



**MONIKA ŚWIERCZEWSKA**

**ANALIZA MOLEKULARNEGO PODŁOŻA  
MECHANIZMU STEROIDOPORNOŚCI  
U DZIECI Z IDIOPATYCZNYM ZESPOŁEM NERCZYCOWYM**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Promotor: Prof. dr hab. n. med. Michał Nowicki**

**Praca wykonana w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N401 528140

**Poznań 2015**

*Pragnę serdecznie podziękować wszystkim  
bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać*

*Panu Prof. dr hab. n. med. Michałowi Nowickiego  
za wszelką pomoc, wsparcie,  
ogromną życzliwość oraz cierpliwość*

*Panu Prof. dr hab. n. med. Maciejowi Zabłowi  
za umożliwienie przeprowadzenia badań  
oraz cenne wskazówki i motywację*

*Koleżankom i Kolegom z pracy  
za stworzenie wspaniałej atmosfery naukowej (i nie tylko)*

*Przyjaciołom  
za każde słowo dodające skrzydeł*

*Rodzicom oraz Rodzeństwu  
za nieustanną motywację, wiarę w moje możliwości  
oraz zapewnienie możliwości realizowania marzeń oraz pasji*

## SPIS TREŚCI

WSTĘP.....	8
1. Glikokortykosteroidy .....	8
2. Steroidoterapia .....	11
3. Molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów .....	12
3.1. Genomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów .....	12
3.2. Niegenomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów .....	18
4. Oporność na glikokortykosteroidy .....	19
4.1. Rodzinna oporność na glikokortykosteroidy .....	19
4.2. Izoforma GR $\beta$ .....	20
4.3. Modyfikacje potranslacyjne GR $\alpha$ .....	21
4.4. Glikoproteina P .....	23
4.5. Kinazy aktywowane mitogenami .....	24
4.6. Białka heteromerycznego kompleksu receptora GR $\alpha$ .....	24
4.7. Acetylacja i deacetylacja histonów .....	25
4.8. Cytokina prozapalna MIF.....	25
5. Molekularne podłoże chorób .....	26
5.1. Markery genetyczne .....	26
5.2. Metoda badania całego genomu - GWAS .....	28
5.3. Badania genów kandydujących .....	29
5.4. Analiza sprzężeń .....	30
6. Steroidooporność – geny kandydujące .....	32
6.1. Gen <i>NR3C1</i> .....	32
6.2. Gen <i>ABCB1</i> .....	33
6.3. Gen <i>HSP90AA1</i> .....	33
6.4. Gen <i>MIF</i> .....	34
7. Zespół nerczycowy .....	35
7.1. Klasyfikacja zespołu nerczycowego .....	35
7.2. Leczenie zespołu nerczycowego .....	38
CELE PRACY.....	40
GRUPA BADANA.....	42
1. Pacjenci.....	42
2. Grupa kontrolna .....	49
MATERIAŁY I METODY .....	50
1. Materiały .....	50
1.1. Aparatura.....	50
1.2. Odczynniki .....	50
1.3. Roztwory i bufory .....	51
1.4. Zestawy komercyjne .....	52
1.5. Żel agarozowy .....	52
1.6. Programy .....	53
1.7. Materiał biologiczny .....	53
2. Metody .....	53
2.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej.....	56
2.2. Analiza ilościowa i jakościowa preparatów DNA.....	56
2.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy .....	57
2.4. Elektroforeza pozioma .....	58
2.5. Oczyszczanie produktów reakcji PCR .....	59
2.6. Pomiar stężenia oraz czystości oczyszczonych produktów reakcji PCR .....	59
2.7. Rozcieńczenie produktów reakcji PCR.....	59
2.8. Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR .....	60
2.9. Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania .....	61
2.10. Rozdział elektroforetyczny produktów sekwencjonowania .....	61
2.11. Analiza wyników sekwencjonowania .....	62

---

2.12.	Analiza mutacji .....	63
2.13.	Analiza polimorfizmów SNP .....	63
2.14.	Analiza nierównowagi sprzężeń.....	65
2.15.	Identyfikacja polimorfizmu krótkich powtórzeń tandemowych .....	66
WYNIKI.....		69
1.	Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej - ocena ilości i jakości produktu .....	69
2.	Wyniki amplifikacji fragmentów badanych genów .....	69
3.	Identyfikacja mutacji punktowych w genach kandydujących .....	69
4.	Identyfikacja polimorfizmów w wytypowanych genach .....	70
5.	Analiza asocjacyjna polimorfizmów wytypowanych genów.....	71
5.1.	Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu <i>NR3C1</i> .....	71
5.2.	Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu <i>ABCB1 (MDR1)</i> .....	73
5.3.	Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu <i>HSP90AA1</i> .....	79
5.4.	Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu <i>MIF</i> .....	81
6.	Analiza nierównowagi sprzężeń genów kandydujących: <i>NR3C1</i> , <i>ABCB1</i> , <i>HSP90AA1</i> i <i>MIF</i> .....	87
6.1	Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu <i>NR3C1</i> .....	87
6.2.	Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> .....	90
6.3.	Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu <i>HSP90AA1</i> .....	100
6.4.	Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu <i>MIF</i> .....	104
6.5.	Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genów <i>NR3C1</i> , <i>ABCB1</i> , <i>HSP90AA1</i> , <i>MIF</i> dla grupy pacjentów z SOZN i SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN i grupy kontrolnej.....	110
OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA.....		113
WNIOSKI.....		138
BIBLIOGRAFIA.....		140
STRESZCZENIE.....		151
ABSTRACT.....		153
SPIS RYCIN.....		155
SPIS TABEL.....		158
SPIS ZAŁĄCZNIKÓW.....		162

## WYKAZ SKRÓTÓW

<b>3'/5'UTR</b>	- niekodujący region leżący po stronie 3'/5' transkryptu (ang. <i>3'/5' untranslated region</i> )
<b>95% CI</b>	- 95% przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i> )
<b>A</b>	- adenina
<b>ABCBI (MDR1)</b>	- gen glikoproteiny P
<b>ACTH</b>	- adrenokortykotropina (ang. <i>adrenocorticotrophic hormone</i> )
<b>ACTN4</b>	- gen $\alpha$ aktyniny-4
<b>AF-1 i AF-2</b>	- domena 1 i 2 z funkcją aktywacyjną (ang. <i>activational function domain 1 or 2</i> )
<b>AP-1</b>	- białko aktywujące-1 (ang. <i>activator protein-1</i> )
<b>ARDS</b>	- zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. <i>acute respiratory distress syndrome</i> )
<b>ARE</b>	- sekwencja bogata w adeniny i uracyl (ang. <i>A/U rich element</i> )
<b>AREB</b>	- białko wiążące się do sekwencji ARE (ang. <i>ARE binding protein</i> )
<b>ATP</b>	- adenosynotrójfosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>C</b>	- cytozyna
<b>CCS</b>	- badania kliniczno-kontrolne (ang. <i>case-control study</i> )
<b>CD</b>	- choroba Leśniowskiego-Crohna (ang. <i>Crohn disease</i> )
<b>CD2AP</b>	- białko związane z CD2
<b>CF</b>	- cyklofosfamid
<b>c-Jun, c-Fos</b>	- białka kompleksu AP-1
<b>COX</b>	- cyklooksygenaza
<b>CsA</b>	- cyklosporyna A
<b>DBD</b>	- domena wiążąca DNA (ang. <i>DNA binding domain</i> )
<b>DMP</b>	- rozlana proliferacja mezangium (ang. <i>diffuse mesangial proliferation</i> )
<b>dNTP</b>	- trifosforan deoksynukleotydu
<b>EDTA</b>	- kwas edetynowy/wersenowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>ERK1/2</b>	- kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe 1/2 (ang. <i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i> )
<b>ESDR</b>	- krańcowe stadium niewydolności nerek (ang. <i>end-stage renal disease</i> )
<b>FGR</b>	- rodzinna oporność na glikokortykosteroidy (ang. <i>familial glucocorticoid resistance</i> )
<b>FSGS</b>	- ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków nerkowych (ang. <i>focal segmental glomerulosclerosis</i> )
<b>FKBP51/FKBP52</b>	- immunofiliny (ang. <i>FK506 binding protein 51/ FK506 binding protein 52</i> )
<b>G</b>	- guanina
<b>GA</b>	- geldanamycyna
<b>GKS</b>	- glikokortykosteroidy
<b>GM-CSF</b>	- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
<b>GR<math>\alpha</math>, GR<math>\beta</math></b>	- receptor glikokortykosteroidowy $\alpha$ , $\beta$ (ang. <i>glucocorticoid receptor</i> )
<b>GRE</b>	- sekwencja odpowiadająca na glikokortykosteroidy (ang. <i>glucocorticoid response elements</i> )
<b>GWAS</b>	- metoda badania całego genomu (ang. <i>genome-wide association studies</i> )
<b>HAT</b>	- acetylotransferaza histonowa (ang. <i>histone acetyltransferase</i> )
<b>HD</b>	- płasawica Huntingtona (ang. <i>Huntington's disease</i> )
<b>HDAC</b>	- deacetylaza histonowa (ang. <i>histone deacetylase</i> )
<b>HPA</b>	- oś podwzgórze-przysadka-nadnercze (ang. <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> )

<b>Hsp90, Hsp70</b>	- białka opiekuńcze, białka szoku termicznego (ang. <i>heat shock protein</i> )
<b>HSP90AA1</b>	- gen Hsp90, izoforma $\alpha$
<b>HuR</b>	- białko należące do AREB
<b>HWE</b>	- prawo równowagi Hardy'ego-Weinberga (ang. <i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> )
<b>IBD</b>	- nieswoiste zapalenie jelit (ang. <i>inflammatory bowel disease</i> )
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	- białko inhibitorowe czynnika jądrowego $\kappa$ B (ang. <i>inhibitory protein of NF-<math>\kappa</math>B</i> )
<b>IKK</b>	- kinaza białka I $\kappa$ B (ang. <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i> )
<b>IL</b>	- interleukina
<b>iNOS</b>	- indukowalna forma syntazy tlenu azotu (ang. <i>inducible NOS</i> )
<b>IZN</b>	- idiopatyczny zespół nerczycowy
<b>JNK</b>	- N-końcowa kinaza c-Jun (ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
<b>LBD</b>	- C-terminalna domena wiążąca ligand (ang. <i>ligand binding domain</i> )
<b>LD</b>	- nierównowaga sprzężeń (ang. <i>linkage disequilibrium</i> )
<b>MAPK</b>	- kinaza aktywowana mitogenem (ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
<b>MCNS</b>	- zespół nerczycowy ze zmianami minimalnymi (ang. <i>minimal change nephrotic syndrome</i> )
<b>MIF</b>	- gen cytokiny MIF
<b>MIF</b>	- cytokina, czynnik hamujący migrację makrofagów (ang. <i>macrophage migration inhibitory factor</i> )
<b>MKP-1</b>	- fosfataza kinazy aktywowanej mitogenem MKP-1 (ang. <i>mitogen activated protein kinase phosphatase-1</i> )
<b>MMF</b>	- mykofenolan mofetylu
<b>MP</b>	- mezangialna proliferacja (ang. <i>mesangial proliferation, MP</i> )
<b>mRNA</b>	- informacyjny kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger RNA</i> )
<b>MSBD</b>	- domena środkowa wiążąca substrat (ang. <i>middle substrate binding domain</i> )
<b>NBD</b>	- domena wiążąca nukleotyd (ang. <i>nucleotide binding domain</i> )
<b>NCBI</b>	- Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
<b>nGRE</b>	- sekwencja nieodpowiadająca na glikokortykosteroidy (ang. <i>negative glucocorticoid response elements</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	- transkrypcyjny czynnik jądrowy $\kappa$ B (ang. <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> )
<b>NLPZ</b>	- niesteroidowe leki przeciwzapalne
<b>NLS</b>	- sygnał lokalizacji jądrowej (ang. <i>nuclear localization signal</i> )
<b>NO</b>	- tlenek azotu
<b>NPHS1</b>	- gen nefryny
<b>NPHS2</b>	- gen podocyny
<b>NR3C1</b>	- gen receptora glikokortykosteroidowego
<b>NTD</b>	- domena N-terminalna (ang. <i>N-terminal domain</i> )
<b>OR</b>	- iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i> )
<b>p50, p65</b>	- białka kompleksu NF- $\kappa$ B
<b>POChP</b>	- przewlekła obturacyjna choroba płuc
<b>p38 MAPK</b>	- kinaza p38 aktywowana mitogenem (ang. <i>mitogen-activated protein kinase p38</i> )
<b>PBMC</b>	- jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
<b>Pf</b>	- plazmafereza
<b>P-gp</b>	- glikoproteina P
<b>Region H</b>	- region łączący (ang. <i>hinge region</i> )
<b>Rtx</b>	- rituksimab

