UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sandra Z. Dragičević

Analiza promotorskih varijanti gena *TGFB1* kao faktora rizika i modulatora odgovora na terapiju astme

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sandra Z. Dragičević

Analysis of the *TGFB1* gene promoter variants as risk factors and modulators of response to asthma therapy

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

dr Aleksandra Nikolić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Dragica Radojković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

KOMISIJA:

dr Aleksandra Nikolić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Dragica Radojković, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Dušanka Savić-Pavićević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane _____

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom dr Dragice Radojković i dr Aleksandre Nikolić kojima dugujem veliku zahvalnost.

Zahvaljujem se dr Dragici Radojković na ukazanom poštovanju, poverenju i prilici da se bavim naukom. Hvala Vam na svim korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem svom neposrednom mentoru dr Aleksandri Nikolić. Reći „hvala“ mi se čini pomalo nedovoljnim za sve što je učinila za mene. Hvala ti Alex na svemu što si me do sada naučila. Hvala ti na strpljenju, nesebičnoj pomoći i podršci koju si mi pružila od dana kada sam došla u laboratoriju. Hvala ti na svim onim jutarnjim „nenaučnim“ razgovorima i prijateljskim savetima, a bilo ih je mnogo. Posebno ti se zahvaljujem što si verovala u mene. Hvala ti što si postala moj prijatelj.

Dr Dušanki Savić-Pavićević želim da se zahvalim na svim korisnim savetima tokom doktorskih studija, prilikom pisanja ove doktorske disertacije, kao i na oceni ovog rada.

Želim da se zahvalim i dr Đorđu Miljkoviću na divnim predavanjima tokom doktorskih studija, na savetima tokom izrade ove doktorske disertacije i na izdvojenom vremenu da me nauči novim metodama. Hvala na nesebičnim odgovorima na sva moja pitanja.

Veliku zahvalnost dugujem porodici Kojić, a posebno Ani koja mi je pomogla u eksperimentima od ključnog značaja za ovu tezu. Hvala ti Anči što si bila na pravom mestu u pravo vreme.

Zahvaljujem se svim članovima Laboratorije za molekualrnu biologiju na podršci, pomoći i dobrom raspoloženju.

Posebono želim da zahvalim Saški na spremnosti da podeli svoje iskustvo sa mnom i da me posavetuje kad god zatreba. Hvala ti Saška na našem druženju i tvom entuzijazmu u eksperimentalnom radu.

Hvala Miri na pomoći, druženju i što smo delile sudbinu doktoranda. Hvala Jovani J. na svim našim razgovorima o nauci i o životu, kao i na ponekom traču „na ogradi". Hvala Ivi na podršci i korisnim savetima. Hvala Maji što je svoje iskustvo u pisanju doktorske disertacije podelila sa mnom. Hvala Jovani D., Taši i Draginji na velikoj pomoći i podršci. Hvala vam devojke na druženju i pozitivnoj atmosferi koju ste unele u sobu br.12.

Hvala Branku i Srđanu na beskrajnom humoru, a pre svega na pomoći kada je zatrebala. Hvala Vanjici na velikoj podršci i motivaciji. Hvala Mili, Maki, Kušić i Lili na razgovorima i korisnim savetima.

Veliko hvala dugujem kolegama i drugarima iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Drage moje, Kris i Dragana, hvala vam na iskrenosti i nesebičnoj podršci, a posebno vam hvala što ste uz mene i u privatnom životu. Sanji, Dani, Vlandi i Jecili želim da se zahvalim na divnom vremenu koje smo provele zajedno kako u Institutu, tako i van njega. Statistički značajnu zahvalnost dugujem Nikoli Kotoru na nesebičnoj pomoći tokom statističke analize rezultata ove doktorske disertacije. Hvala ti Nikola što je rad sa tobom uvek zabavan.

Mojim prijateljima želim da se zahvalim što su bili uz mene i pružili mi maksimalnu podršku. Hvala ti Mirjana na našem druženju koje traje skoro dve decenije. Hvala ti Nemanja na podršci u svim segmentima mog života tokom ovih godina, a posebno ti hvala na smehu.

Neizmernu zahvalnost dugujem mojoj porodici. Mami Mileni i tati Zoranu zahvaljujem na nesebičnoj ljubavi. Hvala vam što verujete u mene i što ste me naučili pravim vrednostima u životu. Hvala mojim sestrama Slađani i Jovani. Srećna sam i bogata

što vas imam. Sister Slađana, hvala ti na ljubavi, beskrajnom razumevanju i strpljenju. Posebno ti zahvaljujem što si moj glas razuma i najveći oslonac. Sister Jovana, Miško moj, hvala ti na ljubavi, što si tako zabavna i što sa tobom mogu uvek da imam devet godina manje. Želim da se zahvalim i sestrama Vladani, Ivani i Anđeli na divnim sestrinskim druženjima. Hvala i zetu Radetu na velikoj podršci.

Na kraju želim da se zahvalim i da ovu doktorsku disertaciju posvetim sestriću Mihajlu i sestričini Sofiji. Hvala vam što ste uneli posebnu radost u moj život istovremeno dodelivši mi novu, odgovornu, ali zabavnu ulogu tetke. Hvala vam anđeli moji što postojite.

Sandra Dragičević

Analiza promotorskih varijanti gena *TGFB1* kao faktora rizika i modulatora odgovora na terapiju astme

REZIME

Transformišući faktor rasta beta 1 (TGFB1) je važan inflamatorni modulator i profibrotički medijator u astmi. Promene u regulaciji ekspresije TGFB1 bi mogle biti povezane sa patogenezom astme i sa adekvatnim odgovorom na terapiju. Cilj ovog rada je bio ispitivanje promotorskih varijanti gena *TGFB1* kao faktora rizika za nastanak astme i modulatora odgovora na terapiju.

Studija je uključila pacijente sa astmom i zdrave ispitanike kod kojih je analiziran 5' regulatorni region gena *TGFB1*. Detektovane su promotorske varijante -509C>T (rs1800469) i -800G>A (rs1800468) za koje asocijativnom studijom nije pokazana povezanost sa patogenezom astme, ali je uočena potencijalna povezanost između promotorske varijante -509C>T i egzacerbacija bolesti. Uticaj ove promotorske varijante na ekspresiju gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta, leka za astmu, je ispitivan *ex vivo* u ćelijama indukovanog sputuma i *in vitro* u ćelijama BEAS 2B. Analizom *ex vivo* je pokazana smanjena ekspresija gena *TGFB1,* pri čemu je efekat bio izraženiji kod astmatičara sa genotipom -509TT (58,9%) u odnosu na astmatičare sa genotipovima -509CC (49,6%) i -509CT (31,8%). U ćelijama BEAS 2B je ekspresija gena bila smanjena za 27%. Nakon transfekcije ćelija BEAS 2B konstruktima sa promotorskim varijantama -509C ili -509T i tretmana montelukastom, zapažena je povećana aktivnost promotora gena *TGFB1*. Odgovor varijante -509T je bio intenzivniji i za 139,9% veći u odnosu na odgovor varijante -509C.

Ova studija je pokazala da promotorska varijanta -509C>T menja ekspresiju gena *TGFB1* u odgovoru na montelukast, ali da bi se njena modulatorna uloga razjasnila, u daljim istraživanjima bi trebalo analizirati i druge genetičke i negenetičke faktore.

Ključne reči: astma, montelukast, promotor, terapija, transformišući faktor rasta, varijanta

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

UDK broj: [57.052:575.113.1]:616.248(043.3)

Analysis of the *TGFB1* gene promoter variants as risk factors and modulators of response to asthma therapy

ABSTRACT

Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) is an important inflammatory modulator and profibrotic mediator in asthma. The changes in regulation of TGFB1 expression could be associated with asthma pathogenesis and adequate response to therapy. The aim of this study was to investigate *TGFB1* gene promoter variants as asthma risk factors and modulators of response to asthma therapy.

The 5' regulatory region of the *TGFB1* gene was analyzed in asthmatic patients and healthy individuals included in this study. The promoter variants -509C>T (rs1800469) and -800G>A (rs1800468) were detected and the association between these variants and asthma pathogenesis was not found. The association was observed between the presence of variant -509C>T and occurence of exacerbations in patients. The influence of -509C>T variant on *TGFB1* gene expression in response to montelukast, used for asthma treatment, was further investigated *ex vivo* in induced sputum cells and *in vitro* in BEAS 2B cells. Analysis *ex vivo* has shown the decrease in the *TGFB1* gene expression, with more pronaunced effect in asthmatics with genotype -509TT (58.9%) in comparison with -509CC (49.6%) and -509CT (31.8%) genotypes. In BEAS 2B cells the gene expression was reduced for 27%. After transfection of BEAS 2B cells with constructs carrying promoter variants -509C or -509T and treatment with montelukast the increased activity was observed for both promoter variants. The response of variant -509T was more intensive and 139,3% higher than response of variant -509C.

This study showed that promoter variant -509T alters *TGFB1* gene expression in response to montelukast, but to clarify its modulatory role other genetic, and nongenetic factors as well, should be taken into consideration in further studies.

Key words: asthma, montelukast, promoter, therapy, transforming growth factor, variant

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular Biology

UDC number: [57.052:575.113.1]:616.248(043.3)

SKRAĆENICE :

ACQ	upitnik o kontroli astme; eng. Asthma Control Questionnaire
ACT	test o kontroli astme; eng. Asthma Control Test
ADAM33	eng. ADAM metallopeptidase domain 33
AP-1	protein aktivator 1; eng. Activator Protein 1
C/EBPß	eng. CCAAT-enhancer binding protein
cAMP	ciklični adenozin monofosfat
cDNK	komplementarna DNK; eng. complementary DNA
Co-SMAD	zajednički SMAD proteini; eng. Common SMAD
CREB	cAMP vezujući protein; eng. cAMP Response Element Binding Protein
CRP	C reaktivni protein
CSC	ekstrakt duvanskog dima; eng. Cigarette Smoke Condensate
DAP	dapson
ddNTP	didezoksiribunukleotid
DEPC	dietilpirokarbonat; eng. Diethyl Pyrocarbonate
DEX	deksametazon; eng. Dexamethasone
DMSO	dimetil-sulfokisd
DPP10	eng. Dipeptidyl Dipeptidase 10
DTT	ditiotreitol
ELISA	eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK	eng. Extracellular-signal Regulated Kinase
FBS	fetalni goveđi serum; eng. Fetal Bovine Serum
FEV1	forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; eng. Forced Expiratory Volume in first second
FVC	forsirani vitalni kapacitet; eng. Forced Vital Capacity
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfodehidrogenaza; eng. Glyceraldehide 3-Phosphate Dehydrogenase
GATA1	eritroidni transkripcioni faktor 1; eng. GATA-binding protein 1

GINA	globalna inicijativa za lečenje astme; eng. Global Initiative for Asthma
GREs	elementi za koje se vezuje glukokortikoidni receptor; eng. Glucocorticoid Response Elements
HRP	peroksidaza rena; eng. Horseradish Peroxidase
IFNG	interferon gamma
Ig	imunoglobulin
iRNK	informaciona RNK
IL	interleukin
I-SMAD	inhibitorni SMAD proteini; eng. Inhibitory SMAD
ITM	indeks telesne mase
JNK	eng. C-Jun N-terminal Kinase
K	kontrola
LAP	eng. Latency-Associated Peptide
LLC	veliki latentni kompleks; eng. Large Latent Complex
LTBP	latentni TGFB1 vezujući protein; eng. Latent TGFB1 Binding Protein
MAPK	eng. Mitogen-Activated Protein Kinase
MNT	montelukast
NFAT	nuklearni faktor aktiviranih T ćelija
NFkB	nuklearni faktor kapa B
ORMDL3	eng. ORM-1 like protein 3
p300/CBP	eng. E1A binding protein p300/CREB binding protein
PBS	fosfatni pufer; eng. Phosphate Buffered Saline
PCR	reakcija lančanog umnožavanja polimerazom; eng. Polymerase Chain Reaction
PEF	vršni protok vazduha; eng. Peak Expiratory Flow
PHF11	eng. PHD finger protein 11
PI3K/AKT	eng. Phosphatidilinositol-3-kinase/a serin/threonine kinase
PL	polinol
PR	prednizon
RFLP	polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata; eng. Restriction Fragment

	Length Polymorphism
R-SMAD	receptorom regulisani SMAD proteini; eng. Receptor-regulated SMAD
Runx3	eng. Runt related transcription factor 3
qRT-PCR	kvantitativni PCR u realnom vremenu; eng. Quantitative Real-Time PCR
SD	standardna devijacija
SLC	mali latentni kompleks; eng. Small Latent Complex
SP-1	eng. Specificity Protein
SR1	eng. Neuropeptide S Receptor 1
TBR	receptor za koji se vezuje TGFB; eng. TGFB Receptor type 1
TFE3	eng. Transcription Factor binding to IGHM Enhancer 3
TGFB1	transformišući faktor rasta beta 1; eng. Transforming Growth Factor Beta 1
TGIF	eng. Transforming Growth-Interacting Factor
Th	T pomoćna ćelija; eng. T helper cell
TMB	tetrametilbenzidin
TNF	faktor nekroze tumora; eng. Tumor Necrosis Factor
Treg	T regulatorna ćelija
YY1	transkripscioni faktor jin-jang 1; eng. Yin-Yang 1

SADRŽAJ

1 UVOD 1

1.1 Astma 1

1.2 Patofiziologija astme 2

1.2.1 Inflamacija disajnih puteva 2

1.2.2 Remodelovanje disajnih puteva 3

1.2.3 Dijagnostikovanje astme 4

1.3 Terapija astme 6

1.4 Molekularna genetika astme 9

1.5 Transformišući faktor rasta beta 1 (TGFB1) 10

1.6 Signalna transdukcija TGFB1 12

1.7 Struktura gena TGFB1 14

1.7.1 Regulacija ekspresije gena *TGFB1* 16

1.7.2 Varijante u genu *TGFB1* 17

1.8 Uloga TGFB1 u astmi 19

2 CILJ 22

3 MATERIJAL I METODE 23

3.1 Ispitanici 23

3.2 Materijal 25

3.2.1 Biološki materijal 25

3.2.1.1 Uzorci poreklom od ispitanika 25

3.2.1.2 Ćelijska linija 25

3.2.1.3 Bakterijski sojevi 26

3.2.2 Plazmidni vektori 26

3.2.3 Oligonukleotidi 26

3.2.4 Agensi za tretmane biološkog materijala 27

3.3 Metode 27

3.3.1 Priprema biološkog materijala 27

3.3.1.1 Izolovanje DNK 27

3.3.1.2 Obrada indukovanog sputuma 28

3.3.1.3 Ex vivo tretman ćelija indukovanog sputuma 28

3.3.1.4 Ex vivo tretman pune krvi 29

3.3.1.5 Izolovanje RNK 30

3.3.2 Analiza DNK, RNK i proteina 31

3.3.2.1 Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina 31

3.3.2.2 Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom 31

3.3.2.3 Prečišćavanje DNK fragmenata 32

3.3.2.4 Sekvenciranje DNK 32

3.3.2.5 Metoda polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata 33

3.3.2.6 Elektroforeza DNK u gelu od agaroze 34

3.3.2.7 Sinteza komplementarne DNK 34

3.3.2.8 Kvantifikacija ekspresije gena qRT- PCR metodom 35

3.3.2.9 Kvantifikacija proteina ELISA metodom 36

3.3.3 Rad sa bakterijama 37

3.3.3.1 Kultivacija bakterija 37

3.3.3.2 Izolovanje plazmidne DNK 37

3.3.3.3 Digestija plazmida 38

3.3.3.4 Prečišćavanje DNK iz gela od agaroze 38

3.3.3.5 Ligacija 39

3.3.3.6 Priprema kompetentnih ćelija E. coli 39

3.3.3.7 Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija 40

3.3.3.8 Priprema plazmidne DNK za transfekcije 40

3.3.4 Rad sa ćelijskim linijama 41

3.3.4.1 Kultivacija humanih ćelijskih linija 41

3.3.4.2 Tretmani ćelija BEAS 2B 42

3.3.4.3 Transfekcija humanih ćelijskih linija 42

3.3.4.4 Luciferazni esej 43

3.4 Statistička obrada podataka 44

4 REZULTATI 45

4.1 Karakteristike grupa ispitanika 45

4.2 Detekcija promotorskih varijanti 45

4.3 Ispitivanje uticaja promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* kao faktora rizika u astmi 50

4.4 Ispitivanje uticaja promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* na odgovor na terapiju astme u adultnoj grupi pacijenata 54

4.5 Analiza ekspresije gena *TGFB1* u ćelijama indukovanog sputuma pod dejstvom montelukasta *ex vivo* 56

4.6 Ispitivanje uticaja sredinskih faktora na ekspresiju gena *TGFB1 in vitro* 58

4.7 Ispitivanje uticaja lekova za astmu na ekspresiju gena *TGFB1* i sekreciju proteina *in vitro* 59

4.8 Analiza promotorske aktivnosti gena *TGFB1 in vitro* 62

4.8.1 Uticaj različitih agenasa na aktivnost promotora gena TGFB1 *in vitro* 62

4.8.2 Ispitivanje uticaja promotorske varijante -509C>T na aktivnost promotora gena *TGFB1* 64

4.8.3 Analiza uticaja promotorske varijante -509C>T na aktivnost promotora gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta 65

5 DISKUSIJA 68

5.1 Analiza promotora gena *TGFB1* u astmi 68

5.2 Uloga promotorskih varijanti gena *TGFB1* kao faktora rizika za nastanak astme 69

5.3 Uloga promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A u odgovoru na terapiju astme74

5.4 Ispitivanje uticaja varijanti gena TGFB1 na odgovor na montelukast *ex vivo* 77

5.5 Uticaj sredinskih faktora rizika za nastanak astme na ekspresiju gena *TGFB1* 81

5.6 Uticaj različitih terapeutika na ekspresiju gena *TGFB1* i sekreciju proteina 85

5.6.1 Uticaj montelukasta 86

5.6.2 Uticaj sistemskih kortikosteroida 87

5.6.3 Uticaj dapsona i polinola 89

5.7 Analiza aktivnosti promotorskih varijanti gena TGFB1 *in vitro* 90

5.8 Translacioni potencijal 93

6 ZAKLJUČCI 95

7 LITERATURA 96

1 UVOD

1.1 Astma

Astma je kompleksna respiratorna bolest koja pogađa čak desetinu svetskog stanovništva i predstavlja globalni zdravstveni problem. Prvi simptomi se najčešće javljaju u detinjstvu i ranoj mladosti i uključuju otežano disanje, nedostatak vazduha, zviždanje u grudima i kašalj. Bolest se manifestuje ponavljanim epizodama ovih simptoma koje mogu nestati spontano ili nakon upotrebe lekova (1, 2).

Astma nastaje kao posledica interakcije više faktora koji se uslovno mogu podeliti na unutrašnje faktore koji uzrokuju nastanak bolesti (induktori) i faktore spoljašnje sredine koji dovode do pojave simptoma i pogoršanja bolesti (pokretači). Pod unutrašnjim faktorima se pre svega podrazumevaju genetički faktori, a zatim pol i prekomerna telesna težina. Zapažena je pozitivna korelacija između gojaznosti i nastanka astme (1). Učestalost astme je veća kod muškog pola u ranijim godinama života, dok se kod devojčica razvijaju teži oblici bolesti (3). Najčešći okidači bolesti su respiratorni alergeni (polen, grinje, buđ, životinjska dlaka, prašina i dr.), alergije na hranu (mleko, jaja, kikiriki i dr.), respiratorne infekcije (najčešće rinovirusima), zagađenje vazduha (azot-monoksid i sumpor-dioksid), duvanski dim, fizički napor, lekovi (aspirin, ibuprofen ili beta-blokatori) i stres (1, 3).

Astma se klasifikuje na osnovu nekoliko kriterijuma. Prema faktorima koji dovode do nastanka bolesti se može podeliti na alergijsku (atopijsku) uzrokovanu alergenima i nealergijsku (neatopijsku) uzrokovanu drugim spoljašnjim činiocima kao što su virusi, hladan vazduh ili duvanski dim. Podela astme prema stepenu težine, na povremenu (inermitentnu) i perzistentnu (blagu, umerenu i tešku), se temelji na učestalosti simptoma i stupnju poremećaja plućne funkcije. Na osnovu stepena uspostavljanja kontrole bolesti, astma se deli na kontrolisanu, delimično kontrolisanu i nekontrolisanu (1). Astma se na osnovu zastupljenosti eozinofila i neutrofila u indukovanom sputumu može podeliti u četiri grupe: eozinofilnu (>3% eozinofila), neutrofilnu (>60% neutrofila), mešovitu (>3% eozinofila i >60% neutrofila) i paucigranulocitnu (<3% eozinofila i <60% neutrofila) (4).

1.2 Patofiziologija astme

U osnovi alergijske astme leži alergijska reakcija, dok mehanizmi nealergijske astme nisu dovoljno razjašnjeni. Ova dva tipa astme se kod nekih pacijenata preklapaju tako da alergijska reakcija može biti pokrenuta i faktorima koji isključuju alergene. Iako su alergijska i nealergijska astma uzrokovane različitim faktorima, bolest se manifestuje na isti način. U odnosu na zdrave osobe kod kojih su bronhije stalno otvorene i strujanje vazduha se odvija neometano, kod astmatičara usled hronične inflamacije i remodelovanja disajnih puteva dolazi do reverzibilne opstrukcije. Tokom astmatičnog napada glatke mišićne ćelije koje okružuju samu bronhiju se snažno kontrahuju i sekrecija mukusa se pojačava pri čemu se lumen disajnih puteva dodatno sužava, a disanje otežava (5).

1.2.1 Inflamacija disajnih puteva

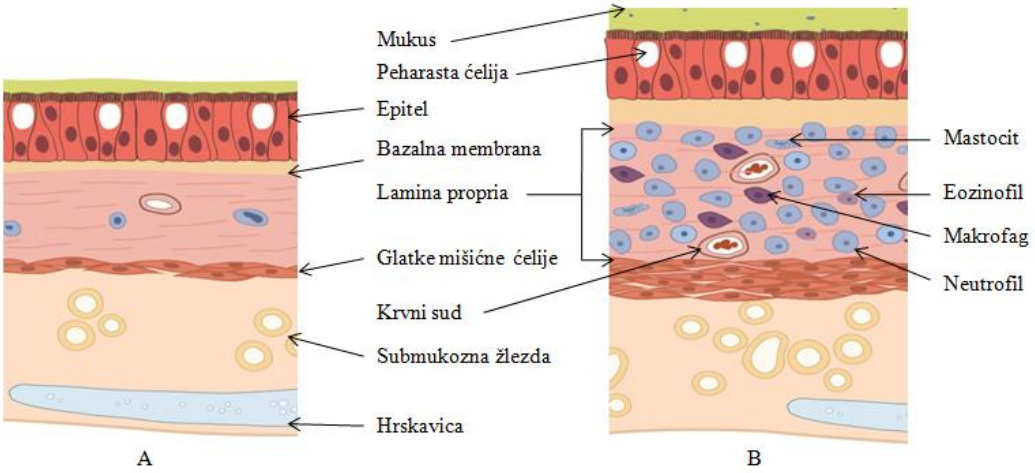
U alergijskoj astmi udahnuti alergeni stimulišu bronhijalne mastocite da oslobađaju medijatore koji izazivaju ponavljanje epizoda bronhokonstrikcije i opstrukciju disajnih puteva praćenih inflamacijom (6). Dendritske ćelije i makrofazi koji su prisutni u plućima prepoznaju, unose i obrađuju antigen pri čemu pokreću ranu fazu imunskog odgovora. Aktivirane T pomoćne ćelije tipa 2 (Th2; eng. T helper cell type 2) sekretuju citokine interleukin 4 (IL-4) i interleukin 13 (IL-13) promovišući stvaranje imunoglobulina E (IgE) od strane B limfocita. IgE antitela se vezuju za receptore mastocita s jedne strane, dok sa druge strane direktno interaguju sa ponovno unetim antigenom, unakrsno se povezuju i posledično dovode do oslobađanja medijatora iz mastocita. Aktivacija mastocita je stimulisana interleukinom 9 (IL-9) sekretovanim od strane Th2 ćelija (7, 8). Degranulacijom mastocita se oslobađa histamin koji izaziva prolaznu kontrakciju glatke muskulature, dilataciju i brzo povećanje propustljivosti krvnih sudova. Metaboliti arahidonske kiseline, prostaglandini i leukotrijeni, stimulišu dilataciju krvnih sudova i produženu kontrakciju mišića. U kasnoj fazi imunskog odgovora dominantnu ulogu ima faktor nekroze tumora alfa (TNF-α; eng. Tumor Necrosis Factor alpha), citokin sekretovan od strane mastocita, koji stimuliše mobilizaciju leukocita. Najznačajniji leukociti koji

učestvuju u ovoj reakciji su eozinofili i neutrofili, koji oslobađajući proteaze mogu da dovedu do oštećenja tkiva. Th2 ćelije sekretuju interleukin 5 (IL-5) koji regrutuje i aktivira eozinofile, dok TNF-α učestvuje u aktivaciji neutrofila. Eozinofili dodatno sekretuju leukotrijene pojačavajući njihove efekte u disajnim putevima. U hroničnoj astmi dolazi do nagomilavanja eozinofila u sluznici bronhija i prekomerne sekrecije mukusa u disajne puteve, a glatka muskulatura postaje hiperaktivna u odgovor na različite stimuluse (8). Pored ćelija imunog sistema, bronhijalne epitelijalne ćelije i fibroblasti u akutnom inflamatornom odgovoru oslobađaju citokine, hemokine i faktore rasta koji su važni medijatori u održavanju inflamacije u plućima (7, 9).

1.2.2 Remodelovanje disajnih puteva

Perzistentna inflamacija posledično dovodi do remodelovanja disajnih puteva odnosno strukturnih promena koje mogu da rezultuju delimično ireverzibilnom opstrukcijom (Slika 1) (1, 9). Degranulacijom eozinofila se oslobađaju visokoreaktivni molekuli koji oštećuju ćelije prisutne u bronhijalnom epitelu. S druge strane, usled epitelijalno-mezenhimalne tranzicije epitelijalne ćelije gube sposobnost vezivanja za bazalnu membranu. Na taj način su bronhije više izložene i postaju osetljivije na faktore spoljašnje sredine. Peharaste ćelije bronhijalnog epitela i ćelije submukoznih žlezda podležu hiperplaziji koja je praćena povećanom produkcijom mukoznog sekreta što posledično dovodi do sužavanja lumena disajnih puteva i otežanog disanja (10). Jedna od ključnih promena koje dovode do opstrukcije disajnih puteva je subepitelijalna fibroza, a koja nastaje usled disbalansa u produkciji i degradaciji komponenti ekstracelularnog matriksa. Subepitelijalna fibroza se javlja u ranim fazama astme i podrazumeva povišenu produkciju kolagena tipa I, III i V, fibronektina, i tenascina od strane fibroblasta i njihovu akumulaciju u donjem sloju bazalne membrane disajnih puteva (6, 10). Glatke mišićne ćelije, pored hiperplastičnih i hipertrofičnih promena, mogu da migriraju u subepitelijalni prostor pod dejstvom hemokina i značajno da doprinesu perzistentnoj inflamaciji i remodelovanju disajnih puteva (10). Angiogeneza i povećana permeabilnost krvnih sudova

koja rezultuje nastankom edema bronhijalnog zida dodatno doprinose opstrukciji disajnih puteva (9, 11).



Slika 1. Shematski prikaz bronhijalnog zida kod zdrave (A) i astmatične osobe (B)
(Preuzeto i modifikovano sa www.thevisualmd.com)

1.2.3 Dijagnostikovanje astme

Pravilno dijagnostikovanje astme je od ključnog značaja za primenu odgovarajuće terapije. Dijagnostika astme se vrši na osnovu manifestovanja simptoma bolesti, porodičnih anamnestičkih podataka (prisustvo astme ili alergije u srodnika prvog stepena srodstva), fizikalnog pregleda i merenja plućne funkcije. Testovi za ispitivanje plućne funkcije se koriste kako za postavljanje dijagnoze, tako i za određivanje težine bolesti i praćenje odgovora na terapiju. S obzirom da je varijabilnost testa kod dece velika, potrebno je vršiti češća merenja kako bi se pravilno procenila težina bolesti (1-3).

Merenje vršnog protoka vazduha (PEF; eng. Peak Expiratory Flow) je jednostavan test primenljiv od treće godine života i izvodi se više puta dnevno. Ovim testom se određuje maksimalna brzina protoka vazduha tokom forsirane ekspiracije i daje podatak o težini opstrukcije u disajnim putevima. Uzimajući u obzir grešku instrumenta koja može iznositi i

do 15%, PEF se najviše koristi za merenje individualnih varijacija u dužem vremenskom periodu. Kao referentna vrednost se uzima maksimalna vrednost dobijena kada pacijent nije pokazivao simptome ili kada je uspostavljena kontrola bolesti (1, 3).

Kod starije dece i odraslih se primenjuje spirometrija kojom se dobijaju podaci o stepenu ireverzibilnosti opstrukcije disajnih puteva. Stepen plućne opstrukcije se procenjuje na osnovu vrednosti dobijenih za forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi (FEV1; eng. Forced Expiratory Volume in first second) i za forsirani vitalni kapacitet (FVC; eng. Forced Vital Capacity). FEV1 je volumen vazduha koji se nakon maksimalne inspiracije izbaci u toku prve sekunde forsirane ekspiracije. Vrednosti FEV1 su kod pacijenata obolelih od astme <80% u odnosu na predviđene vrednosti. FVC predstavlja volumen vazduha koji se nakon maksimalne inspiracije naglo i svom snagom izdahne do nivoa rezidualnog kapaciteta. S obzirom da su vrednosti FEV1 niže od referentnih i u drugim plućnim bolestima, odnos FEV1/FVC predstavlja pouzdaniji podatak za procenu stepena plućne opstrukcije i vrednosti 75-80% se smatraju normalnim (1, 2).

Reverzibilnost bronhoopstrukcije predstavlja povećanje vrednosti FEV1 15 do 20 min nakon inhalacije kratkodelujućim beta-2 agonistima. Pozitivnim testom se smatra povećanje vrednosti FEV1 za 15%. U slučaju negativnog testa, test se ponavlja primenom nekog drugog leka ili nekoliko dana nakon upotrebe kortikosteroida (1, 3).

Imajući u vidu da su simptomi bolesti varijabilni i da testovi plućne funkcije ne korelišu uvek sa simptomima, dodatno se primenjuje bronhoprovokacioni test. Preosetljivost disajnih puteva se može meriti direktno inhalacijom histamina/metaholina i indirektno fizičkim naporom (3). Prilikom izvođenja testa se prate vrednosti FEV1 pre i posle davanja određenih koncentracija histamina/metaholina, a test se smatra pozitivnim ukoliko se vrednost FEV1 smanji za 20% u odnosu na početnu (1, 3). Bronhoprovokacioni test naporom je specifičniji i pouzdaniji, ali manje osetljiv u odnosu na inhalacioni test (3).

Prisustvo alergija pozitivno koreliše sa astmom, te se određivanje alergijskog statusa pacijenata rutinski vrši u kliničkoj praksi. Zlatni standard za merenje osetljivosti na

alergene predstavljaju kožne probe pomoću kojih se za svakog pacijenta dobijaju i informacije o potencijalnim faktorima koji mogu dovesti do pogoršanja bolesti (1, 3). Test se izvodi tako što se na podlakticu ispitanika stavi kap tečnosti koja sadrži rastvoren alergen, a zatim se kroz kap lancetom napravi blagi površni ubod i kap se obriše. Pozitivna reakcija se ispoljava nakon 15 do 20 min u vidu crvenila i otoka kružnog oblika čiji je dijametar ≥3 mm. Kožnim testom se može ispitivati alergijski odgovor na više alergena istovremeno. Tokom izvođenja testa se kao pozitivna kontrola koristi histamin, a kao negativna kontrola fiziološki rastvor (3).

Korišćenjem neinvazivnih metoda kao što je analiza indukovanog sputuma (ispljuvka) se dodatno dobijaju informacije o plućnoj inflamaciji tokom dijagnostikovanja astme i tokom praćenja odgovora na terapiju (1, 12). Indukovani sputum se prikuplja u ranim jutarnjim časovima i standarna procedura traje od 10 do 20 min. Metoda se izvodi tako što se ispitanik inhalira preko ultrazvučnog nebulizatora fiziološkim rastvorom iste koncentracije (4,5%) u vremenskim intervalima koji se sukcesivno produžavaju ili inhalacijom u istim vremenskim intervalima fiziološkim rastvorom čija se koncentracija povećava (3%, 4%, 5%). Kako bi se sprečila moguća bronhokonstrikcija ispitanicima se pre inhalacije daju kratkodelujući beta-2 agonisti, a tokom procedure se primenjuje spirometrija. Po uzorkovanju, indukovani sputum se tretira mukolitičkim agensom, a zatim se ćelije oslobođene od mukusa odvajaju od supernatanta, pripreme metodom citospina za bojenje, i na kraju obojene analiziraju pod mikroskopom (7, 12).

