

**»Mladi za napredek Maribora 2018«**

**35. srečanje**

**Vloga polimorfizma rs174537 na genu FADS1 v razvoju astme**

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtor: TATJANA JERKOVIĆ

Mentor: BERNARDA DEVETAK, UROŠ POTOČNIK

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

**Maribor, 2018**

**»Mladi za napredek Maribora 2018«**

**35. srečanje**

**Vloga polimorfizma rs174537 na genu FADS1 v razvoju astme**

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

**Maribor, 2018**



# Kazalo

|  |    |
|--|----|
| POVZETEK .....   | 3  |
| 1 UVOD .....   | 4  |
| 1.1 Seznam okrajšav .....  | 5  |
| 1.2 Cilj raziskave .....   | 6  |
| 1.3 Raziskovalno vprašanje .....   | 6  |
| 1.4 Hipoteza.....  | 6  |
| 2 TEORETIČNO OZADJE.....   | 7  |
| 2.1 Astma.....   | 7  |
| 2.2 Gen FADS1 .....  | 8  |
| 2.3 Metoda za določanje polimorfizma .....   | 10 |
| 2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo.....   | 10 |
| 2.3.2 Metoda ločevanja na osnovi talilne krivulje (HRM) .....                                      | 11 |
| 2.4 Modeli dedovanja .....   | 11 |
| 3 MATERIALI IN METODE .....  | 13 |
| 3.1 Materiali.....   | 13 |
| 3.1.1 Kemikalije, reagenti in organski materiali.....  | 13 |
| 3.1.2 Oprema in aparature.....   | 13 |
| 3.2 Postopek.....  | 14 |
| 3.2.1 Priprava .....   | 14 |
| 3.2.2 Izolacija limfocitov .....   | 14 |
| 3.2.3 Izolacija DNK .....  | 15 |
| 3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo in talilna krivulja visoke ločljivosti.....                    | 16 |
| 3.3 Statistična obdelava podatkov .....  | 16 |
| 3.3.1 Hardy-Weinbergovo ravnovesje in hi-kvadrat test, za preizkus hipoteze enake verjetnosti..... | 16 |
| 3.3.2 Fisherjev eksaktni test.....   | 17 |
| 3.3.3 Razmerje obetov (OR) in 95% interval zaupanja .....  | 17 |
| 4 REZULTATI.....   | 19 |
| 4.1 Neobdelani podatki.....  | 19 |
| 4.2 Statistična obdelava podatkov .....  | 20 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.1 Genotipske in alelne frekvence ..... | 20 |
| 4.2.2 Modeli dominance .....               | 21 |
| 4.2.3 Fisherjev eksaktni test.....         | 21 |
| 4.2.4 Razmerje obetov (OR) .....           | 22 |
| 5 RAZPRAVA .....                           | 23 |
| 5.5 Ocena metode .....                     | 24 |
| 6 ZAKLJUČEK.....                           | 26 |
| 7 DRUŽBENA ODGOVORNOST.....                | 27 |
| 8 ZAHVALE .....                            | 28 |
| BIBLIOGRAFIJA .....                        | 29 |

### **Kazalo tabel**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Imena in količine reagentov potrebnih za pripravo HRM mešanice.....           | 16 |
| Tabela 2: Frekvenca alelnih parov v bolnikih in kontrolni skupini .....                 | 19 |
| Tabela 3: Teoretične in eksperimentalne vrednosti genotipskih in alelnih frekvenc ..... | 20 |
| Tabela 4: Rezultati hi-kvadrat testa.....   | 20 |
| Tabela 5: Alelni model genotipov bolnikov in kontrolne skupine.....                     | 21 |
| Table 6: Dominantni model genotipov bolnikov in kontrolne skupine .....                 | 21 |
| Table 7: Recesivni model genotipov bolnikov in kontrolne skupine.....                   | 21 |
| Table 8: P vrednosti za obravnavane modele dedovanja .....                              | 21 |
| Table 9: Razmerje obetov in 95% interval zaupanja za obravnavane modele dedovanja ..... | 22 |

### **Kazalo slik**

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Genotipi za SNIP rs174537 (Darryl, 2010) .....  | 10 |
| Figura 2: Verižna reakcija s polimerazo (National Center for Biotechnology Information, 2014)<br>.....            | 10 |
| Figura 3: Epruveta z vzorcem krvi in Lympholytom (Laboratorij za farmakogenomiko, 2015) ..                        | 14 |
| Figura 4: Epruveta s vidnimi fazami komponent krvi in Lympholytom (Laboratorij za<br>farmakogenomiko, 2015) ..... | 15 |

## **POVZETEK**

Astma sodi med obstruktivne pljučne bolezni, s katero mora živeti kar 16% slovenske populacije. Dejavniki, ki vplivajo na njen razvoj so v precejšnji meri še nepoznani, vendar pri nastanku in razvoju bolezni sodeluje veliko število genov. Vemo, da je gen FADS1 odgovoren za sintezo encima desaturaza. Encim sodeluje v proizvodnji maščob, ki imajo vlogo v astmatičnem napadu. V raziskovalni nalogi nas je zanimalo, če ima polimorfizem rs174537 na genu FADS1 vpliv na razvoj astme v slovenski populaciji. Zbrali smo DNK vzorce astmatikov, za kontrolno skupino pa smo uporabili DNK vzorce zdravih posameznikov. Z metodo ločevanja fluorescentno označenih produktov verižne reakcije s polimerazo, na osnovi talilne krivulje, smo določili kateri izmed alelov gena je prisoten v posameznem vzorcu. Sestavili smo različne modele dedovanja in jih obdelali s statističnimi testi.

Rezultati so pokazali, da med polimorfizmom in povečanim tveganjem za astmo, ni statistično značilne povezave.

# 1 UVOD

V zadnjih desetletjih je naše znanje na področju medicine naglo napredovalo in veliko bolezni, ki so včasih pestile človeštvo, lahko ozdravimo s kratkim obiskom lekarne. Kljub temu, pa se še vedno borimo z velikim številom bolezenskih stanj, ki so tako kompleksna, da znanstveniki ne morejo zanesljivo določiti vzroka nastanka bolezni. Za astmo se predvideva, da se razvije zaradi mešanice genetikih in okoljskih faktorjev, oboji pa so v veliki meri še neznani. Z zdravili, ki jih imamo na razpolago, astme ne moremo ozdraviti, lahko le lajšamo njene simptome.