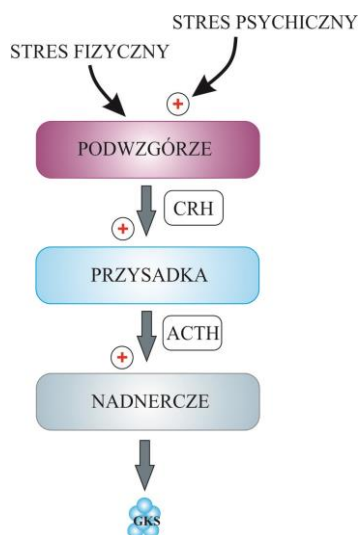
<b>RZS</b>	- reumatoidalne zapalenie stawów
<b>SNP</b>	- polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
<b>SOZN</b>	- steroidooporny zespół nerczycowy
<b>STR</b>	- krótkie powtórzenia tandemowe (ang. <i>short tandem repeats</i> )
<b>SWZN</b>	- steroidowrażliwy zespół nerczycowy
<b>SZZN</b>	- steroidozależny zespół nerczycowy
<b>T</b>	- tymina
<b>TBE</b>	- bufor Tris-Boran-EDTA
<b>TDT</b>	- test nierównowagi transmisji (ang. <i>transmission disequilibrium test</i> )
<b>TMD</b>	- domena transmembranowa (ang. <i>transmembrane domain</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	- czynnik martwicy nowotworu $\alpha$ (ang. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
<b>TTP</b>	- tristetraprolina, białko należące do białek z rodziny AREB
<b>UC</b>	- wrzodziejące zapalenie jelita grubego (ang. <i>ulcerative colitis</i> )
<b>WT-1</b>	- czynnik guza Wilmsa (ang. <i>Wilm's tumor suppressor protein</i> )
<b>ZN</b>	- zespół nerczycowy

# WSTĘP

## 1. Glikokortykosteroidy

Glikokortykosteroidy (GKS) są niezbędne dla życia oraz istotne we wszystkich aspektach stanów zdrowia i choroby, ponieważ regulują procesy komórkowe od mitozy po apoptozę oraz od metabolizmu po wzrost i rozwój [113].

Endogenne GKS należą do steroidowych hormonów syntetyzowanych i wydzielanych przez warstwę pasmowatą kory nadnerczy. Zalicza się do nich kortyzol, kortykosteron i kortyzon. Proces ten podlega regulacji przez oś podwzgórze-przysadka-nadnercze (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA). Bodźce stresowe zwiększają poziom endogennych GKS krążących we krwi. Na skutek stresu fizycznego lub psychicznego dochodzi do pobudzenia podwzgórza, które wydziela kortykoliberynę (ang. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) stymulującą przysadkę do produkcji adrenokortykotropiny (ang. *adrenocorticotropic hormone*, ACTH). Następnie ACTH oddziałuje na nadnercze, które w odpowiedzi syntetyzuje i uwalnia GKS [32, 113, 216] (Ryc. 1). Endogenne GKS wykazują wiele właściwości istotnych dla utrzymania homeostazy organizmu. Odbywa się to m.in. poprzez regulowanie metabolizmu węglowodanów, białek i tłuszczów oraz modulowanie odpowiedzi układu immunologicznego [63]. Brak równowagi w syntetyzowaniu i uwalnianiu endogennych GKS skutkuje stanami patologicznymi, takimi jak: poważne powikłania sercowo-naczyniowe czy metaboliczne i immunologiczne komplikacje, które obserwuje się w chorobach Cushinga (nadmiar GKS) i Addisona (niedobór GKS) [32].



**Rycina 1.** Schemat regulacji wydzielania endogennych glikokortykosteroidów przez oś podwzgórze-przysadka-nadnercze.

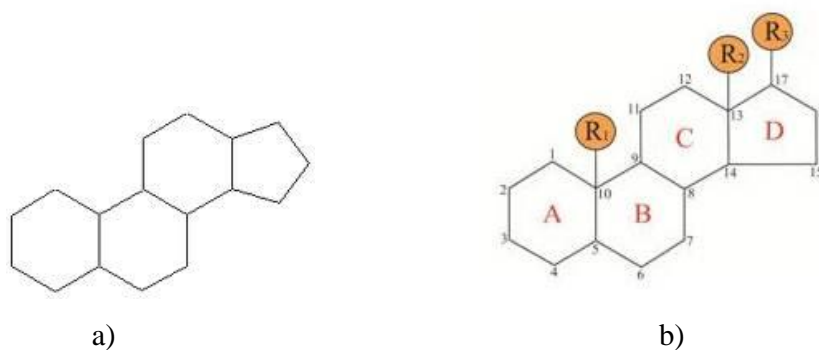
Zastosowanie egzogennych GKS w leczeniu wielu chorób, w tym zapalnych i autoimmunologicznych, sięga 1855 roku. Ukazała się wówczas monografia Tomasza Addisona pt. „*On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Suprarenal Capsule*”, w której opisał on objawy kliniczne jednostki chorobowej związanej z zaburzeniami kory nadnerczy,



nazwanej od jego nazwiska chorobą Addisona [144]. W roku 1930 Pfiffner i Swingle wyodrębnili ekstrakt z kory nadnerczy, który nazwano cortiną [64]. Zapoczątkowało to serię eksperymentów nad strukturą i syntezą związków z kory nadnerczy przez wiele zespołów badawczych, m.in. pod kierunkiem Edwarda Kendalla z kliniki Mayo czy Tadeusza Reichsteina z Uniwersytetu w Bazylei. Odkrycia te doprowadziły do wyodrębnienia związku, pierwotnie nazwanego składnikiem „E” Kendalla lub 17-hydroksy-11-dehydrokortykosteronem, obecnie zwanego kortyzonem. W 1948 roku Philip Hench z kliniki w Mayo jako pierwszy zastosował kortyzon w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS). Terapia zakończyła się sukcesem, a GKS stały się powszechnie przepisywanymi lekami w leczeniu wielu schorzeń [63, 67]. Za swoje prace badawcze i spektakularne wyniki Kendall, Reichstein i Hench otrzymali w 1950 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny [225].

Po wprowadzeniu kortyzonu (1948), a następnie kortyzolu (1951) w leczeniu RZS, rozpoczęto poszukiwania lepszych środków, które wywoływałyby mniej skutków ubocznych. Podczas gdy naturalne GKS można uzyskiwać z nadnerczy zwierząt, farmaceutyczne steroidy są zazwyczaj syntetyzowane z kwasu cholowego lub saponin steroidowych, które występują w roślinach z rodzin Liliowate i Pochrzynowate. Modyfikowanie tych steroidów pozwoliło na otrzymanie dużej grupy syntetycznych steroidów o specjalnych właściwościach istotnych pod kątem farmakologicznym oraz terapeutycznym [142].

Podstawą struktury chemicznej GKS jest steran, który zbudowany jest z trzech pierścieni cykloheksanowych A, B, C oraz jednego pierścienia cyklopentanowego D (Ryc. 2). Orientacja grup funkcyjnych związanych z pierścieniami steroidu jest kluczowa dla jego biologicznej aktywności. Grupy znajdujące się poniżej płaszczyzny steroidu są oznaczane jako  $\alpha$ , natomiast grupy znajdujące się powyżej płaszczyzny steroidu jako  $\beta$  [201].



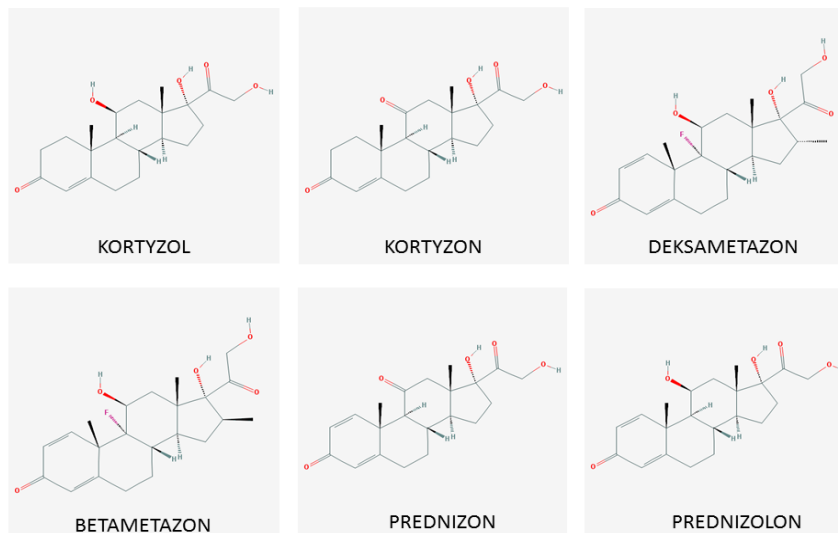
**Rycina 2.** Struktura steroidów: a) schemat budowy steranu – szkielet węglowy, b) ogólny wzór struktury steroidów, gdzie  $R_1$  i  $R_2$ , to zazwyczaj grupy metylowe, natomiast  $R_3$  – łańcuch boczny [201, zmodyfikowane].

Istotnymi grupami funkcyjnymi w aktywności biologicznej GKS są:

- tlen w postaci grupy ketonowej w pozycji C3 oraz C20,
- podwójne wiązanie między atomami węgla C4 i C5,

- grupa  $\beta$ -hydroksylowa w pozycji C11,
- dwuwęglowy łańcuch w pozycji  $\beta$  oraz grupa  $\alpha$ -hydroksylowa w pozycji C17,
- grupa  $\beta$ -metylowa w pozycjach C18 i C19 [142].

Wśród powszechnie stosowanych syntetycznych GKS wymienia się: kortyzol (hydrokortyzon), kortyzon, deksametazon, betametazon, prednizon i prednizolon (Ryc. 3).



**Rycina 3.** Struktury chemiczne powszechnie stosowanych syntetycznych glikokortykosteroidów (GKS) [226].

Na szczególną uwagę zasługują deksametazon oraz betametazon, które posiadają atom fluoru (F) w pozycji C9 $\alpha$ , zwiększający aktywność glikokortykosteroidową oraz grupę metylową (-CH<sub>3</sub>) w pozycji C16 redukującą aktywność mineralokortykoidową, w pozycji  $\alpha$  dla deksametazonu i w pozycji  $\beta$  dla betametazonu. Steroidy te wykazują około 25 razy większą aktywność przeciwzapalną w porównaniu z kortyzolem oraz mają dłuższy okres półtrwania. Dla praktycznego porównania: 0,75 mg deksametazonu lub betametazonu prowadzi do odpowiedzi klinicznej porównywalnej z 5 mg prednizolonu czy 20 mg kortyzolu. Jednakże z powodu silnych efektów ubocznych wskaźnik terapeutyczny deksametazonu czy betametazonu nie jest wyższy niż prednizolonu, w związku z tym stosowane są one w sytuacjach, gdy inne spośród syntetycznych GKS nie są już skuteczne [142].

