Yang, J., Stolee, J. A., Jiang, H., Xiao, L., Kiesman, W. F., Antia, F. D., ... Shi, X. (2018). Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides Using Sulfurization Byproducts for in Situ Capping. *Journal of Organic Chemistry*, 83(19), 11577–11585. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01553>
- Yasui, M., Kanemaru, Y., Kamoshita, N., Suzuki, T., Arakawa, T., & Honma, M. (2014). Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair*, 15(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.01.003>
- Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 54, pp. 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
- Zuo, J., Zhao, M., Liu, B., Han, X., Li, Y., Wang, W., ... Zhang, X. (2019). TNF- $\alpha$ -mediated upregulation of SOD-2 contributes to cell proliferation and cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 42(4), 1497–1506. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7252>