Vendar pa pri tem, pa zaradi kompleksnosti astme, hitro naletimo na velik problem. Simptomi razvoja in poteka bolezni so lahko pri vsakem posamezniku zelo različni. Izražanje astme je v fenotipu odvisno od skupne aktivnosti številnih genov in mnogo teh še nismo identificirali. Omenjeni geni, zaradi številnih mutacij, kot je na primer zamenjava enega nukleotida (SNP), pri različnih bolnikih z astmo, seveda niso povsem enaki. Posledica tega je oteženo preprečevanje in zdravljenje simptomov in ni univerzalnega zdravila, ki bi enako uspešno delovalo na vse obolele posameznike. Simptomi med astmatičnim napadom so lahko zelo hudi in življenjsko ogrožajoči, če pacient ne prejme primerne zdravila pravočasno.

Visoka zahteva po individualiziranem zdravljenju različnih bolezni, je povzročila razvoj veje znanosti, imenovane farmakogenomika. Njen glavni cilj je razvoj zdravljenja, ki bi bilo prilagojeno na pacientov genetski material, kar bi bil neprecenljiv napredek v medicini, saj bi bila taka zdravila veliko bolj učinkovita in bi imela minimalne neželene stranske učinke. Individualizirano zdravljenje bi pomagalo veliko posameznikom, ki jim bolezen onemogoča normalno življenje. Raziskave v farmakogenomiki ciljajo na razvoj novih alternativnih metod, ki bodo posredovale tam, kjer konvencionalni medicini spodleti. Osnova za tovrstne raziskave je identifikacija genov in njihovih alelov, ki so za bolezen odgovorni. Ker ima vsak gen v populaciji veliko različnih oblik, so genetske študije dolgotrajen proces.

Povezava gena FADS1, ki smo ga izbrali za analizo, s stopnjo tveganja astme, je do zdaj še precej neraziskana. Vemo le to, da se ob astmatičnem napadu sprostitjo maščobe, katerih sinteza je odvisna od gena FADS1. Zaradi tega smo se odločili, da je polimorfizem na FADS1 obetaven objekt raziskave in da bodo dobljeni rezultati zagotovo prispevali k skupnemu znanju o astmi.

## **1.1 Seznam okrajšav**

A – adenin

C – citozin

DNK – deoksiribonukleinska kislina

G – Gvanin

HRM – ločevanje na osnovi talilne krivulje (high resolution melt)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

SNP, SNIP – enonukleotidni polimorfizem (single nucleotide polymorphism)

T – Timin



## 1.2 Cilj raziskave

Za gen FADS1 je znano, da je odgovoren za sintezo encima, ki katalizira reakcijo nastanka določenih maščob, ki so eden od kemičnih mediatorjev, sproščenih med astmatičnim napadom. Zaradi tega smo želeli raziskati, če določen, do zdaj še neraziskan, polimorfizem na tem genu, pripomore k razvoju astme. Cilj naše raziskave je ugotoviti, če ima SNP rs174537 na genu FADS1 vpliv na fenotip, pri slovenski populaciji astmatikov.

## 1.3 Raziskovalno vprašanje

Skladno s ciljem naše raziskave smo postavili raziskovalno vprašanje: **Ali je enonukleotidni polimorfizem rs174537 na genu FADS1 povezan s razvojem astme v slovenski populaciji?**

## 1.4 Hipoteza

Ker encim desaturaza, katerega sestava je zapisana v genu FADS1, sodeluje v proizvodnji maščob, ki imajo vlogo v astmatičnem napadu, smo napovedali, da obstaja statistično značilna povezava med mutacijo nukleotida gvanina v timin na SNP-u rs174537 na enem ali obeh homolognih kromosomih in povišanim tveganjem za razvoj astme.

## 2 TEORETIČNO OZADJE

### 2.1 Astma

Astma je kronična bolezen, za katero je značilen vnetni odziv v dihalnih poteh. To povzroči zožanje bronhiolov in izmenjava zraka je otežena. Najbolj pogosta oblika je atopična astma, kjer se protitelo imunoglobulin E (IgE) odzove na inhalirane alergene, kar povzroči hipersenzitivni odziv. Ko alergeni pridejo v stik z vnetimi dihalnimi kanali, se ti zaradi prekomernega imunskega odziva še bolj stisnejo in dihanje je močno oteženo (Hansbro, 2011, str. 81-95). Slovenija spada med države kjer je astma pogosta, saj je delež astmatikov v populaciji 16% (Eržen, 2015).

Med astmatičnim napadom, ena izmed oblik belih krvničk – eozinofilci, ki se nahajajo v sluznici dihalnih poti, od imunskih celic prejmejo signal za začetek nekroze, kar sproži izpust granul topnih kemijskih mediatorjev, kot so histamin, lekotrien, prostaglandin in aktivacijski faktor za trombocite, iz sosednjih celic. Te substance začnejo razgrajevati lipide, proteine in nukleinske kisline. Proces močno škoduje celicam in povzroči vnetno reakcijo. Gladke mišice se začnejo nenadzorovano krčiti, kar zoži dihalne poti. Poveča se izločanje sluzi, kar še dodatno oteži dihanje. V zgodnji fazi bolezni je ta proces obrnljiv – dihalne poti se lahko vrnejo nazaj v normalno stanje, če je sprožilec odstranjen ali pa bolnik vzame ustrezno zdravilo. Vendar preveč pogoste vnetne reakcije, s časom povzročijo nepopravljivo škodo. Pojavijo se lahko edemi, brazgotine in fibroza, ki odebelijo epitel in otežijo dihanje (Hansbro, 2011, str. 81 – 95).

Simptomi astme so dispnea oziroma oteženo dihanje, tesnoba v prsih, hropenje in kašelj. Med izkašljevanjem lahko bolnikov izpljunek vsebuje Curschmannove spirale in Charcot-Leydenove kristale. Curschmannove spirale so čepi sluzi, ki nastanejo v malih bronhijih. So zelo nevarni, saj še bolj otežijo dihanje in predstavljajo oviro za prejeta zdravila, kar prepreči njihovo delovanje. Charcot-Leydenovi kristali so strukture v obliki igle in so ostanki uničenih eozinofilcev. Astmatični napad lahko sprožijo različni okoljski faktorji, kot so onesnaženost zraka, hladen zrak, alergeni (živalska dlaka, pršice, cvetni prah ...), nekatera zdravila (aspirin, beta blokatorji ...) in celo psihološki faktorji, kot so stres, žalost ali smeh (Hansbro, 2011, str. 81 – 95).