1.3 Terapija astme

Cilj savremene terapije astme jeste uspostavljanje i održavanje kontrole kliničkih manifestacija bolesti u dužem vremenskom periodu. To podrazumeva dijagnostikovanje astme, smanjivanje izloženosti faktorima rizika, zatim lečenje i praćenje bolesti, kao i odgovarajući tretman prilikom egzacerbacija. Egzacerbacije podrazumevaju akutna ili subakutna progresivna ponavljanja pojedinih ili kombinovanih simptoma astme i javljaju se kada kontrola bolesti nije potpuna (1, 2).

Lekovi koji se koriste u terapiji astme se mogu podeliti na lekove sa kratkodelujućim i dugodelujućim efektom. Terapeutici sa kratkodelujućim efektom se koriste po potrebi za brzo otklanjanje simptoma, dok se dugodelujući lekovi koriste svakodnevno u dužem vremenskom periodu sa ciljem da se uspostavi potpuna kontrola bolesti (2).

Među lekovima za brzo otklanjanje simptoma tokom akutnog napada prvi izbor predstavljaju kratkodelujući beta-2 agonisti i koriste ih svi pacijenti bez obzira na tip astme. Mogu da se primenjuju inhalacionim ili oralnim putem, pri čemu je inhalacioni put znatno bolji kada se uzme u obzir neophodna doza, brzina i efekat delovanja (13). Za lečenje perzistentne astme se kao dodatak kortikosteroidnoj terapiji koriste i beta-2 agonisti sa dugodelujućim efektom (14). Vezujući se za beta-2 adrenergičke receptore ovi terapeutici indukuju relaksaciju glatke muskulature u plućima (15). Pored beta-2 agonista za brzo otklanjanje simptoma se koriste i antiholinergici koji blokiraju muskarinske receptore na glatkim mišićnim ćelijama i posledično sprečavaju bronhokonstrikciju (1).

Kortikosteroidi su lekovi sa antiniflamatornim i bronhodilatatornim dejstvom koji se u terapiji perzistentne astme koriste za otklanjanje i prevenciju simptoma u dužem vremenskom periodu (1). Inhibiraju sintezu leukotrijena i prostaglandina, smanjuju produkciju citokina i sprečavaju migraciju i aktivaciju inflamatornih ćelija (13). Kortikosteroidi se prema načinu primene dele na inhalacione i oralne kortikosteroide. Inhalacioni kortikosteroidi se primenjuju kao monoterapija ili u kombinaciji sa dugodelujućim beta-2 agonistima ili leukotrijenskim modifikatorima. Oralni kortikosterodi imaju sistemski efekat (sistemski kortikosteroidi) i primenjuju se za lečenje težih oblika astme kada kontrola bolesti nije postignuta visokim dozama inhalacionih kortikosteroida (1, 3).

U kombinaciji sa inhalacionim kortikosteroidima se primenjuju modifikatori leukotrijena koji u odnosu na dugodelujuće beta-2 agoniste mogu da se koriste i kao monoterapija za lečenje blage perzistentne astme (16). Leukotrijenski modifikatori smanjuju inflamaciju, preosetljivost disajnih puteva i produkciju mukoznog sekreta. Prema načinu delovanja ovi lekovi se dele na antagoniste leukotrijenskih receptora i inhibitore 5-

lipooksigenaze. Antagonisti leukotrijenskih receptora se selektivno vezuju za leukotrijenske receptore na strukturnim i inflamatornim ćelijama pluća, dok inhibitori 5-lipooksigenaze sprečavaju sintezu leukotrijena. Usled smanjene produkcije leukotrijena i njihovog efekta delovanja se posledično smanjuju inflamacija u disajnim putevima i intenzitet remodelovanja (1, 17).

Teofilin je terapeutik sa bronhodilatatornim dejstvom, a poseduje i umerena antiinflamatorna svojstva. U odnosu na inhalacione kortikosteroide teofilin pokazuje manju efikasnost kada se primenjuje kao monoterapija, pa se uglavnom koristi kao dodatak terapiji pacijentima koji loše reaguju na standardnu terapiju kortikosteroidima (1).

Od nekonvencionalnih lekova se povremeno koristi dapson (diaminodifenilsulfon) kada je bolest loše kontrolisana oralnim kortikosteroidima kod pacijenata sa teškim oblicima neutrofilne astme (18, 19). Dapson je antibiotik koji se u kliničkoj praksi koristi za lečenje lepre i malarije, a zbog antiinflamatornog dejstva je primenu našao i u lečenju različitih neinfektivnih inflamatornih bolesti kože kao što su dermatitis herpatiformis i hronična idiopatska urtikarija (19, 20). Potencijal dapsona u lečenju inflamatornih bolesti se ogleda u efektima koje ima na neutrofile. Dapson antiinflamatorne efekte ostvaruje inhibiranjem aktivnosti lizozomalnih enzima i produkcije prostaglandina u neutrofilima, dok na hemotaksu ove grupe leukocita nema uticaja (20).

Zbog antiinflamatornog dejstva u terapiji respiratornih bolesti se koriste i homeopatski medikamenti kao dodatak standardnoj terapiji. Polinol pripada ovoj grupi lekova i koristi se za lečenje alergijskih reakcija gornjih disajnih puteva. U sastav polinola ulaze tri aktivne susptance zastupljene u istoj količini (lat. *Luffa operculata* trit.D4, lat. *Galphimia glauca* trit.D3 i lat. *Cardiospermum* trit.D3) čiji mehanizmi delovanja nisu poznati.

Prema savremenim svetskim vodičima za dijagnozu i lečenje astme kao što je Globalna inicijativa za lečenje astme (GINA; eng. Global Initiative for Asthma) primenjuje se stepenasti pristup lečenja gde se na osnovu procenjene težine bolesti pacijentu daje

odgovarajuća terapija. S obzirom da je tok bolesti promenljiv i da postoje interindividualne varijacije u odgovoru na lekove, terapija se menja i prilagođava pacijentu u cilju uspostavljanja potpune kontrole bolesti (1). Podela pacijenata sa astmom na osnovu eozinofilije u sputumu i procena njihovog broja tokom terapije inhalacionim kortikosterodima može ukazati na potrebu da se poveća ili smanji doza ovih lekova, ili da se uvede dodatna terapija dugodelujućim beta-2 agonistima, antagonistima leukotrijenskih receptora ili teofilinom. Iako su se u kliničkoj praksi inhalacioni kortikosteroidi do sada pokazali kao najuspešniji u lečenju eozinofilne astme, uprkos dugotrajnom lečenju, neki pacijenti ne reaguju na kortikosteroidnu terapiju i imaju perzistentnu eozinofiliju u sputumu. Pacijenti sa neeozinofilnom astmom tretirani inhalacionim kortikosteroidima zadržavaju eozinofilnu inflamaciju u zidu disajnih puteva. Pored toga, neutrofilija u sputumu je povezana sa remodelovanjem disajnih puteva i težinom bolesti. Kod pacijenata sa neeozionfilnom astmom je važno doneti odluku da li je potrebno dodatno povećati doze kortikosteroida ili primeniti alternativne lekove.

1.4 Molekularna genetika astme

Astma nastaje kao posledica interakcija više gena, i interakcije gena sa spoljašnjom sredinom. Veliki broj gena pokazuje vezu sa astmom ili fenotipovima koji su povezani sa astmom, poput alergije i preosetljivosti bronhija (21). U pitanju su geni koji kodiraju molekule za koje je pokazano da imaju značajnu ulogu u inflamatornim procesima i koji učestvuju u remodelovanju disajnih puteva. Sa astmom su povezane određene promene u sekvencama DNK u okviru različitih gena među kojima se nalaze i geni povezani sa odgovorom na terapiju (21-23). Geni za koje se smatra da su povezani sa etiologijom astme su dati u tabeli 1.

Tabela1. Pregled gena povezanih sa astmom

Gen	Hromozom	Pozicija (bp od početka p kraka hromozoma)
ADAM33 (eng. ADAM metallopeptidase domain 33)	20	3596621-3610738
DPP10 (eng. Dipeptidyl Dipeptidase 10)	2	114916369-116318406
IFNG (eng. Interferon gamma)	12	66834817-66839788
IL4 (eng. Interleukine 4)	5	132037272-132046267
IL13 (eng. Interleukine 13)	5	132021764-132024700
NPSR1 (eng. Neuropeptide S Receptor 1)	7	34664422-34856115
ORMDL3 (eng. ORM-1 like protein 3)	17	35330822-35337380
PHF11 (eng. PHD Finger protein 11)	13	48967802-49001117
TGFB1 (eng. Transforming Growth Factor Beta 1)	19	46528491-46551656
TNF (eng. Tumor Necrosis Factor)	6	31651329-31654089

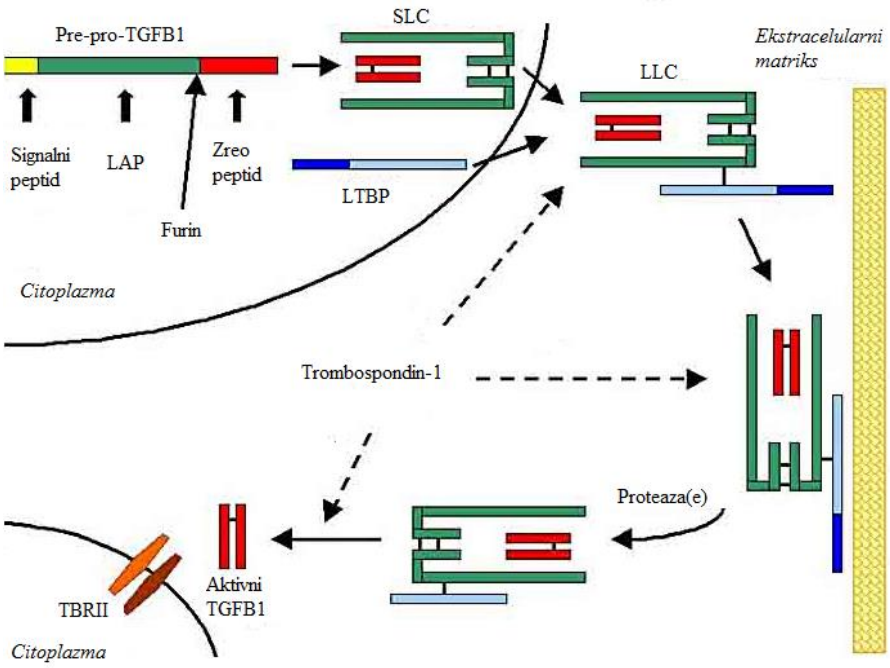
1.5 Transformišući faktor rasta beta 1 (TGFB1)

Među genima koji su povezani sa astmom, gen *TGFB1* je od posebnog značaja, jer kodira plejotropni medijator uključen u oba procesa koja su ključna za patogenezu bolesti – inflamaciju i remodelovanje disajnih puteva.

Familija proteina TGFB je deo velike superfamilije TGFB koja obuhvata više od 30 proteina sa višestrukim ulogama u biološkim procesima. Familiji proteina TGFB kod sisara pripadaju tri člana (TGFB1, TGFB2 i TGFB3), koji dele 60-80% visoko konzerviranih sekvenci. Citokin TGFB1 ima inhibitoran ili stimulativan efekat zavisno od njegove

koncentracije, kao i prisustva i količine drugih molekula. Reguliše različite ćelijske aktivnosti uključujući rast, proliferaciju, migraciju, diferencijaciju, apoptozu i učestvuje u angiogenezi i produkciji ekstracelularnog matriksa. TGFB1 se kod zdravih osoba konstitutivno eskprimira u tkivnim makrofazima i strukturnim ćelijama disajnih puteva (bronhijalne i alveolarne epitelijalne ćelije, endotelijalne ćelije, glatke mišićne ćelije i fibroblasti). Ima ulogu u održavanju homeostaze koju ostvaruje kroz modulaciju lokalne inflamacije, regulaciju proliferacije i diferencijacije ćelija, i učešće u reparaciji tkiva (24, 25).

Aktivna forma TGFB1 je homodimer od 25 kDa u kome su dva polipeptida povezana disulfidnim mostom i hidrofobnim interakcijama. Sinteza i aktivacija TGFB1 je kompleksna (Slika 2). Molekul TGFB1 se inicijalno sintetiše kao veliki prekursorski propeptid od 390 aminokiselina. Sintetisani monomer se sastoji od signalnog peptida od 29 aminokiselina, latentnog peptida (LAP; eng. Latency-Associated Peptide) na N terminusu i peptida TGFB1 koji čine 112 aminokiselina na C terminusu (26, 27). Iz sintetisanog neaktivnog homodimera TGFB1 se signalni peptid proteolitički uklanja, dok LAP posle proteolitičke obrade ostaje nekovalntno vezan formirajući mali latentni kompleks TGFB1 (SLC; eng. Small Latent Complex) (27). LAP sadrži manozo-6-fosfatne ostatke koji imaju ulogu da olakšaju vezivanje ovog kompleksa za manozo-6-fosfatne receptore na većini ćelija i za ekstracelularni matriks (26, 28). Mali latentni kompleks se kovalentno vezuje za latentni TGFB1 vezujući protein (LTBP; eng. Latent TGFB1 Binding Protein) pri čemu nastaje veliki latentni kompleks TGFB1 (LLC; eng. Large Latent Complex) koji se luči van ćelije i pomoću LTBP vezuje za ekstracelularni matriks (27). Razlikuju se četiri latentna TGFB vezujuća proteina kodirana različitim genima i eksprimirana na tkivno specifičan način. U ekstracelularnom matriksu pod dejstvom različitih mehanizama se iz latentnog kompleksa oslobađa bioaktivni molekul TGFB1. U aktivaciji učestvuju proteaze plazmin i trombin, tkivne transglutaminaze, interakcije latentnog proteina sa trombospondinom-1 i integrinima, reaktivne vrste kiseonika i kisela sredina (26, 27).



Slika 2. Sinteza, sekrecija i aktivacija TGFB1

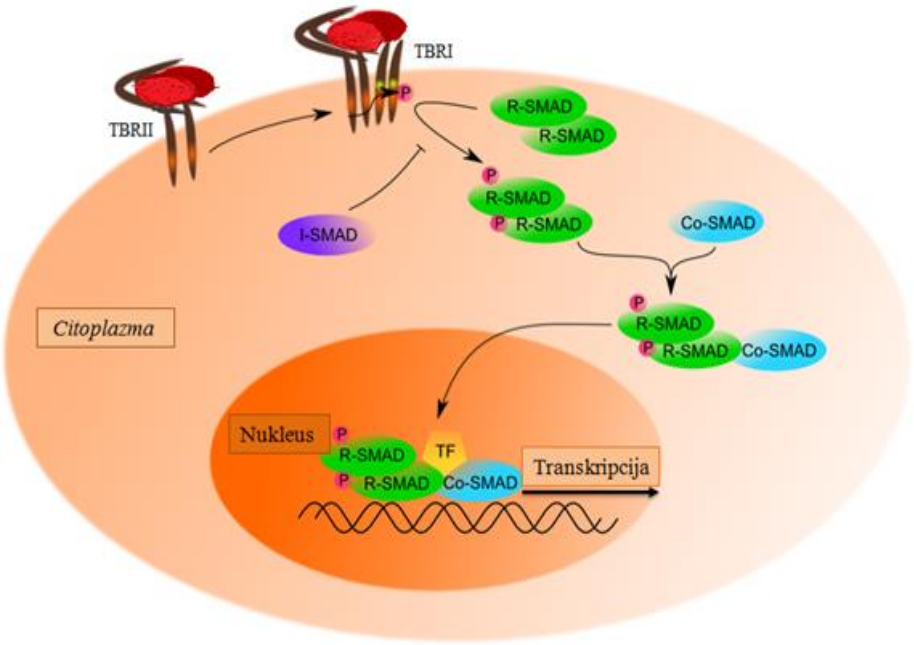
LAP - eng. Latency-Associated Peptide; SLC - eng. Small Latent Complex; LLC - eng. Large Latent Complex; LTBP - eng. Latent TGFB1 Binding Protein; TBRII - eng. TGFB Receptor type II

(Preuzeto i modifikovano iz rada Gressner i saradnici, 2002 (29))

1.6 Signalna transdukcija TGFB1

TGFB1 ostvaruje svoju regulatornu ulogu kroz klasični signalni put TGFB posredovan proteinima SMAD i kroz alternativne signalne puteve. (25). Signalna transdukcija TGFB1 započinje vezivanjem molekula TGFB1 za transmembranske receptore, receptor tipa I (TBRI) i receptor tipa II (TBRII), koji su serin/treonin kinaze. Uloga receptora tipa III (TBRIII) je adapterska i omogućava vezivanje TGFB1 za konstitutivno aktivan TBRII. Nakon vezivanja liganda receptor TBRII regrutuje i fosforiliše glicin/serin domene TBRI formirajući aktivan tetramerni receptorni kompleks. U klasičnom signalnom putu aktiviran TBRI nizvodno pokreće kaskadnu fosforilaciju SMAD proteina (Slika 3). Receptorom regulisani SMAD proteini (R-SMAD; eng. Receptor-regulated SMAD), SMAD2 i SMAD3, se prvi fosforilišu na C terminusu od strane

receptora. Dalje u signalnoj transdukciji SMAD2 i SMAD3 fosforilišu SMAD4, označen kao zajednički SMAD (Co-SMAD; eng. Common SMAD), pri čemu formiraju heterokompleks SMAD2/3/4 koji se translocira u jedro (30). Za razliku od proteina SMAD2, proteini SMAD3 i SMAD4 se vezuju direktno za specifične sekvence u DNK (SBEs; eng. Smad Binding Elements) i zajedno sa drugim transkripcionim faktorima i koregulatorima učestvuju u aktivaciji ili inhibiciji ciljnih gena (30, 31). Na ovaj način se aktivira transkripcija gena koji kodira za SMAD7, a koji pripada grupi inhibitornih SMAD proteina (I-SMAD; eng. Inhibitory SMAD). SMAD7 negativnom povratnom spregom inhibira signalnu transdukciju vezujući se za TBRI i regrutujući ubikvitin ligaze indukuje degradaciju receptora (31).



Slika 3. Signalna transdukcija TGFB

TBRI i TBRII - eng. TGFB Receptor type I and II; Co-SMAD - eng. Common SMAD; R-SMAD - eng. Receptor-regulated SMAD; I-SMAD - eng. Inhibitory SMAD; TF - transkripcioni faktor

(Preuzeto i modifikovano iz rada Kubiczkova i saradnici, 2012 (27))

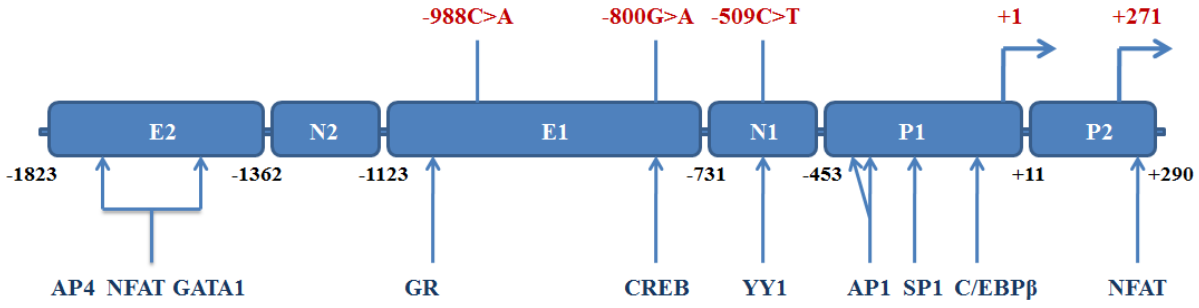
Signalna transdukcija TGFB je pozitivno i negativno regulisana na nivou membranskih receptora, citoplazmatičnih i nukulearnih proteina. Primer pozitivne sprege su B limfociti u kojima se vezivanjem TGFB1 za receptore pokreće signalna kaskada koja rezultuje produkcijom transkripcionog faktora Runx3 (eng. Runt related transcription factor 3), a koji u kompleksu sa SMAD3 indukuje stvaranje IgA. Koaktivatori kao što su TFE3 (eng. Transcription Factor binding to IGHM Enhancer 3) i p300/CBP (eng. E1A binding protein p300/CREB binding protein) se vezuju za SMAD2/3/4 kompleks i učestvuju u aktivaciji transkripcije ciljnih gena (32). TGIF (eng. Transforming Growth-Interacting Factor) i Ski su negativni koregulatori koji regrutuju histon deacetilaze i koji su u kompeticiji sa TFE3 i p300/CBP. SnoN je korepresor koji ima strukturu sličnu Ski i najverovatnije sličan mehanizam delovanja (31, 32).

TGFB1 aktivira SMAD-nezavisne signalne puteve kao što su signalni putevi PI3K/AKT (eng. Phosphatidilinositol-3-kinase/a serin/threonine kinase), NFkB (eng. Nuclear Factor kappa B), Wnt/β-katenin (eng.Wnt/β-catenin) i sva tri puta MAPK (eng. Mitogen-Activated Protein Kinase): ERK (eng. Extracellular-signal Regulated Kinase), p38 i JNK (eng. C-Jun N-terminal Kinase). Učesnici alternativnih signalnih puteva mogu biti uključeni u regulaciju signalne transdukcije TGFB (27). TGFB1 aktivira JNK i p38 MAP kinazne puteve pri čemu dolazi do fosforilacije cikličnog AMP (cAMP) vezujućeg proteina (CREB; eng. cAMP Response Element Binding Protein) koji je homodimer i c-Jun koji je deo proteina aktivatora 1 (AP-1; eng. Activator Protein 1). Ovi transkripcioni faktori su pozitivni regulatori ciljnih gena i interaguju sa SMAD3. S druge strane fosforilacija R-SMAD od strane Erk ima inhibitorni efekat. Iako SMAD2 i SMAD3 formiraju kompleks sa SMAD4, kompleks SMAD2/3/4 se ne translocira u jedro (32).

1.7 Struktura gena TGFB1

Gen *TGFB1* je lokalizovan na dugom kraku hromozoma 19 u regionu q13.1-13.3. Dužina gena *TGFB1* iznosi približno 23,6 kb. Sadrži 7 egzona (dužine 78-355 bp) i veoma duge introne (139-9601 bp). Inicijacija transkripcije gena *TGFB1* se odvija na više mesta, a

dva glavna su na pozicijama +1 i +271. Promotorski region gena *TGFB1* je veoma kompleksan i odlikuje se prisustvom primarnog (bazalnog) i sekundarnog promotora koji ne sadrže tipičan TATA ili CAAT blok (Slika 4). U okviru promotora se nalazi region sa visokim GC sadržajem koji ima esencijalnu ulogu u transkripciji i sadrži osam heksanukleotidnih ponovaka CCGCCC i tri njegova reverzibilna komplementa, GGCGGG (33).



Slika 4. Shematski prikaz promotora gena *TGFB1*

P1 i P2 - primarni i sekundarni promotor; E1 i E2 - proksimalni i distalni pojačivački region (eng. Enhancer); N1 i N2 - proksimalni i distalni negativni regulatorni region; AP, NFAT, GATA1, GR, CREB, YY1, SP1 i C/EBPß - regulatori transkripcije gena *TGFB1*

Primarni promotor obuhvata region od 453 bp uzvodno od prvog mesta početka transkripcije, dok se sekundarni pruža između prvog i drugog mesta početka transkripcije (33). U regulatornom regionu se razlikuju dva negativna i dva pozitivna elementa koja su naizmenično postavljena. Prvi negativni regulatorni element obuhvata region od -731 do -453 bp, drugi od -1362 do -1123 bp, a između njih je lokalizovan proksimalni pojačivački element, dok se distalni pojačivački element proteže od -1823 do -1362 bp (34).

1.7.1 Regulacija ekspresije gena *TGFB1*

Za promotorske i regulatorne elemente gena *TGFB1* se vezuju različiti transkripcioni faktori koji samostalno ili u kombinaciji sa koregulatorima učestvuju u regulaciji transkripcije gena (Slika 4). Promene u promotorskim i/ili regulatornim sekvencama mogu da smanje ili povećaju sposobnost vezivanja transkripcionih faktora za konsenzus sekvence, a samim tim da izmene nivo ekspresije gena *TGFB1* i nivo proteina. Veliki broj neproteinskih molekula može posredno da moduliše ekspresiju gena interagujući sa transkripcionim faktorima. Među faktorima spoljašnje sredine koji modulišu ekspresiju gena *TGFB1* se nalaze i lekovi koji se rutinski koriste u terapiji astme (35).

Promotor gena *TGFB1* sadrži konsenzus sekvence za vezivanje transkripcionog faktora AP-1. Razlikuju se dva vezujuća mesta za ovaj transkripcioni faktor u bazalnom promotoru označeni kao region A (-418/-412) i region B (-371/-364) (36). U sprovedenim istraživanjima je pokazano da visoka koncentracija glukoze i angiotenzina II, nezavisno i bez aditivnog efekta, povećavaju promotorsku aktivnost gena *TGFB1*. Svoj uticaj ostvaruju kroz alternativne signalne puteve TGFB stimulišući pojačano vezivanje AP-1 za konsenzus sekvence. Vezivanje transkripcionog faktora SP-1 (eng. Specificity Protein 1) za region bogat GC parovima nukleotida (-220/-211) ostaje nepromenjeno pod istim uslovima. Međutim, promene u tom regionu za posledicu imaju smanjenje promotorske aktivnosti kako u normalnim, tako i u uslovima povećane koncentracije glukoze i angiotenzina II (36, 37). Transkripcioni faktor C/EBPß (eng. CCAAT-Enhancer Binding Protein) se vezuje za sekvencu -160/-100 i stimuliše aktivnost promotora. Inhibitorni efekat na C/EBPß ima p65 subjedinica NFkB, održavajući na taj način nivo TGFB1 pod kontrolom (37). Transkripcioni transaktivator Tat poreklom iz virusa humane imunodeficijencije tipa 1 indirektno povećava ekspresiju gena *TGFB1* tako što interaguje sa celularnim proteinom Purα koji se vezuje za promotorski region -453/-323 (38). Viralni protein Tat može da interaguje i sa transkripcionim faktorom C/EBPß koji se vezuje za konsenzus sekvence u promotoru gena *TGFB1* (38, 39). U okviru sekundarnog promotora se nalazi vezujuće mesto (+268/288) za nuklearni faktor aktiviranih T ćelija (NFAT; eng. Nuclear Factor of Activated T cells) (34). Transkripcioni faktor jin-jang 1 (YY1; eng. Yin-Yang) se ponaša se

kao aktivator ili represor zavisno od koncentracije, okolnih promotorskih sekvenci i posttranslacionih modifikacija. Vezuje se za sekvence DNK u distalnom pojačivačkom elementu promotora gena *TGFB1*, dok se u proksimalnom pojačivačkom elementu nalaze specifične sekvence za CREB koji stimuliše transkripciju. U proksimalnom pojačivačkom regionu na poziciji -1081/-1086 su detektovane specifične sekvence za vezivanje glukokortikodnog receptora (GREs; eng, Glucocorticoid Response Elements) (40). Transkripcioni faktori AP-4, NFAT, YY1 i eritroidni transkripcioni faktor (GATA1; eng. GATA-binding protein 1) se vezuju za sekvence u distalnom pojačivačkom elementu (34).

1.7.2 Varijante u genu *TGFB1*

Identifikovan je veliki broj baznih zamena u promotorskim i kodirajućim sekvencama gena *TGFB1*, a najčešće ispitivane varijante su date u tabeli 2 (34, 41). Za promotorske varijante -509C>T i -800G>A se pretpostavlja da su povezane sa izmenjenom produkcijom TGFB1 i najčešće su proučavane kao faktor rizika u bolestima koje se karakterišu inflamacijom i fibrozom uključujući astmu (41-44). Bazna zamena na poziciji -509 u prvom negativnom regulatornom elementu kreira konsenzus sekvencu za YY1 transkripcioni faktor što rezultuje povećanom ekspresijom gena (45, 46). S druge strane prisustvo varijante A na poziciji -800 u proksimalnom pojačivačkom elementu je povezano sa smanjenim afinitetom transkripcionog faktora CREB za DNK i posledično smanjenom ekspresijom gena *TGFB1* (47).

Tabela 2. Varijante u promotorskim i kodirajućim sekvencama gena *TGFB1*

Nomenklatura u odnosu na mesto početka transkripcije	Nomenklatura u odnosu na mesto početka translacije	Identifikacioni broj	Pozicija u genu
-800G>A	c.-1638G>A	rs1800468	Proksimalni pojačivački element
-509C>T	c.-1347C>T	rs1800469	Prvi negativni regulatorni element
+869T>C	c.29T>C (p.Leu10Pro)	rs1800470	Egzon 1
+915G>C	c.74G>C (p.Arg25Pro)	rs1800471	Egzon 1
+11929C>T	c.788C>T (p.Thr263Ile)	rs1800472	Egzon 5

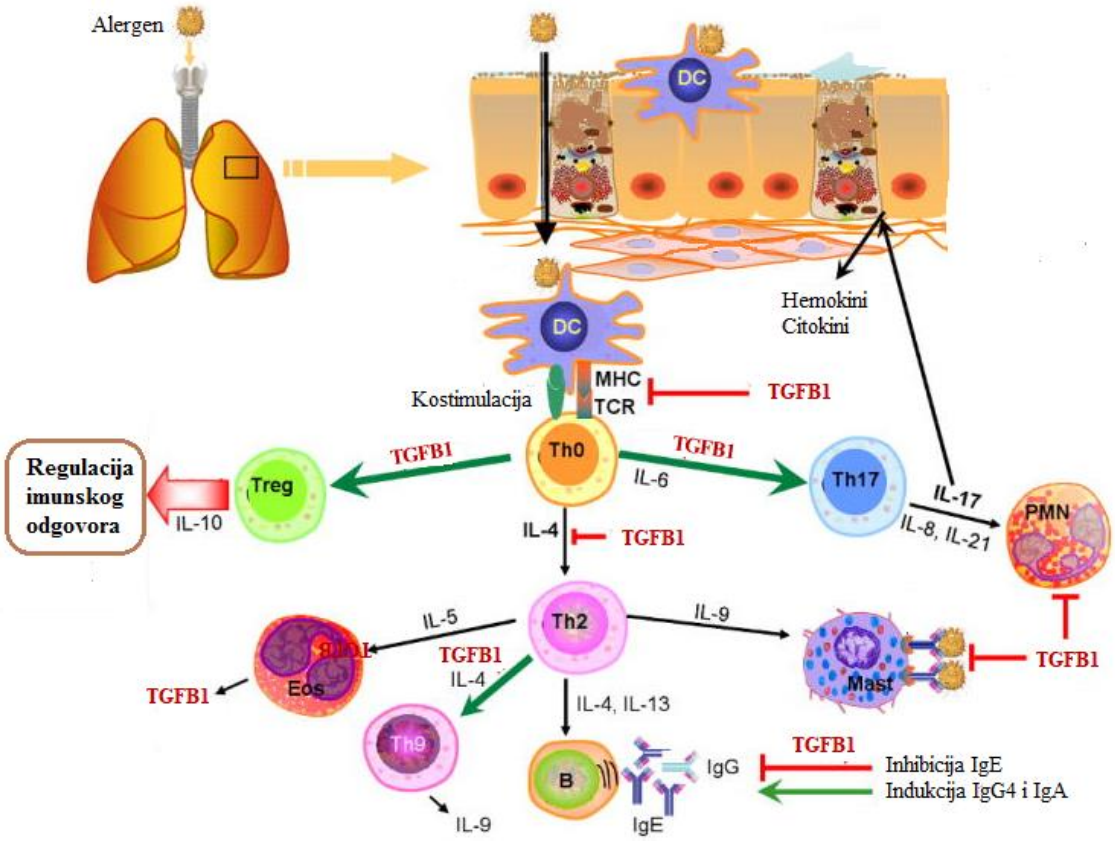
U signalnoj sekvenci su identifikovane dve varijante, +869T>C koja menja kodon 10 (Leu→Pro) i +915G>C koja menja kodon 25 (Arg→Pro). Obe varijante mogu biti povezane sa izmenjenim nivoom TGFB1. Pretpostavlja se da aminokiselinska zamena leucin u prolin utiče na sekreciju TGFB1, dok je zamena arginin u prolin povezana sa aktivacijom latentnog TGFB1 (34, 41). Bazna zamena C→T u kodonu 263 dovodi do aminokiselinske zamene treonin u izoleucin (Thr→Ile) u prekursorskom TGFB1 i može biti povezana sa izmenjenom aktivacijom latentnog TGFB1 (48).