W osoczu kortyzol i jego syntetyczne pochodne wiążą się w sposób odwracalny ze specyficznymi transportowymi globulinami: transkortyną i albuminą. Transkortyna jest globuliną o wysokim powinowactwie, ale niskiej zdolności wiązania, natomiast albumina posiada małe powinowactwo, lecz względnie wysoką zdolność wiązania. W niskich bądź prawidłowych stężeniach 80 - 90% kortyzolu i prednizolonu jest związane z transkortyną, a tylko 5 - 10% z albuminą. W wysokich stężeniach, miejsca wiązania w transkortynie są wysyczone, co skutkuje wzrostem ilości wolnego kortyzolu oraz prednizolonu, które mogą być metabolizowane. Szybkość eliminacji kortyzolu oraz prednizolonu rośnie przy stosowaniu wysokich dawek. Metylprednizolon i deksametazon wiążane są tylko przez albuminę, a procent wiązania jest

niezależny od dawki. W związku z tym szybkość eliminacji dla tych związków jest stała bez względu na dawkę [142].

GKS są metabolizowane głównie poprzez redukcję podwójnego wiązania pomiędzy atomami węgla C4 i C5, co może zachodzić zarówno w wątrobie, jak również poza nią. Następnie redukcji do grupy hydroksylowej podlega grupa ketonowa w pozycji C3, co zachodzi już tylko w wątrobie. Wartość okresów półtrwania wskazuje, że obecność podwójnego wiązania pomiędzy C1 i C2 (prednizolon, metyprednizolon) i fluoru w pozycji C6 (parametazon) lub C9 (betametazon, deksametazon) zwiększa oporność tych molekuł na degradację i redukuje ich klirens, dzięki czemu leki te mogą wywierać długotrwałe efekty w organizmie [142].

## 2. Steroidoterapia

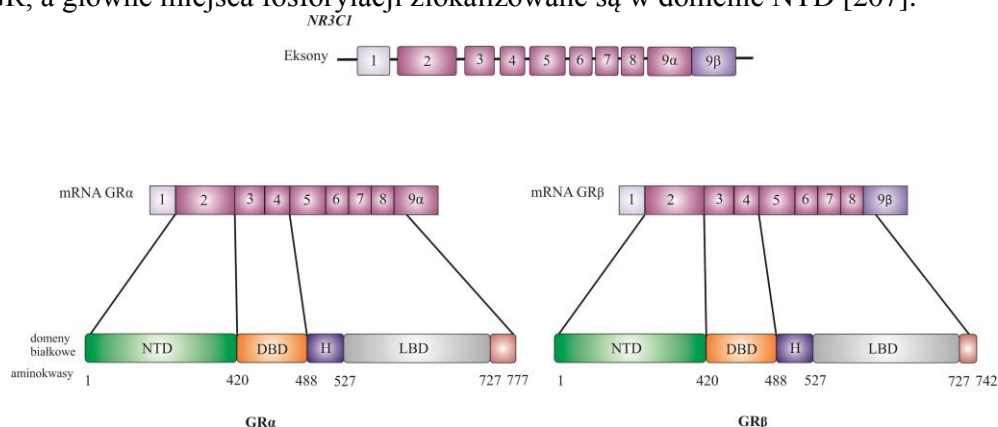
Glikokortykosteroidy znalazły szerokie zastosowanie w leczeniu wielu chorób ze względu na ich właściwości przeciwalergiczne, przeciwzapalne, przeciwświądowe, przeciwobrzękowe i immunosupresyjne oraz przyspieszanie dojrzewania pęcherzyków płucnych czy obniżanie ciśnienia wewnątrzczaszkowego [74]. Jednak stosowanie GKS nie ogranicza się do miejsca docelowego. Działają one ogólnoustrojowo, co prowadzi do wielu skutków ubocznych terapii, takich jak: osteoporoza, zahamowanie wzrostu u dzieci, rozstępy skórne, wybroczyny, trądzik, zanik mięśni, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca wtórna, wrzody żołądka, a także zaburzenia psychiczne, takie jak: agresja, psychozy czy depresja [8, 74, 166].

Obecnie syntetyczne GKS powszechnie stosowane są w leczeniu chorób zapalnych, takich jak: przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) czy zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS), a także chorób autoimmunologicznych, takich jak: astma, RZS czy nieswoiste zapalenie jelit (ang. *inflammatory bowel disease*, IBD) [7, 9, 10]. Spośród wymienionych jednostek chorobowych, w przypadku których stosowanym leczeniem jest przede wszystkim glikokortykosteroidoterapia, obserwuje się różne reakcje pacjentów na leczenie. Bardzo często pojawia się słaba reakcja lub jej brak na terapię w odpowiedzi na wysokie dawki GKS. W przypadku POChP, śródmiąższowego zwłóknienia płuc, ARDS oraz mukowiscydozy wskazuje się w dużej mierze na steroidooporność [9]. W związku z tym włączając do terapii GKS, należy wziąć pod uwagę fakt, że wrażliwość i odpowiedź na GKS różnią się między osobnikami, tkankami i komórkami, jak również zależą od czasu stosowania leków oraz skumulowanej dawki [113].

### 3. Molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów

#### 3.1. Genomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów

Molekularny mechanizm działania GKS może opierać się o genomowe i niegenomowe efekty. Genomowe mechanizmy związane są z wewnątrzkomórkowym receptorem glikokortykosteroidowym GR należącym do podrodziny receptorów jądrowych – czynników transkrypcyjnych zależnych od ligandu [32, 132, 178, 203]. Ekspresja GR zachodzi we wszystkich typach komórek i tkanek. Największą uwagę skupia się na jego dwóch dominujących izoformach: GR $\alpha$  i GR $\beta$ , z których receptor GR $\beta$  nie posiada zdolności wiązania GKS [113]. Na strukturę receptora GR składają się trzy główne funkcjonalne domeny: N-terminalna domena (ang. *N-terminal domain*, NTD), domena centralna wiążąca DNA (ang. *DNA binding domain*, DBD) oraz C-terminalna domena wiążąca ligand (ang. *ligand binding domain*, LBD), a także region H (ang. *hinge region*) łączący domeny DBD i LBD [32, 178] (Ryc. 4). Każda domena posiada specyficzną funkcję. NTD bierze udział w regulacji transkrypcji, jest to tzw. domena z funkcją aktywacyjną 1 (ang. *activational function domain 1*, AF-1). Zbudowana jest ona z pierwszych 420 aminokwasów z końca N i jest kluczową w procesach rekrutacji podstawowej maszyny transkrypcyjnej, w tym białka rozpoznającego sekwencję TATA (ang. *TATA-binding protein*, TBP). Domena DBD (aminokwasy 421 - 488), zawiera dwa palce cynkowe, które zaangażowane są w wiązanie kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. *deoxyribonucleic acid*, DNA), jądrową translokację receptora oraz jego dimeryzację. Domena LBD o funkcji aktywacyjnej 2 (ang. *activational function domain 2*, AF-2), obejmująca aminokwasy 526-556, jest odpowiedzialna za oddziaływania z białkami opiekuńczymi (ang. *chaperones*) oraz koregulatorami w sposób zależny od ligandu [7, 32, 37, 131, 141, 172, 207]. Fosforylacja jest ważnym procesem, który moduluje aktywność i stabilność receptora GR, a główne miejsca fosforylacji zlokalizowane są w domenie NTD [207].



**Rycina 4.** Uproszczony schemat struktury genu *NR3C1*. W wyniku alternatywnego splicingu pierwotnego transkryptu powstają dwie izoformy receptora: GR $\alpha$  i GR $\beta$ ; DBD – domena wiążąca DNA, H – region łączący, LBD – C-terminalna domena wiążąca ligand, NTD – N-terminalna domena [131, 178, zmodyfikowane].

Nieaktywny receptor GR $\alpha$  (niezwiązany z ligandem) zlokalizowany jest w cytoplazmie w postaci heteromerycznego kompleksu z dimerami białek szoku termicznego (ang. *heat shock protein*, Hsp), takimi jak: Hsp90, Hsp70, z podjednostkami białka p23 oraz immunofilinami: FKBP51 (ang. *FK506 binding protein 51*) i FKBP52 (ang. *FK506 binding protein 52*), (Ryc. 5a) [6, 32, 63, 172, 207]. Białka te utrzymują receptor w formie nieaktywnej, hamują jego translokację do jądra komórkowego oraz stabilizują kompleks. GKS są cząsteczkami wysoce lipofilnymi, w wyniku czego swobodnie dyfundują przez błonę komórkową do wnętrza komórki na drodze pasywnej dyfuzji [108]. W oparciu o klasyczną ścieżkę transdukcji sygnału w cytoplazmie dochodzi do aktywacji receptora GR $\alpha$  na skutek związania z GKS będących ligandem dla receptora, co prowadzi do molekularnej rearanżacji heterokompleksu receptora, ekspozycji sygnału lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS) i szybkiego importu do jądra komórkowego. Transport kompleksu GR-GKS przez błonę jądrową angażuje białka: importynę- $\alpha$  oraz importynę-13 [36, 58, 79, 113, 172]. W jądrze komórkowym białka receptorowe tworzą aktywny homodimer, który wzmacnia (transaktywacja) lub hamuje (transrepresja) transkrypcję docelowych genów w oparciu o następujące mechanizmy:

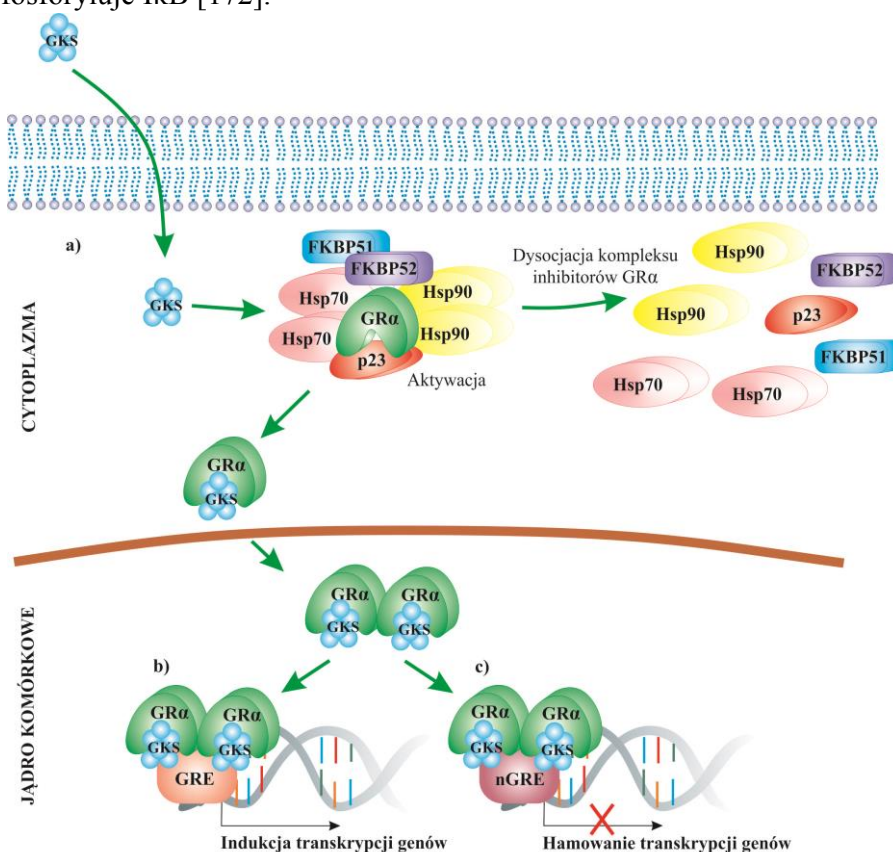
- bezpośrednie oddziaływanie ze specyficzną sekwencją regionu promotorowego genów docelowych (prozapalnych lub przeciwzapalnych) odpowiadającą na GKS, tzw. sekwencją GRE (ang. *glucocorticoid response element*) lub nieodpowiadającą na GKS - nGRE (ang. *negative glucocorticoid response element*),
- oddziaływania z innymi czynnikami transkrypcyjnymi (oddziaływania białko-białko),
- bezpośrednie wiązanie do DNA genów docelowych i interakcje z sąsiadującymi czynnikami transkrypcyjnymi,
- wpływ na strukturę chromatyny,
- potranskrypcyjne efekty [6, 9, 32].