Astma je kompleksna bolezen, kar pomeni, da je posledica številnih genetskih in okoljskih faktorjev, med katerimi nam je še veliko neznanih. Nekateri izmed pomembnih genov, ki so bili povezani s astmo so ADAM33 (A Disintegrin and Metalloprotease33), ki je pomemben za interakcije med celicami; IL4 (Interleukin-4), ki je bistven za proizvodnjo imunoglobulina E; FcεRIβ (β-chain of the high-affinity receptor for IgE), ki kodira del receptorja za imunoglobulin E in ADRB2 (Adrenoceptor beta 2), ki kodira receptor pomemben pri medceličnem signaliziranju (NCBI, 2018).

Okoljski faktorji, ki naj bi vplivali na razvoj astme v zelo zgodnjem otroštvu, vključujejo virusne infekcije respiratornega trakta, nizko biotsko pestrost bakterij v črevesju, prisotnost nekaterih mikrobov v dihalnih poteh ter morebitno kajenje matere in njene prehranjevalne navade med nosečnostjo (Bønnelykke & Ober, 2016, str. 667-679).

Bolezen je lahko intermitentna, blago persistentna, zmerno persistentna in hudo persistentna. Za razvrstitev se uporabljata test največjega pretoka med izdihom (PERF) in test največjega izdihanega volumna v prvi sekundi (FEV1). Oba merita obstrukcijo dihalnih poti, na podlagi katere lahko sklepamo o frekvenci simptomov in kako pogosto so potrebna zdravila (Hall & Agrawal, 2014, str. 316-329).

Astme ni mogoče ozdraviti, vendar se simptomi lahko lajšajo z zdravili. Za bolnika je priporočljivo, da se izogiba stiku s sprožilcem, če pa do stika pride, mora takoj prejeti ustrezna zdravila, kot so bronhodilatatorji, ki sprostijo gladke mišice v bronhiolih. V hudih primerih so potrebni tudi intravenozni kortikosteroidi, magnezijev sulfat in terapija s kisikom (Barnes, 2006, str. 297-303). Posamezni bolniki imajo različen vnetni odziv, zato vsako zdravilo ni enako učinkovito za vse.

## **2.2 Gen FADS1**

FADS1 - desaturaza maščobnih kislin 1 je gen na enajstem kromosomu, ki je skupaj s FADS2 odgovoren za sintezo dveh maščobnih kislin, omega-3-dokozaheksaenojske kisline (DHK) in omega-6- arahidonske kisline (AA). Obe sta esencialni, kar pomeni, da jih človeški organizem ni sposoben sintetizirati iz preprostih molekul. Dobimo jih lahko le s hrano, bodisi cele ali kot prekursorje, ki se pozneje modificirajo. Kot celoto lahko DHK najdemo zlasti v ribjem olju, AA

pa v jajcih, jetrih in živalski masti. Prekursorji, ki jih zaužijemo s rastlinskimi olji, so pretvorjeni v AA in DHK s procesoma nenasičenja in podaljševanja. Zelo pomembna encima v teh procesih sta  $\delta$ -5 in  $\delta$ -6 desaturazi maščobnih kislin, katerih funkcija je dodajanje dvojnih vezi za petim in šestim ogljikovim atomom. Njuna sinteza je kodirana z genoma FADS1 in FADS2. FADS regija je haplotip, kar pomeni da se vedno deduje skupaj, kot celota. Študije kažejo, da v človeški populaciji trenutno obstajata dva različna FADS haplotipa, ki sta sestavljena iz 28 tesno povezanih enonukleotidnih polimorfizmov oziroma SNP-ov (Ameur, 2012, str. 809-820).

SNP-i so najbolj pogoste variacije v dednem materialu populacije. Tako imenujemo mutacijo, ki povzroči substitucijo enega nukleotida na določenem mestu v DNK. Pojavijo se približno na vsakih 300 nukleotidov in največkrat nimajo zaznavnega učinka na človekovo zdravje in razvoj. Kljub temu pa obstajajo nekateri SNP-i, ki so jih povezali z določenimi boleznimi, kot je poznano tudi pri astmi. Vsak SNP zajema dva alela, od katerih je pojavnost enega v populaciji bolj pogosta kot drugega. Glede na pojavnost posameznega alela, je lahko posameznik glede na genotip divji tip (wild type), torej homozigot za pogostejši alel, homozigot za manj pogost alel ali heterozigot. Heterozigot je tisti, ki ima na homolognih kromosomih različna alela, homozigoti pa imajo na homolognih kromosomih enaka alela (National Institute of Health, 2018).

Raziskave kažejo, da je eden izmed FADS haplotipov bolj učinkovit in bolj pogost kot drugi. Ta haplotip je najverjetneje rezultat selektivnega pritiska, zaradi evlucijskega povečevanja možganov. Večino energije, ki jo pridobimo iz maščobnih kislin AA in DHK se porabi za delovanje možganov. S povečanjem možganov je bilo za njihovo vzdrževanje potrebno več energije, zato je bilo potrebnih več omenjenih maščobnih kislin. Geni, ki so bili bolj učinkoviti za modifikacijo prekursorjev, so bili bolj ugodni za preživetje organizma, zato so se ohranili skozi proces naravne selekcije. Vendar pa višja učinkovitost tega haplotipa danes ni več koristna in zvišuje tveganje za nekatere bolezni, kot je na primer koronarna srčna bolezen (Ameur, 2012, str. 809-820).

Kemijski mediatorji, ki se sproščajo med astmatičnim napadom, izvirajo iz omega-6 in omega-3 maščobnih kislin. Zato smo želeli ugotoviti, ali ima določen SNP na genu FADS1 kakršnokoli povezavo s produkcijo vnetnih mediatorjev med ponovnim izbruhom, oziroma poslabšanjem bolezni (Wendell, 2014, str.1255-1264).

Izbran SNP je rs174537, katerega aleli imajo na obravnavanem lokusu gvanin ali timin. Manj pogost alel vsebuje timin, možne kombinacije alelov na homolognih kromosomih pa so vidne spodaj.