Promene u genu *TGFB1* su povezane sa inflamatornim bolestima respiratornog sistema (alergijski rinitis, hronična opstruktivna bolest pluća i astma) i gastrointestinalnog trakta (ulcerozni kolitis i Kronova bolest) (41, 49-52). Dovode se u vezu sa razvojem kolorektalnog adenoma, karcinoma dojke i prostate (53, 54). Takođe, predstavljaju faktor rizika u vaskularnim oboljenjima, gde usled ateroskleroze može doći do infarkta miokarda ili moždanog udara (55, 56).

1.8 Uloga TGFB1 u astmi

Hronična inflamacija i remodelovanje disajnih puteva su dva međusobno zavisna procesa posredovana medijatorima sa višestrukim funkcijama uključujući i TGFB1. TGFB1 predstavlja važan inflamatorni modulator i profibrotički medijator u astmi (26). Inflamatorne ćelije infiltrirane u disajne puteve sekretuju TGFB1 što rezultuje povišenom koncentracijom ovog citokina u plućima. Kod zdravih osoba su bronhijalne epitelijalne ćelije glavni izvor TGFB1, dok u plućima astmatičara tu ulogu preuzimaju eozinofili i makrofazi (25, 57).

TGFB1 ima dualnu ulogu u inflamaciji (Slika 5). Kao snažan hemoatraktant promoviše inflamaciju regrutujući eozinofile, neutrofile, monocite, makrofage, mastocite, T i B limfocite. Pored toga indukuje proliferaciju i preživljavanje limfocita i makrofaga, učestvuje u diferencijaciji i aktivaciji mastocita, stimuliše proliferaciju i aktivaciju neutrofila (26, 57). Takođe, indukuje diferencijaciju T limfocita u Th17 i Th9 proinflamatorne ćelije (57). TGFB1 antiinflamatornu ulogu ostvaruje kroz inhibiciju Th1 i Th2 imunskog odgovora. Stimuliše diferencijaciju naivnih T regulatornih ćelija (Treg; eng. Regulatory T cells) koje su važni regulatori imunološke tolerancije i imunskog odgovora na različite alergene i mikroorganizme (25).



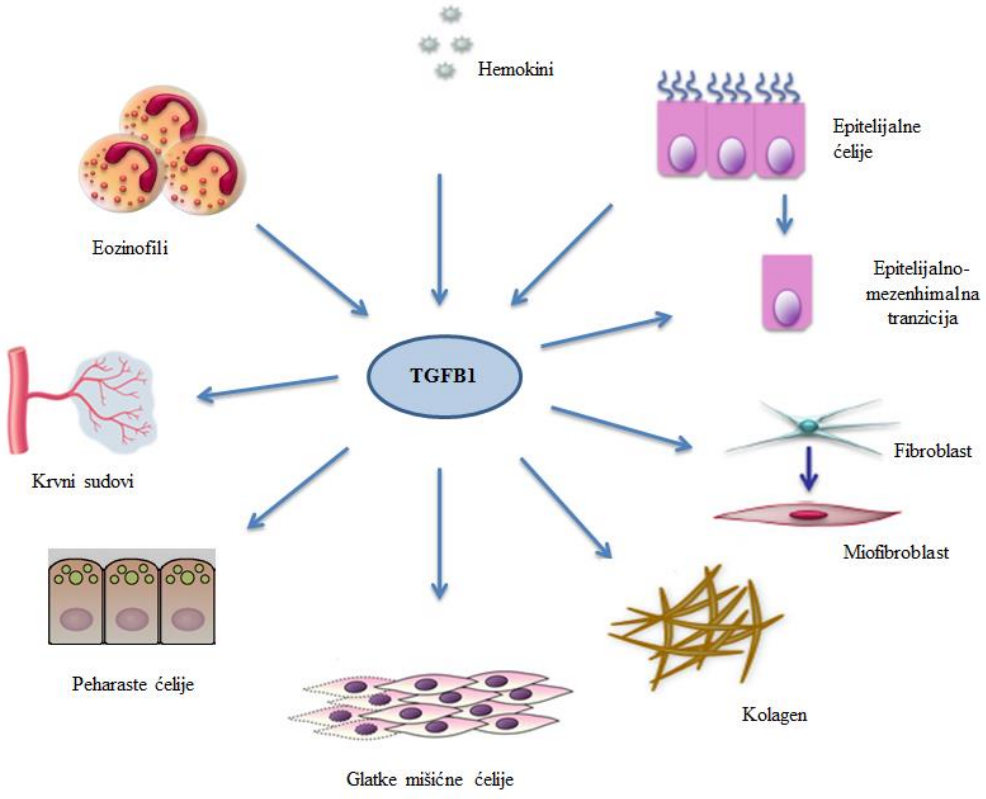
Slika 5. Uloga TGFB1 u regulaciji imunskog odgovora

DC - dendritska ćelija; MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti (eng. Major Histocompatibility Complex); TCR - T-ćelijski receptor; Th - pomoćna T ćelija (eng. T helper cell); Treg - regulatorna T ćelija; IL - interleukin; Ig - imunoglobulin; PMN - polimorfonuklearni leukocit; Mast - mastocit; Eos - eozinofil

(Preuzeto i modifikovano iz rada Qian i saradnici, 2009 (58))

TGFB1 ima važnu ulogu u remodelovanju disajnih puteva (Slika 6) (25). Promoviše fibrozu u disajnim putevima indukujući diferencijaciju fibroblasta u miofibroblaste i sekreciju proteina ekstracelularnog matriksa. S druge strane, TGFB1 smanjuje produkciju enzima koji degraduju ekstracelularni matriks (kolagenaze, heparinaze i stromelizin), a povećava produkciju tkivnih inhibitora matriksnih metaloproteinaza i inhibitora plazminogen aktivatora-1 (24). TGFB1 menja adhezivna svojstva fibroblasta i inflamatornih ćelija infiltriranih u subepitelijalnu mukozu tako što stimuliše ekspresiju

integrina pri čemu povećava vezivanje ovih ćelija za ekstracelularni matriks (24, 26). Sa druge strane promoviše epitelijalno-mezenhimalnu tranziciju čime se narušava adhezija epitelijalnih ćelija i integritet bronhijalnog epitela. TGFB1 pozitivno reguliše proliferaciju fibroblasta i ćelija glatke muskulature. Za razliku od direktnog uticaja na glatke mišićne ćelije, proliferaciju fibroblasta promoviše posredno preko makrofaga (24). Uloga TGFB1 u apoptozi epitelijalnih ćelija je dvojaka i posredovana je odvojenim signalnim putevima. TGFB1 promoviše apoptozu aktivirajući signalni put MAPK, dok anti-apoptotske efekte ostvaruje kroz signalni put zavisan od SMAD proteina (25).



Slika 6. Uloga TGFB1 u remodelovanju disajnih puteva

(Preuzeto i modifikovano iz rada Al-Alawi i saradnici, 2014 (25))

2 CILJ

Iako je molekul TGFB1 često proučavan u astmi, njegova uloga u bolesti nije u potpunosti razjašnjena. S obzirom da je TGFB1 važan profibrotički medijator i inflamatorni modulator, promene u regulaciji ekspresije TGFB1 bi mogle biti povezane sa patogenezom astme i sa adekvatnim odgovorom na terapiju. Povišena koncentracija TGFB1 u plućima i perifernoj cirkulaciji kod pacijenata sa astmom može biti direktna posledica povećane eskpresije gena *TGFB1*.

Imajući u vidu kompleksnost 5' regulatornog regiona gena *TGFB1* i da na modulaciju ekspresije gena pored genetičkih faktora mogu uticati i faktori spoljašnje sredine, ciljevi ovog istraživanja su bili sledeći:

1. Detekcija promotorskih varijanti gena *TGFB1* kod pacijenata sa astmom i zdravih ispitanika
2. Isptivanje uticaja detektovanih promotorskih varijanti gena *TGFB1* kao potencijalnih faktora rizika za nastanak astme
3. Ispitivanje uticaja detektovanih promotorskih varijanti na težinu bolesti i određivanje njihovog značaja kao modulatora odgovora na terapiju
4. Isptivanje uticaja sredinskih faktora rizika za nastanak astme na ekspresiju gena *TGFB1*
5. Ispitivanje uticaja lekova na ekspresiju gena *TGFB1* i sekreciju proteina TGFB1
6. Ispitivanje kombinovanog uticaja funkcionalno značajnih promotorskih varijanti i odabranih lekova na aktivnost promotora gena *TGFB1*

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Ispitanici

U ovu studiju su bili uključeni adultni i pedijatrijski pacijenti oboleli od astme, kao i zdrave adultne osobe. Adultnu grupu pacijenata su činili ispitanici koji su lečeni na Kliničkom odeljenju za pulmologiju i alergologiju sa imunologijom Kliničko bolničkog centra Zvezdara u Beogradu u periodu od 2009. do 2011. godine. Dijagnoza bolesti kod ovih pacijenata je uspostavljena na osnovu anamnestičkih podataka, fizikalnog pregleda i parametara plućne funkcije (FEV1 i FVC). Vrednosti spirometrijskog testa FEV1 <80% i FEV1/FVC <70% od predviđenih vrednosti su bili pozitivni kriterijumi za dijagnozu astme.

Pedijatrijski pacijenti su lečeni na Odeljenju za pulmologiju i alergologiju Univerzitetske dečje klinike u Beogradu u periodu od 2013. do 2015. godine. Kod ovih pacijenata je dijagnostikovana astma ukoliko su ispunili jedan od dva glavna kriterijuma i/ili najmanje dva sporedna kriterijuma. Glavni kriterijumi za dijagnozu astme su pozitivna porodična istorija bolesti i pozitivan kožni test, a sporedni kriterijumi su rinitis, zviždanje u grudima i eozinofilija u indukovanom sputumu. Kod pacijenata starijih od 5 godina primenjivan je i spirometrijski test.

Za procenu kontrole i težine bolesti pacijenata su praćene smernice vodiča za dijagnozu i lečenje astme (GINA). Pored fizikalnog pregleda adultni pacijenti su tokom kontrolnih pregleda popunjavali test o kontroli astme (ACT; eng. Asthma Control Test), dok su pedijatrijski pacijenti popunjavali upitnik o kontroli bolesti (ACQ; eng. Asthma Control Questionnaire). Test o kontroli astme se sastojao od pet pitanja koja su se bodovala ocenama od 1 do 5, a koja su se odnosila na učestalosti simptoma bolesti tokom dana i noći, potrebi za lekovima za brzo otklanjanje simptoma i ličnu procenu pacijenta o kontroli astme. Testom o kontroli astme su dobijene informacije o kvalitetu života pacijenta u poslednje četiri nedelje i zbirna vrednost ACT manja od 20 je ukazivala na lošu kontrolu bolesti. Upitnik o kontroli astme se sastojao od šest pitanja koja su bodovana od 0 do 6. Na

osnovu rezultata ACQ su dobijene informacije o kontroli bolesti pacijenta u poslednjih 7 dana.

Kod adultnih pacijenata je za prevenciju simptoma u dužem vremenskom periodu primenjivana terapija samo inhalacionim kortikosteroidima, i inhalacionim kortikosteroidima u kombinaciji sa dugodelujućim beta-2 agonistima ili leukotrijenskim modifikatorima.

Pacijenti su takođe koristili i fiksnu kombinaciju inhalacionih kortikosteroida sa beta-2 agonistima, a neki su bili i na dodatnoj terapiji teofilinom. Pedijatrijski pacijenti su lečeni standardnom terapijom inhalacionim kortikosteroidima i fiksnom kombinacijom inhalacionih kortikosteroida sa beta-2 agonistima. Neki pacijenti su kao dodatak terapiji koristili dapson.

Kontrolnu grupu su činile zdrave adultne osobe koje su vršile redovan medicinski pregled u Kliničko bolničkom centru Zvezdara u Beogradu i kod kojih je anamnestički, klinički i funkcionalno utvrđeno da nemaju dokumentovanu plućnu patologiju. Parametri plućne funkcije svih kontrolnih ispitanika su pokazali normalne vrednosti FEV1>80% i FEV1/FVC>70% od predviđenih vrednosti.

Za sve ispitanike obuhvaćene ovom studijom je dobijena pismena saglasnost za obavljanje molekularno-genetičkih analiza. Ovo istraživanje su odobrili etički komiteti Kliničko bolničkog centra Zvezdara (pod datumom 30.07.2014.) i Univerzitetske dečje klinike (pod brojem 26/197).

3.2 Materijal

3.2.1 Biološki materijal

3.2.1.1 Uzorci poreklom od ispitanika

U ovom radu su korišćeni uzorci periferne krvi, seruma i indukovanog sputuma.

Uzorci periferne krvi su uzeti od svih ispitanika i odmah po vađenju pomešani sa 0,38% Na-citratom kao antikoagulansom u odnosu 1:9. Uzorci periferne krvi su čuvani na -20°C i dalje su korišćeni za izolaciju DNK.

Uzorci seruma su uzimani od adultnih pacijenata i skladišteni na -70°C do dalje analize. Uzorci seruma su korišćeni za analizu proteina.

Uzorci indukovanog sputuma su sakupljani od svih pedijatrijskih pacijenata. Indukovani sputum je u roku od 2 h po uzorkovanju korišćen za *ex vivo* tretmane i izolaciju RNK.

3.2.1.2 Ćelijska linija

U ovom radu je korišćena adherentna humana ćelijska linija BEAS 2B poreklom od normalnog bronhijalnog epitela. Ova ćelijska linija je dobijena imortalizovanjem primarnih ćelija adenovirus 12 - SV40 hibridom koji nema mogućnost replikacije. Ćelije BEAS 2B su zadržale sposobnost diferencijacije i pogodne su za ispitivanje uticaja hemijskih i bioloških agenasa. Podležu terminalnoj skvamoznoj diferencijaciji u prisustvu veće količine seruma i prilikom postizanja potpune konfluentnosti.

Ćelije BEAS 2B su podvrgavane tretmanima i potom korišćene za izolaciju totalne RNK i tranzijentnu transfekciju, dok je medijum u kome su ćelije gajene korišćen za analizu proteina.

3.2.1.3 Bakterijski sojevi

U ovom radu je korišćen bakterijski soj *E. coli* DH5α (*supE*44 Δ*lac*U169 (*ϕ*80*lacZ*ΔM15) *h*sdR17 *recA*1 *end A*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1).

Bakterijski soj *E. coli* je u ovom radu korišćen za kloniranje.

3.2.2 Plazmidni vektori

Plazmidni vektori sa ampicilinskom rezistencijom korišćeni u ovom radu su bili sledeći: pBluescriptT/A (59) i dva ekspresiona pGL4 vektora, pGL4.10[luc2] i pGL4.70[hRluc] (Promega). pBluescriptT/A je vektor veličine 2994 bp i koristi se za kloniranje. Vektor pGL4.10[luc2], veličine 4242 bp, sadrži reporterski gen za luciferazu poreklom iz svica (*Photinus pyralis*), dok vektor pGL4.70[hRluc], veličine 3522 bp, sadrži reporterski gen za luciferazu poreklom iz renile (*Renilla reniformis*).

Plazmidni vektori su korišćeni za kloniranje i tranzijentne transfekcije.

3.2.3 Oligonukleotidi

U ovom radu su korišćeni sledeći oligonukleotidi:

TGFB1 P1F	5'-GGGAAGCTTGCTTAGCCACATGGGAGGTGC-3'
TGFB1 P1R	5'-GGGCCATGGGCTCAGAGCCGGGGGGGTGC-3'
TGFB1 SESF	5'-GGGCTCGAG CACTGG GGA GCTATG GAA GG-3'
TGFB1 SESR	5'-GGGAAG CTT CCCAGAACG GAAGGA GAGTC-3'
TGFB1 RTF	5'-AAGGACCTCGGCTGGAAGTGG-3'
TGFB1 RTR	5'-CCGGGTTATGCTGGTTGTACA G-3'
GAPDH F	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'
GAPDH R	5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'

Oligonukleotidi TGFB1 P1F, TGFB1 P1R, TGFB1 SESF i TGFB1 SESR su korišćeni u reakaciji lančanog umnožavanja polimerazom, dok su oligonukleotidi TGFB1 RTF, TGFB1 RTR, GAPDH F i GAPDH R korišćeni za relativnu kvantifikaciju gena.

3.2.4 Agensi za tretmane biološkog materijala

Imena i koncentracije agenasa korišćeni za tretmane u ovom radu su navedeni u tabeli 3.

Tabela 3. Imena agenasa i korišćene koncentracije

Naziv supstance	Finalna koncentracija
Montelukast (MNT)	100 μM
Deksametazon (DEX)	5 μM
Prednizon (PR)	10 μM
Dapson (DAP)	10 μM
Polinol (PL)	0,25 mg/mL
Ekstrakt duvanskog dima (CSC*)	40 μg/mL
Lipopolisaharid (LPS)	10 μg/mL

*CSC – eng. Cigarette Smoke Condensate

3.3 Metode

3.3.1 Priprema biološkog materijala

3.3.1.1 Izolovanje DNK

Za izolovanje DNK iz limfocita periferne venske krvi se koristi komercijalni kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen) prema protokolu proizvođača. U epruvete se sipa 200 μL krvi, a zatim se doda 20 μL QIAGEN Protease i 200 μL pufera AL. Smeša se promeša i inkubira 10 min na 56°C. Po inkubaciji u epruvetu se doda 200 μL etanola (96%-100%), smeša se promeša, nanese na prethodno sklopljenu kolonu i centrifugira 1 min na 8000

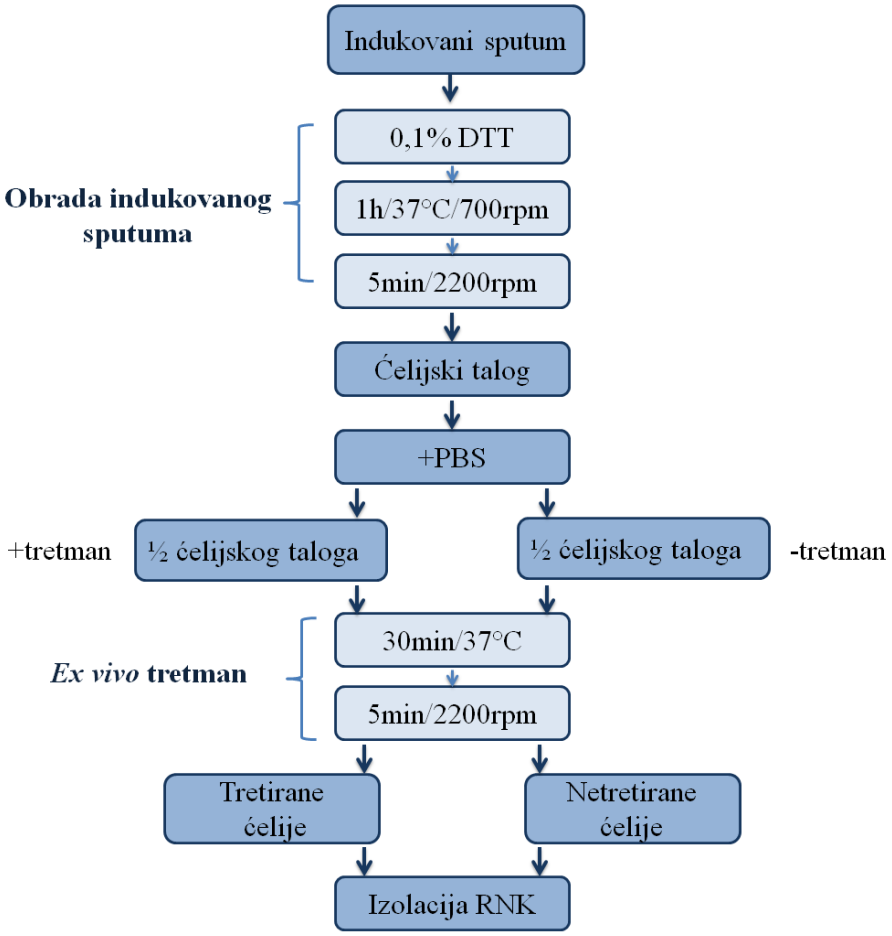
rpm. Pri svakom centrifugiranju epruveta od 2 mL u kojoj se sakuplja filtrat se odbaci, a kolona prenese na novu. Nakon što se epruveta zameni, na kolonu se nanese 500 μL pufera AW1. Centrifugiranje se ponovi 1 min na 8000 rpm. Nakon toga se doda 500 μL pufera AW2 i centrifugira 3 min na 13000 rpm. Kolona se dodatno centrifugira 1 min na 13000 rpm da bi se obezbedilo potpuno uklanjanje pufera AW2, a zatim prenese na novu epruvetu. Doda se 150 μL destilovane vode, ostavi na sobnoj temperaturi 1 min, a zatim centrifugira 1 min na 8000 rpm. Izolovana DNK koja je rastvorena u vodi se čuva na -20°C.

3.3.1.2 Obrada indukovanog sputuma

U uzorak indukovanog sputuma se dodaje mukolitički agens, 0,1% ditiotreitol (DTT), čija je količina 4 puta veća od uzorka. Uzorak se inkubira 1 h na 37°C uz konstantno mešanje na 700 rpm pri čemu se raskidaju disulfidne veze. Nakon homogenizacije uzorak se centrifugira 5 min na 2200 rpm. Supernatant se odbaci, a talog se resuspenduje u 1 mL fosfatnog pufera (PBS; eng. Phosphate Buffered Saline; 137 mM NaCl, 3,7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4, 10,1 mM Na_2HPO_4).

3.3.1.3 Ex vivo tretman ćelija indukovanog sputuma

Nakon što se na adekvatan način pripremi, uzorak indukovanog sputuma se podeli na dva dela, pri čemu se jedan deo tretira odgovarajućim agensom rastvorenim u PBS-u do finalne koncentracije, a u drugi deo koji se koristi kao negativna kontrola se doda samo PBS. Obe smeše, tretirana i netretirana, se inkubiraju 30 min na 37°C, a zatim se centrifugiraju 5 min na 2200 rpm. Supernatant se odbaci, a ćelijski talog se resuspenduje u rastvoru za izolaciju RNK (Slika 7).



Slika 7. Shematski prikaz obrade indukovanog sputuma i *ex vivo* tretmana sputumskih ćelija

DTT - ditiotreitol; PBS - fosfatni pufer (eng. Phosphate Buffered Saline)

3.3.1.4 Ex vivo tretman pune krvi

Uzorak periferne krvi se podeli na dva jednaka dela, a zatim se jedan deo tretira odgovarajućim agensom rastvorenim do finalne koncentracije u PBS-u, dok se drugi deo u koji se doda samo PBS koristi kao negativna kontrola. Dalje se tretirana i netretirana smeša inkubiraju 30 min na 37°C, a zatim centrifugiraju 5 min na 1600 rpm. Supernatant se odbaci, dok se ćelijski talog resuspenduje u 1 mL razblaženog pufera za liziranje eritrocita

(155 mM NH_4Cl, 10 mM $NaHCO_3$, 0,1 mM EDTA). Smeše se inkubiraju 30 min na 37°C uz konstantno mešanje, a zatim se centrifugiraju 15 min na 1600 rpm. Supernatant se odlije, dok se ćelijski talog ispere tri puta sa 500 µL PBS-a centrifugiranjem na 1600 rpm u trajanju od 3 min, a potom se resuspenduje u rastvoru za izolaciju RNK.

3.3.1.5 Izolovanje RNK

Rastvori koji se koriste za izolaciju RNK se prave sa DEPC-vodom. DEPC-voda se prethodno priprema kao 0,1% dietilpirokarbonatni rastvor, inkubiran na 37°C preko noći, nakon čega se autoklavira 1 h na 100°C.

Za izolaciju totalne RNK iz ćelija se koristi TriReagent rastvor (Life Technologies), monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata, prema uputstvu proizvođača. Ćelije se u epruveti resuspenduju dodavanjem 1 mL TriReagent rastvora. Smeša se inkubira na sobnoj temperaturi 5 do 10 min, a ćelije se dodatno liziraju laganim mešanjem pomoću pipete. U liziran uzorak se doda 200 µL hloroforma, epruveta se snažno promućka i inkubira na sobnoj temperaturi 15 min. Uzorak se centrifugira 15 min na 12000 rcf na 4°C, nakon čega se jasno izdvajaju sledeće faze: vodena faza u kojoj se nalazi RNK (gornja faza), interfaza (srednja faza) i organska faza u kojoj se nalaze DNK i proteini (donja faza). Vodena faza se prebaci u novu epruvetu, doda se 1 mL izopropanola, i smeša se lagano promeša invertovanjem tube. Kako bi se istaložila RNK, smeša se inkubira 10 do 15 min na sobnoj temperaturi. Epruveta se dalje centrifugira 15 min na 12000 rcf na 4°C, a zatim se odlije supernatant. Talog se opere sa 1 mL hladnog rastvora 70% DEPC-etanol (etanol razblažen sa DEPC-vodom) i epruveta se centrifugira 10 min na 12000 rcf na 4°C. Supernatant se odlije, RNK talog se osuši na sobnoj temperaturi i rastvori u DEPC-vodi. Uzorak se do dalje upotrebe čuva na -80°C.

3.3.2 Analiza DNK, RNK i proteina

3.3.2.1 Određivanje koncentracije nukleinskih kiselina

Koncentracija i čistoća DNK i RNK se određuju spektrofotometrijski merenjem apsorbance na 260 nm i 280 nm, korišćenjem aparata NanoVue (GEHealthcare Lifesciences).

3.3.2.2 Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom

Reakcija lančanog umnožavanja polimerazom (PCR; eng. Polymerase Chain Reaction) omogućava umnožavanje segmenta DNK definisanog oligonukleotidima koji su komplementarni njegovim krajevima. Ovom metodom se stvara veliki broj kopija sekvence DNK od interesa koristeći malu količinu polazne DNK. Metoda se zasniva na osobini DNK polimeraze da ugrađuje pojedinačne nukleotide na 3'-OH kraj rastućeg polinukleotidnog lanca i time sintetiše komplemenatran lanac na postojeću matricu (DNK). Za započinjanje reakcije neophodno je prvo vezivanje graničnika koji ima slobodnu -OH grupu na 3' kraju.

U PCR reakciju se dodaju odgovarajući graničnici zavisno od željenog fragmenta, dok je ostatak reakcione smeše isti u svim reakcijama i čine je sledeće komponente:

- 5 µL 10x pufera za *Taq* polimerazu sa $MgCl_2$ (Kapa)
- 5 µL smeše dNTP (2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP)
- po 1 µL graničnika (10 pmol/µL)
- 5 µL DMSO (dimetil-sulfoksid)
- 0,5 µL (1 U/µL) *Taq* polimeraze (Kapa)
- 5 µL rastvora DNK (20-50 ng)
- Destilovana voda do 50 µL

Koristi se sledeći program za umnožavanje: 95°C/10 min; 35 ciklusa: 95°C/45 sec, 60°C/1 min, 72°C/30 sec; 72°C/10 min.

3.3.2.3 Prečišćavanje DNK fragmenata

Za prečišćavanje fragmenata DNK dobijenih reakcijom lančanog umnožavanja polimerazom se koristi komercijalni kit QIAquick PCR Purification Qiagen po protokolu koji je obezbedio proizvođač. Na jednu zapreminu PCR smeše se doda pet zapremina pufera PBI. Zatim se smeša dobro promeša, prenese na prethodno sklopljenu QIAquick spin kolonicu i centrifugira 1 min na 13000 rpm. Sakupljena tečnost se odbaci, a kolonica vrati na istu tubu od 2 mL. Doda se 750 µL pufera PE i postupak centrifugiranja se ponovi. Nakon što se tečnost ponovo odbaci, kolonica se dodatno centrifugira 1 min na 13000 rpm. Zatim se kolonica prebaci na čistu epruvetu, nanese 30 µL destilovane vode i inkubira 1 min na sobnoj temperaturi. DNK se eluira sa kolonice centrifugiranjem 1 min na 13000 rpm.

3.3.2.4 Sekvenciranje DNK

Metodom sekvenciranja se određuje redosled nukleotida u molekulu DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK polimeraze da sintetiše komplementarni lanac DNK, nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK. Reakcija sinteze komplementarnog lanca se zaustavlja ugrađivanjem didezoksiribonukleotida (ddNTP) koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK. Reakcije se vrše sa samo jednim graničnikom. Na ovaj način se dobija serija jednolančanih fragmenata koje se završavaju didezoksiribonukleotidom i čija se dužina razlikuje za po jedan nukleotid. Svaki od četiri didezoksiribonukleotida je obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućeno da se reakcija sekvenciranja vrši u istoj reakciji. Za reakciju sekvenciranja je potrebno na adekvatan način pripremiti prečišćenu matricu DNK (PCR produkt ili plazmid) i odgovarajući oligonukleotid. Sekvenciranje DNK se vrši komercijalnim kitom Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems).

Reakcija sekvenciranja se odvija u smeši ukupne zapremine 8 µL koja sadrži:

- 1 µL PCR produkta (6-12 ng)
- 1 µL oligonukleotida (3,2 pmol/µL)
- 2 µL Ready Reaction MIX (Applied Biosystems)
- 4 µL destilovane vode

Koristi se sledeći program za umnožavanje: 96°C/10 min; 25 ciklusa: 96°C/10 min, 50°C/5 sec, 60°C/4 min.

Nakon umnožavanja, dobijeni produkti reakcije sekvenciranja se prečišćavaju. U 8 µL reakcione smeše se doda 40 µL rastvora A (1,2 mL 3 M Na-acetata (pH 5,2), 25 mL etanola i 5,8 mL H_2O). Zatim se smeša centrifugira 10 min na 13000 rpm. Nakon odlivanja supernatanta postupak ispiranja taloga sa 200 µL 70% etanola i centrifugiranja 10 min na 13000 rpm se ponovi dva puta. Talog se osuši i rastvori u 20 µL HiDi Formamide (Applied Biosystems). Tako pripremljeni uzorci se nanesu na aparat i podvrgavaju kapilarnoj elektroforezi. Sekvenciranje se vrši na četvorokapilarnom automatizovanom sistemu za elektroforezu sa sistemom za detekciju zasnovanim na fluorescenciji 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Podaci dobijeni sekvenciranjem se obrađuju pomoću softvera Sequencing Analysis Software 5.2 (Applied Biosystems).

3.3.2.5 Metoda polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata

Metoda polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP; eng. Restriction Fragment Length Polymorphism) omogućava direktnu detekciju promena u DNK sekvenci. U zavisnosti od toga da li je ispitivana promena prisutna ili odsutna iz sekvence DNK zavisiće i očuvanost mesta prepoznavanja određene restrikcione endonukleaze. Obrada PCR produkata određenim restrikcionim enzimom, rezultuje dobijanjem DNK fragmenata različite dužine. Nakon razdvajanja produkata digestije na agaraznom gelu prisustvo promene potvrđuje određeni obrazac traka.

Digestija PCR fragmenta restrikcionim enzimom *Dde*I radi detekcije nukleotidne zamene u sekvenci DNK se vrši u reakcionoj smeši od 45 µL koja sadrži 40 µL umnoženog fragmenta, 4,5 µL 10x NE Buffer 3 (New England BioLabs) i 0,5 µL enzima *Dde*I (10 U/µL, New England BioLabs). Reakciona smeša se inkubira preko noći na 37°C.

Digestija PCR fragmenta restrikcionim enzimom *Tai*I se vrši u reakcionoj smeši od 20 µL koja sadrži 17,5 µL umnoženog fragmenta, 2 µL 10x R Buffer (Thermo Scinetific) i 0,5 µL enzima *Tai*I (10 U/µL, Thermo Scinetific). Reakciona smeša se inkubira 3 h na 60°C.

3.3.2.6 Elektroforeza DNK u gelu od agaroze

Elektroforeza se vrši u 1x puferu TAE (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 1 mM Na_2EDTA) pri naponu 7-10 V/cm. Kako bi se omogućila vizualizacija DNK u gel se dodaje etidijum-bromid (0,5 µg/mL), a zatim se gel osvetljava UV svetlošću. Elektroforezom u 2% gelu od agaroze se analiziraju fragmenti dobijeni reakcijom lančanog umnožavanja i fragmenti dobijeni digestijom PCR produkata restrikcionim enzimima. Analiza plazmidne DNK i produkata dobijenih digestijom plazmidne DNK se vrši elektroforezom u 1% gelu od agaroze.

3.3.2.7 Sinteza komplementarne DNK

Sinteza komplementarne DNK (cDNK) se vrši pomoću komercijalnog kita High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) po uputstvu proizvođača. U prisustvu nasumičnih graničnika i reverzne transkriptaze totalna informaciona RNK (iRNK) se prevodi u jednolančanu cDNK. Sinteza cDNK se vrši u reakcionoj smeši ukupnog volumena od 20 µL sledećeg sastava:

- 2 µL 10x pufera RT
- 0,8 µL 25x dNTP (100 mM)
- 2 µL 10x nasumičnih graničnika
- 1 µL RNaze inhibitora

- 1 µL MultiScribe reverzne transkriptaze
- 0,25-1 µg RNK
- destilovana voda bez RNaze do 20 µL

Za sintezu cDNK se prema uputstvu koristi sledeći program: 25°C/10 min; 37°C/120 min, 85°C/5 sec.