W jądrze komórkowym homodimer aktywnego receptora GR $\alpha$  wiąże się z palindromową 15-nukleotydową sekwencją GRE (AGAACANNNTGTTCT, gdzie N oznacza dowolny nukleotyd). Interakcja ta pozwala na rekrutację kofaktorów transkrypcji, takich jak: koaktywatora receptora steroidowego 1 (ang. *steroid receptor coactivator 1*, SRC-1), białka wiążącego z elementami odpowiedzi na cAMP, tzw. białko CREB (ang. *cAMP response-binding protein*, CBP), białka p300, kompleksu białka p300 i CBP-PCAF (ang. *p300/CBP associated protein*). Białka te posiadają aktywność acetylotransferazy histonowej (ang. *histone acetyltransferase*, HAT) przeprowadzającej reakcję acetylacji histonów (głównie histonu 4), wpływając tym samym na rearanżację struktury chromatyny. Rozluźnienie struktury chromatyny pozwala na szybkie wiązanie czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA II, a tym samym na indukcję transkrypcji genów docelowych [10, 78, 172, 220] (Ryc. 5b).

Przeciwna sytuacja zachodzi przy wiązaniu receptora z nGRE (CTCC(N)<sub>0-2</sub>GGAGA). Wykazano, że przyłączanie GR $\alpha$  do nGRE skutkuje tworzeniem kompleksów korepresorów oraz rekrutacją deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylase*, HDAC), co prowadzi do hamowania

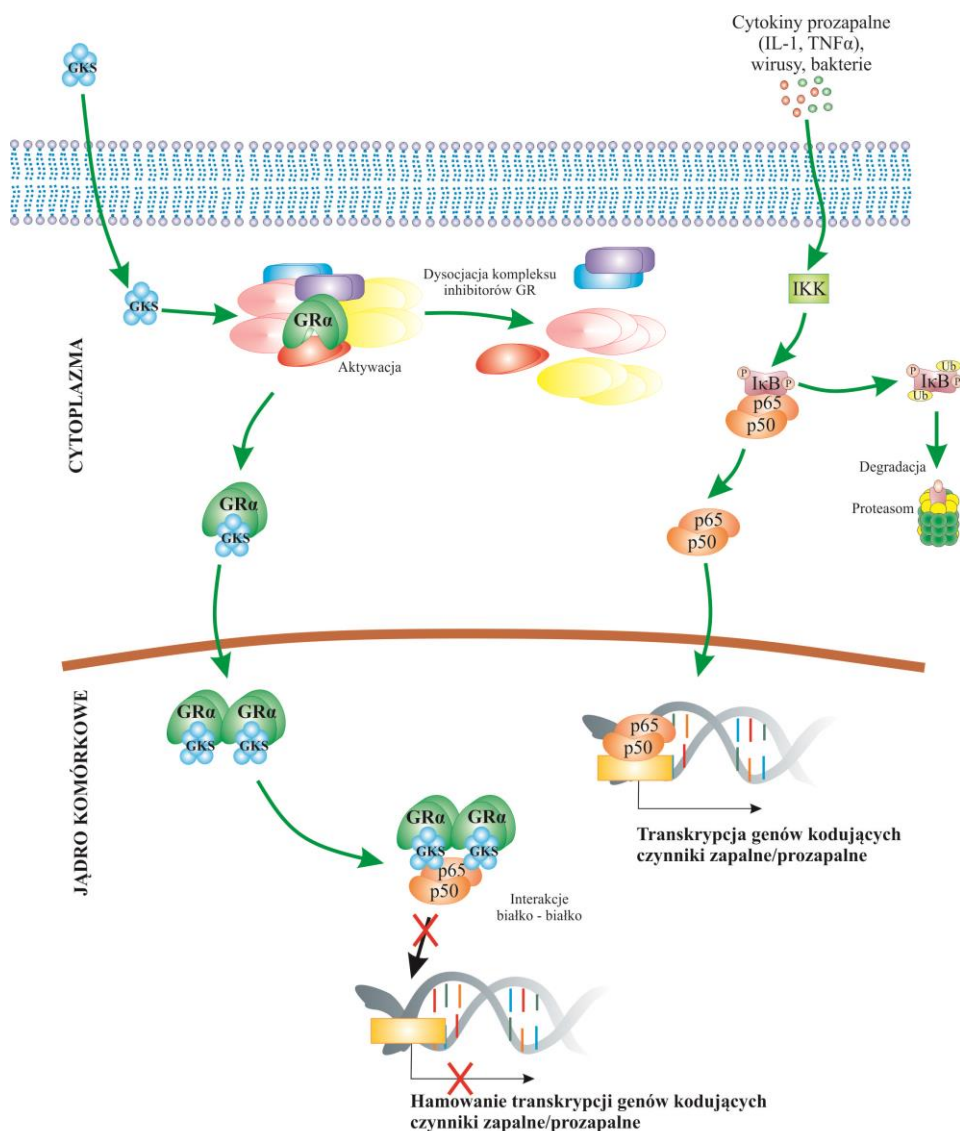
transkrypcji docelowych genów [172, 220]. Dodatkowo, nGRE uniemożliwia dimeryzację GR $\alpha$  dzięki unikatowej sekwencji, która zmienia konformację reszt GR $\alpha$  ważnych dla aktywacji transkrypcji, co wspiera transrepresję [75] (Ryc. 5c).

GR $\alpha$  może także hamować transkrypcję genów poprzez oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. transkrypcyjnym czynnikiem jądrowym  $\kappa$ B (ang. *nuclear factor  $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B) i białkiem aktywującym-1 (ang. *activator protein-1*, AP-1) [10, 172]. NF- $\kappa$ B jest czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w rozwój wielu chorób zapalnych. Może występować jako homodimer lub heterodimer, w skład którego mogą wchodzić podjednostki: p65 (RelA), c-Rel, Rel B, p52/p100 i p50/p105. Dominującą kombinacją jest p65/p50 - heterodimer zaangażowany w aktywację procesów transkrypcyjnych. W cytoplazmie NF- $\kappa$ B występuje w formie nieaktywnej związanej z inhibitorem  $\kappa$ B (ang. *inhibitory protein of NF- $\kappa$ B*, I $\kappa$ B). To połączenie maskuje sygnał NLS, zapobiegając jego przemieszczaniu się do jądra i wiązaniu z DNA. Aktywność NF- $\kappa$ B indukowana jest m.in. przez cytokiny prozapalne, takie jak: interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF $\alpha$ ), jak również przez produkty mikrobiologiczne (lipopolisacharydy) czy infekcje wirusowe. Stymulacja komórek przez te induktory prowadzi do aktywacji kinazy I $\kappa$ B (ang. *I $\kappa$ B kinase*, IKK), która fosforyluje I $\kappa$ B [172].



**Rycina 5.** Molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów (GKS): a) – aktywacja i przemieszczanie receptora GR $\alpha$  do jądra, b) wiązanie receptora GR $\alpha$  do sekwencji GRE - aktywacja transkrypcji genów docelowych, c) wiązanie GR $\alpha$  do sekwencji nGRE - hamowaniem transkrypcji genów docelowych [172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście).

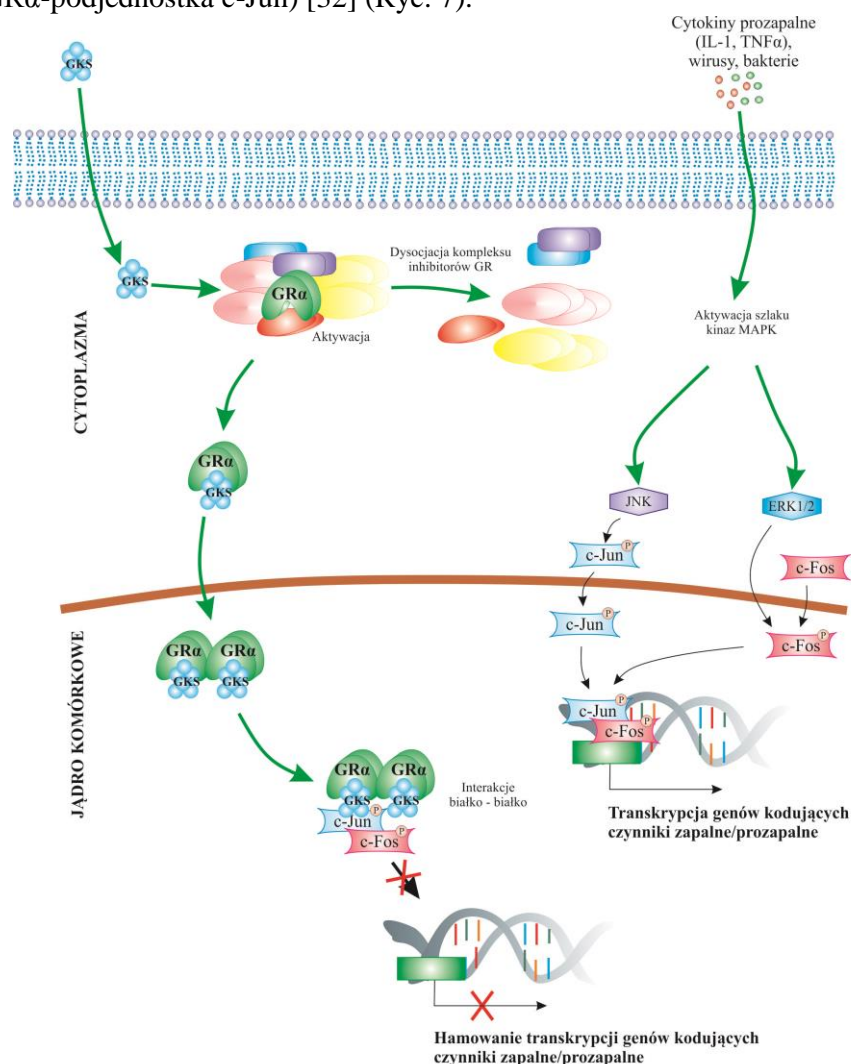
Ufosforylowane I $\kappa$ B poddawane jest poliubikwitynacji i kierowane na degradację do kompleksu proteasomowego. NF- $\kappa$ B jest importowany do jądra i aktywuje transkrypcję genów kodujących czynniki prozapalne, takie jak: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) czy enzymy związane z syntezą zapalnych mediatorów, takie jak: cyklooksygenaza-2 (COX-2) czy indukowalna syntaza tlenku azotu (ang. *inducible NOS*, iNOS). GR $\alpha$  hamuje aktywność transkrypcyjną NF- $\kappa$ B poprzez bezpośrednią interakcję z podjednostką p65 [172] (Ryc. 6).



**Rycina 6.** Hamowanie transkrypcji genów kodujących czynniki zapalne/prozapalne poprzez oddziaływanie receptora GR $\alpha$  z transkrypcyjnym czynnikiem NF- $\kappa$ B [172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście).