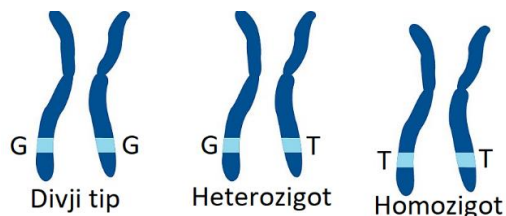


Figura 1: Genotipi za SNIP rs174537 (Darryl, 2010)

## 2.3 Metoda za določanje polimorfizma

Metoda, ki smo jo uporabili za določanje prisotnosti polimorfizma, je ločevanje fluorescentno označenih produktov verižne reakcije s polimerazo, na osnovi talilne krivulje.

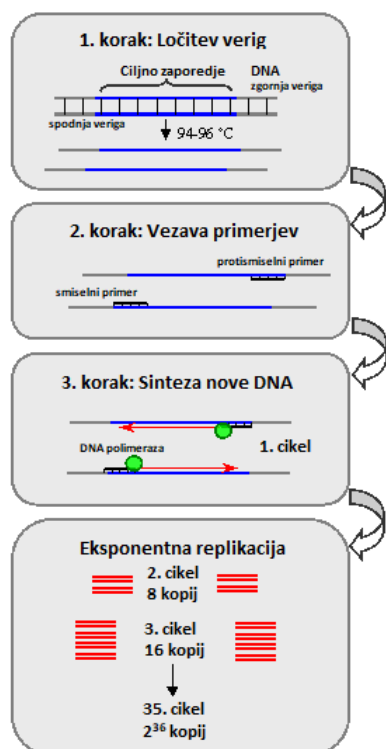


Figura 2: Verižna reakcija s polimerazo (National Center for Biotechnology Information, 2014)

### 2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, pri kateri izkoristimo zmožnost encima DNK polimeraze, da sintetizira komplementarno DNK verigo. Omogoča nam, da izberemo specifično regijo DNK, ki jo želimo pomnožiti in ker je replikacija eksponentna, na koncu PCR reakcije dobimo milijarde kopij te regije – amplikona (National Center for Biotechnology Information, 2014). Ker DNK polimeraza ne more dodajati nukleotidov na 5' koncu, potrebujemo začetne oligonukleotide, oziroma primerje, s katerimi določimo specifično regijo na DNK, ki jo želimo kopirati. Uporabljena je posebna Taq DNK polimeraza, ki je termično stabilna in ne denaturira pri visoki temperaturi. V reakcijski mešanici so potrebni tudi prosti nukleotidi, ki se bodo združili v novo DNK verigo. Proces je sestavljen iz več ciklov, vsak cikel pa iz treh korakov. PCR aparatura najprej dvigne temperaturo nad tališče DNK, da ta

razpade na posamezni verigi. Temperatura se nato zniža in primerji se lahko vežejo na ciljna DNK zaporedja. Nato se temperatura spet dvigne in DNK polimeraza začne dodajati nukleotide in tvoriti novo DNK verigo. S vsakim ciklom se količina DNK podvoji in na tak način lahko v relativno kratkem času dobimo veliko količino odseka na DNK, ki ga želimo analizirati (Garibyan & Avashia, 2013).

Pri iskanju možnih začetnih oligonukleotidov smo uporabili spletno orodje Primer3, kamor smo vnesli določeno sekvenco v okolici polimorfizma. Nato smo dobljene rezultate analizirali s programom Oligoanalyzer 3.1, da smo določili njihovo primernost. Začetni oligonukleotidi ali primeri so primerni, če ne oblikujejo sekundarnih struktur.

### **2.3.2 Metoda ločevanja na osnovi talilne krivulje (HRM)**

Metodo ločevanja fluorescentno označenih produktov verižne reakcije s polimerazo, na osnovi talilne krivulje, smo uporabili za kvantitativno analizo naših vzorcev. Pri tem procesu DNK dodamo posebna fluorescentna barvila, ki se vežejo samo na dvoverižno DNK in oddajajo svetlobo, le ko so vezani. Nato DNK izpostavimo vedno višjim temperaturam od 50°C do 95°C. Ko temperatura doseže tališče DNK, se vodikove vezi, s katerimi sta verigi povezani, prekinajo in barvilo se nanju ne more več vezati. Analizator zaznava intenzivnost svetlobe ob določeni temperaturi in iz teh podatkov začrta talilno krivuljo. Različna zaporedja nukleotidov imajo različna tališča, zato so njihove talilne krivulje drugačne. S to metodo lahko določimo kateri nukleotid je prisoten na mestu SNP-a v vzorcih, saj bo par nukleotidov AT imel nižje tališče kot par GC (Taylor, 2010). Uporabili smo tako imenovano PCR reakcijo v realnem času (Real-time PCR), pri kateri smo lahko spremljali fluorescenco produktov na koncu vsakega PCR cikla.

## **2.4 Modeli dedovanja**

Da smo lahko določili, če ima SNP res vpliv na razvoj astme in pod kakšnimi pogoji se ta vpliv pokaže, smo s pridobljenimi podatki sestavili tri hipotetične modele dedovanja bolezni. Ti nam pomagajo določiti ali se neka značilnost, v našem primeru astma, deduje dominantno, kodominantno ali recesivno (Horita & Kaneko, 2015, str. 1-8). Različni modeli so sestavljeni na podlagi predpostavk o vplivu različnih alelnih kombinacij (TT – homozigot, GT – heterozigot, GG – divji tip) na tveganje za razvoj bolezni.

Prvi je ko-dominantni model, kjer domnevamo, da ima vsaka alelna kombinacija neodvisen vpliv na tveganje. Ta model predpostavlja, da ima prisotnost alela s timinom res vpliv na razvoj astme, vendar pa z različnimi nivoji tveganja. In sicer, za GG tveganja ne bi bilo, za GT bi bilo nekaj tveganja in za TT bi bilo tveganje visoko.

Drugi je dominantni model, kjer predpostavljamo, da je tveganje za razvoj astme prisotno že, če je eden izmed alelov polimorfen, zato med heterozigoti in homozigoti ni razlike. S tem domnevamo, da prisotnost alela s timinom na enem izmed homolognih kromosomov, povzroči enako tveganje, kot če je T alel prisoten na obeh.

Tretji je recesivni model, kjer se predpostavlja, da je tveganje za astmo prisotno le, če imata oba alela timin, torej je oseba homozigot. Če je alel s timinom prisoten samo na enem izmed homolognih kromosomov, to ne vpliva na fenotip, saj je recesiven in se ne izraža. Polimorfizem lahko vpliva na tveganje za razvoj astme le, če je substitucija iz gvanina v timin prisotna na obeh homolognih kromosomih (TT).