3.3.2.8 Kvantifikacija ekspresije gena qRT- PCR metodom

Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qRT-PCR; eng. Quantitative Real-Time PCR) je najosetljivija i najpouzdanija metoda za kvantifikaciju nukleinskih kiselina koja se bazira na detekciji fluorescentnog signala. Ovom metodom se prati akumulacija DNK produkta tokom PCR reakcije. U početnim ciklusima PCR reakcije signal nije detektabilan i tim ciklusima se definiše osnovni nivo signala amplifikacione krive. Tačka u kojoj intenzitet signala PCR reakcije doseže intenzitet fluorescentnog signala iznad osnovnog nivoa označen je kao "treshold" i definisan je parametrom Ct. Parametar Ct se definiše kao ciklus u kome intenzitet fluorescencije dostiže osnovni nivo.

Za kvantifikaciju ekspresije gena metodom SYBR Green se koristi komercijalni kit BriliantII SYBR Green QPCR Low ROX Master mix (Agilent Technologies) prema uputstvu proizvođača. Fluorescentna SYBR Green boja se vezuje za male žljebove cDNK sintetisane tokom PCR reakcije.

Reakcija umnožavanja gena metodom SYBR Green se odvija u smeši u ukupnoj zapremini 10 µL koja sadrži:

- 5 µL Briliant II SYBR Green QPCR Low ROX Master mix
- 300 nM odgovarajućih graničnika
- 25 ng cDNK

Za reakciju umnožavanja se koristi sledeći program: 50°C/2 sec; 95°C/3 min, 40 ciklusa: 95°C/15 sec, 60°C/1 min. Merenje se vrši na aparatu 7500 Real-time PCR (Applied

Biosystems) u triplikatu. Nakon svakog merenja se određuje kriva topljenja fragmenta kako bi se potvrdila specifičnost reakcije.

Za merenje nivoa ekspresije gena u tretiranim uzorcima se koristi qRT-PCR metoda sa komparativnom ddCt analizom. Ekspresija ciljnog gena se normalizuje u odnosu na endogenu kontrolu i u odnosu na kalibrator. Relativna vrednost količine ekspresije se dobija prema formuli: $Q = 2^{-ddCt}$, gde je $ddCt = dCt_{uzorak} - Ct_{kalibrator} = (Ct_{target,\ uzorak} - Ct_{endogena\ kontrola,\ uzorak}) - (Ct_{target,\ kalibrator} - Ct_{endogena\ kontrola,\ kalibrator})$. Kao endogena kontrola je korišćena ekspresija gena gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH; eng. Glyceraldehide 3-Phosphate Dehydrogenase), a za kalibrator je odabrana srednja vrednost normalizovanih vrednosti ekspresije ciljnog gena u netretiranim uzorcima.

3.3.2.9 Kvantifikacija proteina ELISA metodom

Metod ELISA (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se koristi za određivanje koncentracije proteina u tečnim uzorcima i zasniva se na imunoenzimskoj reakciji. U eseju se koristi mikrotitar ploča sa bunarićima čija su dna obložena odgovarajućim antitelima. Nakon dodavanja uzorka i monoklonskog antitela obeleženog biotinom, uzorak se nalazi između dva sloja antitela (sendvič ELISA). Peroksidaza rena (HRP; eng. Horseradish Peroxidase) je združena sa streptavidinom koji se vezuje za biotin. Nakon formiranja avidin-biotin kompleksa dodaje se supstrat tetrametilbenzidina (TMB; eng. Tetramethylbenzidine). Peroksidaza oksiduje bezbojni TMB u plavo obojeni produkt. Reakcija se prekida dodavanjem sumporne kiseline pri čemu se razvija žuta boja. Apsorbanca se očitava spektrofotometrijski korišćenjem filtera 450 nm i korekcijom talasne dužine oduzimanjem apsorbance izmerene na filteru 620 nm.

Ukoliko se u uzorku određuje koncentracija proteina koji se sekretuju u neaktivnoj formi, neophodno je prethodno ekstrahovati uzorak. Pod ekstrakcijom se podrazumeva prevođenje proteina u imunoreaktivnu formu kako bi bio prepoznat od strane antitela i mehanizam zavisi od proteina koji se kvantifikuje. Prema protokolu proizvođača za komercijalni Multispec TGFB1 ELISA kit se za oslobađanje proteina iz latentnog

kompleksa koristi Extraction Solution (pH <7). U epruvetu se sipa 100 µL uzorka, a zatim doda 300 µL rastvora za ekstrakciju i smeša se inkubira 30 min na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje. Uzorci se centrifugiraju 10 min na 1000 rcf i supernatant se prebaci u novu epruvetu. Ukoliko su uzorci bogati proteinima dalje se dodatno razblažuju 10 puta pomoću pufera za razblaživanje. U bunariće na mikrotitar ploči se sipa po 200 µL uzoraka za analizu. U posebne bunariće se sipa po 200 µL uzoraka sa standardizovanom opadajućom koncentracijom proteina koji se prethodno na adekvatan način pripreme. U sve bunariće se zatim doda 50 µL antitela konjugovanog sa biotinom i smeše se inkubiraju 3 h na sobnoj temperaturi. Dalje se svi bunarići 4 puta dobro isperu puferom za ispiranje. Zatim se doda 100 µL rastvora Streptavidin-HRP enzima i smeše se inkubiraju 30 min na sobnoj temperaturi. Ispiranje se ponovi 4 puta, doda se 100 µL TMB supstrata i smeše se inkubiraju u mraku na sobnoj temperaturi maksimalno 30 min. Reakcija se prekida dodavanjem 100 µL rastvora za zaustavljanje reakcije. Koncentracija citokina (pg/mL) se određuje u odnosu na standardnu krivu pri čemu se uzima u obzir faktor razblaženja. Standardna kriva se pravi na osnovu vrednosti izmerenih u uzorcima sa standardizovanim dvostruko opadajućim koncentracijama citokina. Osetljivost ovog eseja je <15 pg/mL.

3.3.3 Rad sa bakterijama

3.3.3.1 Kultivacija bakterija

Bakterije se kultivišu na temperaturi od 37°C i za rad sa bakterijama su neophodni sterilni uslovi (60). Bakterije *E. coli* soja DH5α se gaje u tečnom medijumu LB (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj podlozi LA (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% agra). Medijumi za kultivisanje bakterija se sterilišu autoklaviranjem 20 min na 121°C. Prilikom gajenja bakterija se u tečni i čvrsti medijum dodaje odgovarajući antibiotik.

3.3.3.2 Izolovanje plazmidne DNK

Izolacija plazmidne DNK iz bakterija se vrši metodom “10 minutni” mini prep prema prethodno opisanom protokolu (60). U epruvete se odvoji 1,5 mL prekonoćne

bakterijske kulture i centrifugira 20 sec na 13000 rpm. Supernatant se odlije tako da u epruveti ostane 50 do 100 µL medijuma LB, a pelet se resuspenduje kratkim mešanjem. U epruvete se zatim doda 300 µL pufera TENS (1 M Tris HCl (pH 8,0), 0,5 M EDTA, 10 M NaOH, 10% SDS) i ponovo kratko izmeša. U istu epruvetu se sipa 150 µL 3M Na-acetata (pH 5,2), izmeša i centrifugira 5 min na 13000 rpm. Supernatant se prebaci u novu epruvetu, doda se 1 mL hladnog 95% etanola i centrifugira 2 min na 13000 rpm. Talog se opere sa 500 µL 70% etanola i centrifugira 5 min na 13000 rpm. Dalje se supernatant odlije, talog osuši i resuspenduje u 30 µL destilovane vode. Do dalje upotrebe plazmidna DNK se čuva na -20°C.

3.3.3.3 Digestija plazmida

Digestija PGL4.10 i BluescriptT/A plazmida restrikcionim enzimima *Hind*III i *Nco*I se vrši u reakcionoj smeši od 25 µL koja sadrži 1 µg plazmida, 2,5 µL 10x Tango Buffer (Fermentas), 1 µL enzima *Hind*III (10 U/µL, Fermentas) i 1 µL enzima *Nco*I (10 U/µL, Fermentas). Reakciona smeša se inkubira preko noći na 37°C.

3.3.3.4 Prečišćavanje DNK iz gela od agaroze

Ekstrakcija i prečišćavanje DNK fragmenata iz gela od agaroze se vrši komercijalnim kitom QIAquick Gel Extraction (Qiagen) prema uputstvu proizvođača. Nakon elektroforeze deo gela u kome se nalazi fragment DNK od interesa se iseče skalpelom, izmeri na vagi i prebaci u epruvetu. U epruvetu se dodaju tri volumena pufera QG (u odnosu na volumen gela) i smeša se inkubira 10 min na 50°C uz povremeno mešanje. Uzorak se prenese na prethodno sklopljenu QIAquick kolonu i centrifugira 1 min na 13000 rpm. Sakupljena tečnost se odbaci, a kolona se vrati na istu tubu. Kako bi se uklonili svi tragovi agaroze doda se 500 µL pufera QG i ponovo centrifugira 1 min na 13000 rpm. Tečnost se odbaci, a na kolonu se doda 750 µL pufera PE i još jednom centrifugira pri istim uslovima. Kolona se zatim prenese na sterilnu epruvetu i na nju se nanese 30 µL destilovane vode. Nakon što tako odstoji 1 min, DNK se eluira

centrifugiranjem u trajanju od 1 min na 13000 rpm. Do dalje upotrebe ovako izolovana DNK se čuva na -20°C.

3.3.3.5 Ligacija

Prečišćeni fragmenti dobijeni umnožavanjem u PCR reakciji odgovarajućim graničnicima se ligiraju u vektor za kloniranje BluescriptT/A. Reakcija ligacije u ovaj vektor se vrši u zapremini od 20 µL i sadrži 2 µL 10x pufera za ligaciju, 1 µL ATP, 1 µL T4 ligaze (200 U, Fermentas), 50 ng vektora i 140 ng prečišćenog fragmenta. Reakciona smeša se inkubira preko noći na 4°C.

Ligacija fragmenata dobijenih prečišćavanjem isečenog inserta iz vektora BluescriptT/A sa vektorom pGL4.10[luc2] se vrši u zapremini 20 µL. Reakciona smeša sadrži 2 µL 10x pufera za ligazu (Promega), 1 µL T4 ligaze (100 U, Promega), 50 ng linearizovanog vektora pGL4.10[luc2] i 30 ng prečišćenog inserta. Reakcija ligacije se vrši 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim preko noći na 4°C.

3.3.3.6 Priprema kompetentnih ćelija E. coli

Kako bi stekle sposobnost da prime strane molekule DNK bakterijske ćelije se tretiraju puferima koji povećavaju propustljivost bakterijske membrane. Priprema kompetentnih bakterijskih ćelija za transformaciju se vrši na sledeći način (60). Sa čvrste LA podloge se inokuliše nekoliko pojedinačnih kolonija u 10 mL tečnog medijuma LB. Nakon kultivacije preko noći na 180 rpm na 37°C, 2 mL bakterijske kulture se prebaci u erlenmajer sa 200 mL medijuma LB. Kultura se gaji na 37°C na 180 rpm do dostizanja optičke gustine (OD; eng. Optical Density) od 0,3 do 0,5 OD/mL koja se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 600 nm. Nakon dostizanja optičke gustine kultura se centrifugira na 2500 rpm 10 min na 4°C. Supernatant se odlije, a ćelijski talog se resuspenduje u 10 mL 0,1 M $CaCl_2$, inkubira na ledu 15 min i centrifugira 10 min na 2500 rpm na 4°C. Supernatant se odlije, a talog se resuspenduje u 2 mL hladnog RF2 rastvora (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 7 mM $CaCl_2$ i 15% glicerol). Nakon toga se smeša inkubira

na ledu 15 min, a zatim se po 20 µL razdeli hladnim nastavcima u hladne 1,5 mL epruvete na ledu. Kompetentne bakterijske ćelije se čuvaju do upotrebe na -80°C.

3.3.3.7 Transformacija kompetentnih bakterijskih ćelija

Metodom transformacije se u bakterije ubacuje željena plazmidna DNK. Protokol za transformaciju bakterija toplotnim šokom je sledeći (60). U alikvot kompetentnih ćelija se doda 10 µL ligacione smeše, blago se promeša i inkubira 1 h na ledu. Dalje se smeša inkubira 2 min na 42°C kako bi se bakterije transformisale, a zatim ponovo 5 min na ledu. Transformisanim ćelijama se doda 400 µL tečnog medijuma LB bez antibiotika i kultura se inkubira 1 h na 37°C pri 180 rpm. Nakon toga se tečna bakterijska kultura utrlja u čvrstu LA podlogu i inkubira preko noći na 37°C.

Dobijeni transformanti su vijabilni na LA podlogama nekoliko nedelja. Za duže čuvanje transformanata se pripremaju glicerolski stokovi. Odaberu se prekonoćne kulture za koje je sekvenciranje izolovanih plazmida pokazalo da nose željeni insert i po 850 µL se doda u epruvete sa 150 µL sterilnog glicerola. Glicerolski stokovi se čuvaju na -80°C, a bakterije ostaju vijabilne nekoliko godina.

3.3.3.8 Priprema plazmidne DNK za transfekcije

Za izolaciju plazmidne DNK za transfekcije u ćelijskoj kulturi se koristi PureLink HiPure Plasmid Dna Purification kit (Invitrogen) prema uputstvu koje je obezbedio proizvođač. U epruvete se odvoji 1,5 mL prekonoćne bakterijske kulture i centrifugira 10 min na 4000 rcf. Supernatant se odbaci. Dodatnih 1,5 mL se odvoji u istu epruvetu i centrifugiranje se ponovi. U bakterijski talog se doda 400 µL pufera L7 kako bi se lizirale ćelije. Smeša se blago promeša invertovanjem tube nekoliko puta i inkubira 5 min na sobnoj temperaturi. Kako bi se istaložila DNK u istu epruvetu se sipa 400 µL pufera N3, zatim se smeša promeša na isti način i dobijeni lizat se centrifugira 10 min na 12000 rcf. U sledećem koraku se supernatant prenese na kolonu, koja se prethodno kalibriše propuštanjem 2 mL pufera za kalibraciju EQ1. Nakon što gravitacionim putem uzorak prođe kroz kolonu, plazmidna DNK vezana na koloni se ispere dva puta puferom W8. Sa

900 µL pufera E4 plazmidna DNK se eluira u čistu epruvetu u koju se potom doda 630 µL 100% izopropanola. Smeša se dobro promeša i centrifugira 30 min na 12000 rcf na 4°C. Supernatant se odbaci, a talog ispere sa 1 mL 70% etanola centrifugiranjem 5 min pod istim uslovima. Supernatant se ponovo odbaci, a talog se osuši na sobnoj temperaturi 10 min i rastvori u 50 µL pufera TE. Tako izolovana plazmidna DNK se čuva na -20°C.

3.3.4 Rad sa ćelijskim linijama

3.3.4.1 Kultivacija humanih ćelijskih linija

Za rad sa ćelijskim linijama su neophodni sterilni uslovi. Ćelije se gaje u inkubatoru sa automatskim protokom 5% CO_2 na temperaturi od 37°C. Za održavanje ćelijske linije BEAS 2B se koristi kompletan medijum LHC9 koji se sastoji od 98% bazalnog medijuma LHC9, 2% fetalnog goveđeg seruma (FBS; eng. Fetal Bovine Serum), 10 U/µL penicilina i 10 ng/mL streptomicina. PBS se koristi za pranje ćelija, a tripsin (Sigma) za odlepljivanje ćelija od suda za gajenje. Komponente se pre upotrebe zagreju na 37°C.

Ćelije se zasejavaju u flask tako što se alikvoti ćelija brzo otope, resuspenduju u svežem kompletnom medijumu i prenesu u flask. Subkultivacija se vrši kada ćelije dostignu konfluentnost 80-90% na svaka 2 do 4 dana. Medijum u kome su gajene ćelije se odlije, a ćelije se operu PBS-om dva puta. Ćelije se odlepljuju od suda za gajanje tako što se doda 1x tripsin i inkubiraju u trajanju od 3 do 5 min. Tripsin se inaktivira dodavanjem kompletnog medijuma LHC9. Ćelije se potom pipetom dobro resuspenduju i podele u odgovarajuće sudove za gajenje ili se deo odvoji za zamrzavanje.

Ćelije se zasejavaju u odgovarajuće sudove u određenom broju. Za brojanje ćelija se koristi Neubauer-ova pločica koja ima 4 velika polja, svako sa 16 (4x4) manjih polja, i gustina ćelija se izračuna po sledećoj formuli: broj ćelija/ml = broj ćelija/$4x10^4$.

Zamrzavanje ćelija se vrši u medijumu za zamrzavanje koji se sastoji od 90% FBS i 10% DMSO, u kome DMSO ima krioprotektivnu ulogu. Nakon što se operu PBS-om i odlepe od suda ćelije se iz flaska prebace u tube i centrifugiraju 3 min na 1800 rpm.

Supernatant se odbaci, a ćelije se resuspenduju u medijumu za zamrzavanje. Dalje se ćelije razdeljuju u kriotube i zamrznu prvo na -20°C (4 do 8 h), a zatim na -80°C (16 do 24 h). Nakon toga se ćelije smeste u tečni azot (-196°C). Na toj temperaturi hemijske i fizičke aktivnosti u ćeliji su na zanemarljivom nivou i one ostaju vijabilne godinama.

3.3.4.2 Tretmani ćelija BEAS 2B

Ćelije BEAS 2B se za tretmane zasejavaju u mikrotitar ploču sa 6 bunarića pri gustini $3x10^5$ ćelija u 1 mL kompletnog medijuma LHC9. Nakon 24 h medijum se odlije, a ćelije se tretiraju 1 h sa odgovarajućom supstancom rastvorenom do finalne koncentracije u medijumu LHC9 obogaćenom samo sa 10 U/µL penicilina i 10 ng/mL streptomicina. Nakon tretmana medijum se odlije u epruvete od 1,5 mL za dalju analizu proteina, a ćelije se liziraju pomoću TriReagent rastvora za izolaciju totalne RNK.

3.3.4.3 Transfekcija humanih ćelijskih linija

Za transfekciju ćelija BEAS 2B se koristi reagens Lipofectamine 2000 (Invitrogen), prema uputstvu proizvođača. U mikrotitar ploču sa 12 bunarića se zaseju ćelije pri gustini $1,5x10^5$ u 1 mL kompletnog medijuma LHC9. Nakon 24 h gajenja ćelije se u svakom bunariću transfekuju sa 980 ng plazmida pGL4.10[luc2] sa odgovarajućim insertom i 20 ng plazmida pGL4.70[hRluc]. U dve tube se sipa po 650 µL medijuma Opti-MEM, a zatim se u jednu doda DNK, a u drugu 36 µL reagensa Lipofectamine. Obe smeše se dobro promešaju, a zatim spoje u jednu koja se dobro izmeša i inkubira 10 min na sobnoj temperaturi kako bi se formirao kompleks između DNK i reagensa Lipofectamine. U međuvremenu se medijum u kome su gajene ćelije zameni novim medijumom bez seruma. Dalje se po 100 µL formiranog kompleksa DNK-Lipofectamine nakapa u svaki bunarić. Pet sati nakon transfekcije medijum se zameni novim koji sadrži agens za stimulaciju promotora i ćelije se kultivišu preko noći.

3.3.4.4 Luciferazni esej

Metoda luciferaznog eseja se zasniva na tome da se u istom uzorku mere aktivnosti dve luciferaze, luciferaze svica (gen [luc2]) i luciferaze renile (gen [hRluc]). Merenje se vrši pomoću luciferaznog reporter sistema (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega) prema uputstvu proizvođača. Ćelije u kojima se meri aktivnost produkata gena luc2 i hRluc se prethodno transfekuju plazmidom pGL4.10[luc2] koji nosi željeni insert i kontrolnim plazmidom pGL4.70[hRluc]. Merenje se vrši u triplikatu na aparatu GloMax 20/20 Luminometer (Promega).

Priprema ćelijskih ekstrakata

Ćelije se isperu dva puta PBS-om, a zatim se u svaki bunarić doda 200 µL 1x Passive Lysis Buffer (Promega). Ćelije se inkubiraju 30 min na ledu, a potom se dobijeni ćelijski ekstrakti sakupljaju u epruvete od 1,5 mL i centrifugiraju 30 sec na 13000 rpm. Supernatanti koji sadrže proteine ćelijskih ekstrakata se prebace u nove epruvete od 1,5 mL i čuvaju na -80ºC.

Merenje luciferazne aktivnosti

Za merenje aktivnosti luciferza se odvoji 10 µL ćelijskih ekstrakata pripremljenih u 1x Passive Lysis Buffer-u. Prvo se meri aktivnost luciferaze svica tako što se u uzorak doda 50 µL reagensa LAR II (eng. Luciferase Assay Reagent II), koji sadrži luciferin, supstrat za luciferazu. Enzimska aktivnost luciferaze se sastoji u prevođenju luciferina u oksiluciferin pri čemu se emituje luminiscentni signal koji se meri na luminometru. Ovaj signal se prekida dodavanjem reagensa Stop&Glo Reagent u kome se nalazi koelenterazin, supstrat za luciferazu renile. Prilikom prevođenja koelenterazina u koelenteramid se emituje drugi signal koji se takođe meri na aparatu, a koji se gasi postepeno tokom merenja.

3.4 Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka se koristi softver Statistical Package for Social Science (SPSS) verzija 20.0. Nezavisne kategorijske promenljive se analiziraju korišćenjem Pirsonovog χ^2 testa. Kolmogorov-Smirnov test se koristi kako bi se analizirala distribucija kontinualnih vrednosti i izabrao odgovarajući test. Razlike između kontinualnih vrednosti za nezavisne uzorke se analiziraju pomoću sledećih testova: Independent Sample t test, Independent Samples Mann Whitney U test i Kruskal Wallis test. Razlike između kontinualnih vrednosti za zavisne uzorke se analiziraju pomoću Paired Sample t testa i Related Samples Wilcoxon Signed Rank testa. Vrednosti $P \leq 0,05$ se smatraju statistički značajnim.

4 REZULTATI

4.1 Karakteristike grupa ispitanika

Ova studija je uključila adultne i pedijatrijske pacijente obolele od astme i zdrave adultne osobe. U adultnu i pedijatrijsku grupu pacijenata je bilo uključeno po 102 ispitanika, dok je kontrolna grupa uključila 58 ispitanika. Osnovne karakteristike grupa ispitanika su date u tabeli 4.

Tabela 4. Osnovne karakteristike grupa ispitanika

	Adultni pacijenti	Pedijatrijski pacijenti	Zdravi ispitanici
Ispitanici, n	102	102	58
Godine (srednja vrednost±SD)	43,7±14,3	12,4±3,8	46,4±10,8
Pol M/Ž, %	46/54	57/43	50/50
ITM, kg/m^2 (srednja vrednost±SD)	27,2±4,8	19,7±4,3	26,8±4,6
Pušački status, %	18	-	62

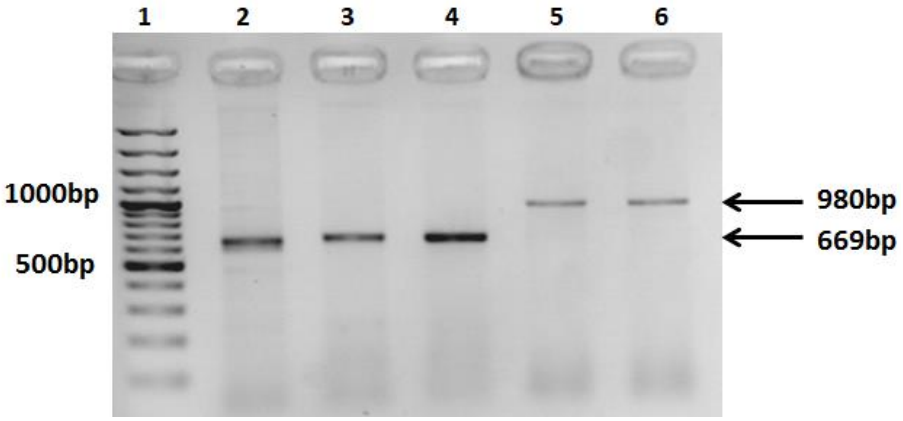
ITM – indeks telesne mase; M – muški; Ž – ženski; SD – standardna devijacija

Polna struktura se nije značajno razlikovala između ispitivanih grupa. Zdravi ispitanici uključeni u studiju se nisu razlikovali po starosnoj dobi i indeksu telesne mase od adultnih pacijenata, dok je razlika u pušačkom statusu bila statistički značajna ($p<0,001$). Broj pušača u grupi kontrolnih ispitanika je bio znatno veći u odnosu na broj pušača u grupi adultnih pacijenata.

4.2 Detekcija promotorskih varijanti

Iz uzoraka periferne krvi svih ispitanika je izolovana DNK komercijalnim kitom. Uobičajeni prinos reakcije izolacije na ovaj način je iznosio 30-50 ng/µL. Uzorci DNK su dalje korišćeni u reakciji lančanog umnožavanja polimerazom.

Bazalni promotor gena *TGFB1* i deo negativnog regulatornog regiona su umnožavani pomoću graničnika TGFB1 P1F i TGFB1 P1R. Graničnici su obuhvatali segment DNK dužine 669 bp. Proksimalni i distalni negativni regulatorni region, kao i proksimalni pojačivački region gena *TGFB1* su umnožavani graničnicima TGFB1 SESF i TGFB1 SESR. Graničnici su obuhvatili segment DNK dužine 980 bp. Produkti PCR reakcije su analizirani elektroforezom u 2% gelu od agaroze (Slika 8).



Slika 8. Analiza PCR produkata u 2% gelu od agaroze

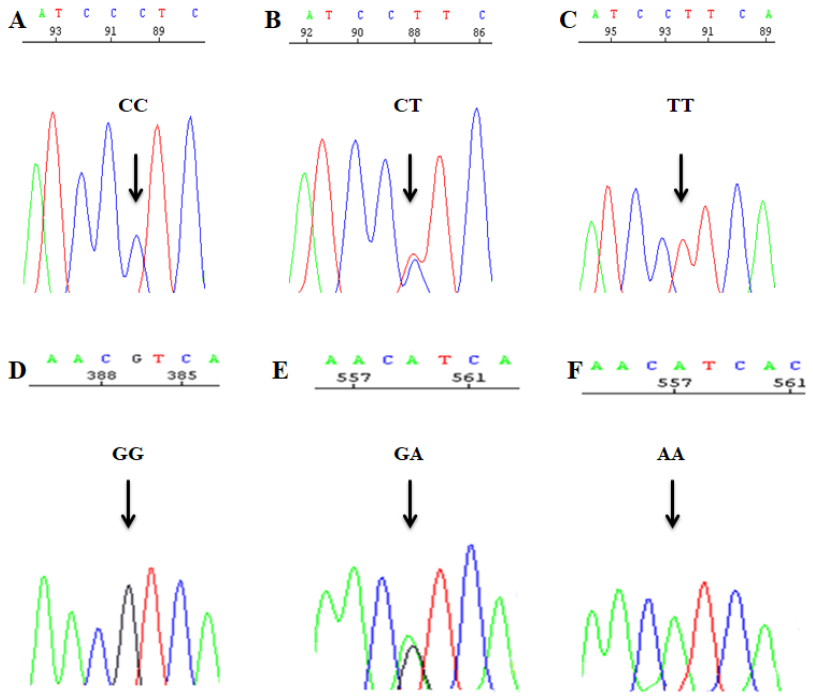
1 - DNK lestvica 100 bp

2-4 - PCR produkti dobijeni umnožavanjem pomoću graničnika TGFB1 P1F i TGFB1 P1R

5,6 - PCR produkti dobijeni umnožavanjem pomoću graničnika TGFB1 SESF i TGFB1 SESR

Direktnim sekvenciranjem su detektovane promotorske varijante -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* u adultnoj i pedijatrijskoj grupi pacijenata. Produkti PCR reakcije su prvo na adekvatan način prečišćeni, a zatim podvrgnuti reakciji sekvenciranja. Sekvenciranje je vršeno u odvojenim reakcijama, a u svakoj reakciji je korišćen po jedan od graničnika kojima je vršeno umnožavanje.

U regulatornom regionu promotora gena *TGFB1* su detektovane dve promene: C u T na poziciji -509 i G u A poziciji -800 (Slika 9).

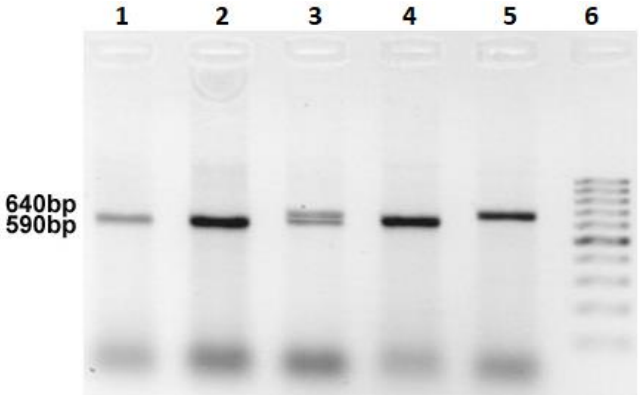


Slika 9. Detekcija promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* metodom direktnog sekvenciranja

A - -509CC; B - -509CT; C - -509TT; D - -800GG; E - -800GA; F - -800AA

Za detekciju promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* u kontrolnoj grupi korišćena je PCR-RFLP metoda. Digestija PCR fragmenta radi detekcije promotorske varijante -509C>T vršena je restrikcionim enzimom *Dde*I, dok je za detekciju promotorske varijante -800G>A korišćen restrikcioni enzim *Tae*I.

Produkti digestije su razdvajani elektroforezom u 2% gelu od agaroze. Fragment sa varijantom -509C ostaje nesečen (640 bp), dok sečenje fragmenta sa varijantom -509T rezultuje pojavom traka dužine 590 bp i 50 bp (Slika 10).

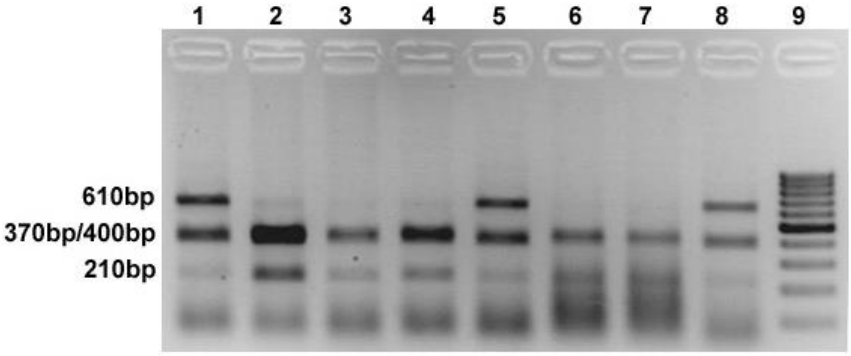


Slika 10. Detekcija promotorske varijante -509C>T gena *TGFB1* elektroforezom u 2% gelu od agaroze

1, 2, 4 - -509TT; 3 - -509CT; 5 - -509CC; 6 - DNK lestvica 100 bp

(Slika je objavljena na engleskom jeziku u radu Dragicevic i saradnici, 2016 (61))

Na Slici 11 su prikazani produkti digestije PCR fragmenta sa promotorskom varijantom -800G>A. Prisustvo G varijante rezultuje u pojavi traka dužine 400 bp, 370 bp i 210 bp, a varijante A u pojavi traka dužine 610 bp i 370 bp.



Slika 11. Detekcija promotorske varijante -800G>A gena *TGFB1* elektroforezom u 2% gelu od agaroze

1, 5, 8 - -800GA; 2, 3, 4,6,7 - 800GG; 9 - DNK lestvica 100 bp

(Slika je objavljena na engleskom jeziku u radu Dragicevic i saradnici, 2016 (61))

Obradom podataka dobijenih genotipizacijom ispitivanih varijanti određene su učestalosti alela i distribucije genotipova kod pacijenata i zdravih ispitanika (tabela 5). Učestalosti alela i distribucije genotipova za promotorske varijante -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* se nisu značajno razlikovale između grupa pacijenata.

Tabela 5. Učestalosti alela i distribucija genotipova u ispitivanim grupama

	Adultni pacijenti n (%)	Pedijatrijski pacijenti n (%)	Zdravi ispitanici n (%)
Aleli			
-509C	113 (55,4)	107 (52,9)	47 (40,5)
-509T	91 (44,6)	96 (47,1)	69 (59,5)
-800G	191 (93,6)	192 (94,1)	104 (89,7)
-800A	13 (6,4)	12 (5,9)	12 (10,3)
Genotipovi			
-509CC	36 (35,3)	31 (30,4)	13 (22,4)
-509CT	41 (40,2)	46 (45,1)	21 (36,2)
-509TT	25 (24,5)	25 (24,5)	24 (41,4)
-800GG	91 (89,2)	91 (89,2)	48 (82,8)
-800GA	9 (8,8)	10 (9,8)	8 (13,8)
-800AA	2 (2,0)	1 (1,0)	2 (3,4)

Za analizirane promotorske varijante testirana je Hardi-Vajnbergova ravnoteža distribucije genotipova u grupama pacijenata i kontrolnoj grupi. Distribucija genotipova za varijantu -509C>T je bila u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži u ispitivanim grupama ($p>0,05$), dok je za varijantu -800G>A odstupala od ravnoteže u adultnoj grupi pacijenata ($\chi^2=6,9$; $p=0,010$) i kontrolnoj grupi ($\chi^2=3,8$; $p=0,050$). Uočen je blagi porast učestalosti homozigota -800AA u ovim grupama u odnosu na očekivane vrednosti.