AP-1 jest kompleksem zaangażowanym w regulację ekspresji wielu genów kodujących cytokiny oraz enzymy niszczące tkanki, takie jak kolagenazy. AP-1 wchodzi w skład rodziny białek bZIP (ang. *basic leucine zipper protein*), które charakteryzują się sekwencjami bogatymi w białka zasadowe oraz domenę suwaka leucynowego. Składa się ono z elementu należącego

do rodziny białek Jun (c-Jun, v-Jun, Jun-B, Jun-D) oraz białek Fos (c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2) i może występować jako homodimer lub heterodimer. Heterodimery spotykane są częściej, jako że wykazują większe powinowactwo wiązania z DNA. Powszechnie spotykaną formą jest heterodimer c-Fos/c-Jun. Dimeryzacja zachodzi na skutek stymulacji ze strony cytokin zapalnych poprzez fosforylację podjednostki c-Jun przez N-kończącą kinazę c-Jun (ang. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK) oraz podjednostki c-Fos przez kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi 1 i 2 (ang. *extracellular signal-regulated kinases 1/2*, ERK1/2). GR $\alpha$  hamuje aktywność AP-1 poprzez te same mechanizmy, jak w przypadku NF- $\kappa$ B, na drodze bezpośrednich interakcji białko-białko (GR $\alpha$ -podjednostka c-Jun) [32] (Ryc. 7).



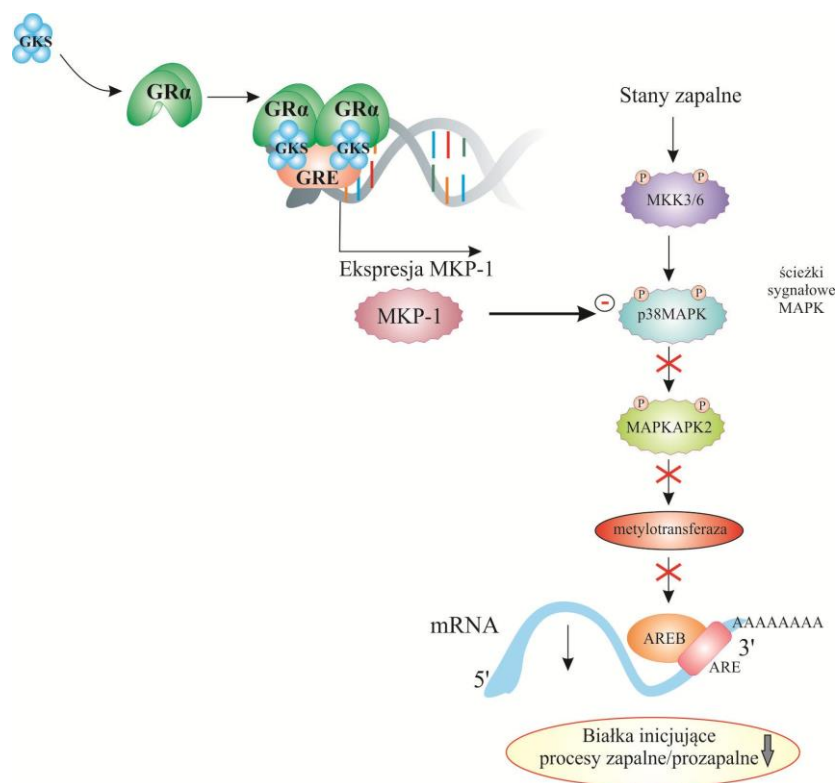
**Rycina 7.** Hamowanie transkrypcji genów kodujących czynniki zapalne/prozapalne poprzez oddziaływanie receptora GR $\alpha$  z transkrypcyjnym czynnikiem AP-1 [172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście).

W wyniku mechanizmów opisanych powyżej, NF- $\kappa$ B i AP-1 są wyciszane przez receptor GR $\alpha$  i nie dochodzi do transkrypcji genów zapalnych i prozapalnych. Hamowana jest produkcja wielu cytokin, takich jak: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, IL-11 czy GM-CSF, które są zaangażowane w powstawanie chorób zapalnych. Również wiele chemokin, takich jak:



eotaksyna, chemokina  $\beta$  (ang. *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*, RANTES), enzymy: iNOS i COX-2 czy cząsteczki adhezyjne: ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*) i VCAM-1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*) są regulowane w ten sposób [10, 172].

Niektóre geny prozapalne, np. *TNFA* kodujący TNF $\alpha$ , mają niestabilne cząsteczki informacyjnego kwasu rybonukleinowego (ang. *messenger RNA*, mRNA), które są szybko degradowane przez specjalne enzymy RNazy, ale stabilizowane, jeśli komórki są stymulowane przez czynniki zapalne. Na stabilność mRNA wpływa sekwencja ARE (ang. *AU rich element*), bogata w adeniny (A) i uracyl (U), która zlokalizowana jest w regionie 3' nie ulegającym translacji (ang. *3' untranslated region*, 3'UTR) [10]. Z regionem tym mogą wiązać się białka AREB (ang. *ARE binding protein*) i powstaje wówczas kompleks rybonukleoproteinowy, który kontroluje degradację mRNA. Wśród tych białek są: tristetrapolina (TTP), która przyspiesza degradację mRNA oraz białko HuR (ang. *Hu-antigen R*) wydłużające czas półtrwania mRNA [32, 78]. Wiązanie HuR do ARE zależne jest od działania kinazy p38MAPK należącej do kinaz MAP aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK). Kinaza ta poprzez kinazę białkową 2 aktywowaną kinazami MAP (ang. *MAP kinase activated protein 2*) aktywuje specyficzną metylotransferazę, która z kolei metyluje białka AREB chroniąc je przed degradacją w proteasomie i czyniąc je stabilnymi [111]. GKS wywierają inhibitorowy efekt na ścieżki sygnałowe MAPK poprzez wzrost ekspresji fosfatazy MKP-1 (ang. *mitogen activated protein kinase phosphatase-1*), która hamuje p38 MAPK. Informacyjne RNA (mRNA) nie jest stabilizowane i białka inicjujące procesy zapalne nie powstają. Odnotowano, że jeden z syntetycznych GKS – deksametazon, reguluje poziom białek TTP i HuR, zmniejszając w ten sposób poziom mRNA genów kodujących czynniki zapalne, takich jak: gen kodujący cyklooksygenazę - 2 – *COX2* i gen kodujący eotaksynę - *CCL11*. Wymagało to jednak wyższych stężeń, około 10 nM, a nie standardowo stosowanego 1 nM [78] (Ryc. 8).



**Rycina 8.** Destabilizacja mRNA czynników zapalnych/prozapalnych zawierających sekwencję ARE. GKS poprzez receptor GR $\alpha$ , wpływają na kaskadę kinaz MAPK na drodze aktywacji MKP-1, która jest inhibitorem p38 MAPK; MKK3/6 – kinazy 3 i 6 aktywujące p38MAPK, MAPKAPK2 – kinaza białkowa 2 aktywowana kinazami MAP; [10, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście).

### 3.2. Niegenomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów

Niegenomowy mechanizm działania GKS dotyczy bezpośredniego modulowania ścieżek przekazywania sygnału. Odbywa się to poprzez błonowy receptor GR (ang. *membrane-bound glucocorticoid*, mGR) lub poprzez cytoplazmatyczny receptor GR (ang. *cytoplasmic glucocorticoid*, cGR), które wchodzi w interakcje z kinazami MAPK: ERK, JNK, p38 MAPK czy kinazami tyrozynowymi, np. Src [32]. Przykładem jest stymulowane przez GKS uwalnianie kinazy Src, która prowadzi do aktywacji lipokortyny 1, będącej inhibitorem fosfolipazy - enzymu uwalniającego kwas arachidonowy. W efekcie dochodzi do zahamowania syntezy mediatorów procesu zapalnego, dla których kwas arachidonowy jest substratem [58, 156].

Do niegenomowych mechanizmów GKS można również zaliczyć ich bezpośredni wpływ na układ immunologiczny na poziomie komórkowym. Indukują one apoptozę limfocytów T, neutrofilów, bazofili czy eozynofili, redukując tym samym stany zapalne [32].

Niegenomowe efekty GKS zachodzą szybko, w ciągu kilku sekund/minut i odbywają się na poziomie błony komórkowej. Działania genomowe są wolniejsze (potrzeba godzin/dni, zanim zmiany w komórkach, tkankach czy narządach będą widoczne), wymagają modulacji transkrypcji genów i zachodzą w jądrze komórkowym [38, 144].

## 4. Oporność na glikokortykosteroidy

Terapia GKS jest wykorzystywana w leczeniu chorób zapalnych, autoimmunologicznych i proliferacyjnych. Jednakże pomimo szerokiego klinicznego zastosowania, korzyści z ich przyjmowania są często tłumione na skutek występowania zmienności osobniczej. U niektórych pacjentów obserwuje się słabą reakcję na leczenie GKS albo całkowity jej brak. W takich przypadkach wymagane jest stosowanie wysokich dawek GKS. Spadek efektywności terapii związany jest również z komplikacjami, takimi jak: osteoporoza, choroby metaboliczne czy zwiększone ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego. Z tego powodu pacjenci, którym podawane są wysokie dawki lecznicze, dodatkowo znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka wystąpienia efektów ubocznych [37, 220]. Uznaje się, że efekt leczniczy zależy zarówno od dawki jak i czasu trwania terapii [220].

### 4.1. Rodzinna oporność na glikokortykosteroidy

Oporność na GKS w leczeniu wielu chorób zapalnych należy odróżnić od zespołu Chrousosa - rodzinnej oporności na GKS (ang. *familial glucocorticoid resistance*, FGR). Zespół Chrousosa jest bardzo rzadkim schorzeniem dziedziczonym autosomalnie recesywnie lub dominująco. Charakteryzuje się zmniejszonym działaniem kortyzolu, z powodu defektu receptora GR [9, 37, 217]. Objawia się hiperkortyzolemią bez cech syndromu Cushinga [10, 207]. Zredukowane działanie kortyzolu skutkuje stymulacją osi HPA. Wzrost stężenia ACTH stymuluje nadnercze do produkcji innych niż GKS steroidów, co skutkuje objawami klinicznymi FGR, takimi jak: nadciśnienie z hipokalemią (jako objaw nadmiaru mineralokortykoidów) i/lub hirsutyzm, cechy męskie i zaburzenia menstruacyjne u kobiet (jako objaw nadmiaru androgenów) [10, 217]. Zespół Chrousosa związany jest z mutacjami w genie jądrowego receptora GKS z grupy 1C podrodziny 3 - *NR3C1*, które w większości dotyczą funkcji domeny LBD oraz DBD [37, 207]. Mutacje te wpływają na receptor GR poprzez osłabienie działania transaktywacyjnego, zaburzenie procesu wiązania ligandu, zmniejszenie ekspresji receptora GR $\alpha$ , opóźnienie importu jądrowego receptora, zmianę w oddziaływaniach z koaktywatorami, wpływ na alternatywny splicing oraz zdolność wiązania do GRE [22, 217]. W eksonie 6 (domena LBD) zidentyfikowano mutację przesunięcia ramki odczytu (ang. *frameshift*), która skutkuje ekspresją skróconego białka GR $\alpha$ . Zmutowane białko najprawdopodobniej wykazuje dominującą negatywną aktywność, pogarszając tym samym import prawidłowego receptora GR $\alpha$  do jądra komórkowego [187]. Pacjenci z FGR wyraźnie różnią się od pacjentów z glikokortykosteroidoopornością w przebiegu chorób zapalnych. Potwierdza to fakt, że u pacjentów z astmą oporną na GKS analiza mutacji nie wykazała żadnych nieprawidłowości w strukturze receptora GR $\alpha$  [10].