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Materiali

#### 3.1.1 Kemikalije, reagenti in organski materiali

- Fosfatni pufer (PBS), Thermo Fisher Scientific
- Lympholyte™, Cedarlane
- DNK vzorci bolnikov in zdravih posameznikov
- TRI reagent, Merck
- Kloroform (CHCl<sub>3</sub>), Merck
- 75% etanol, Merck, ≥ 99.5 %
- 100% etanol, Merck, ≥ 99.5 %
- 100% izopropanol, Merck, ≥ 99.5 %
- 0.3M gvandinov hidroklorid v 100% etanolu, Merck, ≥99%
- 0.1M natrijev citrat v 10% etanolu, Merck
- Destilirana voda
- HRM master miks, Roche
- Prosti nukleotidi, Roche
- Magnezijev klorid (MgCl<sub>2</sub>), Merck
- FADS1 smiselni začetni nukleotidi, Roche
- FADS1 nesmiselni začetni nukleotidi, Roche

#### 3.1.2 Oprema in aparature

- 3x 50 ml centrifugirke s pokrovom (sterilne)
- 2x 15 ml centrifugirke s pokrovom (sterilne)
- Stojalo za centrifugirke
- 5ml avtomatska pipeta in konice, Eppendorf
- 1000μL avtomatska pipeta in konice, Eppendorf



- 2ml epruvete za manjši volumen vzorca
- 100 $\mu$ L avtomatska pipeta in konice, Eppendorf
- 1.5ml epruvete za manjši volumen vzorca
- Stojalo za epruvete
- Centrifuga 5810R, Eppendorf
- Lightcycler LC 480, Roche

## 3.2 Postopek

### 3.2.1 Priprava

Vzorci krvi 137 bolnikov in 170 zdravih oseb so bili pridobljeni iz shrambe Medicinske fakultete Maribor. Kri zdravih ljudi je bila potrebna za kontrolni vzorec, s katerim so bili primerjani vzorci bolnikov z astmo.

### 3.2.2 Izolacija limfocitov

Enako količino PBS pufra in krvi smo dali v 50 mililitrsko centrifugirko s pokrovom in zmešali s pipeto. Nato smo dodali enako količino Lympholyta, kot je bilo vzorca krvi, v novo centrifugirko. Mešanico PBS pufra in krvi smo previdno nanесли na Lympholyte.

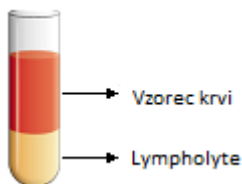


Figura 3: Epruveta z vzorcem krvi in Lympholytom (Laboratorij za farmakogenomiko, 2015)

Centrifugirko smo centrifugirali 20 minut na 2500 rpm, pri 18°C. S tem se je mešanica ločila na štiri plasti: krvno plazmo, limfocite, Lympholyte in eritrocite.

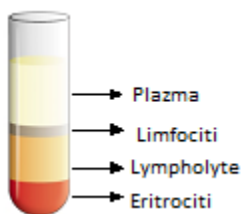


Figura 4: Epruveta s vidnimi fazami komponent krvi in Lympholytom (Laboratorij za farmakogenomiko, 2015)

Plazmo (zgornja plast) smo prenesli v 15 mililitrsko centrifugirko in shranili v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Fazo z limfociti smo prenesli v novo 50 mililitrsko centrifugirko. Fazo z Lympholytom smo zavrgli in shranili spodnjo fazo z eritrociti v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$  v novi 15 mililitrski centrifugirki.

Limfocitom smo dodali 15 mililitrov PBS-pufra in centrifugirali 10 minut na 2800 rpm pri  $18^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo zavrgli in ponovili proces centrifugiranja. Preostanek smo shranili v zamrzovalniku pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3 Izolacija DNK

Zamrznjene limfocite smo odtajali na sobni temperaturi. Nato smo jim dodali  $1.5\ \mu\text{L}$  TRI reagenta in celice razbili, naprej s pipetiranjem, nato pa z vorteks mešalnikom, dokler ni bilo več vidnih večjih delcev. Mešanico smo prenesli v 2 mililitrsko epruveto in jo inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Za tem smo dodali  $300\ \mu\text{L}$  kloroforma in inkubirali 10 minut pod enakimi pogoji.

Mešanico smo centrifugirali 15 minut na 12000 rpm pri  $4^{\circ}\text{C}$ , da se je ločila v tri faze. Zgornjo fazo, ki je vsebovala RNA smo odstranili, saj ni bila pomembna za naš eksperiment, in shranili. Preostanku smo dodali  $450\ \mu\text{L}$  100% etanola, nežno premešali in pustili na sobni temperaturi 2 do 3 minute. Nato smo mešanico centrifugirali 5 minut na 5000 rpm pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Po odstranitvi supernatanta je ostala DNK oborina, ki smo jo spirali s dodatkom  $1.5\ \mu\text{L}$  natrijevega citrata in mešanjem. Mešanico smo inkubirali na sobni temperaturi 30 minut in jo nato 5 minut centrifugirali na 500 rpm pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo zavrgli in še enkrat ponovili proces spiranja.

Nato smo DNK oborini dodali 1 mililiter 75% etanola in mešanico inkubirali na sobni temperaturi 10 do 20 minut. Vzorec smo centrifugirali 5 minut na 5000 rpm pri  $4^{\circ}\text{C}$  in nato zavrgli supernatant.

Na koncu smo DNK oborino posušili v eksikatorju, raztopili v 400  $\mu\text{L}$  destilirane vode in shranili na 4°C.

### 3.2.4 Verižna reakcija s polimerazo in talilna krivulja visoke ločljivosti

Najprej smo vse reagente centrifugirali, premešali in nato pripravili reakcijsko mešanico (navodila za pripravo so v tabeli 3). Mešanico smo nanegli na ploščice z nanesenimi vzorci DNK. Ploščice smo vstavili v Lightcycler LC 480 in izbrali ustrezní protokol.

Tabela 1: Imena in količine reagentov potrebnih za pripravo HRM mešanice

| Reagent                           | Volumen za 1 vzorec [ $\mu\text{L}$ ] |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| DNK                               | 2.0                                   |
| H <sub>2</sub> O                  | 1.8                                   |
| HRM Master Miks (Roche)           | 5.0                                   |
| 25 mM raztopina MgCl <sub>2</sub> | 0.8                                   |
| FADS1 (forward primer)            | 0.2                                   |
| FADS1 (reverse primer)            | 0.2                                   |
| <b>TOTAL</b>                      | <b>10</b>                             |

### 3.3 Statistična obdelava podatkov

Podatki so bili analizirani s spodaj navedenimi statističnimi testi, z uporabo programov SPSS in Excel 2013.