4.3 Ispitivanje uticaja promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* kao faktora rizika u astmi

Kako bi se promotorske varijante -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* analizirale kao potencijalni faktor rizika u astmi, učestalosti alela i distribucije genotipova su upoređene između adultne grupe pacijenata i kontrolne grupe. U grupi pacijenata je zapaženo više nosilaca genotipa -509CC (35,3%) u odnosu na kontrolnu grupu (22,4%), ali statistički značajna razlika nije postignuta (p=0,061). Nosioci promotorske varijante -509C su bili zastupljeniji u grupi pacijenata (55,4%) nego u grupi zdravih ispitanika (40,5%) sa statističkom značajnošću p=0,011. Učestalosti alela i distribucija genotipova za promotorsku varijantu -800G>A se nisu statistički značajno razlikovale između adultne grupe pacijenata i kontrolne grupe (p=0,203 i p=0,506, respektivno).

Promotorske varijante -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* su u daljoj analizi korelisane sa kliničkim parametrima pacijenata. U adultnoj grupi pacijenata nije pokazana povezanost između ispitivanih varijanti sa parametrima plućne funkcije (FEV1 i FVC) i kontrolom astme koja je procenjena na osnovu vrednosti ACT. U uzorcima seruma deset adultnih pacijenata za koje je prethodno izvršena genotipizacija promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A je kvantifikovan nivo proteina TGFB1. Izmerene koncentracije su bile u opsegu od 35 do 85 ng/mL i nisu se značajno razlikovale između genotipova.

Rezultati dobijeni korelacijom promotorske varijante -509C>T gena *TGFB1* sa osnovnim kliničkim parametrima pedijatrijskih pacijenata su predstavljeni u tabeli 6.

Tabela 6. Korelacija promotorske varijante -509C>T gena *TGFB1* sa kliničkim parametrima kod pedijatrijskih pacijenata sa astmom

	Genotipovi			
	-509CC	-509CT	-509TT	P vrednost
FEV1,% (srednja vrednost±SD)	89,5±17,6	84,6±13,8	92,0±10,8	0,093
FVC, % (srednja vrednost±SD)	86,2±13,3	84,6±12,7	87,8±10,1	0,638
Pozitivne kožne probe, %	90,3	87,0	92,0	0,785
CRP, mg/L (srednja vrednost±SD)	2,1±1,5	2,3±1,9	2,0±1,6	0,745
Kontrola astme,%				
Potpuna	74,2	65,9	58,3	0,461
Delimična	25,8	34,1	41,7	
Sputumske ćelije,% (srednja vrednost±SD)				
Eozinofili	21,9±18,2	15,5±15,2	21,8±20,8	0,316
Neutrofili	34,9±19,9	39,6±16,5	40,7±18,7	0,267
Limfociti	20,2±13,2	20,6±12,2	17,9±11,1	0,780
Monociti	7,6±3,3	7,8±4,1	4,8±4,0	0,051
Makrofazi	16,3±8,5	16,5±7,6	13,5±9,7	0,066

FEV1 - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; SD - standardna devijacija; FVC - forsirani vitalni kapacitet (eng. Forced Vital Capacity); CRP - C-reaktivni protein

Monociti i makrofazi su bili zastupljeniji u indukovanom sputumu pacijenata sa genotipovima -509CC i -509CT nego u indukovanom sputumu pacijenata sa genotipom -509TT (7,6% i 7,8% vs. 5,0%; p=0,051 za monocite; 16,3% i 16,5% vs.13,5%; p=0,066 za makrofage, respektivno), ali statistički značajna razlika nije postignuta.

S obzirom da je u pedijatrijskoj grupi detektovan genotip -800AA samo kod jednog pacijenta u daljoj analizi korelacije promotorske varijante -800G>A gena *TGFB1* sa kliničkim parametrima je taj pacijent isključen, a rezultati su dati u tabeli 7.

Tabela 7. Korelacija promotorske varijante -800G>A gena *TGFB1* sa kliničkim parametrima kod pedijatrijskih pacijenata sa astmom

	Genotipovi		
	-800GG	-800GA	P vrednost
FEV1, % (srednja vrednost±SD)	87,9±14,9	89,1±11,9	0,660
FVC, % (srednja vrednost±SD)	85,9±12,5	86,2±8,2	0,360
Pozitivne kožne probe, %	88,0	90,0	0,993
CRP, mg/L (srednja vrednost±SD)	3,3±2,5	2,6±5,8	0,128
Kontrola astme, %			
Potpuna	68,2	40,0	0,062
Delimična	29,5	60,0	
Sputumske ćelije,% (srednja vrednost±SD)			
Eozinofili	19,2±17,2	18,5±22,9	0,717
Neutrofili	37,6±17,8	44,7±21,1	0,553
Limfociti	19,9±11,8	19,8±15,5	0,719
Monociti	7,3±4,1	7,2±3,9	0,273
Makrofazi	16,1±8,6	10,7±8,6	0,097

FEV1 - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; SD - standardna devijacija; FVC - forsirani vitalni kapacitet (eng. Forced Vital Capacity); CRP - C-reaktivni protein

Rezultati su pokazali da postoji tendencija za težim postizanjem potpune kontrole bolesti kod pacijenta sa heterozigotnim genotipom -800GA u odnosu na homozigotni genotip -800GG, ali statistička značajnost nije postignuta (p=0,062). Poređenjem rezultata dobijenih za druge kliničke parametre nije pokazana statistički značajna razlika između genotipova -800GG i -800GA.

Kako bi se ispitao uticaj promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* na težinu bolesti, pedijatrijska grupa pacijenata je podeljena na dve podgrupe: podgrupa pacijenata sa teškim oblikom astme i podgrupa pacijenata sa blagim oblikom astme. Osnovne kliničke karakteristike, kao i učestalosti alela i genotipova su korelisane sa težinom bolesti (tabela 8).

Tabela 8. Analiza kliničkih parametara i uticaj promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* na težinu astme kod pedijatrijskih pacijenata sa astmom

	Težina astme		
	Blaga (n=55)	Teška (n=47)	P vrednost
FEV1, % (srednja vrednost±SD)	88,6±14.9	87,3±14,4	0,796
FVC, % (srednja vrednost±SD)	85,3±12,2	86,6±12,4	0,522
Pozitivne kožne probe, %	87,3	91,5	0,494
CRP, mg/L (srednja vrednost±SD)	2,3±1,8	2,5±1,9	0,271
Kontrola astme, %			
Potpuna	94,5	32,6	**<0,001***
Delimična	5,5	67,4	
Sputumske ćelije, % (srednja vrednost±SD)			
Eozinofili	15,5±14,2	23,2±20,3	0,089
Neutrofili	40,7±19,7	35,5±15,6	0,202
Limfociti	20,0±12,2	19,7±12,2	0,861
Monociti	7,7±3.7	6,5±4,2	0,128
Makrofazi	16,4±9,3	14,6±7,3	0,343
Genotipovi, n (%)			
-509CC	21 (38,2)	10 (21,3)	
-509CT	22 (40,0)	24 (51,1)	0,181
-509TT	12 (21,8)	13 (27,6)	
-800GG	1(1,8)	0 (0)	
-800GA	5 (9,1)	5 (10,6)	0,632
-800AA	49 (89,1)	42(89,4)	
Aleli, n (%)			
-509C	64 (58,2)	43 (45,7)	0,076
-509T	46 (41,8)	51 (54,3)	
-800G	103 (93,6)	89 (94,7)	0,496
-800A	7 (6,4)	5 (5,3)	

FEV1 - forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; SD - standardna devijacija; FVC - forsirani vitalni kapacitet (eng. Forced Vital Capacity); CRP - C-reaktivni protein
*Statistički značajna P vrednost

Podgrupe pacijenata sa teškim i blagim oblikom astme su se statistički značajno razlikovale u kontroli bolesti ($p<0,001$), dok se vrednosti dobijene za ostale kliničke parametre nisu razlikovale. Distribucija genotipova za promotorsku varijantu -509C>T se nije razlikovala između podgrupa. Iako je učestalost varijante -509T (54,3%) bila veća kod pacijenata sa teškom astmom u odnosu na pacijente sa blagom astmom (41,8%), statistički značajna razlika nije postignuta ($p=0,076$). Učestalosti alela i distribucija genotipova za promotorsku varijantu -800G>A se nisu razlikovale između podgrupa pacijenata sa teškim i blagim oblikom astme.

4.4 Ispitivanje uticaja promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* na odgovor na terapiju astme u adultnoj grupi pacijenata

Od 102 adultna pacijenta, 97 je klinički praćeno u periodu dužem od tri meseca. Kod ovih pacijenata je praćena pojava egzacerbacija kao parametra koji ukazuje na loš odgovor na terapiju. Kako bi se ispitala korelacija promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* sa odgovorom na terapiju u daljoj analizi su adultni pacijenti podeljeni u dve podgrupe na osnovu toga da li su imali egzacerbacije u periodu praćenja.

Dobijeni rezultati poređenja osnovnih kliničkih parametara, učestalosti alela i distribucije genotipova između pacijenata sa i bez egzacerbacija su prikazani u tabeli 9.

Tabela 9. Analiza kliničkih parametara i uticaja promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* na pojavu egzacerbacija kod adultnih pacijenata sa astmom

	Sa egzacerbacijama (n=44)	Bez egzacerbacija (n=53)	P vrednost
FEV1, % (srednja vrednost±SD)	68,4±21,6	89,0±16,2	**<0,001***
FVC, % (srednja vrednost±SD)	87,4±18,3	98,6±14,4	**<0,001***
ACT, % (srednja vrednost±SD)	16,3±4,9	21,9±2,3	**<0,001***
Genotipovi, n (%)			
-509 CC	12 (27,3)	22 (41,5)	
-509 CT	16 (36,4)	22 (41,5)	0,080
-509 TT	16 (36,4)	9 (17,0)	
-800 GG	40 (90,9)	46 (86,8)	
-800 GA	3 (6,8)	6 (11,3)	0,745
-800 AA	1 (2,3)	1 (1,9)	
Aleli, n (%)			
-509C	40 (45,5)	66 (62,3)	**0,019***
-509T	48 (54,5)	40 (37,8)	
-800G	83 (94,3)	98 (92,5)	0,605
-800A	5 (5,7)	8 (7,5)	

FEV1- forsirani ekspiratorni volumen u prvoj sekundi; SD- standardna devijacija; FVC- forsirani vitalni kapacitet (eng. Forced Vital Capacity); ACT- test o kontroli astme (eng. Asthma Control Test);
* Statistički značajna P vrednost

Parametri spirometrije (FEV1 i FVC) i vrednosti ACT su bili znatno sniženi u grupi pacijenata koji su imali učestalije simptome bolesti. Genotip -509TT je bio učestaliji u podgrupi pacijenata koji su imali egzacerbacije (36,4%) u odnosu na podgrupu pacijenata koji nisu imali egzacerbacije (17,0%), ali ova razlika nije bila statistički značajna (p=0,080). U recesivnom modelu nasleđivanja (CC+CTvs.TT) je pokazano da su pacijenti sa genotipom -509TT pod 2,8 puta većim rizikom za pojavu egzacerbacija u odnosu na pacijente sa genotipovima -509CC i -509CT (95% interval poverenja 1,0867-7,1816; p=0,037). Za promotorsku varijantu -509C>T je pokazana statistički značajna razlika u

učestalostima alela između podgrupa pacijenata sa i bez egzacerbacija (p=0,019). Za promotrsku varijantu -800G>A nisu uočene razlike u učestalosti alela i distribuciji genotipova između podgrupa.

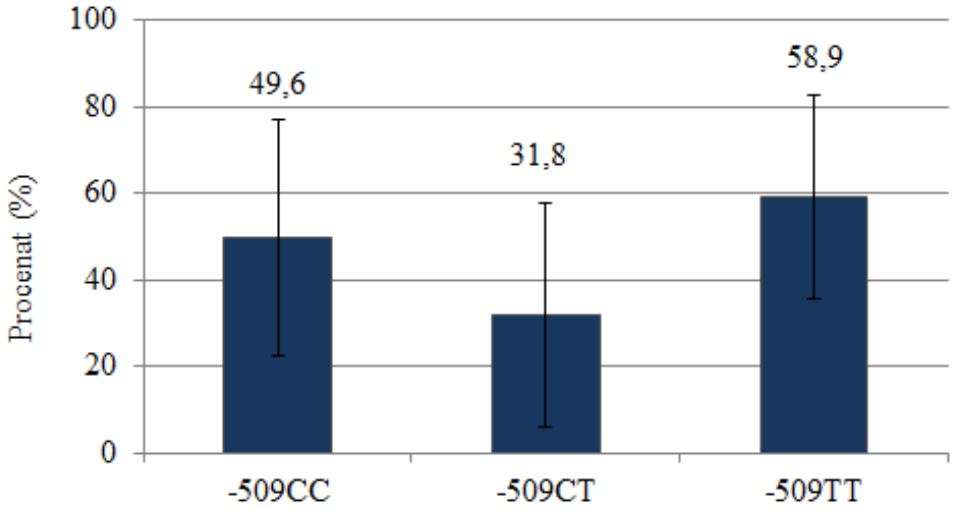
Broj pušača u podgrupi pacijenata bez egzacerbacija je bio veći u odnosu na podgrupu pacijenata sa egzacerbacijama (20,8%vs.13,6%), ali razlika nije bila statistički značajna (p=0,359). U daljoj analizi je ispitano da li prisustvo određenog genotipa u kombinaciji sa pušačkim statusom pacijenta ima uticaja na pojavu egzacerbacija. Dobijeni rezultati nisu ukazali na združeni efekat promotorskih varijanti gena *TGFB1* i pušačkog statusa pacijenta na pojavu egzacerbacija (p=0,514 za varijantu -509C>T i p=0,240 za varijantu -800G>A).

4.5 Analiza ekspresije gena *TGFB1* u ćelijama indukovanog sputuma pod dejstvom montelukasta *ex vivo*

Indukovani sputum je uzorkovan od svih pedijatrijskih pacijenta uključenih u studiju. Za *ex vivo* tretmane je selektovano 88 uzoraka čija je zapremina bila ≥1 mL. Uzorci indukovanog sputuma su na adekvatan način obrađeni, podeljeni u dva jednaka dela, a zatim je jedan deo tretiran montelukastom (100 μM), a drugi je služio kao kontrola. Iz tretiranih i netretiranih sputumskih ćelija je izolovana RNK kako bi se ispitala ekspresija gena *TGFB1*. Za sintezu komplementarne DNK je korišćena RNK izolovana iz oba dela indukovanog sputuma (tretiranog i netretiranog) istog pacijenta, ukoliko je bila odgovarajuće koncentracije (20-100 ng/μL). Odnos apsorpcije RNK na 260 nm i 280 nm (A260/280) je u nekim slučajevima bio niži (1,6-1,8) od zahtevanog (1,8-2). Od 32 analizirana para uzoraka (treitaranog i netretiranog dela idukovanog sputuma) relativna kvantifikacija ekspresije gena *TGFB1* je uspešno izvršena metodom qRT-PCR u uzorcima indukovanog sputuma 22 pacijenta odnosno u 25% *ex vivo* tretiranih uzoraka.

Nivo ekspresije gena *TGFB1* u netretiranim ćelijama indukovanog sputuma se nije razlikovao između genotipova (p=0,283). Ekspresija gena *TGFB1* je bila smanjena u

odgovoru na montelukast kod dvadeset jednog pacijenta, dok je kod jednog pacijenta zapaženo povećanje nakon tretmana. Pacijenti kod kojih je ekspresija gena bila smanjena nakon tretmana su grupisani prema genotipovima. Promene u ekspresiji gena *TGFB1* između tretiranih i netretiranih ćelija indukovanog sputuma su izražene u procentima i prikazane na Slici 12.



Slika 12. Ekspresije gena *TGFB1* u ćelijama sputuma sa različitim genotipom nakon tretmana montelukastom

Kod nosilaca genotipa -509TT ekspresija gena *TGFB1* je bila smanjena nakon tretmana montelukastom za prosečno 58,9%, više nego kod nosilaca genotipa -509CC (49,6%) i genotipa -509CT (31,8%), ali statistički značajna razlika nije postignuta (p=0,071). U dominantnom modelu nasleđivanja nije nađena razlika u promeni ekspresije gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta (CCvs.CT+TT; p=0,704), dok je u recesivnom modelu ta razlika bila na granici statističke značajnosti (CC+CTvs.TT; p=0,056).

Imajući u vidu da je isti tip inflamatornih ćelija zastupljen u indukovanom sputumu kao i u perifernoj cirkulaciji, uticaj montelukasta na ekspresiju *TGFB1* gena je ispitan i na

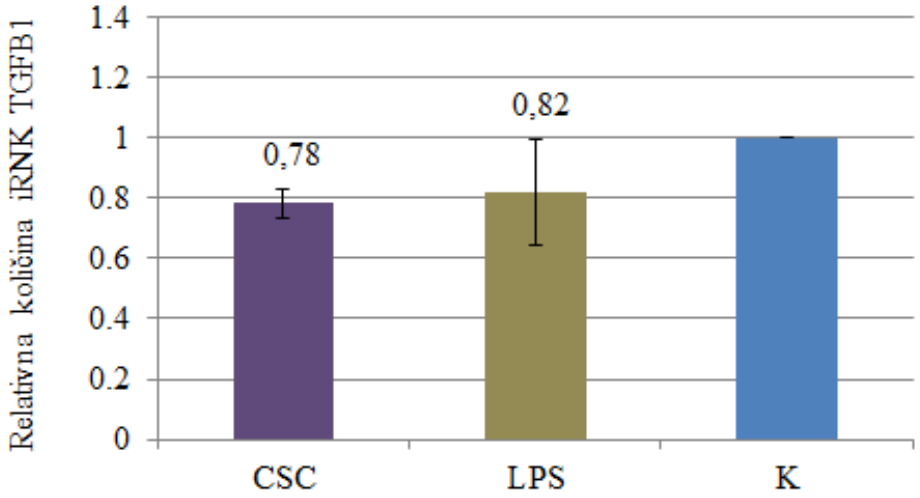
leukocitima periferne krvi. Uzorci periferne krvi su uzeti od tri pedijatrijska pacijenta sa stabilnom astmom, a zatim su podeljeni i *ex vivo* tretirani montelukastom na isti način kao i ćelije indukovanog sputuma. Ekspresija gena *TGFB1* u leukocitima je bila smanjena nakon tretmana montelukastom u odnosu na netretirane leukocite za prosečno 35%.

4.6 Ispitivanje uticaja sredinskih faktora na ekspresiju gena *TGFB1 in vitro*

Kako bi se ispitao uticaj sredinskih faktora rizika za nastanak astme na ekspresiju gena *TGFB1*, ćelije BEAS 2B su podvrgavane tretmanima ekstraktom duvanskog dima (40 ng/mL) i lipopolisaharidom (10 μg/mL) u trajanju od 1 h. Agensi su razblaživani u medijumu bez seruma do finalnih koncentracija. Eksperiment je uključivao i netretirane kontrolne ćelije.

Ekspresija gena *TGFB1* je metodom qRT-PCR analizirana u tretiranim i netretiranim ćelijama BEAS 2B u triplikatu. Kao endogena kontrola je korišćen gen *GAPDH*, a kao kalibrator je korišćena srednja vrednost ekspresije gena *TGFB1* u netretiranim ćelijama. Rezultati dobijeni za tretirane uzorke su izraženi u odnosu na vrednosti dobijene za kalibrator kome je dodeljena vrednost 1. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±SD na Slici 13.

Ekspresija gena *TGFB1* je bila smanjena nakon tretmana ekstraktom duvanskog dima za 22% što je bilo statistički značajno (p=0,001). Smanjena ekspresija gena za 18% je uočena i u odgovoru na tretman lipopolisaharidom, ali statistička značajnost nije postignuta (p=0,087).



Slika 13. Relativna kvantifikacija ekspresije gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B nakon tretmana sredinskim faktorima rizika za nastanak astme

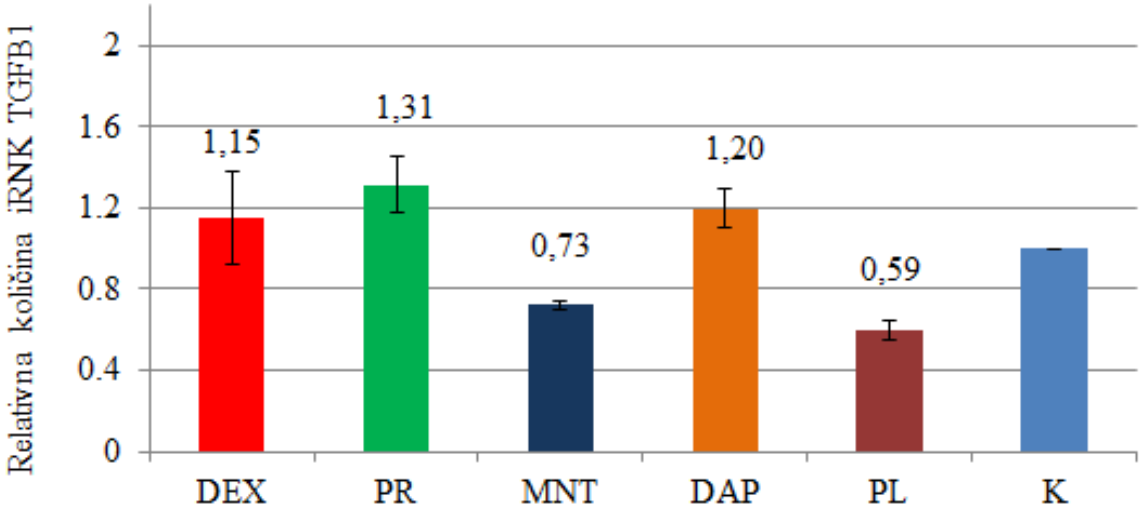
CSC - ekstrakt duvanskog dima (eng. Cigarette Smoke Condensate); LPS - lipopolisaharid; K - kontrola

4.7 Ispitivanje uticaja lekova za astmu na ekspresiju gena *TGFB1* i sekreciju proteina *in vitro*

Kako bi se ispitao uticaj različitih lekova na ekspresiju gena *TGFB1* i sekreciju proteina, ćelije BEAS 2B su tretirane montelukastom (100 μM), deksametazonom (5 μM), prednizonom (10 μM), dapsonom (10 μM) i polinolom (0,25 mg/mL). Ćelije su inkubirane 1 h sa lekovima razblaživanim do finalnih koncentracija. Eksperiment je uključivao i netretirane kontrolne ćelije. Metodom qRT-PCR je analizirana ekspresija gena *TGFB1* u ćelijama, dok je u medijumu u kome su ćelije gajene kvantifikovan nivo TGFB1 ELISA metodom. U medijum koji je korišćen za tretmane nije dodavan goveđi serum kako ne bi uticao na analizu, jer je bogat faktorima rasta, uključujući TGFB1.

Ekspresija gena *TGFB1* je analizirana u tretiranim i netretiranim ćelijama BEAS 2B u triplikatu. Kao endogena kontrola je korišćen gen *GAPDH*, a kao kalibrator je korišćena

srednja vrednost ekspresije gena *TGFB1* u netretiranim ćelijama. Kalibratoru je dodeljena vrednost 1, a dobijeni rezultati za tretirane uzorke su izraženi u odnosu na kalibrator. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±SD na Slici 14.

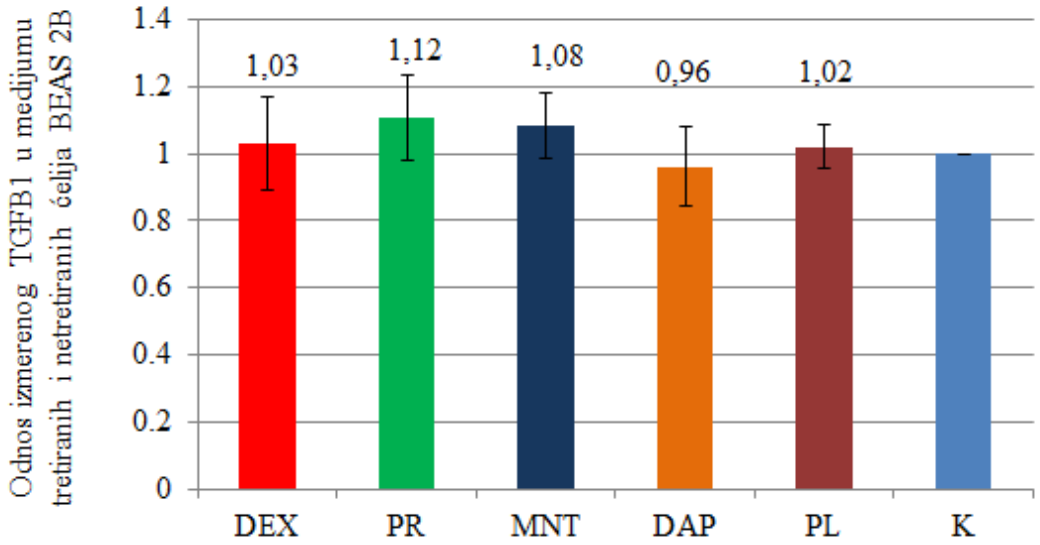


Slika 14. Relativna kvantifikacija ekspresije gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B nakon tretmana različitim lekovima

DEX - deksametazon; PR - prednizon; MNT - montelukast; DAP - dapson; PL - polinol; K - kontrola

Ekspresija gena *TGFB1* je bila smanjena nakon tretmana montelukastom za 27% i nakon tretmana polinolom za 41%. Ove promene u ekspresiji gena su bile statistički značajne ($p<0,001$ za montelukast i $p=0,008$ za polinol). Nakon tretmana dapsonom i kortikosteroidima je zapažena povećana ekspresiju gena *TGFB1* u odnosu na netretirane ćelije. Efekat prednizona na ekspresiju gena je bio dva puta veći u odnosu na deksametazon (31%vs.15%, respektivno). Iako su tretmani dapsonom, prednizonom i deksametazonom indukovali promene ekspresije gena *TGFB1*, statistička značajnost nije postignuta ($p=0,105$ za dapson; $p=0,326$ za deksametazon i $p=0,089$ za prednizon).

Kvantifikacija proteina TGFB1 je vršena u duplikatu. Rezultati analize su pokazali da nijedan od navedenih lekova nije uticao na količinu sekretovanog proteina TGFB1. Na Slici 15 su rezultati predstavljeni kao odnos koncentracija proteina TGFB1 izmerenih u tretiranim i netretiranim ćelijama BEAS 2B.



Slika 15. Uticaj lekova na količinu sekretovanog TGFB1

DEX - deksametazon; MNT - montelukast; PR - prednizon; DAP - dapson; PL- polinol; K – kontrola

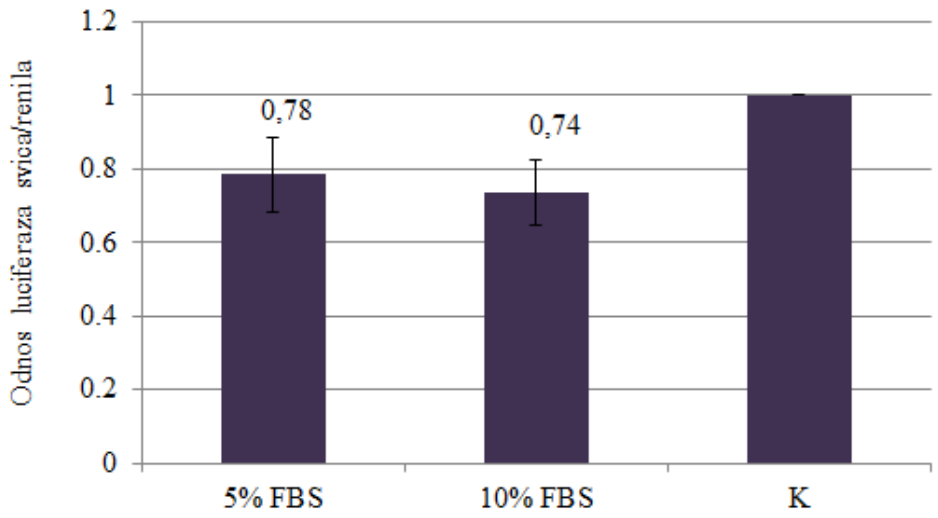
4.8 Analiza promotorske aktivnosti gena *TGFB1 in vitro*

Analiza aktivnosti promotorskih varijanti gena *TGFB1* je vršena sa fragmentima koji su amplifikovani u PCR reakciji pomoću graničnika TGFB1 P1F i TGFB1 P1R i koji su uklonirani u ekspresioni vektor pGL4.10[luc2]. Kloniranje je rađeno u nezavisnim eksperimentima. DNK izolovana iz periferne krvi dva pacijenta za koje je prethodno određen homozigotni genotip, -509CC i -509TT, korišćena je kao matrica u PCR reakcijama. Nakon ligacije u vektor pBluescriptT/A i transformacije bakterijskog soja DH5α *E. coli*, vektori su izolovani iz prekonoćnih bakterijskih kultura, provereni elektroforezom u 1% gelu od agaroze i analizirani sekvenciranjem. Inserti su dalje isecani iz vektora pBluescriptT/A pomoću restrikcionih enzima *Hind*III i *Nco*I i klonirani u ekspresioni vektor pGL4.10[luc2]. Konstrukti pGL4.10-TGFB1C i pGL4.10-TGFB1T su korišćeni za tranzijentne transfekcije ćelija BEAS 2B. Ćelije su simultano transfekovane kontrolnim plazmidom [pGL4.70hRluc]. Aktivnost promotora je merena pomoću sistema DualGlo Luciferase Assay. Izmerena aktivnost luc2 gena je normalizovana u odnosu na aktivnost hRluc gena, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost±SD.

4.8.1 Uticaj različitih agenasa na aktivnost promotora gena TGFB1 *in vitro*

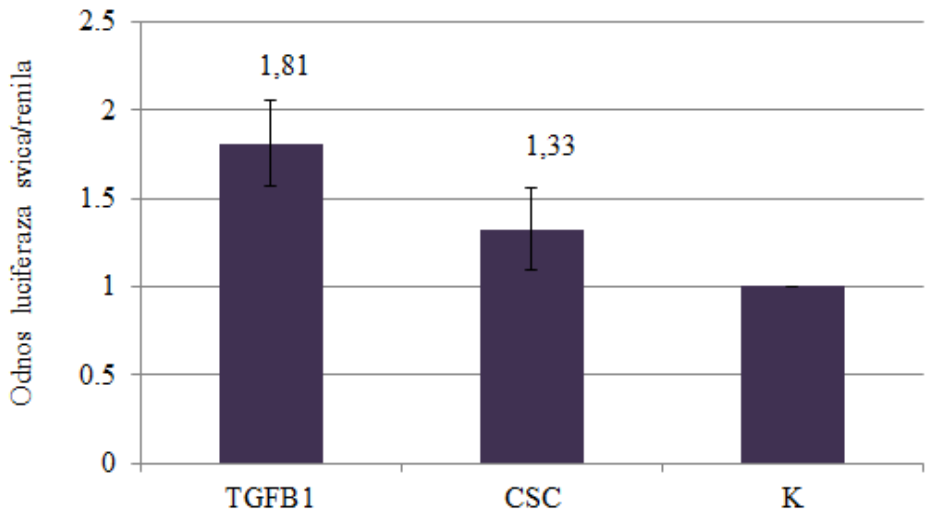
S obzirom da je izmerena bazalna aktivnost promotora gena *TGFB1* bila na granici detektabilnosti luciferazne aktivnosti, ćelije su tretirane različitim agensima kako bi se ispitao njihov stimulatorni uticaj na promotorsku aktivnost. Ćelije BEAS 2B su transfekovane u triplikatu reporterskim konstruktom koji sadrži promotor gena *TGFB1*, i simulatno transfekovane kontrolnim vektorom, pGL4.70hRluc. Nakon pet sati, medijum za gajenje ćelija bez seruma je zamenjen novim u kome su ispitivane supstance rastvorene do finalnih koncentracija. U eksperiment su bile uključene i netretirane ćelije kao kontrola. Rezultati su izraženi kao odnos aktivnosti ekspresionog vektora i kontrolnog plazmida, a vrednosti dobijene nakon tretmana su predstavljene u odnosu na kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 1.