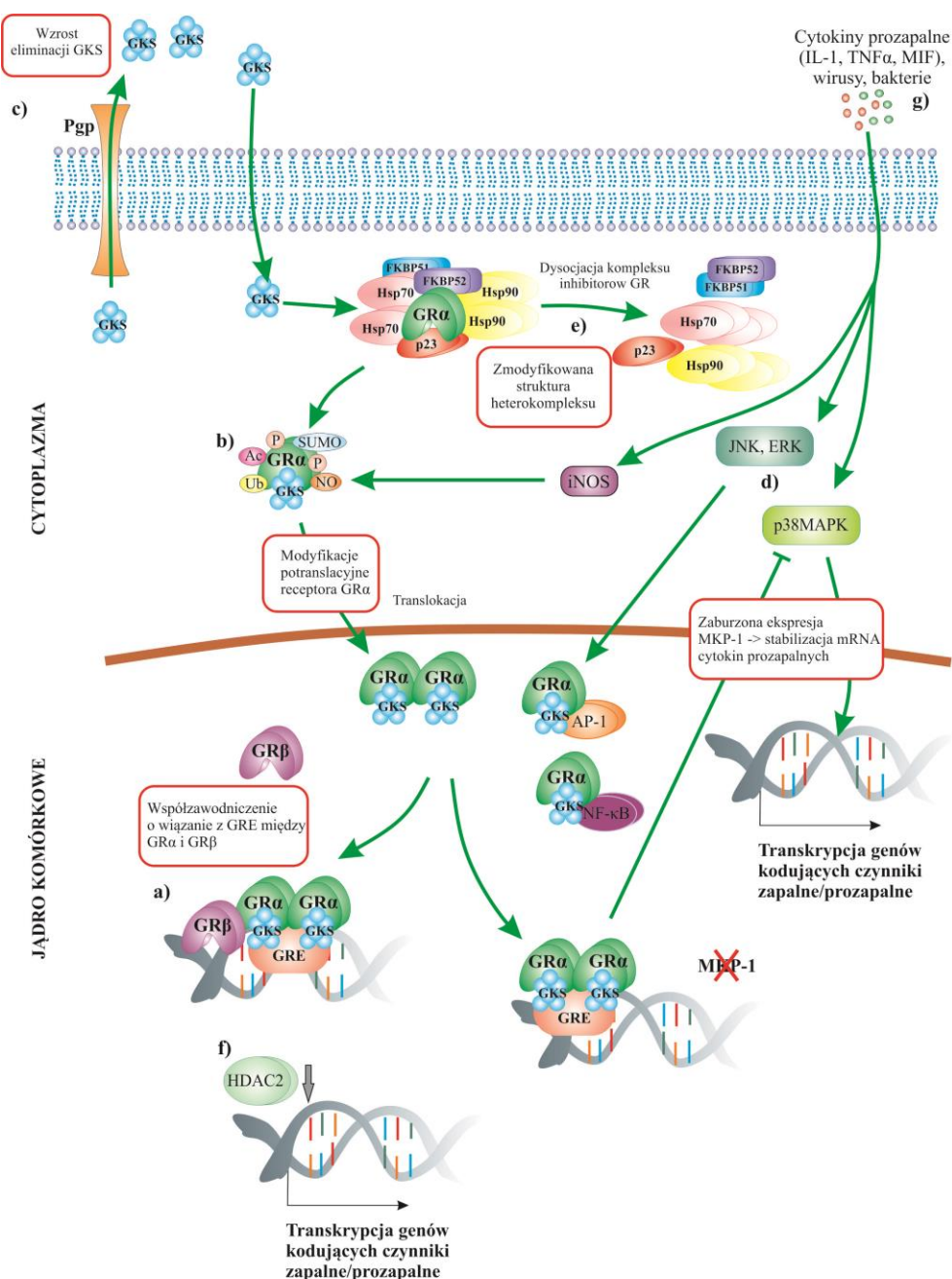
Inne mechanizmy prowadzące do oporności na GKS związane z defektami receptora GR $\alpha$  mogą dotyczyć zwiększonej ekspresji Hsp90, zmian stopnia fosforylacji receptora, indukowanej

hormonem zmiany konformacji receptora wpływającej na jego transport do jądra czy jego termolabilności [217].

## 4.2. Izoforma GR $\beta$

Izoformy receptora GR warunkują specyficzność transkrypcyjną. Mają one różne wzory dystrybucji tkankowej i profile regulacji transkrypcyjnej. Dodatkowo są również poddawane różnym potranslacyjnym modyfikacjom, które wpływają na ich funkcje [113].

W przeciwieństwie do GR $\alpha$ , izoforma GR $\beta$  nie wiąże GKS, ale jest transkrypcyjnie aktywna, co potwierdzają badania zespołu Cidłowskiego [110] nad syntetycznym steroidem mifepristonem (RU-486). Wykazali oni, że GR $\beta$  wiąże mifepriston i ulega translokacji do jądra, gdzie wywołuje pożądany efekt. Cytokiny prozapalne, jak również mikrobiologiczne antygeny czy enterotoksyny gronkowca mogą indukować izoformę GR $\beta$ . Współzawodniczy ona z GR $\alpha$  o wiązanie z sekwencją GRE, działając jako dominujący inhibitor [9] (Ryc. 9a). Wzrost ekspresji GR $\beta$  powiązano z wieloma chorobami zapalnymi, m.in. niewrażliwą na leczenie GKS astmą [61], RZS [99], wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (ang. *ulcerative colitis*, UC) [72] i IBD [134]. Jednakże w przypadku astmy steroidozależnej, nie odnotowano zwiększonego poziomu ekspresji GR $\beta$ . Dużo niższy poziom ekspresji GR $\beta$  w stosunku do GR $\alpha$  we wszystkich typach komórek, za wyjątkiem neutrofilii, sugeruje, że wpływ GR $\beta$  nie jest na tyle silny, aby przyczyniał się do powstania zjawiska steroidooporności [9, 10, 51]. Jednakże interesujący wydaje się fakt zaobserwowany u myszy. Zwierzęta te wykazują wysoką wrażliwość na GKS i nie tworzy się u nich izoforma GR $\beta$ , a poddane transdukcji genem *GRB* stają się odporne na GKS [108]. Sugerowano również rolę GR $\beta$  w mechanizmie oporności w przebiegu ciężkiej astmy, poprzez wpływ nadekspresji tej izoformy na obniżenie aktywności HDAC2. Niestety hipoteza ta nie została potwierdzona [20].



**Rycina 9.** Mechanizm działania glikokortykosteroidów (GKS) oraz czynniki zaangażowane w steroidooporność: a) współzawodniczego o wiązanie z GRE pomiędzy GR $\alpha$  i GR $\beta$ , b) modyfikacje potranslacyjne GR $\alpha$ : fosforylacja (P) i defosforylacja, sumoilacja (SUMO), ubikwitynacja (Ub) acetylacja (Ac) i deacetylacja, nitrozylacja (NO), c) rola P-gp, d) rola kinaz MAPK, e) modyfikacje heteromerycznego kompleksu receptora GR, f) działanie acetylaz i deacetylaz, g) wpływ cytokin [10, 172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście).

### 4.3. Modyfikacje potranslacyjne GR $\alpha$

Potranslacyjne modyfikacje receptora GR $\alpha$  odgrywają ważną rolę w jego aktywacji [207, 213] (Ryc. 9b). Sugeruje się, że ich zaburzenia mogą prowadzić do nieprawidłowości mogących powodować steroidooporność. Wśród potranslacyjnych modyfikacji znajdują się: fosforylacja i towarzysząca jej defosforylacja, ubikwitynacja, acetylacja i towarzysząca jej deacetylacja,

sumoilacja i nitryzylacja. Zestawienie wszystkich modyfikacji potranslacyjnych wraz z ich lokalizacją, induktorem oraz wpływem na działanie GR $\alpha$  przedstawia tabela 1.

Wykazano, że fosforylacja może wywoływać różne efekty w zależności od jej lokalizacji. Fosforylacja Ser211 przez p38 MAPK wiąże się ze wzrostem poziomu transkryptów genów indukowanych przez GR $\alpha$  [124, 195]. Natomiast fosforylacja Ser226 obniża transdukcję sygnału GR $\alpha$  poprzez zwiększone usuwanie GR $\alpha$  z jądra komórkowego [23, 78]. Sugeruje się także, że fosforylacja może kierować receptor na drogę degradacji poprzez ubikwitynację, a następnie degradację proteasomalną [78].

Sumoilacja wykazuje działanie przeciwstawne do ubikwitynacji i najprawdopodobniej wywiera wpływ na rekrutację kofaktorów [32, 78]. Obserwuje się, że efekty sumoilacji są wysoce zależne od typu komórki [131].

Acetylacja GR $\alpha$  jest zależna od ligandu i reguluje funkcje GR $\alpha$  w zależności od docelowego genu i typu komórki [207]. Często towarzyszy jej deacetylacja receptora w pozycji Lys494 i Lys495 umożliwiającą oddziaływanie GR $\alpha$  z białkiem p65 kompleksu NF- $\kappa$ B, co prowadzi do zahamowania jego aktywności transkrypcyjnej [80].

Nitrozylacja GR przez tlenek azotu (NO) w miejscu oddziaływania z Hsp90 zapobiega dysocjacji receptora GR $\alpha$  z kompleksu, uniemożliwiając tym samym wiązanie ligandu [52]. W chorobach zapalnych odnotowuje się często wzrost ekspresji iNOS, która produkuje duże ilości NO [9].

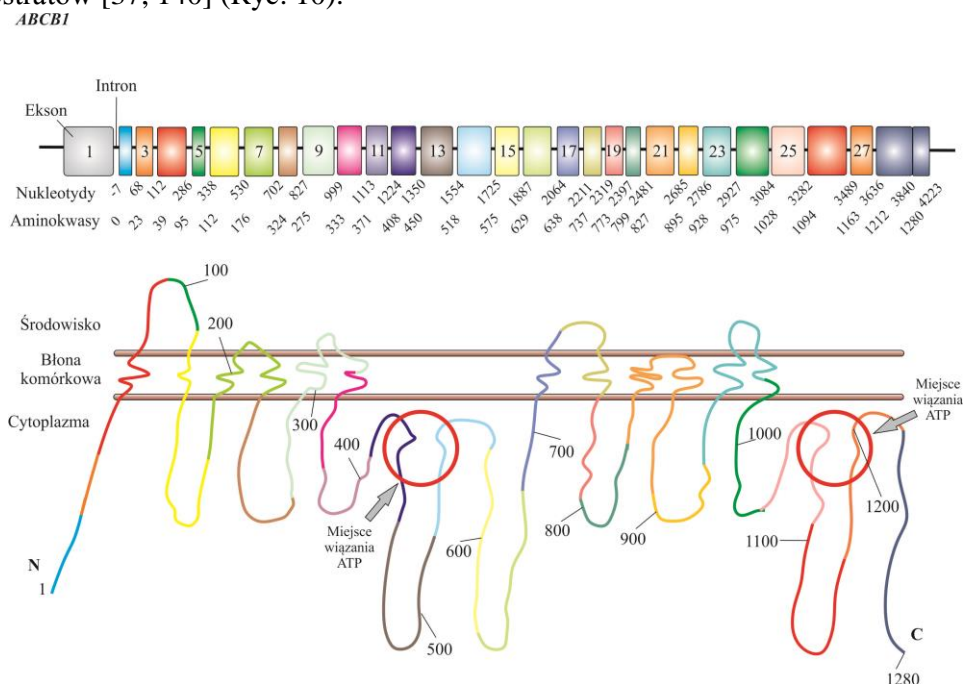
**Tabela 1.** Potranslacyjne modyfikacje receptora GR $\alpha$ .