#### 3.3.1 Hardy-Weinbergovo ravnovesje in hi-kvadrat test, za preizkus hipoteze enake verjetnosti

Hardy-Weinbergov princip navaja, da bodo aleli in frekvence genotipov v populaciji ostale konstantne iz generacije v generacijo, če ni prisotnih drugih evolucijskih vplivov (Nature education, 2014). To pomeni, da frekvence genotipov niso naključne, ampak sledijo določenemu ravnovesju. V našem primeru bi to bilo:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Legenda:

G ... p

T ... q

$p^2$  ... GG

2pq ... GT

$q^2$  ... TT

Zaradi tega pravila smo morali preveriti, če se naše, eksperimentalno pridobljene frekvence, ujemajo s podatkovnimi zbirkami. Če temu ne bi bilo tako, bi z našim delom bilo nekaj narobe.

Pri primerjavi teoretičnih vrednosti z eksperimentalnimi, smo s pomočjo spletne aplikacije Quantpsy opravili hi-kvadrat test, za preizkus hipoteze enake verjetnosti. Ta test se uporablja za določitev, če se vzorčni podatki skladajo z distribucijo iz določene populacije, torej če predstavljajo podatke, ki bi jih lahko našel v dejanski populaciji. Če je p vrednost, ki jo test izračuna, manjša od 0.05 vzorčni podatki ne prihajajo iz določene distribucije.

### **3.3.2 Fisherjev eksaktni test**

Fisherjev natančni test se uporablja za določanje statistične značilnosti v dva ali več-razsežnih tabelah. Uporabili smo ga za določitev statistično značilne razlike med rezultati bolnikov in kontrolno skupino za vse modele dedovanja. Če je p vrednost pod 0.05 obstaja statistično značilna razlika med skupinama. (Weisstein, 2009)

### **3.3.3 Razmerje obetov (OR) in 95% interval zaupanja**

Razmerje obetov je razmerje med deležem tistih, ki so nosilci bolezenskega genotipa ali alela, proti tistim ki tega dejavnika nimajo, v skupni bolnikov, proti istemu razmerju v skupini zdravih. Razmerje obetov uporabljamo za določanje, kako je izpostavljenost nekemu faktorju (v tem primeru prisotnost timina namesto gvanina) povezano s verjetnostjo, oziroma obetom izida (razvoj astme). Če je  $OR > 1$  je izpostavljenost povezana s visokim obetom izida, za  $OR < 1$  je izpostavljenost povezana s nižjo verjetnostjo izida in če je  $OR = 1$ , izpostavljenost ne vpliva na verjetnost izida. Poleg tega smo izračunali tudi 95% interval zaupanja, ki določi razpon vrednosti,

ki jih OR lahko zavzame. Majhen razpon nakazuje visoko natančnost rezultatov (Szumilas, 2010, str. 227-229).

## 4 REZULTATI

### 4.1 Neobdelani podatki

V Tabeli 4 vidimo število vzorcev, za katere smo določili ali so divji tip, homozigot ali heterozigot, torej ali imajo na mestu obravnavanega SNP-a na homolognih kromosomih G ali T in pa število posameznih alelov.

*Tabela 2: Frekvenca alelnih parov v bolnikih in kontrolni skupini*

|            | ASTMATIKI | KONTROLA | SKUPAJ |
|------------|-----------|----------|--------|
| GG (n)     | 66        | 83       | 149    |
| GT (n)     | 52        | 71       | 123    |
| TT (n)     | 19        | 16       | 35     |
| skupaj (n) | 137       | 170      | 307    |
| G (n)      | 184       | 237      | 421    |
| T (n)      | 90        | 103      | 193    |
| skupaj (n) | 274       | 340      | 614    |

## 4.2 Statistična obdelava podatkov

### 4.2.1 Genotipske in alelne frekvence

Najprej smo določili genotipske in alelne frekvence v procentih tako, da smo izračunali odstotek posameznega genotipa v populaciji. To smo primerjali s teoretičnimi frekvencami za evropsko populacijo, pridobljenimi iz baze podatkov dbSNP.

Tabela 3: Teoretične in eksperimentalne vrednosti genotipskih in alelnih frekvenc

| Genotip/alel  | Teoretične vrednosti |                      | Eksperimentalne vrednosti |                      |
|---------------|----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
|               | Frekvenca            | Št. oseb z genotipom | Frekvenca                 | Št. oseb z genotipom |
| GT            | 0.442                | 133                  | 0.379                     | 123                  |
| GG            | 0.434                | 136                  | 0.482                     | 149                  |
| TT            | 0.124                | 38.0                 | 0.139                     | 35                   |
| <i>SKUPAJ</i> | 1.00                 | 307                  | 1.00                      | 307                  |
| <hr/>         |                      |                      |                           |                      |
| G             | 0.655                | 402                  | 0.686                     | 421                  |
| T             | 0.345                | 212                  | 0.314                     | 193                  |
| <i>SKUPAJ</i> | 1.00                 | 614                  | 1.00                      | 614                  |

Nato smo opravili hi-kvadrat test, za preizkus enake verjetnosti.

Tabela 4: Rezultati hi-kvadrat testa

|          | <b>P vrednost</b> |
|----------|-------------------|
| Genotipi | 0.187             |
| Alela    | 0.108             |

#### 4.2.2 Modeli dominance

Tabela 5: Alelni model genotipov bolnikov in kontrolne skupine

| Alelni par | Kontrola | Bolniki |
|------------|----------|---------|
| GG         | 83       | 66      |
| GT         | 71       | 52      |
| TT         | 16       | 19      |

Table 6: Dominantni model genotipov bolnikov in kontrolne skupine

| Alelni par | Kontrola | Bolniki |
|------------|----------|---------|
| GG         | 83       | 66      |
| GT+TT      | 87       | 71      |

Table 7: Recessivni model genotipov bolnikov in kontrolne skupine

| Alelni par | Kontrola | Bolniki |
|------------|----------|---------|
| GG+GT      | 154      | 118     |
| TT         | 16       | 19      |