Prvo je ispitan efekat povećane količine seruma u medijumu, 5% FBS i 10% FBS, i dobijene vrednosti su bile blago snižene u odnosu na vrednosti izmerene u netretiranim ćelijama (Slika 16).



Slika 16. Uticaj povišene koncentracije fetalnog goveđeg seruma (FBS; eng. Fetal Bovine Serum) na promotorsku aktivnost gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B

Ćelije BEAS 2B su zatim tretirane rekombinantnim proteinom TGFB1 (0,1 ng/mL) i ekstraktom duvanskog dima (40 µg/mL) kako bi se ispitao stimulatorni uticaj ovih faktora na aktivnost promotora gena *TGFB1*. Dobijeni rezultati su prikazani na Slici 17.



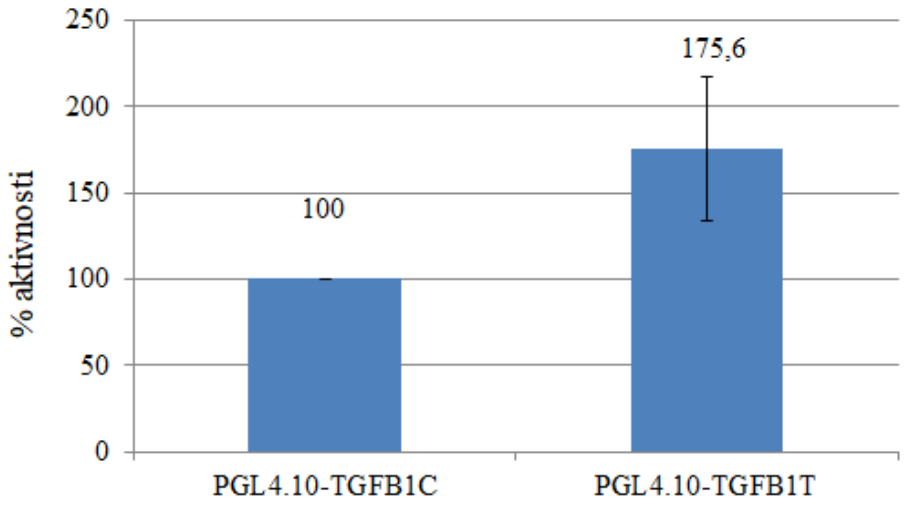
Slika 17. Stimulišući uticaj TGFB1 i ekstrakta duvanskog dima (CSC; eng. Cigarette Smoke Condensate) na promotorsku aktivnost gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B

Oba ispitivana faktora su stimulisala aktivnost promotora gena *TGFB1*. S obzirom da je nakon tretmana proteinom TGFB1 aktivnost promotora bila povećana skoro dva puta i da bi tretman ekstraktom duvanskog dima mogao da indukuje prekomerno oslobađanje slobodnih radikala u ćeliji, u daljim eksperimentima je TGFB1 korišćen kao faktor stimulacije promotorske aktivnosti.

4.8.2 Ispitivanje uticaja promotorske varijante -509C>T na aktivnost promotora gena *TGFB1*

Promotorske aktivnosti konstrukata pGL4.10-TGFB1C i pGL4.10-TGFB1T su analizirane u ćelijama BEAS 2B u tri nezavisna eksperimenta. Ćelije BEAS 2B su tranzijentno transfekovane navedenim konstruktima i kontrolnim plazmidom [pGL4.70hRluc]. Pet sati posle transfekcije, medijum je zamenjen medijumom bez seruma, a bazalna aktivnost promotora je stimulisana proteinom TGFB1 preko noći u finalnoj koncentraciji 0,1 ng/mL.

Dobijeni rezultati su predstavljeni na Slici 18 gde je promotorska aktivnost konstrukta pGL4.10-TGFB1T izražena kao procenat aktivnosti promotora konstrukta pGL4.10-TGFB1C kome je dodeljena vrednost 100%, odnosno 1. Razlika u promotorskoj aktivnosti konstrukata pGL4.10-TGFB1C i pGL4.10-TGFB1T je iznosila 100% prema 175,6%. Ova razlika u bazičnoj promotorskoj aktivnosti zavisno od prisutne varijante, -509C ili -509T, je bila statistički značajna (p<0,001).



Slika 18. Uticaj varijante -509C>T na aktivnost promotora gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B

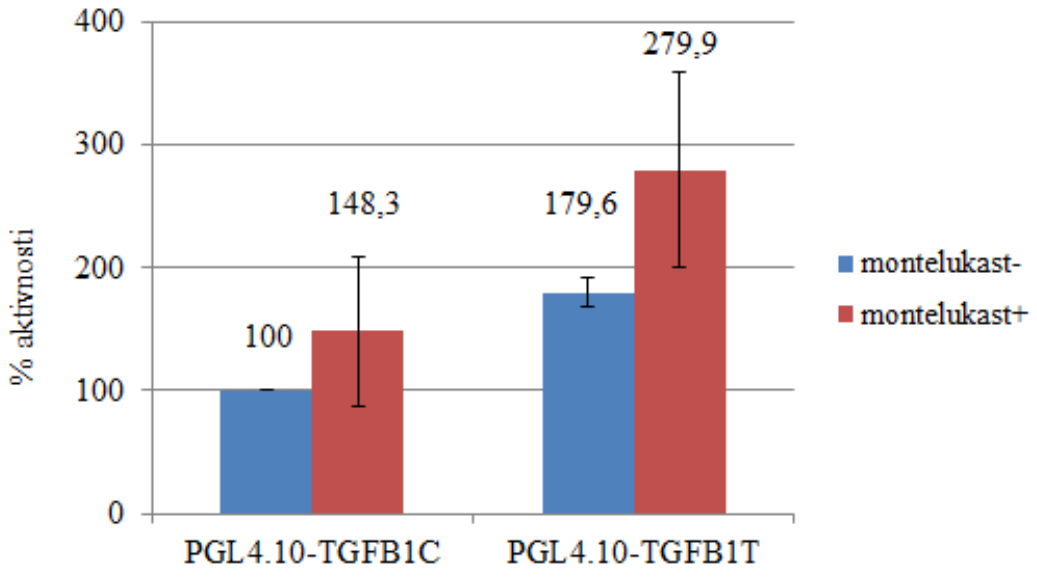
PGL4.10TGFB1C - ćelije transfekovane konstruktom sa promotorskom varijantom -509C

PGL4.10TGFB1T - ćelije transfekovane konstruktom sa promotorskom varijantom -509T

4.8.3 Analiza uticaja promotorske varijante -509C>T na aktivnost promotora gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta

Uticaj montelukasta na promotorsku aktivnost gena *TGFB1* je ispitivan pomoću luciferaznih eseja u ćelijama BEAS 2B. Ćelije su zasejavane u heksaplikatu, tranzijentno transfekovane konstruktima pGL4.10-TGFB1C i pGL4.10-TGFB1T i kontrolnim plazmidom [pGL4.70hRluc]. Nakon pet sati ćelije su pretretirane sa TGFB1 (0,1 ng/mL)

preko noći. Ćelije transfekovane odgovarajućim konstruktima su tretirane u triplikatu 1 h montelukastom rastvorenim u medijumu bez seruma do finalne koncentracije 100 μM, dok su netretetirane transfekovane ćelije služile kao negativna kontrola. Izmerena je aktivnost promotora u tretiranim i netretiranim ćelijama, a dobijene vrednosti su normalizovane u odnosu na aktivnost kontrolnog vektora. Aktivnosti konstrukta pGL4.10-TGFB1T u netretiranim ćelijama i konstrukata pGL4.10-TGFB1C i pGL4.10-TGFB1T u tretiranim ćelijama su izraženi u odnosu na aktivnost konstrukta pGL4.10-TGFB1C u netretiranim ćelijama kojoj je dodeljena vrednost 100%, odnosno 1 (Slika 19).



Slika 19. Uticaj varijante -509C>T na aktivnost promotora gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta u ćelijama BEAS 2B

PGL4.10TGFB1C - ćelije transfekovane konstruktom sa promotorskom varijantom -509C

PGL4.10TGFB1T - ćelije transfekovane konstruktom s a promotorskom varijantom -509T

Nakon tretmana montelukastom promotorska aktivnost konstrukta pGL4.10-TGFB1C je porasla za 48,3%, dok je u slučaju konstrukta pGL4.10-TGFB1T promotorska aktivnost povećana za 100,3%. Iako je promotorska aktivnost oba konstrukta pod dejstvom

montelukasta bila veća u odnosu na bazične vrednosti odgovarajućih konstrukata, ova razlika nije bila statistički značajna (p=0,060 za pGL4.10-TGFB1C i p=0,062 za pGL4.10-TGFB1T). Promotorska aktivnost konstrukta sa -509T varijantom je bila dva puta veća nakon stimulacije montelukastom u odnosu na odgovor konstrukta sa promotorskom varijantom -509C i ova razlika je bila statistički značajna (p=0,035).

5 DISKUSIJA

5.1 Analiza promotora gena *TGFB1* u astmi

U ovom radu su direktnim sekvenciranjem analizirani bazalni promotor i regulatorni region gena *TGFB1* kod adultnih i pedijatrijskih pacijenata sa astmom kako bi se utvrdilo prisustvo promena u sekvenci DNK. U proksimalnom negativnom regulatornom elementu je detekotvana bazna zamena C u T na poziciji -509, a u prvom pojačivačkom elementu na poziciji -800 je uočena bazna zamena G u A. S obzirom da su kod pacijenata obolelih od astme u promotoru gena *TGFB1* detektovane samo varijante -509C>T i -800G>A, prisustvo ovih varijanti je u grupi zdravih ispitanika analizirano metodom PCR-RFLP. Metoda PCR-RFLP je izabrana za analizu ovih varijanti u kontrolnoj grupi, jer predstavlja standardnu metodu za detekciju baznih zamena od interesa. Pored toga u laboratorijskoj praksi je pokazano da je u odnosu na direktno sekvenciranje ova metoda ekonomičnija i jednostavnija za izvođenje.

Promotorska varijanta -509C>T je često ispitivana kao fakor rizika u astmi i drugim inflamatornim bolestima. Međutim, studije asocijacije u kojima je ova varijanta ispitivana su dale kontradiktorne rezultate (41). Nukleotidna zamena C u T je povezana sa povišenim nivoom transkripcije gena *TGFB1*, povišenim nivoom TGFB1 u perifernoj cirkulaciji i povišenom produkcijom IgE u serumu (44-46, 62, 63). U odnosu na promotorsku varijantu -509C>T, promotorska varijanta -800G>A je ređe proučavana u astmi i drugim bolestima, a dovodi se u vezu sa smanjenom ekspresijom gena *TGFB1* (42, 44, 47, 48, 64, 65).

Za razliku od promotorske varijante -800G>A gena *TGFB1*, za varijantu -509C>T se uočava velika varijabilnost u učestalostima alela i genotipova u različitim populacijama. Učestalosti alela -509T (59,5%), genotipa -509TT (41,4%), kao i alela -800A (10,3%) dobijenih za zdravu populaciju u ovoj studiji su bile u opsegu učestalosti dobijenih u drugim studijama (24,2-71% za alel -509T; 2,5-44,5% za genotip -509TT i 5,2-15,7% za alel -800A) (23, 42, 44, 45, 48, 64-70). Učestalost genotipa -800AA (3,4%) dobijena u našoj studiji za populaciju Srbije je bila viša u odnosu na učestalosti dobijene za druge populacije (0-1,4%) (42, 44, 48, 64, 65).

Distribucija dobijenih genotipova za promotorsku varijantu -509C>T je bila u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži u svim ispitivanim grupama za razliku od varijante -800G>A. Uočen je blagi porast homozigota -800AA u grupi adultnih pacijenata (2%) i kontrolnoj grupi (3,4%) u odnosu na pedijatrijsku grupu pacijenata (1%). S obzirom da je dobijena učestalost alela -800A u adultnoj grupi pacijenata iznosila 6,4%, a u kontrolnoj grupi 10,3% homozigotni genotipovi u ovim grupama nisu očekivani.

Do odsustva Hardi-Vajnbergove ravnoteže može doći usled greške u genotipizaciji, populacione stratifikacije ili male veličine grupe. U ovoj studiji je izvršena regenotipizacija tako da smo prvi navedeni razlog isključili. Grupe adultnih i pedijatrijskih pacijenata su uključile isti broj ispitanika i razlika u učestalosti genotipa -800AA za 1% u ovim grupama je dovela do odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže u adultnoj grupi pacijenata. S obzirom da su se razlikovali kriterijumi po kojima su adultni i pedijatrijski pacijenti selektovani za studiju, razlika od 1% može biti slučajna i nastati usled populacione stratifikacije. U drugim studijama koje su ispitivale varijantu -800G>A distribucije dobijenih genotipova su bile u Hardi-Vajnbergovoj ravnoteži (42, 44, 48, 64). Imajući u vidu da je naša studija uključila manji broj ispitanika u odnosu na druge studije, odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže može biti posledica male veličine grupe, kao i heterogenosti ispitivanih populacija.

5.2 Uloga promotorskih varijanti gena *TGFB1* kao faktora rizika za nastanak astme

Učestalosti alela i genotipova promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A dobijene u ovoj studiji se nisu razlikovale između pedijatrijskih i adultnih pacijenata. Grupa zdravih adultnih osoba selektovanih za studiju se nije razlikovala po opštim karakteristikama (pol, godine i ITM) od adultnih pacijenata. Dobijene učestalosti alela i distribucija genotipova su upoređene između adultnih pacijenata i zdravih ispitanika kako bi se promotorske varijante -509C>T i -800G>A ispitale kao potencijalni faktori rizika za nastanak astme. Pedijatrijski

pacijenti nisu bili uključeni u ovu analizu s obzirom da za ovu studiju nije bila dostupna odgovarajuća kontrolna grupa sa kojom bi bili upoređeni.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali povezanost varijanti -509C>T i -800G>A sa patogenezom astme. Za promotorsku varijantu -509C>T je uočen porast učestalosti genotipa -509CC u grupi adultnih pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu (35,3%vs.22,4%, respektivno) što je u skladu sa učestalostima dobijenim za populaciju Srbije u prethodnoj studiji (35,1% u grupi pacijenata i 26,5% u kontrolnoj grupi) (71). Učestalost alela -509T u kontrolnoj grupi je bila veća nego u grupi adultnih pacijenata (59,5%vs.44,6%; p=0,011). Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim nalazima studija sprovedenih u Srbiji i Poljskoj (69, 71). U većini drugih studija je učestalost alela -509T bila veća u grupama pacijenata u odnosu na zdrave ispitanike ili se nije razlikovala (23, 42, 44, 45, 66-68, 70, 72). Rezultati naše studije za promotorsku varijantu -509C>T su potvrdili nalaz prethodne studije za populaciju Srbije i nalaze se u skladu sa rezultatima za korejsku populaciju i evropske populacije Češke, Nemačke i Poljske (42, 67, 71, 73, 74). U multietničkoj studiji sprovedenoj u Kolumbiji nije pokazana povezanost ove varijante sa astmom (72). Suprotno ovim studijama, istraživanja u Velikoj Britaniji, Severnoj Americi, Meksiku i većini azijskih zemalja su okarakterisale baznu zamenu C u T kao faktor rizika za razvoj astme (44, 45, 68, 70, 75-77). U našoj studiji nije nađena razlika u učestalostima alela i genotipova između adultnih pacijenata i kontrolne grupe za promotorsku varijantu -800G>A što je u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim studijama asocijacije (42, 44).

U proučavanju kompleksnih bolesti kao što je astma se često dobijaju oprečni rezultati koji mogu biti posledica genetičke heterogenosti populacija, kriterijuma prilikom selekcije ispitanika, populacione stratifikacije, izloženosti različitim sredinskim faktorima i broja ispitanika uključenih u studije. Prema podacima meta-analize u kojoj je obuhvaćeno dvadeset studija koje su ispitivale varijantu -509C>T u astmi, bazna zamena C u T predstavlja faktor rizika za razvoj astme više u populaciji Azije nego u beloj populaciji (41). Studije ukazuju na interakcije varijante -509C>T sa drugim varijantama gena *TGFB1* i na udruženost određenih haplotipova sa razvojem astme. Promotorska varijanta -509C>T je okarakterisana kao faktor rizika za nastanak astme u haplotipu sa varijantom +869T>C

(T-C i C-T), kao i u haplotipu sa nukleotidnim ponovcima (CT)n(CA)m i sa varijantom -800G>A (23-G-T), dok je u haplotipu sa varijantama +72insC, +869T>C i +915G>C okarakterisana kao faktor rizika za razvoj težih oblika astme (44, 66, 68). Nukleotidni ponovci (CT)n(CA)m koji su ispitivani u haplotipu sa promotorskim varijantama -509C>T i -800G>A se nalaze 24,9 kb uzvodno od gena *TGFB1*, u regionu koji nije analiziran u našoj studiji. Studija koja je ispitivala ove nukleotidne ponovke je sprovedena u indijskoj populaciji. Suprotno haplotipu 23-G-T koji je okaraktersian kao faktor rizika za nastanak astme, u istoj studiji je pokazana povezanost haplotipa 22-G-C sa smanjenim rizikom za nastanak astme. Unutar oba opisana haplotipa je prisutna varijanta -800G (44). U našoj studiji nisu analizirani haplotipovi iz razloga što je varijanta -800A detektovana sa niskom učestalošću (10,3%). Promotorska varijanta -509C>T gena *TGFB1* je ispitivana i u interakcijama sa drugim genima. U kombinaciji sa varijantom -308G>A gena *TNF* je okarakterisana kao faktor rizika za nastanak astme (23). Hobbs i saradnici su pokazali sinergistički uticaj promotorskih varijanti -571C>A gena *IL10* i -509C>T gena *TGFB1* na produkciju IgE kod pacijenata sa astmom (62).

U daljoj analizi je ispitivana povezanost promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A sa plućnom funkcijom koja je procenjena na osnovu parametara spirometrije, FEV1 i FVC. Za razliku od varijante -509C>T, u našoj studiji je promotorska varijanta -800G>A prvi put korelisana sa parametrima plućne funkcije. Poređenjem vrednosti FEV1 i FVC u grupama pacijenata nije uočena razlika imeđu genotipova za bilo koju od ispitivanih varijanti. Dobijeni rezultati za varijantu -509C>T su u skladu sa nekim studijama, a suprotni studiji Ueda-e i saradnika u kojoj je pokazano da astmatični pacijenti sa genotipom -509CC imaju bolju plućnu funkciju odnosno vrednosti FEV1 (101%) u odnosu na pacijente sa genotipom -509CT (87%) i genotipom -509TT (91%) (45, 69, 78).

Prethodno je pokazana pozitivna korelacija promotorske varijante -509C>T sa stepenom razvoja atopije procenjenim na osnovu vrednosti dobijenih kožnim testom (77). Rezultati naše studije nisu pokazali razlike u alergijskoj senzibilizaciji u odnosu na genotip za promotorske varijante -509C>T i -800G>A. S obzirom da je 88,2% pedijatrijskih pacijenata bilo osetljivo na različite alergene, odsustvo povezanosti može biti posledica

neujednačenosti u broju pacijenata sa pozitivnim i negativnim rezultatima kožnog testa. U meta-analizi u kojoj je izvršena substratifikacija prema atopijskom statusu pacijenata, nije utvrđena povezanost promotorske varijante -509C>T sa razvojem atopijske (alergijske) astme i zapaženo je da su atopijski pacijenti uključeni u studije najvećim delom bili azijskog porekla (41). Studije u kojima su promotorske varijante -509C>T i -800G>A korelisane sa količinom IgE u serumu kao atopijskim parametrom nisu pokazale povezanost promotorske varijante -800G>A sa nivoom IgE za razliku od varijante -509C>T (42, 44, 45, 62, 72, 78).

S obzirom da je TGFB1 važan inflamatorni modulator, u ovom istraživanju je ispitivana i povezanost promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* sa parametrima inflamacije. Najbolji pokazatelj plućne inflamacije je povišen nivo izdahnutog azot monoksida (FeNO). Merenje FeNO predstavlja funkcionalni test, jer pored inflamatornih ćelija, epitelijalne ćelije usled inflamacije oslobađaju azot monoksid. Međutim, u ovoj studiji nije bilo moguće izmeriti FeNO kod pedijatrijskih pacijenata. Stoga je inflamacija kod pedijajtrijskih pacijenata procenjena na osnovu nivoa C-reaktivnog proteina u serumu i na osnovu analize indukovanog sputuma. Za razliku od C-reaktivnog proteina koji je nespecifičan parametar sistemske inflamacije, inflamatorne ćelije indukovanog sputuma daju pouzdaniju sliku o inflamaciji zastupljenoj u plućima pacijenata. Međutim, analizom indukovanog sputuma se dobijaju samo podaci o distribuciji inflamatornih ćelija, ali ne i o stepenu njihove aktivnosti.

Rezultati naše studije nisu pokazali povezanost promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* sa nivoom C-reaktivnog proteina u serumu pedijatrijskih pacijenata. Poređenjem distribucije inflamatornih ćelija indukovanog sputuma je kod pacijenata sa genotipom -509TT uočen trend ka smanjenoj produkciji monocita (4,8%) i makrofaga (13,5%) u odnosu na pacijente sa genotipom -509CC i -509CT (7,6% i 7,8% za monocite, p=0,051; 16,3% i 16,5% za makrofage, p=0,066). Pošto je varijanta -509T povezana sa povećanom ekspresijom gena *TGFB1* onda se u njenom prisustvu može očekivati povišen nivo proteina TGFB1. Imajući u vidu da TGFB1 inhibitorno deluje na monocite i makrofage, povišen nivo TGFB1 kod osoba sa genotipom -509TT može biti povezan sa

smanjenom produkcijom ovih inflamatornih ćelija. Za promotorsku varijantu -800G>A gena *TGFB1* nisu uočene razlike u distribuciji inflamatornih ćelija indukovanog sputuma između genotipova.

Uticaj promotorske varijante -509C>T na težinu astme je do sada ispitivan kod adultnih i pedijatrijskih pacijenata, ali su studije dale oprečne rezultate. S druge strane promotorska varijanta -800G>A je ispitivana u samo jednoj studiji, koja je sprovedena u grupi adultnih astmatičara. U ovom istraživanju je analiziran uticaj promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* na težinu bolesti u pedijatrijskoj grupi pacijenata. Grupa pedijatrijskih pacijenata je podeljena na podgrupe pacijenata sa blagim i teškim oblikom astme, a učestalosti alela i distribucije genotpova su upoređene između podgrupa. Dobijeni rezultati nisu pokazali povezanost promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A sa težinom astme što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (42, 70, 78). Iako se učestalosti genotipova za promotorsku varijantu -509C>T između podgrupa nisu značajno razlikovale, zapažen je blagi porast učestalosti homozigota -509TT (27,6%) kod pacijenata sa teškom astmom u odnosu na pacijente sa blagom astmom (21,8%). Ovaj rezultat je u skladu sa studijom koju su sproveli Pulleyn i saradnici, a u kojoj je uočena 1,8 puta viša učestalost genotipa -509TT u grupi pacijenata sa teškim oblikom astme u odnosu na grupu pacijenata sa blagim oblikom astme (68). U našoj studiji je zapažena viša učestalost genotipa -509CT u okviru grupe pacijenata sa teškim oblikom astme u odnosu na učestalosti genotipova -509CC i -509TT (51,5%vs.21,3% i 27,6%, respektivno) što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (66, 70). Učestalost alela -509T je bila povišena kod pacijenata sa teškim oblikom astme (54,3%) u odnosu na pacijente sa blagim oblikom astme (41,8%). Iako statistička značajnost nije postignuta (p=0,076), u našoj studiji je uočen trend da astmatičari koji su nosioci varijante -509T razvijaju teže oblike astme što je u skladu sa drugim studijama (66, 68, 70).

Ranije studije su pokazale da je kod astmatičara genotip -509TT povezan sa povišenom nivoom TGFB1 u perifernoj cirkulaciji u odnosu na genotipove -509CC i -509CT, dok za varijantu -800G>A nema podataka (63, 70, 78). U našoj studiji je koncentracija TGFB1 izmerena u deset uzoraka seruma adultnih pacijenata sa različitim

genotipom i dobijene vrednosti se nisu razlikovale između genotipova, što je u skladu sa nalazom prethodne studije (78).

5.3 Uloga promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A u odgovoru na terapiju astme

Najbolji pristup za proučavanje modulatorne uloge promotorskih varijanti gena *TGFB1* na terapiju astme je *in vivo*, praćenjem i evaluacijom astmatičara, ali ovakav pristup ima brojna ograničenja. Za ovu studiju su selektovani adultni pacijenti sa astmom koji su imali egzacerbacije u periodu praćenja bez obzira na tip terapije koju su primali, a na osnovu kojih je procenjen odgovor na terapiju. Za ovakvu vrstu analize je poželjno korelisati promotorske varijante sa odgovorom na monoterapiju određenim tipom leka. Međutim, neki lekovi se retko (leukotrijenski modifikatori) ili uopšte ne primenjuju kao monoterapija (beta-2 agonisti), pa je teško pratiti odgovor na tu vrstu lekova (1). Veliki problem u dizajniranju ovakvih studija je varijabilnost u izboru terapeutika i njihovih primenjenih doza. Ovaj problem još više dolazi do izražaja u dizajniranju studija koje obuhvataju pedijatrijske pacijente. Često je kod dece mlađe od 5 godina teško proceniti odgovor na terapiju, jer se kod ove dece ne primenjuje spirometrija, što otežava utvrđivanje intenziteta opstrukcije pluća (3). U ovoj studiji nije bilo moguće formirati grupe pacijenata koji su bili na monoterapiji, pa je odabran pristup koji podrazumeva ispitivanje odgovora na terapiju određenim tipom leka *ex vivo* na uzorku koji je poreklom od samog pacijenta. Kako su u opisanom pristupu u uzorku koji se koristi dominantne inflamatorne ćelije koje su izvor velikog broja različitih modulatora molekularnih procesa u plućima, selektovani su pedijatrijski pacijenti sa stabilnom astmom kako bi se umanjio uticaj individualnih varijacija na dobijene rezultate.

U ovoj studiji je ispitana povezanost promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* sa kontrolom bolesti u odabranim grupama pacijenata. Za razliku od promotorske varijante -509C>T, uticaj promotorske varijante -800G>A na kontrolu bolesti je prvi put ispitivan u ovoj studiji. Dobijeni rezultati nisu pokazali povezanost varijanti -

509C>T i -800G>A gena *TGFB1* sa kontrolom bolesti u grupama pacijenata. U adultnoj grupi pacijenata je učestalost genotipa -509TT kod pacijenata sa loše kontrolisanom astmom bila viša za 8% u odnosu na učestalost kod pacijenata sa dobrom kontrolom bolesti, ali razlika nije bila statistički značajna (p=0,649). U prethodnoj studiji koju su sproveli Panek i saradnici, a u kojoj su korišćeni isti kriterijumi za porcenu kontrole bolesti kao u našoj studiji, alel -509T je okarakterisan kao faktor rizika za lošu kontrolu astme (69). Razlike u dobijenim rezultatima mogu biti posledica broja ispitanika uključenih u studije i razlika u učestalostima genotipova dobijenih za grupe pacijenata. Učestalost alela -509C (33%) i genotipa -509CC (2,9%) u studiji koju su sproveli Panek i saradnici su bile znatno niže od učestalosti alela -509C (55,4%) i genotipa -509CC (24,5%) dobijenih u našoj studiji. U grupi pedijatrijskih pacijenata je učestalost genotipa -509TT bila povišena kod pacijenata sa delimično kontrolisanom astmom (31,3%) u odnosu na pacijente sa dobrom kontrolom bolesti (21,2%), ali razlika nije bila statistički značajna (p=0,587). S obzirom da su pedijatrijsku grupu ispitanika činili pacijenti sa dobrom (70%) i delimičnom kontrolom bolesti (30%), ovaj rezultat može biti posledica kriterijuma selekcije.

Prisustvo homozigotnog genotipa -800AA u adultnoj grupi pacijenata je utvrđeno kod dva pacijenta koja su imali lošu kontrolu bolesti, dok je u pedijatrijskoj grupi pacijenata genotip -800AA bio prisutan kod jednog pacijenta sa dobrom kontrolom bolesti. Učestalost genotipa -800GA je u adultnoj grupi pacijenata bila dva puta viša kod pacijenata sa lošom kontrolom u odnosu na pacijente sa dobrom kontrolom bolesti (60%vs.29,5%), ali nije postignuta statistički značajna razlika (p=0,062). U grupi pedijatrijskih pacijenata se učestalost genotipa -800GA nije razlikovala između pacijenata sa dobrom i lošom kontrolom astme (10,5%vs.8,1%). Pored toga što su u pedijatrijsku grupu bili uključeni samo pacijenti sa stabilnom astmom, u ovoj studiji je dobijena učestalost genotipa -800GG bila ista u obe grupe (89,2%) i bila je znatno viša u odnosu na učestalost genotipa -800GA (8,8% za adultnu grupu i 9,8% za pedijatrijsku grupu).

Kako bi se ispitao uticaj promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A na odgovor na terapiju, grupa adultnih pacijenata je podeljena prema učestalostima simptoma na podgrupe pacijenata sa i bez egzacerbacija. Pacijenti sa egzacerbacijama uključeni u ovu studiju su

imali snižene prosečne vrednosti plućne funkcije FEV1 (68,4±21,6%) i FVC (87,4±18,3%) u odnosu na pacijente koji nisu imali egzacerbacije (89,0±16,2% i 98,6±14,4, respektivno). Kod pacijenata sa egzacerbacijama su vrednosti ACT bile značajno snižene u odnosu na pacijente koji nisu imali egzacerbacije ($p<0,001$). Ovakve vrednosti mogu biti očekivane imajući u vidu da je kod pacijenata sa egzacerbacijama opstrukcija disajnih puteva izraženija, simptomi češći i da ovi pacijenti često razvijaju teže oblike astme. U grupi pacijenata koji su imali učestalije simptome bolesti uočena je veća učestalost alela -509T (54,5%) i genotipa -509TT (36,4%) u odnosu na pacijente koji nisu imalli egzacerbacije (37,8% za alel -509T i 17% za genotip -509TT). Takođe, u recesivnom modelu nasleđivanja je pokazano da su pacijenti sa genotipom -509TT pod 2,8 puta većim rizikom za pojavu egzacerbacija (CC+CTvs.TT; $p=0,037$). Rezultati naše studije ukazuju na povezanost varijante -509C>T sa pojavom egzacerbacija i genotipa -509TT sa lošim odgovorom na terapiju astme.

S obzirom da je pušenje povezano sa učestalijom pojavom egzacerbacija i sa lošim odgovorom na terapiju, u našoj studiji je ispitivan sinergistički uticaj promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* i pušačkog statusa pacijenta na pojavu egzacerbacija. Dobijeni rezultati su pokazali da pojava egzacerbacija ne zavisi od prisutnih varijanti u promotoru gena *TGFB1* u kombinaciji sa pušačkim statusom pacijenta. Studija koju su sproveli Salam i saradnici je pokazala da su deca sa genotipom -509TT pod 3,4 puta većim rizikom da razviju perzistentnu astmu u odnosu na decu sa genotipom -509CT i -509TT ukoliko su bila izložena duvanskom dimu tokom intrauterinog života ili zagađenom vazduhu u ranom detinjstvu (75). S druge strane promotorska varijanta -800G>A nije do sada ispitivana u ovakvom kontekstu. Rezultati naše studije mogu biti posledica manjeg broja pacijenata koji su pušači (17,3%) u odnosu na broj pacijenata koji su nepušači (82,7%).

Za promotorsku varijantu -800G>A nisu uočene razlike u učestalostima alela i distribuciji genotipova između podgrupa pacijenata sa i bez egzacerbacija. S obzirom da je promotorska varijanta -800G>A zastupljena sa niskom učestalošću u ispitivanim grupama i da nije pokazana povezanost ove varijante sa kliničkim karakteristikama pacijenata

(plućnom funkcijom, inflamacijom i alergijskom senzibilizacijom), može se pretpostaviti da varijanta -800G>A nema implikacije u patologiji astme što je u skladu sa prethodnim studijama (42, 44). Imajući u vidu da je bazna zamena G>A povezana sa smanjenom promotorskom aktivnošću gena *TGFB1* odnosno produkcijom TGFB1 i da je varijanta -800A učestalija u kontrolnoj grupi (10,3%) u odnosu na učestalosti u grupama pacijenata (6,4% za adultnu grupu i 5,9% za pedijatrijsku grupu), ova varijanta bi mogla imati protektivnu ulogu. U tom slučaju bi osobe sa homozigotnim genotipom za varijantu -800A bile pod smanjenim rizikom za razvoj astme ili bi bolest nastupila u kasnijim godinama života. Međutim, učestalost alela -800A je znatno niža u odnosu na učestalost alela -800G u opštoj populaciji, pa je potrebno sprovesti dalja istraživanja koja bi uključila znatno veći broj ispitanika kako bi se razjasnila uloga promotorske varijante -800G>A gena *TGFB1* u astmi.