Typ modyfikacji	Lokalizacja	Induktor	Efekt
<b>Fosforylacja i defosforylacja</b> [9, 10, 32, 78, 207, 131]	Domena NTD: Ser113, Ser141, Ser203, Ser211, Ser226, Ser404	kinazy: ERK, p38 MAPK, JNK; fosfataza: MKP-1	Wpływ na: wiązanie ligandu, interakcje z koaktywatorami, wewnątrzkomórkową lokalizację, stabilność receptora, transport jądrowo-cytoplazmatyczny, potencjał transaktywacyjny
<b>Ubikwitynacja</b> [32, 78, 113, 131]	Domena NTD: Lys419	enzym aktywujący ubikwitynę - E1, enzym koniugujący - E2, ligaza ubikwitynowo- białkowa - E3	Kierowanie receptora na degradację proteasomalną; zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej
<b>Acetylacja i deacetylacja</b> [131, 207]	Rejon łączący H: Lys492-495 (sekwencja KGTK)	acetylotransferaza histonowa - HAT, deacetylaza histonowa - HDAC2	Zachodzi po związaniu ligandu i przed translokacją jądrową; modulowanie aktywności transkrypcyjnej GR poprzez wzmacnianie lub hamowanie jego interakcji z koaktywatorami
<b>Sumoilacja</b> [32, 78, 131, 207]	Domena NTD: Lys277 i Lys293; domena LBD: Lys703	SUMO-1	Wpływ na: stabilność białka i zwiększenie aktywności transkrypcyjnej
<b>Nitrozylacja</b> [9]	Reszty Tyr	NO	Redukcja powinowactwa wiązania GKS

GKS - glikokortykosteroidy, LBD - C-terminalna domena wiążąca DNA, NTD - N-terminalna domena, K, Lys – lizyna, NO - tlenek azotu, Ser - seryna, T – treonina, Tyr – tyrozyna, SUMO - sumoilacja

#### 4.4. Glikoproteina P

Podłoża steroidooporności upatruje się także w niewystarczającej ilości ligandu dla GR $\alpha$  (Ryc. 9c). Może być to związane z nadekspresją genu *ABCB1* (*MDR1*) kodującego glikoproteinę P (P-gp) [10, 172]. P-gp należy do rodziny białek ABC (ang. *adenosine triphosphate-binding cassette family*) i jest transporterem błonowym. Działa jako pompa zależna od ATP biorąca udział w absorpcji, dystrybucji i eliminacji lipofilowych cząsteczek, w tym GKS, poza komórkę. W związku z tym sugeruje się, że może przyczyniać się do powstania steroidooporności [9, 37]. Na ludzką P-gp składa się 1280 aminokwasów. Zbudowana jest ona z dwóch homologicznych, symetrycznych sekwencji, z których każda zawiera sześć hydrofobowych transmembranowych domen (ang. *transmembrane domain*, TMD) i motyw wiążący ATP (ang. *nucleotide binding domain*, NBD). Hydroliza ATP dostarcza energii, która jest konieczna dla aktywnego transportu leków wbrew gradientowi stężeń. Część cytoplazmatyczna domeny NBD zawiera miejsca wiązania i hydrolizy ATP, natomiast segmenty 4-6 i 10-12 domeny TMD zawierają miejsca wiązania substratów [37, 140] (Ryc. 10).



**Rycina 10.** Uproszczony schemat struktury genu *ABCB1* oraz model P-glikoproteiny. Region P-glikoproteiny kodowany przez odpowiedni ekson zaznaczono tymi samymi kolorami [2, zmodyfikowane].

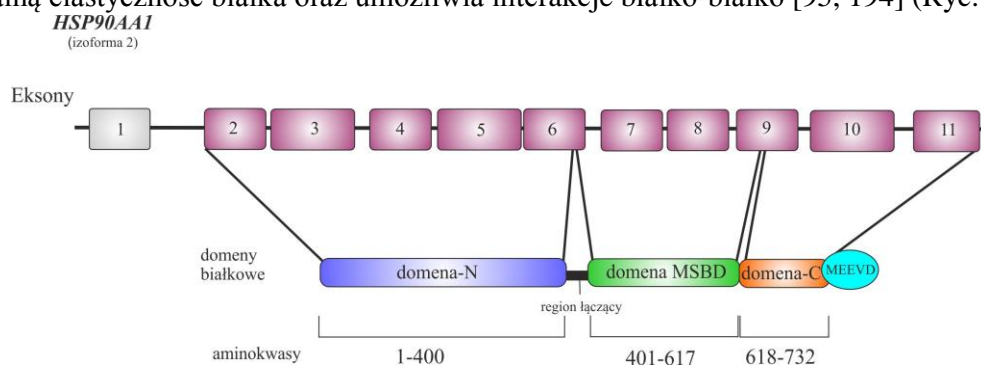
Nadekspresję glikoproteiny P wykryto m.in. w limfocytach u pacjentów z RZS opornym na leczenie GKS [190]. Dodatkowo u pacjentów ze stwierdzonym UC, u których stosowano terapię GKS, odnotowano wzrost ekspresji P-glikoproteiny w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) [69]. Ponadto, zastosowanie specyficznych inhibitorów pompy P-glikoproteinowej, jak PSC833, wykazało wewnątrzkomórkowy wzrost poziomu kortyzolu i cyklosporyny w ludzkim nabłonku jelitowym oraz limfocytach T [46].

#### 4.5. Kinazy aktywowane mitogenami

Sugeruje się, że kinazy aktywowane mitogenami (MAPK) odgrywają ważną rolę w odpowiedzi zapalnej. Kinaza JNK działa prozapalnie regulując aktywację AP-1, podczas gdy ścieżka sygnałowa kinazy p38 MAPK może działać prozapalnie stabilizując mRNA genów prozapalnych, takich jak: *COX-1*, *TNFA*, *IL6* i *IL8* lub wyciszać geny odpowiedzi immunologicznej, np. *TLR2*. GKS wyciszają działanie p38 MAPK poprzez indukowanie transkrypcji fosfatazy MKP-1, która defosforylując JNK, ERK i p38, inaktywuje je [172]. W badaniach *in vitro* zaobserwowano również, że kombinacja IL-2 i IL-4 indukuje steroidooporność związaną z aktywacją kinazy p38 MAPK. Powiązano to z fosforylacją receptora GR $\alpha$ , której skutkiem był spadek powinowactwa wiązania ligandu oraz jego translokacji jądrowej [7]. Związek p38 MAPK ze steroidoopornością potwierdzają także inne badania. Wykazano, że znaczny poziom aktywności tej kinazy występuje w makrofagach pęcherzyków płucnych pacjentów chorych na astmę, u których występowała słaba odpowiedź na leczenie GKS, w porównaniu do pacjentów, którzy reagowali pozytywnie na terapię [13]. Informacje te mogą stać się wskazówką w celu zastosowania inhibitorów MAPK, jako cząsteczek skutecznych w redukcji steroidooporności [7, 172] (Ryc. 9d).

#### 4.6. Białka heteromerycznego kompleksu receptora GR $\alpha$

Białko Hsp90 odgrywa ważną rolę w stabilizowaniu konformacji GR $\alpha$ , aby mógł on wydajnie wiązać ligand [226]. Wyróżnia się izoformy Hsp90 $\alpha$  i Hsp90 $\beta$ . Białka te zbudowane są z trzech wysoce konserwatywnych domen: domeny N-końcowej wiążącej ATP, domeny środkowej wiążącej substrat (ang. *middle substrate binding domain*, MSBD) o aktywności ATPazowej oraz C-końcowej domeny karboksylowej z motywem pentapeptydu MEEVD. Domena C-końcowa odpowiedzialna jest za dimeryzację białka oraz wiązanie białek opiekuńczych zawierających 34-aminokwasowe powtórzenia (ang. *tetratricopeptide repeat*, TPR). Domena N-końcowa jest połączona z domeną MSBD poprzez łącznik, który wpływa na strukturalną elastyczność białka oraz umożliwia interakcje białko-białko [95, 194] (Ryc. 11).



**Rycina 11.** Uproszczony schemat struktury genu *HSP90AA* oraz kodowane przez niego białko Hsp90 $\alpha$  izoforma 2, składająca się z 732 aminokwasów; MSBD – domena wiążąca substrat, MEEVD – motyw pentapeptydu.



Wskazuje się na potencjalne zmiany w białku Hsp90, które mogą przyczyniać się do steroidooporności. Ouyang i wsp. [137] wskazali na związek wysycenia jądrowym Hsp90 z opornością na GKS. Powiązano również polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphisms*, SNP) genu *FKBP51* ze wzrostem ekspresji białek opiekuńczych, co może prowadzić do zmian w aktywności receptora GR $\alpha$  i skutkować steroidoopornością. Wysoką ekspresję białka FKBP51 powiązano ze zredukowanym powinowactwem wiązania ligandu przez GR $\alpha$ . FKBP51 może również hamować efekt wywołany przez GKS promując import jądrowy transkrypcyjnie nieaktywnej izoformy receptora GR $\beta$  [84] (Ryc. 9e).

#### 4.7. Acetylacja i deacetylacja histonów

Acetylacja histonów odgrywa ważną rolę w regulowaniu transkrypcji genów zapalnych, jak również w mechanizmie działania GKS [10]. HAT acetyluje histony, głównie histon 4 (H4). Dochodzi wówczas do częściowej dekondensacji chromatyny, w wyniku czego jest ona lepiej dostępna dla czynników transkrypcyjnych [7]. Przeciwwzpalne działanie GKS polega na zwiększeniu aktywności HDAC2, która działając przeciwstawnie do HAT, prowadzi do wyciszania transkrypcji genów zapalnych. Zaburzenia w poziomie aktywności i ekspresji HDAC2 obserwuje się u pacjentów ze słabą odpowiedzią na terapię GKS [10, 79]. Szczególnie dużo przypadków odnotowano w chorobach zapalnych związanych z układem oddechowym: obniżony poziom HDAC2 zaobserwowano w PBMC i makrofagach pęcherzykowych u pacjentów ze stwierdzoną astmą oporną na sterydy [68] oraz w makrofagach pęcherzyków płucnych, dróg oddechowych i płuc u pacjentów ze zdiagnozowanym POChP [77]. Wskazuje to na możliwość zastosowania aktywatorów HDAC2 w celu przywracania aktywności enzymowi, jak teofiliny w POChP, co miałyby prowadzić do znoszenia efektu steroidooporności [10] (Ryc. 9f).

#### 4.8. Cytokina prozapalna MIF

Cytokina MIF (ang. *macrophage migration inhibitory factor*) jest wysoce konserwatywnym białkiem, składającym się ze 115 aminokwasów z masą molekularną 12,5 kDa. Ludzkie białko MIF wykazuje 90% homologię z białkiem MIF myszy i szczurów. Domeny białka C-końcowa oraz wolne reszty prolin domeny N-końcowej są ważne dla jego aktywności tautomerycznej. Dodatkowo domena C-końcowa wpływa również na strukturę czwartorzędową oraz termodynamiczną stabilność białka. Cytokina MIF wykazuje szerokie właściwości plejotropowe, może działać jako: prozapalna cytokina, chemokina, regulator proliferacji komórkowej i przeżycia, regulator angiogenezy, enzym posiadający aktywność tautomerazy, moduluje również wstępną odpowiedź immunologiczną regulując przeżycie limfocytów B i aktywację komórek T, wchodzi w interakcje z GKS, oddziałuje na oś HPA oraz wpływa na wydzielanie insuliny. Wskazano na duży udział cytokiny MIF w różnych autoimmunologicznych i zapalnych chorobach, takich jak: sepsa, RZS, kłębuszkowe zapalenie nerek, miażdżyca, stwardnienie rozsiane, jak i w nowotworach [163] (Ryc. 9g).

## 5. Molekularne podłoże chorób

Zmienność fenotypowa między ludźmi wynika z różnic występujących w DNA kodującym białka. W przypadku DNA niekodującego, jest on źródłem informacji o różnicach międzypersonalnych, które identyfikuje się za pomocą testów genetycznych związanych z analizowaniem wybranych markerów molekularnych. W celu poznania całkowitej sekwencji genomowego DNA człowieka wdrożono międzynarodowy Program Poznania Genomu Ludzkiego (ang. *human genome project*, HGP) [86, 145]. Pozyskane dane z badań molekularnych stają się cennym źródłem informacji, pozwalającym na poznanie patomechanizmów chorób na poziomie materiału genetycznego, komórki, tkanki, narządu lub całego organizmu człowieka. Dodatkowo ułatwiają diagnostykę chorób, wskazując na ich przyczyny oraz wczesne rozpoznanie, a także umożliwiają podejmowanie odpowiednich kroków w profilaktyce, leczeniu, przebiegu choroby oraz jej skutków [86].