#### 4.2.3 Fisherjev eksaktni test

Table 8: P vrednosti za obravnavane modele dedovanja

| Model dedovanja | p vrednost |
|-----------------|------------|
| Alelni          | 0.541      |
| Dominantni      | 1.00       |
| Recesivni       | 0.279      |



#### 4.2.4 Razmerje obetov (OR)

Table 9: Razmerje obetov in 95% interval zaupanja za obravnavane modele dedovanja

| <b>Model dedovanja</b> | <b>Razmerje obetov</b> | <b>95% interval zaupanja</b> |
|------------------------|------------------------|------------------------------|
| Alelni                 | 1.125                  | 0.799 – 1.585                |
| Dominantni             | 1.026                  | 0.654 – 1.610                |
| Recesivni              | 1.550                  | 0.764 – 3.143                |

## 5 RAZPRAVA

Rezultati statističnih testov, ki smo jih izvedli na modelih dedovanja kažejo, da obravnavani enonukleotidni polimorfizem nima vpliva na razvoj astme. Primerjava eksperimentalno pridobljenih frekvenc s teoretičnimi, nam pove, da se rezultati za našo vzorčno populacijo skladajo s podatki za evropsko populacijo, saj s p vrednostnima 0.187 za genotipe in 0.108 za alele, med njima ni statistično značilne razlike.

S Fisherjevim eksaktnim testom smo ugotovili, da med astmatiki in kontrolno skupino ni statistično značilne razlike v nobenem od modelov dedovanja (p-vrednost za ko-dominantni model je 0.449, za dominantni 1.00 in za recesivni model 0.279). Domnevamo lahko, da verzija raziskanega SNP-a rs174537, ki vsebuje timin, ni bolj pogosta pri astmatikih kot v kontrolni skupini. Torej se alel s timinom pojavlja z enako frekvenco pri bolnikih z astmo, kot tudi pri zdravem delu populacije, zato naj ne bi prispeval k povečanemu tveganju za astmo.

Vrednost razmerja obetov je za dominantni model 1.03, za recesivni pa 1.55, kar pomeni, da je prisotnost alelov s timinom povezana s povečanim tveganjem za astmo. Iz tega bi lahko sklepali, da oblike FADS1 gena, ki vsebujejo T namesto G, prispevajo k razvoju astme, kar nasprotuje rezultatom Fisherjevega testa. Nemogoče je, da bi bili vsi modeli pravilni, saj alel ne more biti dominanten in recesiven hkrati.

Da bi rešili ta problem je potrebno upoštevati vrednosti 95% intervala zaupanja. Vidimo lahko, da je razpon v vseh primerih zelo širok, za dominantni model od 0.65 do 1.61, za recesivni model pa od 0.76 do 3.14. Oba izmed teh razponov vključujeta 1, kar pomeni, da vrednosti razmerja obetov niso dovolj natančne. Obstaja verjetnost da je vrednost 1, kar bi pomenilo, da prisotnost timina sploh ne vpliva na verjetnost razvoja astme.

Če povzamemo vse rezultate, ki smo jih dobili s pomočjo statističnih testov, lahko zaključimo, da prisotnost dušikove baze timina namesto gvanina v SNP-u rs174537, na genu FADS1 ne vpliva na povečano tveganje za razvoj astme. Vendar tega seveda ne moremo z gotovostjo potrditi, saj je astma kompleksna bolezen in je vedno mogoče, da ima obravnavani polimorfizem na genu FADS1 vpliv na razvoj astme, morda v kombinaciji z drugimi polimorfizmi.

Nadaljnje raziskave na tem področju bi bile zelo zanimivi in poučne. Kot je bilo že omenjeno, je na FADS1 genu 28 SNP-ov in potrebno bi bilo raziskati vsakega posebej in preveriti, če določene kombinacije polimorfizmov povišajo tveganje za razvoj astme. Podobne raziskave bi lahko opravili tudi s polimorfizmi na drugih genih, kar bi prispevalo k boljšemu razumevanju tega, kako posamezni geni prispevajo k razvoju bolezni. Možnosti za nadaljnje raziskave je veliko, saj je o astmi še veliko neznanega.

Raziskave za omenjen polimorfizem prej še niso bile izvedene (vsaj ne takšne, ki bi bile javno dostopne), zato naših rezultatov ne moremo primerjati z drugimi viri. Objavljena je raziskava, v kateri so analizirali nekatere druge polimorfizme na FADS1 genu, v povezavi s astmo (Standl, 2011, str. 1757-1766). Njihovi rezultati so podobni našim, saj tudi v teh raziskavah ni statistično značilne povezave med dejavniki. Za razliko od FADS1 pa so na genu FADS2 prisotni polimorfizmi, ki so jih v študijah povezali s višjim tveganjem za astmo, kar nam da misliti, da ima FADS1 vseeno večjo vlogo v razvoju astme, kot kažejo naši rezultati, glede na to da je regija haplotip (Sharma, 2014, str. 1153-1162).

## **5.5 Ocena metode**

Metoda ki smo jo uporabili, se velikokrat uporablja za analizo polimorfizmov v DNK. Njene največje prednosti so, da je relativno preprosta za razumevanje in uporabo in je zelo hitra, saj lahko v kratkem času proizvedemo milijarde kopij DNA. Rezultati so natančni, saj je metoda zelo občutljiva.

Kljub temu so se med našim delom pojavile nekatere težave, ki bi lahko vplivale na točnost rezultatov. Največji problem je bil, da PCR reakcija v nekaterih vzorcih ni potekla, zato analiza s HRM metodo ni bila mogoča. Do tega lahko pride zaradi več različnih razlogov, torej če DNK ni bila pravilno izolirana ali je bila kontaminirana, pri pripravi vzorcev je prihajalo do napak, ali pa je bil prisoten kakšen drug moteč faktor, za katerega ne vemo. Problema ne moremo jasno opredeliti, zaradi tega pa je bila populacija manjša, kot smo predvideli in posledično so bili rezultati statističnih testov manj natančni.

Raziskavo bi lahko izboljšali z razširitvijo vzorčne populacije, saj več vzorcev da bolj natančne rezultate in bolj realne za slovensko populacijo.

Za analizo DNK bi lahko uporabili tudi druge metode, kot so na primer metoda z DNK mikročipi, po meri narejene teste za tipizaciji genov ali pa sekvenciranje nove generacije (NCS-next generation sequencing), vendar se te metode praviloma uporabljajo pri raziskavah z veliko vzorci. Takrat se primerja več SNP-ov naenkrat, kot je to na primer pri asociacijski študiji na celotnem genomu. Metoda ki smo jo uporabili, je najbolj optimalna za potrebe te raziskave, morda bi bilo potrebnih le več vzorcev in seveda večja izkušnost in pazljivost pri delu.