5.4 Ispitivanje uticaja varijanti gena TGFB1 na odgovor na montelukast *ex vivo*

Ovo je prva studija koja je ispitivala da li antagonisti leukotrijenskih receptora imaju direktan uticaj na ekspresiju gena *TGFB1* i da li on zavisi od varijanti prisutnih u regulatornom regionu gena. Poznato je da usled inflamacije leukotrijeni sekretovani od strane mastocita i eozinofila stimulišu ekspresiju gena *TGFB1* i produkciju proteina čija je koncentracija u plućima astmatičara obično povišena (25, 79). Međutim, ne zna se da li antagonsiti leukotrijenskih receptora utiču na ekspresiju gena *TGFB1*. Stimulišući uticaj ovih leukotrijenskih modifikatora bi dodatno doprineo povećanju koncentracije TGFB1 u plućima i perifernoj cirkulaciji. Na taj način bi se pojačali efekti koje TGFB1 ima u astmi što bi posledično moglo da utiče na efikasnost terapije ovim lekovima.

U našoj studiji je ispitivanjem povezanosti promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* sa pojavom egzacerbacija pokazano da bi promotorska varijanta -509C>T mogla biti povezana sa lošim odgovorom na terapiju. Kako bi se ispitao uticaj promotorske varijante -509C>T gena *TGFB1* sa odgovorom na terapiju antagonistima

leukotrijenskim receptorima, ćelije indukovanog sputuma pedijatrijskih pacijenata su *ex vivo* tretirane montelukastom. Stoga su za ispitivanje montelukasta selektovani pedijatrijski pacijenti kod kojih je kontrola astme postignuta terapijom koja nije uključivala leukotrijenske modifikatore.

S obzirom da inflamatorne ćelije zastupljene u sputumu oslikavaju mikrosredinu plućnog tkiva pacijenta i da se analiza indukovanog sputuma već koristi u kliničkoj praksi, indukovani sputum predstavlja pogodan sistem za ovakvu vrstu analize (80). Indukovani sputum je uzorkovan od svih pedijatrijskih pacijenata uključenih u studiju. Pedijatrijski pacijenti selektovani za studiju su bili pacijenti sa stabilnom astmom kod kojih je inflamacija bila kontrolisana. Analizom indukovanog sputuma je pokazano da nema značajnih razlika u distribuciji eozinofila i neutrofila koji predstavljaju dominantne inflamatorne ćelije u plućima. Imajući u vidu da je u ovoj studiji analizirana ekspresija gena *TGFB1* i da inflamatorne ćelije sekretuju medijatore koji bi mogli da utiču na ekspresiju gena *TGFB1* uključujući i sam TGFB1, ovakav kriterijum je bio neophodan. U suprotnom, velike fluktuacije u distribuciji inflamatornih ćelija usled inflamacije bi mogle da utiču na rezultate analize.

Za razliku od naše studije, u dosadašnjim studijama je montelukast korišćen samo kao blokator leukotrijenskih receptora u eksperimentima *in vitro,* dok je *ex vivo* na ekspresiju TGFB1 od lekova za astmu ispitivan uticaj kortikosteroida (79, 81-83). Koncentracija montelukasta korišćena za tretmane u našoj studiji (100 μM) je određena na osnovu koncentracija (10 nM - 100 μM) korišćenih za tretmane različitih ćelijskih linija u prethodnim studijama (81-83). Takođe, uzeti su u obzir i podaci o koncentracijama drugih lekova korišćenih za stimulaciju ćelija indukovanog sputuma. U studiji koju su sproveli Gai i saradnici su ćelije indukovanog sputuma astmatičara kultivisane i tretirane deksametazonom (100 μM), a zatim je meren nivo sekretovanog TGFB1, dok je u studiji Higashi i saradnika meren nivo leukotrijena nakon *ex vivo* stimulacije ćelija indukovanog sputuma aspirinom (100 μM) (79, 80).

Dok je u drugim studijama u indukovanom sputumu kvantifikovan nivo TGFB1, u ovom istraživanju je iz inflamatornih ćelija izolovana ukupna RNK kako bi se ekspresija gena *TGFB1* analizirala na nivou iRNK radi dobijanja preciznije informacije o uticaju leka na gensku ekspresiju (79, 84-86). Međutim, analiza ekspresije gena *TGFB1* u odgovoru na dejstvo montelukasta je izvršena na malom broju uzoraka indukovanog sputuma. Usled interindividualne varijabilnosti u količini uzorka, uzorci indukovanog sputuma kod 15% pedijatrijskih pacijenata nisu bili odgovarajuće zapremine (≥1 mL), pa nisu korišćeni za analizu. Za analizu ekspresije gena *TGFB1* su selektovani uzorci 32 pacijenta, jer je RNK izolovana iz tretiranog i netretiranog dela indukovanog sputuma ovih pacijenata bila odgovarajuće koncentracije i čistoće. U ostalim slučajevima kvalitet izolovane RNK je bio nizak, a u nekim slučajevima RNK nije detektovana u tretiranom, netretiranom ili u oba dela indukovanog sputuma.

Iako je indukovani sputum pogodan uzorak za procenu interindividualnih varijacija u odgovoru na antiinflamatornu terapiju, analiza sputuma metodom qRT-PCR ima određena ograničenja. S obzirom da je svaki uzorak podeljen na dva dela i da je za izolaciju RNK korišćen rastvor TriReagent, prvo ograničenje se odnosi na broj ćelija koji je često manji ($1x10^4$-$1x10^5$ ćelija) od predviđenog minimuma prema protokolu ($1x10^6$ ćelija). Drugo ograničenje je kvantitet izolovane RNK koja se degraduje pod dejstvom ribonukleaza prisutnih u indukovanom sputumu u velikoj meri. Treće ograničenje se odnosi na kvalitet izolovane RNK. Uprkos tome što se pomoću rastvora TriReagent dobija izolovana RNK zadovoljavajućeg prinosa, često u izolatu zaostaje fenol iz samog reagensa koji utiče na odnos apsorpcije RNK na talasnim dužinama 260 nm i 280 nm.

Od selektovanih uzoraka relativna kvantifikacija ekspresije gena *TGFB1* je uspešno izvršena u uzorcima indukovanog sputuma 22 pacijenta što je predstavljalo 25% *ex vivo* tretiranih uzoraka. Prvo je ispitana povezanost promotorske varijante -509C>T sa nivoom ekspresije gena *TGFB1* u netretiranim ćelijama indukovanog sputuma i nije utvrđena razlika u ekspresiji gena u odnosu na genotip. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnom studijom u kojoj je korelisana promotorska varijanta -509C>T sa ekspresijom gena *TGFB1* u leukocitima periferne krvi (69). Poređenjem ekspresije gena *TGFB1* u tretiranim i

netretiranim ćelijama indukovanog sputuma za svakog pacijenta je uočeno da postoji trend ka negativnoj regulaciji transkripcije gena pod dejstvom montelukasta.

U našoj studiji je pokazano da bi varijanta -509C>T mogla biti povezana sa odgovorom na montelukast u inflamatornim ćelijama indukovanog sputuma. Uticaj montelukasta na smanjenje ekspresije gena *TGFB1* je kod nosilaca genotipa -509TT (58,9%) bio veći u odnosu na nosioce genotipa -509CT (31,8%) i genotipa -509TT (49,6%). U recesivnom modelu nasleđivanja (CC+CTvs.TT) je pokazana razlika u odgovoru na montelukast koja je bila na granici statističke značajnosti (p=0,056). Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da inflamatorne ćelije pacijenata sa genotipom -509TT pod dejstvom montelukasta produkuju manju količinu TGFB1 u odnosu na pacijente sa drugim genotipovima (-509CT i -509CC) što posledično može biti udruženo i sa efektima koje ovaj citokin ima u disajnim putevima. Na taj način bi kroz smanjenu produkciju TGFB1 pacijenti sa genotipom -509TT bolje reagovali na terapiju montelukastom što bi bilo od velikog značaja u terapiji astme.

Imajući u vidu prethodno navedena ograničenja koja se odnose na analizu indukovanog sputuma metodom qRT-PCR, kao i da se ćelije periferne cirkulacije infiltriraju u pluća astmatičara, periferna krv tri pedijatrijska pacijenta je tretirana *ex vivo* montelukastom. U leukocitima periferne krvi je zapažena smanjena ekspresija gena *TGFB1* u odgovoru na tretman montelukastom što je u skladu sa rezultatom analize ekspresije gena u inflamatornim ćelijama indukovanog sputuma.

S obzirom da je montelukast antagonist leukotrijenskih receptora, najverovatnije u inflamatornim ćelijama ima inderektno dejstvo na ekspresiju gena *TGFB1*. Eozinofili predstavljaju glavni izvor leukotrijena koji se vezuju za receptore na različitim inflamatornim ćelijama uključujući i same eozinofile (87). Pošto je pokazano da leukotrijeni stimulišu ekspresiju gena *TGFB1,* blokiranjem leukotrijenskih receptora se posledično inhibiraju i efekti koje leukotrijeni imaju na ekspresiju TGFB1.

5.5 Uticaj sredinskih faktora rizika za nastanak astme na ekspresiju gena *TGFB1*

S obzirom da su ćelije bronhijalnog epitela glavni izvor TGFB1 u zdravim plućima, u ovoj studiji je za ispitivanje uticaja sredinskih faktora na ekspresiju TGFB1 odabrana imortalizovana primarna ćelijska linija poreklom od bronhijalnog epitela (BEAS 2B). Ćelije BEAS 2B se odlikuju očuvanim morfološkim i funkcionalnim karakteristikama kakve se sreću u zdravim plućima i predstavljaju pogodan model sistem za proučavanje dejstva različitih faktora spoljašnje sredine kojima su pluća direktno izložena. Ćelije bronhijalnog epitela su za potrebe ovog istraživanja kultivisane u medijumu obogaćenim 2% fetalnim goveđim serumom što je predstavljalo optimalnu koncentraciju, jer u prisustvu veće količine seruma ćelije BEAS 2B podležu skvamoznoj diferencijaciji. S obzirom da je u ovom istraživanju praćena ekspresiija TGFB1, tretmani su vršeni u medijumu bez seruma kako bi se izbegao uticaj TGFB1 koji je u određenoj meri prisutan u serumu. Tretmani su primenjivani tako što je medijum u kome su ćelije kultivisane zamenjivan medijumom bez seruma u kome su agensi od interesa razblaživani do finalnih koncentracija. Prilikom kultivacije ćelija BEAS 2B u našoj studiji je primećeno da u potpunom odsustvu seruma ćelije ne mogu dugo da opstanu, dok dugoročnim izlaganjem čak i manjoj količini seruma usled kumulativnog efekta podležu strukturnim i funkcionlanim promenama.

Među faktorima spoljašnje sredine koji se dovode u vezu sa narušenom funkcijom pluća i razvojem različitih respiratornih bolesti uključujući astmu jesu duvanski dim i infekcije mikroorganizmima. Plućne ćelije su izložene duvanskom dimu direktno kroz konzumiranje cigareta ili posredno usled sekundarnog pušenja. Mikororganizmi dolaze u direktan kontakt sa plućnim epitelom i predstavljaju najčešći uzrok inflamacije u plućima (88). Kako bi se razjasnila uloga koju TGFB1 ima u astmi, važno je poznavati uticaj ovih sredinskih faktora na regulaciju ekspresije gena *TGFB1* pre svega u zdravom tkivu. Stoga je u našoj studiji ispitivan odgovor gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B na dejstvo ekstrakta duvanskog dima i lipopolisaharida koji je bakterijskog porekla.

Studije u kojima je ispitivan uticaj duvanskog dima na ekspresiju TGFB1 su pokazale da duvanski dim stimuliše profibrotička svojstva TGFB1 indukujući oksidativni stres koji posledično vodi aktivaciji latentnog TGFB1. Prema rezultatima studije koju su sproveli Checa i saradnici, pod dejstvom duvanskog dima se povećava ekspresija integrina koji interagujući sa latentnim proteinom oslobađaju aktivni TGFB1 iz latentnog kompleksa (89). Postoji mali broj studija koje su ispitivale direktan uticaj duvanskog dima na ekspresiju gena *TGFB1* i dale su oprečne rezultate (89, 90).

U našoj studiji je pokazano da pojava egzacerbacija kod adultnih pacijenata ne zavisi od kombinovanog uticaja promotorskih varijanti -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* i pušačkog statusa pacijenta. Kako bi se dalje ispitao uticaj ekstrakta duvanskog dima na ekspresiju gena *TGFB1 in vitro,* korišćena su dva različita eksperimentalna pristupa. Aktivnost promotora gena *TGFB1* u odgovoru na dejstvo ekstrakta duvanskog dima je merena pomoću luciferaznih eseja, dok je relativna ekspresija gena kvantifikovana metodom qRT-PCR.

Rezultati dobijeni merenjem aktivnosti luciferaze su pokazali povećanje promotorske aktivnosti gena *TGFB1* za 33% nakon prekonoćne stimulacije ekstraktom duvanskog dima, dok je relativnom kvantifikacijom iRNK utvrđeno da se nakon stimulacije u trajanju od 1 h ekspresija gena *TGFB1* smanjuje za 22%. Ovakva kontradiktornost može poticati od razlika u primenjenoj metodologiji, vremena inkubacije i same ispitivane sekvence DNK. Moguće je da ekstrakt duvanskog dima inicijalno negativno reguliše transkripciju gena, a zatim da indirektno indukujući ekspresiju transkripcionih faktora ili koaktivatora stimuliše ekspresiju gena *TGFB1*. U ovoj studiji nije praćena ekspresija gena *TGFB1* na nivou iRNK nakon prekonoćne stimulacije ekstraktom duvanskog dima. S druge strane, imajući u vidu da je luciferaznim esejima ispitivan samo bazalni promotor i deo negativnog regulatornog regiona gena *TGFB1*, razlike mogu poticati i od uticaja drugih promotorskih sekvenci uključenih u regulaciju transkripcije gena.

Rezultati naše studije su pokazali značajno smanjenje u ekspresiji gena *TGFB1* pod dejstvom duvanskog dima (p=0,001) što je delimično u skladu sa studijom u kojoj je

pokazano da pri manjoj gustini ćelija $1x10^6$ ekstrakt duvanskog dima nakon 48 h inkubacije ima dozno zavisan inhibitoran efekat na ekspresiju gena *TGFB1* u humanim fetalnim fibroblastima pluća (90). U istoj studiji je pokazano da prisustvo 5% ekstrakta duvanskog dima stimuliše ekspresiju gena *TGFB1* pri gustini ćelija $5x10^6$, dok 10% ekstrakt duvanskog dima ima inhibitorno dejstvo pri istim uslovima. Checa i saradnici su pokazali na tumorskim ćelijama alveolarnog epitela A549 da se pod dejstvom ekstrakta duvanskog dima (1%, 5%, 10%) nakon 1-5 nedelja inkubacije u povišenoj meri eksprimiraju geni koji su udruženi sa epitelijalno-mezenhimalnom tranzicijom uključujući gen *TGFB1* (89). S obzirom da su u našoj studiji korišćene imortalizovane primarne bronhijalne ćelije, dugoročnije izlaganje ekstraktu duvanskog dima bi imalo citotoksičan efekat. Imajući u vidu i da su tretmani vršeni u medijumu bez seruma, dugoročna kultivacija ćelija u takvim uslovima bi takođe indukovala smrt ćelija.

Razlike u dobijenim rezultatima u našoj i drugim studijama mogu poticati od načina pripreme i primenjene doze ekstrakta duvanskog dima, vremena inkubacije, gustine i tipa ćelija. Za potrebe naše studije ekstrakt duvanskog dima je dobijen rastvaranjem faze katrana u DMSO, dok je u drugim studijama pripreman propuštanjem dima cigarete kroz medijum, koji je zatim razblažen i korišćen za tretmane ćelija (89, 90). S obzirom da faza katrana nije istog sastava kao i faza gasa duvanskog dima, sadržaj komponenti na koje je promotor gena *TGFB1* osetljiv može da varira i da indukuje heterogeni odgovor. Takođe, treba uzeti u obzir da se duvanski dim kome su plućne ćelije izložene *in vivo* razlikuje od ekstrakta koji se primenjuje *in vitro*. S obzirom da duvanski dim sadrži reaktivne vrste kiseonika pod čijim dejstvom se aktivira signalni put NFkB, smanjena ekspresija gena *TGFB1* može biti posledica negativne regulacije ekspresije gena od strane transkripcionog faktora NFkB (91). Pored toga, duvanski dim može da moduliše ekspresiju gena za proteine koji su regulatori signalnog puta TGFB. Springer i saradnici su pokazali smanjenje u ekspresiji gena *SMAD7* u ćelijama A549 nakon izlaganja 1% i 10% ekstraktu duvanskog dima, bez uticaja na ekspresiju gena *SMAD2*, *SMAD3* i *SMAD4* (92). Na ovaj način se posledično promoviše signalizacija TGFB. Naime, usled smanjene ekspresije gena *SMAD7* smanjuje se količina intracelularnog SMAD7 koji inhibira signalnu transdukciju TGFB,

dok signalni proteini SMAD2, SMAD3 i SMAD4 neometano formiraju heterokompleks koji se translocira u jedro i vezuje za sekvence DNK regulišući ekspresiju različitih gena. Suprotno ovoj studiji Samanta i saradnici su pokazali da znatno duže izlaganje duvanskom dimu smanjuje promotorsku aktivnost gena *SMAD3* usled deacetilacije histona (93). Razlike u rezultatima između ove dve studije mogu biti usled vremena izlaganja ćelija duvanskom dimu, kao i usled načina pripreme ekstrakta duvanskog dima. U prvoj studiji su ćelije inkubirane 48 h sa duvanskim dimom rastvorenim u medijumu, dok su rezultati druge studije dobijeni nakon višemesečnog izlaganja ćelija komercijalnom ekstraktu duvanskog dima.

U našoj studiji su ćelije tretirane lipopolisaharidom pri koncentraciji 10 µg/mL za koju je prethodno pokazano da nema toksičan efekat na ćelije BEAS 2B nakon 48 h inkubacije. Dobijeni rezultati su pokazali smanjenu ekspresiju gena *TGFB1* pod dejstvom lipopolisaharida u odnosu na netretirane ćelije, ali razlika nije bila statistički značajna (p=0,087). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnom studijom u kojoj su ćelije tretirane 10 puta višom koncentracijom lipopolisaharida (100 µg/mL) u odnosu na koncentracije korišćene u našoj studiji (94). Sličan odgovor na stimulaciju lipopolisaharidom se sreće u inflamatornim ćelijama. Kultivisani neutrofili i makrofazi poreklom iz pluća nakon 12 h tretmana lipopolisaharidom sekretuju manju količinu TGFB1 u odnosu na netretirane ćelije (95). Lipopolisaharid promoviše inflamaciju direktno aktivirajući signalne puteve NFkB i MAPK u ćelijama plućnog epitela ili posredno indukujući mijeloidne ćelije da sekretuju citokine koji dalje utiču na epitelijalne ćelije. Smanjena ekspresija gena *TGFB1* pod dejstvom lipopolisaharida je najverovatnije posledica interakcija transkripcionih faktora NFkB i C/EBPß koje su povezane sa negativnom regulacijom gena *TGFB1*. Sa druge strane, signalni putevi TGFB1 i NFkB su međusobno povezani pri čemu najvažniju ulogu ima inhibitorni protein SMAD7. Pod dejstvom lipopolisaharida aktivira se signalni put i transkripcioni faktor NFkB koji se vezuje za regulatorne sekvence gena *SMAD7*. Usled stimulišućeg dejstva NFkB na transkripciju gena *SMAD7* povećava se koncentracija SMAD7 i inhibitorni efekti na signalu transdukciju TGFB. Na taj način se posledično smanjuje ekspresija ciljnih gena u čijoj regulaciji učestvuje TGFB1 (96).

Pokazana je niska osetljivost ćelija BEAS 2B i A549 na proinflamatrone medijatore kao što su citokini TNF-α i IL-1 koja je najverovatnije u vezi sa protektivnom ulogom kako bi se sprečila preosetljivost pluća na stimuluse koji nisu poreklom od mikroorganizama. Međutim, ćelije BEAS 2B i A549 su u velikoj meri neosetljive na lipopolisaharid pri niskim koncentracijma (<10 μg/mL) (97). Verovatno odgovor ovih ćelija na lipopolisaharid zavisi od koncentracije i vremena izlaganja.

Na osnovu svega navednog se može pretpostaviti da je i odgovor gena *TGFB1* na dejstvo sredinskih fakora za nastanak astme u vezi sa protektivnom ulogom. Na taj način se sprečava fibroza indukovana povišenom koncentracijom TGFB1 i održava homeostaza u plućima.

5.6 Uticaj različitih terapeutika na ekspresiju gena *TGFB1* i sekreciju proteina

Kako bi se ispitala uloga TGFB1 kao potencijalnog terapijskog modulatora, ćelije BEAS 2B su tretirane različitim terapeuticima. Od lekova koji se rutinski koriste u terapiji astme ispitivani su montelukast i kortikosteroidi. Prethodno je u ovoj studiji pokazano *ex vivo* da montelukast smanjuje ekspresiju gena *TGFB1* u inflamatornim ćelijama stoga je u daljoj analizi ispitano dejstvo montelukasta *in vitro*. S obzirom da je TGFB1 inflamatorni modulator i da su kortikosteroidi lekovi sa antiinflamatornim dejstvom, analizirani su efekti prednizona i deksametazona. Pored kortikosteroida i montelukasta, od lekova koji se ne koriste rutinski za lečenje astme ispitani su dapson i polinol.

Uticaj lekova na ekspresiju gena *TGFB1* kao i na količinu sekretovanog TGFB1 su mereni u istom eksperimentalnom sistemu na nivou iRNK, metodom qRT-PCR, i na nivou proteina ELISA metodom. Dobijeni rezultati su pokazali promene u ekspresiji gena *TGFB1* pod dejstvom različitih terapeutika, dok na količinu sekretovanog proteina nisu imali uticaj.

5.6.1 Uticaj montelukasta

Rezultati ove studije su pokazali da montelukast smanjuje ekspresiju gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B za 27% u odnosu na netretirane ćelije sa statističkom značajnošću $p<0,001$, dok na količinu sekretovanog TGFB1 nema značajnog uticaja. Uticaj montelukasta na ekspresiju gena *TGFB1* u inflamatornim ćelijama indukovanog sputuma nakon *ex vivo* tretmana je bio veći nego u ćelijama BEAS 2B. Veći uticaj montelukasta na ekpresiju gena *TGFB1* u inflamatornim ćelijama u odnosu na ćelije BEAS 2B može poticati od razlika u model sistemima, ali i samog mehanizma delovanja montelukasta. Ključna razlika između ova dva eksperimentalna pristupa je u tome što su eozionofili kao najvažniji izvor leukotrijena bili odsutni u eksperimentima *in vitro,* pa se njihov modulatorni efekat na ekspresiju gena *TGFB1* može isključiti. S obzirom da TGFB1 pozitivno reguliše ekspresiju leukotrijenskih receptora na eozinofilima i strukturnim plućnim ćelijama, smanjena ekspresija gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta bi posledično smanjila i uticaj TGFB1 na ekspresiju receptora za leukotrijene. Na taj način bi montelukast posredno manjujući ekspresiju TGFB1 mogao da reguliše efekte leukotrijena i poveća svoje antiinflamatorno dejstvo u terapiji astme. Ovi rezultati su u skladu sa pretpostavkom da montelukast ima dodatne mehanizme delovanja pored vezivanja za leukotrijenske receptore (98). Na osnovu eksperimentalnih istraživanja na miševima pretpostavljeno je da montelukast utiče na signalni put TGFB smanjujući ekspresiju proteina Smad3 koji pripada kanonskom signalnom putu (99). S druge strane, u humanim fibroblastima pluća leukotrijeni ostvaruju modulatornu ulogu na ekspresiju gena *TGFB1* i kroz alternativni p38 MAP kinazni put (100). Imajući u vidu da se montelukast vezuje za iste receptore kao i leukotrijeni, može se pretpostaviti da efekat na ekspresiju gena *TGFB1* ostvaruje i kroz signalne puteve koji su nezavisni od SMAD proteina.

5.6.2 Uticaj sistemskih kortikosteroida

Rezultati ovog istraživanja su pokazali povećanu ekspresiju gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B nakon tretmana sistemskim kortikosteroidima, koji na količinu sekretovanog TGFB1 nisu imali značajnog uticaja. Imajući u vidu da je prednizon manje potentan lek u odnosu na deksametazon, tokom eksperimenta je korišćena viša koncentracija prednizona (5 μMvs.10 μM, respektivno). Iako je ekspresija gena *TGFB1* bila povišena dva puta nakon tretmana prednizonom (31%) u odnosu na tretman deksametazonom (15%), ove promene nisu bile statistički značajne (p=0,089 za prednizon i p=0,326 za deksametazon). S obziorm da je deksametazon rastvaran u etanolu, a prednizon kao komercijalni lek u vidu tablete rastvaran u PBS-u, razlika u efektima kortikosteroida na ekspresiju gena *TGFB1* može biti posledica načina pripreme lekova za tretmane.

Studije koje su do sada ispitivale uticaj kortikosteroida na ekspresiju TGFB1 su dale kontradiktorne rezultate. Stimulišući efekat kortikosteroida na transkripciju gena *TGFB1* je pokazan u ćelijama karcinoma prostate PC-3, dok u humanim fetalnim fibroblastima pluća HFL-1 i ćelijama osteosarkoma MG-63 tretman deksametazonom nije imao uticaja na ekspresiju gena *TGFB1* (101-103). Imajući u vidu kompleksnost regulacije ekspresije ciljnih gena pod dejstvom kortikosteroida, više različitih mehanizama može biti uključeno u regulaciju ekspresije gena *TGFB1*. Glukokortikoidni receptor bi pod dejstvom kortikosteroida mogao direktno da stimuliše ekspresiju gena *TGFB1* vezujući se za GRE sekvence u promotoru gena *TGFB1* i interagujući sa koaktivatorima kao što je p300/CBP. Pokazano je da na interakcije glukokortikoidnog receptora i transkripcionog faktora CREB utiče deksametazon (>1 μM) pri čemu se posledično indukuje transkripcija različitih gena u ćelijama A549 (104). Pored toga, glukokortikoidni receptor bi mogao direktnim ili indirektnim putem da inhibira aktivnost transkripcionih faktora AP-1 i NFkB (105). S obzirom da je AP-1 pozitivan, a NFkB negativan regulator ekspresije gena *TGFB1*, smanjena aktivnost ovih transkripcionih faktora može biti povezana sa povišenom ekspresijom gena *TGFB1*. Pokazano je i da deksametazon inhibira signalni put TGFB vezujući se za SMAD3 (103, 106).

U ćelijama osteosarkoma MG-63 je zapažena povećana aktivacija latentne forme TGFB1 u odgovoru na tretman deksametazonom. Pretpostavljeno je da u tome učestvuju proteaze (aspartat proteaza i katepsin B i D) čije su aktivnosti pod dejstvom kortikosteroida bile povišene (101). U fibroblastnim ćelijma HFL-1 je pokazan inhibitorni efekat budezonida na sekreciju TGFB1 koji pozitivno koreliše sa primenjenom dozom i vremenom inkubacije. U istoj studiji je pokazano slično dejstvo deksametazona, dok hidrokortizon nije imao uticaja na ekspresiju TGFB1 (103). S obzirom da su ekspresija gena *TGFB1* i sekrecija proteina u našoj studiji ispitivani 1 h nakon inkubacije sa lekovima, bilo bi poželjno ispitati uticaj kortikosteroida i u drugim vremenskim tačkama. Pokazano je da kortikosteroidi mogu imati i promenljiv smer delovanja zavisno od vremena inkubacije (35).

Sistemski kortikosteroidi se koriste periodično kod akutnih stanja pogoršanja bolesti ili da bi se izbegla kontinuirana inhalaciona terapija. Kod pacijenata kod kojih kontrola bolesti nije postignuta inhalacionom kortikosteroidnom terapijom, sistemski kortikosteroidi se primenjuju u dužem vremenskom periodu (13). Ovi pacijenti često razvijaju tešku opstrukciju disajnih puteva usled strukturnih promena. Imajući u vidu da su strukturne promene u disajnim putevima povezane sa hroničnom inflamacijom, kortikosteroidi bi se potencijalno mogli koristiti i u prevenciji remodelovanja disajnih puteva. Međutim, TGFB1 je ključni medijator u remodelovanju disajnih puteva i stimulišuće dejstvo kortikosteroida na ekspresiju gena *TGFB1* bi posledično dovelo do povišenog nivoa TGFB1 i moglo bi pojačati profibrotičke efekte TGFB1 u plućima pacijenata. Ova hipoteza je u skladu sa zapažanjem da je kod pacijenata sa umerenom i teškom astmom koncentracija TGFB1 povišena u plućima uprkos kortikosteroidnoj terapiji (84, 107). Imajući u vidu da se deksametazon i prednizon primenjuju oralnim putem, efekat na ekspresiju TGFB1 u plućima pacijenata sa astmom može zavisiti od primenjene doze i metaboličke razgradnje leka, kao i uticaja drugih genetičkih faktora. Kako bi se razjasnila uloga TGFB1 u terapiji astme kortikosteroidima sve navedene faktore bi trebalo uzeti u obzir, i njihov združeni efekat ispitati *in vivo*. Najpogodniji sistem za ovakvu vrstu analize bi bio animalni model sistem.

5.6.3 Uticaj dapsona i polinola

Dejstvo dapsona i polinola na ekspresiju gena *TGFB1* u humanim ćelijama pluća BEAS 2B je po prvi put ispitano u našoj studiji. Tretmani ovim lekovima su indukovali promene u ekspresiji gena *TGFB1*, dok na količinu sekretovanog proteina nisu imali uticaj.

Smanjena ekspresija gena *TGFB1* za 40% pod dejstvom polinola dobijena u našoj studiji je bila statistički značajna (p=0,008). Smanjena ekspresija TGFB1 u odgvoru na primenu ovog leka bi bila od značaja u prevenciji remodelovanja disajnih puteva u astmi. Međutim, polinol je homeopatski lek i u našoj studiji je ispitivano dejstvo celokupnog terapeutika, ali ne i aktivnih supstanci koje ulaze u njegov sastav.

U našoj studiji je pokazano da dapson stimuliše eskpresiju gena *TGFB1* za 20% u ćelijama BEAS 2B, ali ova promena u ekspresiji gena nije bila statistički značajna (p=0,105). Za razliku od polinola koji se daje astmatičarima bez obzira na tip i težinu bolesti, dapson se primenjuje u posebnim slučajevima kada kontrola bolesti nije uspostavljena. Pre više od dvadeset godina dokumentovana je jedna klinička studija u kojoj je ispitivan efekat dapsona u terapiji astme. Pokazano je da se nakon primene ovog leka kod pacijenata sa astmom u značajnoj meri smanjuje potreba za sistemskim kortikosteroidima ili se u potpunosti prekida kortikosteroidna terapija (108). Dapson ostvaruje dejstvo inaktivirajući neutrofile i nije poznato da li utiče na ekspresiju gena povezanih sa inflamacijom ili remodelovanjem disajnih puteva. Dugotrajna primena ovog leka bi mogla da bude povezana sa povišenim nivoom TGFB1 i da doprinese remodelovanju disajnih puteva. Međutim, dapson ima neželjena dejstva koja se najviše odražavaju na krvni sistem (hemoliza i leukopenija), pa se lek pažljivo dozira i izbegava se njegova primena u dužem vremenskom periodu.

Iskustva u primeni dapsona u lečenju astme su empirijska. U kliničkoj praksi je uočeno da pedijatrijski pacijenti sa neutrofilnom astmom koja je loše kontrolisana kortikosteroidima dobro reaguju na dodatnu terapiju dapsonom (108). Ovakvi rezultati su

najverovatnije posledica poznatih mehanizama delovanja dapsona na neutrofile u kojima inhibira aktivnost mijelperoksidaze i produkciju prostaglandina (18, 19).

5.7 Analiza aktivnosti promotorskih varijanti gena TGFB1 *in vitro*

Da bi se ispitala promotorska aktivnost gena *TGFB1* u zavisnosti od prisustva promotorske varijante -509C>T u ovom istraživanju su ćelije BEAS 2B transfekovane konstruktima sa odgovarajućim varijantama, pGL4.10-TGFB1C i pGL4.10-TGFB1T. Ćelije su simultano transfekovane kontrolnim vektorom. Analiza aktivnosti promotora sa varijantama -509C i -509T je vršena metodom dualnog luciferaznog eseja. U ovakvom eseju ekspresija luciferaze svica se nalazi pod direktnim uticajem promotora od interesa, a aktivnost luciferaze se normalizuje u odnosu na aktivnost kontrolnog vektora odnosno luciferaze renile (109). Imajući u vidu razlike u hemijskoj prirodi testova, načinu izvođenja eseja i karakteristike merenja, metoda luciferaznog eseja je osetljivija i pouzdanija metoda u odnosu na druge reporterske eseje u kojima se meri aktivnost enzima kao što su hloramfenikol acetiltransferaza i beta galaktozidaza (109-111). Ključna razlika je u tome što se metoda dualnog luciferaznog eseja zasniva na tome da se u istom uzorku mere aktivnosti obe luciferaze. Luciferaza svica i luciferaza renile su različitog porekla, razlikuju se po strukturi i supstratu na koju deluju, stoga predstavljaju idealan sistem za merenje luminiscencije u istom uzorku (109). Kvantifikacija luminiscencije se odvija u sekundama, dok se aktivnost hloramfenikol acetiltransferaze i beta galaktozidaze meri u krajnjoj tački nakon određenog vremena inkubacije. Pored toga, na kvantifikaciju aktivnosti beta galokozidaze može da utiče beta galaktozidaza poreklom iz ćelija, dok na aktivnost hloramfenikol acetiltransferaze utiče i endogena deacetilaza (109-111).

U našoj studiji je bilo neophodno pre samog eksperimenta stimulisati promotor gena *TGFB1*, jer je promotorska aktivnost izmerena luciferaznim esejima bila na granici detektabilnosti. Imajući u vidu da je TGFB prisutan u serumu i da pozitivno reguliše eskpresiju sopstvenog gena, prvo je ispitano da li kultivacija ćelija u medijumu obogaćenim serumom može da stimuliše bazalnu aktivnost promotora gena *TGFB1*. Dobijeni rezultati

su bili suprotni očekivanim. Prisustvo 5% i 10% fetalnog goveđeg seruma je indukovalo smanjenje promotorske aktivnosti gena *TGFB1* za 22% i 26%, respektivno. Stimulacija rekombinantnim proteinom TGFB1 je dovela do povećanja promotorske aktivnosti gena *TGFB1* za 81%. Prema podacima iz literature koncentracije TGFB1 koje su korišćene za tretmane različitih ćelija su bile u opsegu 0,1-10 ng/mL (83, 103). U našoj studiji je promotor gena *TGFB1* uspešno stimulisan pri koncentraciji 0,1 ng/mL i stoga je ova koncentracija korišćena u daljim eksperimentima. Uočeno je da su ćelije u odgovoru na prisustvo 5% i 10% fetalnog goveđeg seruma više proliferisale u odnosu na kontrolne ćelije i ćelije koje su stimulisane proteinom TGFB1. S obzirom da TGFB1 ima antiproliferativan efekat na epitelijalne bronhijalne ćelije, proliferacija ćelija pod dejstvom seruma je verovatno indukovana drugim faktorima rasta prisutnim u serumu. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da koncentracija TGFB1 u serumu nije bila dovoljno visoka da inhibira proliferaciju ćelija BEAS 2B i da stimuliše promotorsku aktivnost gena *TGFB1* (<0,1 ng/mL).

Ispitivanjem promotorske aktivnosti gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B u zavisnosti od prisustva varijante -509C>T, u našoj studiji je pokazano da prisustvo varijante -509T povećava bazičnu aktivnost promotora za 75,6% u odnosu na prisustvo varijante -509C ($p<0,001$). U prethodnim studijama je takođe pokazan trend ka većoj promotorskoj aktivnosti gena *TGFB1* kada je prisutna varijanta -509T (45, 46). Silverman i saradnici su pokazali da varijanta -509T povećava promotorsku aktivnost za 30% u ćelijama A549, dok su Luedecking i saradnici zabeležili povećanje od 24% u imortalizovanim ćelijama bubrega poreklom od majmuna. Rezultati naše studije su pokazali znatno veću razliku između bazičnih aktivnosti promotora TGFB1 koji nosi varijantu -509T u odnosu na promotor sa varijantom -509C. Za razliku od naše studije, Luedecking i saradnici su dobili detektabilne vrednosti luciferazne aktivnosti bez prethodne stimulacije promotora. Stoga je moguće da veća razlika između varijanti -509C i -509T potiče od stimulišućeg dejstva proteina TGFB1 na aktivnost samog promotora. Način normiranja luciferazne aktivnosti može doprineti većoj razlici između aktivnosti promotora dobijenoj u našoj studiji imajući u vidu da su Silverman i saradnici dobijene vrednosti luciferaze normirali u odnosu na aktivnost beta

galaktozidaze. Pored toga, u našoj studiji je analizirana sekvenca dužine 669 bp, dok su u prethodnim studijama analizirani fragmenti dužine 270 bp i 424 bp.

Ovo je prva studija u kojoj je promotorska varijanta -509C>T gena *TGFB1* analizirana kao potencijalni modulator odgovora na terapiju astme. Preliminarni rezultati dobijeni stimulacijom inflamatornih ćelija indukovanog sputuma su ukazali da bi varijanta -509T mogla biti povezana sa smanjenom ekspresijom gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta. Stoga je odgovor promotorske varijante -509C>T gena *TGFB1* na stimulaciju montelukastom ispitan *in vitro* luciferaznim esejima. Nakon stimulacije montelukastom je uočeno da se aktivnost promotora povećava bez obzira koji je nukleotid prisutan na poziciji -509. Aktivnost promotora sa -509T varijantom je bila oko dva puta veća nakon stimulacije montelukastom u odnosu na odgovor promotora sa varijantom -509C. Ova razlika u promotorskoj aktivnosti u odgovoru na tretman montelukastom je bila statistički značajna (p=0,037). U slučaju konstrukta sa promotorskom varijantom -509C stimulacija montelukastom je povećala aktivnost promotora gena *TGFB1* za 48,3%, dok je to povećanje u prisustvu varijante -509T bilo oko 100,3% u poređenju sa bazičnim vrednostima dobijenim za odgovarajuće varijante.

Luciferaznim esejima je pokazana povećana promotorska aktivnost gena *TGFB1* pod dejstvom montelukasta, dok je metodom qRT-PCR pokazano da montelukast smanjuje ekspresiju gena *TGFB1* za oko 25%. Ovaj suprotan rezultat može biti posledica samog metodološkog pristupa imajući u vidu da je u luciferaznim esejima analiziran deo 5' regulatornog regiona gena *TGFB1*. Fragment DNK koji je insertovan u reporterski vektor čija je aktivnost merena je obuhvatio ceo primarni promotor i deo negativnog regulatornog regiona koji sadrži varijantu -509C>T. S obzirom da druge regulatorne sekvence gena *TGFB1* nisu ispitivane u ovom kontekstu, može se pretpostaviti da je dejstvo montelukasta na aktivnost promotora gena *TGFB1* znatno kompleksnije. Pored direktnog uticaja zavisno od promena u regulatornim sekvencama, treba uzeti u obzir interakcije sa transkripcionim faktorima i drugim regulatornim proteinima.

5.8 Translacioni potencijal

Translacioni potencijal ovog istraživanja može se razmatrati sa dva različita aspekta. Rezultati ove studije ukazuju da promotorska varijanta -509C>T ima modulatornu ulogu u odgovoru gena *TGFB1* na dejstvo montelukasta, na osnovu čega se može ispitati mogućnost genetičkog testiranja pre odluke o primeni ovog leka u tretmanu pacijenata. S druge strane, praćenje odgovora inflamatornih ćelija indukovanog sputuma na stimulaciju različitim lekovima bi bilo od šireg značaja za personalizovani tretman plućnih bolesti.

Genetičko testiranje koje bi obuhvatilo analizu prisustva varijante TGFB1 -509C>T moglo bi se potencijalno primenjivati kod pacijenata sa astmom koji ne postižu kontrolu bolesti monoterapijom inhaliranim kortikosteroidima, a pre primene montelukasta. Da bi se ispitala svrsishodnost ovakvog testa neophodno je sprovesti prospektivne kliničke studije u kojima bi bili testirani pacijenti koji se podvrgavaju postojećem protokolu lečenja kako bi se utvrdilo da li nosioci različitih genotipova različito reaguju na dodavanje montelukasta kortikosteroidnoj terapiji.

Analiza indukovanog sputuma se već koristi za procenu odgovora na terapiju inhalacionim kortikosteroidima, pa bi se *ex vivo* tretman indukovanog sputuma mogao razviti u test kojim će se analizirati medijatori koji imaju implikacije u astmi. S obzirom da se kod većine astmatičara vrši uzorkovanje indukovanog sputuma za potrebe rutinskih analiza kako pri dijagnozi, tako i na kontrolnim pregledima, ovaj tip uzorka bi u većini slučajeva bio dostupan i za druge analize. Slične analize vrše se i prilikom kliničke obrade pacijenata sa drugim plućnim bolestima koje se karakterišu inflamacijom, kao što su hronična obstruktivna bolest pluća i bronhiektazije. Stoga bi *ex vivo* analiza indukovanog sputuma mogla naći primenu i u proceni i lečenju drugih plućnih bolesti. Pored toga, ovaj sistem je potencijalno pogodan i za testiranje različitih doza lekova kako bi se terapija prilagodila pacijentu. Za razvoj ovog testa i njegovu eventualnu primenu u kliničkoj praksi neophodno je dalje unaprediti metodu uzorkovanja i optimizovati metode za analizu, imajući u vidu relativno mali broj ćelija u uzorku.

Ukoliko se pokaže da varijanta TGFB1 -509C>T ima potencijal za primenu u farmakogenetici, to bi bilo od značaja za sve pacijente sa astmom kod kojih se inhalacionim kotrikosteroidima ne postiže željeni terapijski efekat. Ovi pacijenti takođe bi bili kandidati za *ex vivo* analizu indukovanog sputuma, a posebno pacijenti mlađi od 5 godina, kod kojih je teško pratiti efekat terapije zbog nemogućnosti izvođenja spirometrijskih testova. Identifikovanje medijatora koji dovode do pogoršanja bolesti, a čija je ekspresija pod dejstvom određenih lekova smanjena ili povećana, uz poznavanje genetičkih faktora koji mogu da utiču na interindividualne varijacije u odgovoru tih medijatora na lekove i mogućnost korišćenja *ex vivo* analize indukovanog sputuma za analizu efekta pojedinih lekova, bi bilo od velikog značaja za izbor adekvatne terapije u astmi.

6 ZAKLJUČCI

1. Analizom 5' regulatornog regiona gena *TGFB1* su kod pacijenata sa astmom detektovane dve bazne zamene: C u T na poziciji -509 i G u A na poziciji -800
2. Učestalost alela -509T u populacji Srbiije je 59,5%, dok je učestalost alela -800A 10,3% i nalaze se u opsegu učestalosti dobijenih za druge populacije
3. Promotorske varijante -509C>T i -800G>A gena *TGFB1* ne predstavljaju faktor rizika za nastanak astme i nisu povezane sa težinom bolesti
4. Promotorska varijanta -800G>A nije povezana sa pojavom egzacerbacija, dok promotorska varijanta -509C>T predstavlja faktor rizika za pojavu egzacerbacija; pacijenti sa genotipom -509TT su pod 2,8 puta većim rizikom za pojavu egzacerbacija u odnosu na pacijente sa genotipovima -509CC i -509CT
5. Sredinski faktori rizika za nastanak astme, duvanski dim i lipopolisaharid, indukuju smanjenu ekspresiju gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B
6. Montelukast i polinol značajno smanjuju ekspresiju gena *TGFB1* u ćelijama BEAS 2B, dok na sekreciju TGFB1 nemaju uticaja
7. Sistemski kortikosteroidi i dapson blago povećavaju ekspresiju gena *TGFB1*, dok na sekreciju proteina TGFB1 nemaju uticaja
8. Promotorska varijanta -509C>T ima modulatornu ulogu u odgovoru gena *TGFB1* na dejstvo montelukasta

7 LITERATURA

1. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Global Initiative for Asthma; 2016.

2. Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, Custovic A, Gern J, Lemanske R, et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma. Allergy. 2012;67(8):976-97.

3. Vodič kliničke prakse za dijagnostikovanje, lečenje i praćenje astme u dečjem uzrastu. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse; 2002.

4. Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. Respirology. 2006;11(1):54-61.

5. Verrills NM, Irwin JA, He XY, Wood LG, Powell H, Simpson JL, et al. Identification of novel diagnostic biomarkers for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(12):1633-43.

6. Lemanske RF, Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. J Allergy Clin Immunol. 2010;125(2 Suppl 2):S95-102.

7. Vijverberg SJ, Hilvering B, Raaijmakers JA, Lammers JW, Maitland-van der Zee AH, Koenderman L. Clinical utility of asthma biomarkers: from bench to bedside. Biologics. 2013;7:199-210.

8. Murdoch JR, Lloyd CM. Chronic inflammation and asthma. Mutat Res. 2010;690(1-2):24-39.

9. Vignola AM, Kips J, Bousquet J. Tissue remodeling as a feature of persistent asthma. J Allergy Clin Immunol. 2000;105(6 Pt 1):1041-53.

10. Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. Remodeling in asthma. Proc Am Thorac Soc. 2009;6(3):301-5.

11. Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc. 2006;3(5):434-9.

12. Holz O, Kips J, Magnussen H. Update on sputum methodology. Eur Respir J. 2000;16(2):355-9.

13. prakse Nvk. Vodič kliničke prakse za dijagnostikovanje, lečenje i praćenje astme u dečjem uzrastu. 2002.

14. Beasley R, Weatherall M, Shirtcliffe P, Hancox R, Reddel HK. Combination corticosteroid/β-agonist inhaler as reliever therapy: a solution for intermittent and mild asthma? J Allergy Clin Immunol. 2014;133(1):39-41.

15. Hall IP. Beta 2 adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important? Thorax. 1996;51(4):351-3.

16. Yang D, Luo H, Wang J, Bunjhoo H, Xu Y, Xiong W. Comparison of inhaled corticosteroids and leukotriene receptor antagonists in adolescents and adults with mild to moderate asthma: a meta-analysis. Clin Respir J. 2013;7(1):74-90.

17. Bisgaard H. Role of leukotrienes in asthma pathophysiology. Pediatr Pulmonol. 2000;30(2):166-76.

18. Dykewicz MS. Newer and alternative non-steroidal treatments for asthmatic inflammation. Allergy Asthma Proc. 2001;22(1):11-5.

19. Moss RB. Alternative pharmacotherapies for steroid-dependent asthma. Chest. 1995;107(3):817-25.

20. Morgan M, Cooke A, Rogers L, Adams-Huet B, Khan DA. Double-blind placebo-controlled trial of dapsone in antihistamine refractory chronic idiopathic urticaria. J Allergy Clin Immunol Pract. 2014;2(5):601-6.

21. Sleiman PM, Hakonarson H. Recent advances in the genetics and genomics of asthma and related traits. Curr Opin Pediatr. 2010;22(3):307-12.

22. Weiss ST, Raby BA, Rogers A. Asthma genetics and genomics 2009. Curr Opin Genet Dev. 2009;19(3):279-82.

23. Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective. Clin Mol Allergy. 2009;7:7.

24. Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. Chest. 2004;125(2):754-65.

25. Al-Alawi M, Hassan T, Chotirmall SH. Transforming growth factor β and severe asthma: a perfect storm. Respir Med. 2014;108(10):1409-23.

26. Duvernelle C, Freund V, Frossard N. Transforming growth factor-beta and its role in asthma. Pulm Pharmacol Ther. 2003;16(4):181-96.

27. Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-β - an excellent servant but a bad master. J Transl Med. 2012;10:183.

28. Clark DA, Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF-beta). Int J Biochem Cell Biol. 1998;30(3):293-8.

29. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. Front Biosci. 2002;7:d793-807.

30. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF-β/TGF-β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. Clin Sci (Lond). 2011;121(6):233-51.

31. Wrana JL. Signaling by the TGFβ superfamily. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(10):a011197.

32. Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. J Cell Sci. 2000;113 (Pt 7):1101-9.

33. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB. Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta 1 gene. J Biol Chem. 1989;264(1):402-8.

34. Shah R, Rahaman B, Hurley CK, Posch PE. Allelic diversity in the TGFB1 regulatory region: characterization of novel functional single nucleotide polymorphisms. Hum Genet. 2006;119(1-2):61-74.

35. Bolkenius U, Hahn D, Gressner AM, Breitkopf K, Dooley S, Wickert L. Glucocorticoids decrease the bioavailability of TGF-beta which leads to a reduced TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004;325(4):1264-70.

36. Weigert C, Sauer U, Brodbeck K, Pfeiffer A, Häring HU, Schleicher ED. AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF-beta1 promoter in mesangial cells. J Am Soc Nephrol. 2000;11(11):2007-16.

37. Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, Häring HU, Schleicher ED. Angiotensin II induces human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. Diabetologia. 2002;45(6):890-8.

38. Thatikunta P, Sawaya BE, Denisova L, Cole C, Yusibova G, Johnson EM, et al. Identification of a cellular protein that binds to Tat-responsive element of TGF beta-1 promoter in glial cells. J Cell Biochem. 1997;67(4):466-77.

39. Abraham S, Sweet T, Khalili K, Sawaya BE, Amini S. Evidence for activation of the TGF-beta1 promoter by C/EBPbeta and its modulation by Smads. J Interferon Cytokine Res. 2009;29(1):1-7.

40. Parrelli JM, Meisler N, Cutroneo KR. Identification of a glucocorticoid response element in the human transforming growth factor beta 1 gene promoter. Int J Biochem Cell Biol. 1998;30(5):623-7.

41. Che Z, Zhu X, Yao C, Liu Y, Chen Y, Cao J, et al. The association between the C-509T and T869C polymorphisms of TGF-β1 gene and the risk of asthma: a meta-analysis. Hum Immunol. 2014;75(2):141-50.

42. Wiśniewski A, Obojski A, Pawlik A, Jasek M, Luszczek W, Majorczyk E, et al. Polymorphism of the TGFB1 gene is not associated with bronchial allergic asthma in a Polish population. Hum Immunol. 2009;70(2):134-8.

43. Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. Transplantation. 1998;66(8):1014-20.

44. Nagpal K, Sharma S, B-Rao C, Nahid S, Niphadkar PV, Sharma SK, et al. TGFbeta1 haplotypes and asthma in Indian populations. J Allergy Clin Immunol. 2005;115(3):527-33.

45. Silverman ES, Palmer LJ, Subramaniam V, Hallock A, Mathew S, Vallone J, et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169(2):214-9.

46. Luedecking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. Hum Genet. 2000;106(5):565-9.

47. Syrris P, Carter ND, Metcalfe JC, Kemp PR, Grainger DJ, Kaski JC, et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. Clin Sci (Lond). 1998;95(6):659-67.

48. Amani D, Farjadian S, Ghaderi A. The frequency of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms in a normal southern Iranian population. Int J Immunogenet. 2008;35(2):145-51.

49. Schulte CM, Goebell H, Röher HD, Schulte KM. C-509T polymorphism in the TGFB1 gene promoter: impact on Crohn's disease susceptibility and clinical course? Immunogenetics. 2001;53(2):178-82.

50. Tamizifar B, Lankarani KB, Naeimi S, Rismankar Zadeh M, Taghavi A, Ghaderi A. Promoter polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene and ulcerative colitis. World J Gastroenterol. 2008;14(2):243-7.

51. Celedón JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL, et al. The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Hum Mol Genet. 2004;13(15):1649-56.

52. Wu L, Chau J, Young RP, Pokorny V, Mills GD, Hopkins R, et al. Transforming growth factor-beta1 genotype and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. Thorax. 2004;59(2):126-9.

53. Berndt SI, Huang WY, Chatterjee N, Yeager M, Welch R, Chanock SJ, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma. Carcinogenesis. 2007;28(9):1965-70.

54. Brand TC, Bermejo C, Canby-Hagino E, Troyer DA, Baillargeon J, Thompson IM, et al. Association of polymorphisms in TGFB1 and prostate cancer prognosis. J Urol. 2008;179(2):754-8.

55. Koch W, Hoppmann P, Mueller JC, Schömig A, Kastrati A. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with myocardial infarction in patients with angiographically proven coronary heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(5):1114-9.

56. Peng Z, Zhan L, Chen S, Xu E. Association of transforming growth factor-β1 gene C-509T and T869C polymorphisms with atherosclerotic cerebral infarction in the Chinese: a case-control study. Lipids Health Dis. 2011;10:100.

57. Yang YC, Zhang N, Van Crombruggen K, Hu GH, Hong SL, Bachert C. Transforming growth factor-beta1 in inflammatory airway disease: a key for understanding inflammation and remodeling. Allergy. 2012;67(10):1193-202.

58. Qian BF, Wahl SM. TGF-beta can leave you breathless. Curr Opin Pharmacol. 2009;9(4):454-61.

59. Uzelac G, Miljkovic M, Lozo J, Radulovic Z, Tosic N, Kojic M. Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. Microbiol Res. 2015;179:45-53.

60. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

61. Dragicevic S, Petrovic-Stanojevic N, Nikolic A. TGFB1 Gene Promoter Polymorphisms in Serbian Asthmatics. Adv Clin Exp Med. 2016;25(2):273-8.

62. Hobbs K, Negri J, Klinnert M, Rosenwasser LJ, Borish L. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta promoter polymorphisms in allergies and asthma. Am J Respir Crit Care Med. 1998;158(6):1958-62.

63. Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. Hum Mol Genet. 1999;8(1):93-7.

64. Amani D, Zolghadri J, Dehaghani AS, Pezeshki AM, Ghaderi A. The promoter region (-800, -509) polymorphisms of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) gene and recurrent spontaneous abortion. J Reprod Immunol. 2004;62(1-2):159-66.

65. Feizollahzadeh S, Taheripanah R, Khani M, Farokhi B, Amani D. Promoter region polymorphisms in the transforming growth factor beta-1 (TGFβ1) gene and serum TGFβ1 concentration in preeclamptic and control Iranian women. J Reprod Immunol. 2012;94(2):216-21.

66. Mak JC, Leung HC, Ho SP, Law BK, Ho AS, Lam WK, et al. Analysis of TGF-beta(1) gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(1):92-6.

67. Kim SH, Park HS, Holloway JW, Shin HD, Park CS. Association between a TGFbeta1 promoter polymorphism and rhinosinusitis in aspirin-intolerant asthmatic patients. Respir Med. 2007;101(3):490-5.

68. Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. Hum Genet. 2001;109(6):623-7.

69. Panek M, Pietras T, Fabijan A, Zioło J, Wieteska L, Małachowska B, et al. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms, C-509T, C+466T and T+869C, of the TGF-β1 gene in patients with asthma and their influence on the mRNA expression level of TGF-β1. Int J Mol Med. 2014;34(4):975-86.

70. Bandaru S, Marri VK, Akka J, Alvala M, Mundluru HP. Association of transforming growth factor-Beta 1 promoter variant -509 c/t with bronchial asthma in South Indian population. Inflammation. 2015;38(1):409-14.

71. Despotovic M, Jevtovic-Stoimenov T, Stankovic I, Pavlovic D, Djordjevic B, Basic J, et al. Transforming growth factor B1 C-509T gene polymorphism in patients with bronchial asthma. Acta Medica Medianae. 2014;53(4).

72. Acevedo N, Vergara C, Gusmão L, Jiménez S, Martínez B, Mercado D, et al. The C-509T promoter polymorphism of the transforming growth factor beta-1 gene is associated with levels of total and specific IgE in a Colombian population. Int Arch Allergy Immunol. 2010;151(3):237-46.

73. Buckova D, Izakovicová Hollá L, Benes P, Znojil V, Vácha J. TGF-beta1 gene polymorphisms. Allergy. 2001;56(12):1236-7.

74. Heinzmann A, Bauer E, Ganter K, Kurz T, Deichmann KA. Polymorphisms of the TGF-beta1 gene are not associated with bronchial asthma in Caucasian children. Pediatr Allergy Immunol. 2005;16(4):310-4.

75. Salam MT, Gauderman WJ, McConnell R, Lin PC, Gilliland FD. Transforming growth factor-1 C-509T polymorphism, oxidant stress, and early-onset childhood asthma. Am J Respir Crit Care Med. 2007;176(12):1192-9.

76. Lv J, Liu Q, Hua L, Dong X, Bao Y. Association of five single nucleotide polymorphism loci with asthma in children of Chinese Han nationality. J Asthma. 2009;46(6):582-5.

77. Li H, Romieu I, Wu H, Sienra-Monge JJ, Ramírez-Aguilar M, del Río-Navarro BE, et al. Genetic polymorphisms in transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and childhood asthma and atopy. Hum Genet. 2007;121(5):529-38.

78. Ueda T, Niimi A, Matsumoto H, Takemura M, Yamaguchi M, Matsuoka H, et al. TGFB1 promoter polymorphism C-509T and pathophysiology of asthma. J Allergy Clin Immunol. 2008;121(3):659-64.

79. Gai XY, Sun YC, Cao WL. Effect of dexamethasone on the release of transforming growth factor-beta1, interleukin-8, interleukin-10 and RANTES release by sputum cells in severe asthma. Chin Med J (Engl). 2006;119(18):1567-71.

80. Higashi A, Kumlin M, Higashi N, Daham K, Gaber F, Lindeberg A, et al. Challenge of isolated sputum cells supports in vivo origin of intolerance reaction to aspirin/non-steroidal anti-inflammatory drugs in asthma. Int Arch Allergy Immunol. 2012;158(3):299-306.

81. Hosoki K, Kainuma K, Toda M, Harada E, Chelakkot-Govindalayathila AL, Roeen Z, et al. Montelukast suppresses epithelial to mesenchymal transition of bronchial epithelial cells induced by eosinophils. Biochem Biophys Res Commun. 2014;449(3):351-6.

82. Eap R, Jacques E, Semlali A, Plante S, Chakir J. Cysteinyl leukotrienes regulate TGF-β(1) and collagen production by bronchial fibroblasts obtained from asthmatic subjects. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2012;86(3):127-33.

83. Asakura T, Ishii Y, Chibana K, Fukuda T. Leukotriene D4 stimulates collagen production from myofibroblasts transformed by TGF-beta. J Allergy Clin Immunol. 2004;114(2):310-5.

84. Gagliardo R, Chanez P, Gjomarkaj M, La Grutta S, Bonanno A, Montalbano AM, et al. The role of transforming growth factor-β1 in airway inflammation of childhood asthma. Int J Immunopathol Pharmacol. 2013;26(3):725-38.

85. Grabowski M, Seys S, Decraene A, Kasran A, Dilissen E, Barg W, et al. Airway inflammation in patients with chronic non-asthmatic cough. Thorax. 2013;68(2):125-30.

86. Eickmeier O, Boom L, Schreiner F, Lentze MJ, NGampolo D, Schubert R, et al. Transforming growth factor β1 genotypes in relation to TGFβ1, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha in induced sputum and blood in cystic fibrosis. Mediators Inflamm. 2013;2013:913135.

87. Laidlaw TM, Boyce JA. Cysteinyl leukotriene receptors, old and new; implications for asthma. Clin Exp Allergy. 2012;42(9):1313-20.

88. Bosch AA, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EA, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. PLoS Pathog. 2013;9(1):e1003057.

89. Checa M, Hagood JS, Velazquez-Cruz R, Ruiz V, García-De-Alba C, Rangel-Escareño C, et al. Cigarette Smoke Enhances the Expression of Profibrotic Molecules in Alveolar Epithelial Cells. PLoS One. 2016;11(3):e0150383.

90. Wang H, Liu X, Umino T, Kohyama T, Zhu YK, Wen FQ, et al. Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003;284(1):L205-13.

91. Pace E, Ferraro M, Di Vincenzo S, Siena L, Gjomarkaj M. Effects of ceftaroline on the innate immune and on the inflammatory responses of bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke. Toxicol Lett. 2016;258:216-26.

92. Springer J, Scholz FR, Peiser C, Groneberg DA, Fischer A. SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke. Biol Chem. 2004;385(7):649-53.

93. Samanta D, Gonzalez AL, Nagathihalli N, Ye F, Carbone DP, Datta PK. Smoking attenuates transforming growth factor-β-mediated tumor suppression function through downregulation of Smad3 in lung cancer. Cancer Prev Res (Phila). 2012;5(3):453-63.

94. Nishioka M, Ogawa E, Kinose D, Haruna A, Ohara T, Ito I, et al. Lipopolysaccharide induced connective tissue growth factor gene expression in human bronchial epithelial cells. Respirology. 2010;15(4):669-76.

95. Kwong KY, Niang S, Literat A, Zhu NL, Ramanathan R, Jones CA, et al. Expression of transforming growth factor beta (TGF-b1) by human preterm lung inflammatory cells. Life Sci. 2006;79(25):2349-56.

96. Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, et al. A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. Genes Dev. 2000;14(2):187-97.

97. Schulz C, Farkas L, Wolf K, Kratzel K, Eissner G, Pfeifer M. Differences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549). Scand J Immunol. 2002;56(3):294-302.

98. Niimi A. Cough, asthma, and cysteinyl-leukotrienes. Pulm Pharmacol Ther. 2013;26(5):514-9.

99. Shin IS, Jeon WY, Shin HK, Lee MY. Effects of montelukast on subepithelial/peribronchial fibrosis in a murine model of ovalbumin induced chronic asthma. Int Immunopharmacol. 2013;17(3):867-73.

100. Perng DW, Wu YC, Chang KT, Wu MT, Chiou YC, Su KC, et al. Leukotriene C4 induces TGF-beta1 production in airway epithelium via p38 kinase pathway. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006;34(1):101-7.

101. Boulanger J, Reyes-Moreno C, Koutsilieris M. Mediation of glucocorticoid receptor function by the activation of latent transforming growth factor beta 1 in MG-63 human osteosarcoma cells. Int J Cancer. 1995;61(5):692-7.

102. Reyes-Moreno C, Frenette G, Boulanger J, Lavergne E, Govindan MV, Koutsilieris M. Mediation of glucocorticoid receptor function by transforming growth factor beta I expression in human PC-3 prostate cancer cells. Prostate. 1995;26(5):260-9.

103. Wen FQ, Kohyama T, Sköld CM, Zhu YK, Liu X, Romberger DJ, et al. Glucocorticoids modulate TGF-beta production by human fetal lung fibroblasts. Inflammation. 2003;27(1):9-19.

104. Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. Mol Cell Biol. 2000;20(18):6891-903.

105. Ito K, Chung KF, Adcock IM. Update on glucocorticoid action and resistance. J Allergy Clin Immunol. 2006;117(3):522-43.

106. Song CZ, Tian X, Gelehrter TD. Glucocorticoid receptor inhibits transforming growth factor-beta signaling by directly targeting the transcriptional activation function of Smad3. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(21):11776-81.

107. Chakir J, Shannon J, Molet S, Fukakusa M, Elias J, Laviolette M, et al. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. J Allergy Clin Immunol. 2003;111(6):1293-8.

108. Berlow BA, Liebhaber MI, Dyer Z, Spiegel TM. The effect of dapsone in steroid-dependent asthma. J Allergy Clin Immunol. 1991;87(3):710-5.

109. Smale ST. Luciferase assay. Cold Spring Harb Protoc. 2010;2010(5):pdb.prot5421.

110. Smale ST. Chloramphenicol acetyltransferase assay. Cold Spring Harb Protoc. 2010;2010(5):pdb.prot5422.

111. Smale ST. Beta-galactosidase assay. Cold Spring Harb Protoc. 2010;2010(5):pdb.prot5423.

BIOGRAFIJA

Sandra Dragičević je rođena 17.05.1985. godine u Bijeljini, Republika Srpska, Bosna i Hercegoivna. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, upisala je školske 2004/2005 godine, a diplomirala je u septembru 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,21 i diplomskim radom pod nazivom „Strukturna analiza promotora gena za TGFB1 kod pacijenata sa astmom“. Doktorske studije je upisala školske 2011/2012. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Od 2012-2015. godine je bila stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od marta 2015. godine je zaposlena u Laboratoriji za molekularnu biologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Učesnik je nacionalnog projekta „Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera“ (MNTR 173008), a bila je učesnik i na bilateralnom projektu naučne i tehnološke saradnje između Republike Srbije i Republike Slovenije „Polimorfizmi u genu za MMP9 kao modulatori odgovora na terapiju u astmi“ (2014-2015).

Sandra Dragičević je do sada objavila 2 rada u časopisima međunarodnog značaja i imala je 7 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 3 saopštenja na skupovima domaćeg značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Сандра З. Драгичевић**

број уписа **М3011/2011**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Анализа промоторских варијанти гена *TGFB1* као фактора ризика и модулатора одговора на терапију астме

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, **10.10.2017.**

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора ____**Сандра З. Драгичевић** _____

Број индекса _____ **М3011/2011** _____

Студијски програм _____ **Молекуларна биологија** _____

Наслов рада ___ **Анализа промоторских варијанти гена *TGFB1* као фактора__ ризика и модулатора одговора на терапију астме** _____

Ментор _____**др Александра Николић и др Драгица Радојковић**_____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, **10.10.2017.** _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Анализа промоторских варијанти гена *TGFB1* као фактора ризика и модулатора одговора на терапију астме

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство – некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прерада

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, **10.10.2017.** _____

1. **Ауторство**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.