## 6 ZAKLJUČEK

V naši raziskavi smo želeli določiti, če ima enonukleotidni polimorfizem rs174537, v katerem je gvanin zamenjan s timinom, kakšen vpliv na razvoj astme. Z uporabo verižne reakcije s polimerazo in talilne krivulje visoke ločljivosti smo ugotovili, da polimorfizem, pri naši vzorčni populaciji, nima vpliva na razvoj astme.

Hipoteza, »da obstaja statistično značilna povezava med mutacijo nukleotida gvanina v timin na SNP-u rs174537 na enem ali obeh homolognih kromosomih in povišanim tveganjem za razvoj astme« je bila v tem primeru zavrnjena, saj analiza rezultatov ni pokazala nobene povezave. Kljub temu, da proteini, ki jih gen FADS1 kodira, sodelujejo pri astmatičnem napadu, to nima vpliva na razvoj astme. Vendar je vseeno možno, da ima SNP vpliv na bolezen na kak drug način, ki ga v tej nalogi nismo raziskali, na primer v kombinaciji s drugimi polimorfizmi na istem ali pa na drugih genih. Zato bi bile potrebne nadaljnje, razširjene in optimizirane raziskave.

Menim, da je bila raziskava uspešna, saj smo dosegli zadani cilj in odgovorili na raziskovalno vprašanje. Čeprav smo hipotezo zavrnili, smo vseeno pridobili veliko znanja o astmi, kar je prav tako dragoceno. Če delamo dobro in natančno, je vsak rezultat, tudi tak ki je v nasprotju z našimi pričakovanji, pravilen rezultat.

## 7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Vsak raziskovalec, ki želi prispevati k skupnemu napredku, se mora v prvi vrsti zavedati vpliva, ki ga ima njegovo delo na družbo in stremeti k temu, da je le ta pozitiven za vse socialne skupine. Ker se zavedamo, kako škodljivi za okolje so lahko reagenti in kemikalije, ki smo jih uporabljali, smo naredili vse, kar je bilo v naši moči, da jih zavržemo na ustrezen ekološki način. Vsi reagenti, so bili po koncu uporabe zlit v ustrezne kontejnerje, in so odpeljani na deponijo v času, ki je določen za posamezne odpadne kemikalije. Tam jih prevzame podjetje, ki se ukvarja s ekološko odstranitvijo škodljivih odpadkov. Da smo zaščitili sebe in druge delavce v laboratoriju, smo v vseh fazah eksperimenta uporabljali zaščitna oblačila, očala in rokavice ter sterilizirali vso opremo in delovne površine, pred in po uporabi. Vsi vzorci krvi in DNK so bili pridobljeni iz shrambe Medicinske fakultete v Mariboru in niso bili odvzeti posebej za namene te raziskovalne naloge. Vsi darovalci so soglašali z njihovo uporabo za raziskovalne namene na Medicinski fakulteti.

## **8 ZAHVALE**

Tukaj se želim zahvaliti svoji profesorici biologije, ki me je podpirala skozi celotno raziskavo in zagotovila, da je moja naloga takšna, kot mora biti.

Prav tako se zahvaljujem mentorju, za vse strokovne nasvete, dovoljenje za rabo njegovega laboratorija in pomoč pri izvajanju poskusa.

Rada pa bi se zahvalila tudi vsem tistim, ki so mi na tak ali drugačen način pomagali pri izvajanju in pisanju raziskave, saj je bila pomoč neprecenljiva.

## BIBLIOGRAFIJA

- Ameur, A. (2012). Genetic Adaptation of Fatty-Acid Metabolism: A Human-Specific Haplotype Increasing the Biosynthesis of Long-Chain Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids. *American Journal of Human Genetics*, 809-820.
- Barnes, P. J. (2006). Drugs for Asthma. *British Journal of Pharmacology*, 297-303.
- Bønnelykke, K., & Ober, C. (2016). Leveraging Gene-Environment Interactions and Endotypes for Asthma Gene Discovery. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 667-679.
- Darryl, L. (2010, June 12). Heterozygous. National Genome Research Institute. Retrieved January 19, 2018, from <https://www.genome.gov/dmd/img.cfm?node=Photos/Graphics&id=85182>
- Eržen, R. (2015). Astma - Ena najpogostejših kroničnih bolezní. *Doktor*.
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*.
- Hall, S., & Agrawal, D. K. (2014). Key Mediators in the Immunopathogenesis of Allergic Asthma. *International Immunopharmacology*, 316-329.
- Hansbro, P. M. (2011). Cytokine/anti-Cytokine Therapy - Novel Treatments for Asthma? *British Journal of Pharmacology*, 81-95.
- Horita, N., & Kaneko, T. (2015). Genetic Model Selection for a Case-control Study and a Meta-Analysis. *Meta Gene*, 1-8.
- Laboratorij za farmakogenomiko. (2015, August 4). Postopek izolacije limfocitov: Slika 1.
- Laboratorij za farmakogenomiko. (2015, August 4). Postopek izolacije limfocitov: Slika 2.
- National Center for Biotechnology Information. (2014, September 26). *Probe*. Retrieved January 10, 2018, from National Center for Biotechnology Information Web site: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>
- National Institute of Health. (2018, February 6). *Genetics Home Reference*. Retrieved October 29, 2017, from National Institute of Health Web site: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/snp>
- Nature education. (2014). *Glossary*. Retrieved from Scitable: <https://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equilibrium-122>
- Sharma, S. (2014). A genome-wide survey of CD4(+) lymphocyte regulatory genetic variants identifies novel asthma genes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1153-1162.



- Standl, M. (2011). FADS gene variants modulate the effect of dietary fatty acid intake on allergic diseases in children. *Clinical and Experimental Allergy*, 1757-1766.
- Szumilas, M. (2010). Explaining Odds Ratios. *Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 227-229.
- Taylor, S. (2010). *A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping*. California, US: Bio-Rad Laboratories.
- Weisstein, E. W. (2009). *MathWorld - A Wolfram Web Resource*. Retrieved from Statistical tests: <http://mathworld.wolfram.com/FishersExactTest.html>
- Wendell, S. (2014). Fatty Acids, Inflammation, and Asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1255-1264.