Jedną z najczulszych technik pozwalających na wykrywanie zmian w materiale genetycznym oraz jednoczesną ich charakterystykę, jest sekwencjonowanie DNA [145, 146]. Pierwszymi technikami sekwencjonowania były: metoda terminacji łańcucha (Sangera) oraz metoda chemicznej degradacji (Maxama-Gilberta). Obecnie wykorzystuje się automatyczne sekwenatory, które dzięki znakowaniu fluorescencyjnym trifosforanów dideoksynukleotydów pozwalają na szybki odczyt sekwencji analizowanego DNA (300-1000 par zasad). Detektory fluorescencji zbierają w czasie rzeczywistym informacje o kolejnych nukleotydach, a pozyskane sekwencje DNA są następnie porównywane z sekwencjami prawidłowymi z baz danych, takich jak: amerykańskie GenBank czy Europejskie Laboratorium Biologii Molekularnej (ang. *European Molecular Biology Laboratory*, EMBL). W stosunkowo nowej metodzie pirosekwencjonowania („sekwencjonowanie poprzez syntezę”), badanie kolejności zasad w sekwencji DNA opiera się na analizie sygnałów pochodzących z chemiluminescencji emitowanej podczas dobudowywania kolejnego nukleotydu do jednoniciowej matrycy. Modyfikacją pirosekwencjonowania jest metoda 454 zaliczana do sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS), która wykorzystuje równoległe pirosekwencjonowanie wielu fragmentów DNA w tym samym czasie, co znacząco skraca czas reakcji. Metody te pozwalają na analizę sekwencji DNA, poszukiwanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, mutacji oraz badanie genomów kolejnych organizmów [86, 145].

### 5.1. Markery genetyczne

Wyróżnia się dwa główne typy markerów genetycznych: powtórzenia tandemowe (satelity) oraz polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Oba typy markerów mogą być przyczyną chorób, jak również mogą nie wywoływać żadnego efektu i być wykorzystywane jako markery pozwalające na zawężenie lokalizacji chromosomowej genów chorobotwórczych [19, 145].

Powtórzeniami tandemowymi nazywa się fragmenty DNA, które charakteryzują się prostym, tandemowym motywem występującym w ciągu. Na podstawie długości powtarzającej się sekwencji, rozróżnia się: minisatelity (powtórzenia 6-100 par zasad), nazywane również zmienną liczbą tandemowych powtórzeń (ang. *various number tandem repeats*, VNTRs) oraz mikrosatelity (powtórzenia 1-5 par zasad), nazywane także krótkimi powtórzeniami tandemowymi (ang. *short tandem repeats*, STR). Wśród chorób spowodowanych tandemowymi powtórzeniami znajdują się m.in. płasawica Huntingtona (ang. *Huntington's disease*, HD), związana z powtórzeniami motywu CAG w liczbie 38-180 w genie *IT15* chromosomu 4. W efekcie powstaje uszkodzony produkt białkowy tego genu – huntingtyna, co skutkuje zaburzeniami w sygnalizacji nerwowej oraz w transporcie białka w mózgu. Inną chorobą jest dystrofia miotoniczna typu I (choroba Crushmanna Steinerta), objawiająca się zanikiem mięśni. Związana jest ona z polimorfizmem STR (powtórzenia motywu CTG w liczbie 35-50, a nawet aż do 1000) w genie *DMPK* zlokalizowanym na chromosomie 19 [145].

W przypadku SNP zmiana dotyczy pojedynczego nukleotydu oraz musi występować przynajmniej u 1% populacji. Mogą one mieć funkcjonalne konsekwencje, powodując zmiany w sekwencji aminokwasów, wpływać na stabilność transkryptu i zmianę powinowactwa wiązania czynników transkrypcyjnych. Wiele SNP nie wywiera żadnego wpływu na funkcje komórki, ale zmiany w sekwencji DNA mogą mieć duży wpływ na reakcje ludzkiego organizmu na chorobę, czynniki środowiskowe: wirusy, bakterie, toksyny, chemikalia, leki czy inne terapie. Dzięki temu wiedza na temat SNP jest bardzo wartościowa w badaniach biomedycznych, a także w diagnostyce medycznej czy podczas wytwarzania produktów farmaceutycznych [19, 145, 181].

Największe znaczenie wydaje się mieć badanie tych polimorfizmów, które wpływają na funkcję białka lub jego ekspresję, ponieważ to one najprawdopodobniej zwiększają ryzyko choroby. W celu nadania hierarchii ważności polimorfizmów pod względem przyczyniania się do wystąpienia schorzenia należy wziąć pod uwagę lokalizację w genie oraz typ powodowanej zmiany [19, 181]. W związku z tym, najgroźniejsze mogą być zmiany niesynonimiczne w DNA. Zaliczyć do nich możemy zmiany sensu (ang. *missense*), w wyniku których w kodowanym białku w danym miejscu występuje inny aminokwas. Kolejną jest zmiana nonsens (ang. *nonsense*), która prowadzi do wcześniejszego zakończenia translacji (zmiana generuje wcześniejsze pojawienie się kodonu „stop”). W przypadku zmian synonimicznych, gdy polimorfizm występuje w regionie kodującym, ale nie skutkuje zmianą aminokwasu w białku, lub jeśli znajduje się w rejonie niekodującym, może on w dalszym ciągu wpływać na funkcję genu. Ujawniać się to może w zmniejszeniu stabilności transkryptu czy alternatywnym składaniu mRNA [181].

Rozpatrując lokalizację polimorfizmów, zaobserwowano wzrost ich wpływu, gdy położone są w rejonach promotorowych lub regulatorowych genu. Pomimo że trudno jest przewidzieć efekt polimorfizmu promotora tylko w oparciu o sekwencję DNA, sugeruje się, że zmiana taka występująca w rejonie wysoce konserwatywnym najprawdopodobniej ma znaczenie funkcjonalne. W analizie polimorfizmów o prawdopodobnym znaczeniu funkcjonalnym bierze się pod uwagę

głównie obszary kodujące, promotorowe, odległe sekwencje wzmacniające transkrypcję (ang. *enhancers*) oraz miejsca splicingowe [181].

Nowy diagnostyczny marker może być użyteczny tylko w sytuacji, gdy wywiera wpływ na ważne decyzje podejmowane przez lekarzy klinicystów. Natura tych decyzji zależy od typu choroby, etapu choroby i dostępnych metod leczenia. Diagnostyczne markery można podzielić na:

- zapobiegawcze, które wskazują na potrzebę dokonywania badań przesiewowych w populacjach z wysokim ryzykiem danej choroby,
- prognostyczne, które wskazują na prawdopodobny przebieg choroby, np. nawroty czy prognozy przeżycia pacjenta niezależnego od stosowanego leczenia, jakie uzyska pacjent,
- markery odpowiedzi na terapię, wykorzystywane do monitorowania odpowiedzi pacjentów na leczenie, pozwalające również na fenotypowe różnicowanie podobnych chorób [146].

Wśród tego typu markerów wskazuje się na polimorfizmy genów enzymów metabolizujących leki. Pierwszy taki polimorfizm zlokalizowano w cholinoesterazie butyrylowej oraz N-acetylotransferazie. Szczególną uwagę skupia się na metabolizmie leków przeciwnowotworowych, z powodu ich po toksyczności. Dla przykładu S-metylotransferaza tiopuryny (ang. *thiopurine S-methyltransferase*, TPMT) jest enzymem metabolizującym merkaptourynę oraz azatropinę, które są wykorzystywane jako leki przeciwnowotworowe oraz immunosupresyjne [54, 90]. Zidentyfikowano dwa SNP w genie *TPMT*, które prowadzą do zmniejszenia stężenia enzymu. Przyczyną najprawdopodobniej jest niestabilność tego wariantu białka, które ulega wcześniejszej degradacji. Innym przykładem jest system cytochromu P450, na który składa się grupa enzymów metabolizująca szeroki zakres związków chemicznych, w tym wiele różnych leków. Wiele enzymów P450 wykazuje obecność polimorfizmów, które wpływają na poziom eliminacji dużej liczby leków [90].

Poznanie sekwencji genomu człowieka umożliwiło pozyskanie wielu danych, które wskazują na czynniki genetyczne determinujące wiele zaburzeń zdrowotnych. Badania genetyczne okazały się istotne w identyfikowaniu prostych chorób mendlowskich, takich jak mukowiscydoza, HD i wielu innych rzadkich zaburzeń. Trudniejsze okazało się badanie złożonych chorób, do których zalicza się: IBD, astmę czy choroby serca. W ich przypadku ryzyko choroby najprawdopodobniej kontrolowane jest przez kilka genów, jak również poprzez oddziaływanie gen - gen czy środowisko - gen [109].

## 5.2. Metoda badania całego genomu - GWAS

Na uwagę zasługuje nowa metoda badania całego genomu GWAS (ang. *genome-wide association studies*). GWAS mierzy i analizuje zmiany w sekwencji DNA całego genomu w celu określenia genetycznych czynników ryzyka chorób, które są powszechne w populacji. Ostatecznym celem GWAS jest wykorzystanie genetycznego czynnika ryzyka do wskazania, kto

znajduje się w tej grupie oraz identyfikowania biologicznych podstaw podatności na rozwój chorób. Dąży się tym samym do oszacowania nowych strategii ich zapobiegania i leczenia. Jednym z pierwszych sukcesów GWAS była identyfikacja genu *CFH* kodującego czynnik H układu dopełniacza, jako głównego czynnika ryzyka zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (ang. *age-related macular degeneration*, AMD) [19]. Metoda GWAS znalazła również szerokie zastosowanie w obszarze farmakologii. Na uwagę zasługuje farmakogenetyka, która bada metabolizm leków oraz ich efektywność leczenia, jak również niekorzystne działanie, w odniesieniu do zmian w sekwencji DNA [19, 54]. Przykładem może być warfaryna będąca lekiem przeciwzakrzepowym. Dobranie odpowiedniej dawki leczenia wpływa na skuteczność terapii. Spekuluje się, że częściowo kontrolowane jest to również przez geny. Przypuszczenia te mogą potwierdzać badania GWAS, które ujawniły zmiany w sekwencjach DNA w kilku genach, których produkty białkowe mogą mieć istotny wpływ na dawkowanie warfaryny [19]. Wskazuje się również na funkcjonalne polimorfizmy genu oporności wielolekowej *ABCB1* i ich związki z ekspresją i aktywnością glikoproteiny P [54]. Testy genetyczne metodą GWAS przyczyniły się do rozwinięcia nowego obszaru medycyny tzw. medycyny spersonalizowanej, której celem jest dostosowanie opieki medycznej do każdego pacjenta indywidualnie w oparciu o jego genetyczny profil i inne biologiczne cechy [19].

Metoda GWAS opiera się na zastosowaniu dużej próby badanej oraz dużego panelu markerów genetycznych [19]. Katalog GWAS Narodowego Instytutu Badania Ludzkiego Genomu (dostępny na stronie internetowej: <http://www.genome.gov/GWASStudies>), zawiera listę ponad 3600 SNP identyfikujących znane choroby. Choroby szczegółowo opisane charakteryzują się obecnością wielu alleli podatności na te schorzenia, przy czym każdy z nieznacznym wpływem [19, 30].

W metodzie GWAS analizuje się setki tysięcy, a nawet miliony polimorfizmów. Badanie genomu na tak szeroką skalę nie wymaga hipotez na temat jakie typy genów czy polimorfizmy wykazują prawdopodobny związek z fenotypem, który nas interesuje, jednakże wiąże się to z wysokimi nakładami finansowymi. Dodatkowo potencjał identyfikowania powiązania fenotypu z SNP jest niski z powodu dużej ilości testów [116].

### 5.3. Badania genów kandydujących

Konkurencyjną metodą do metody GWAS, są badania oparte o geny kandydujące. Mają one na celu ograniczać koszty tego typu analiz, jak również zmniejszać liczbę testów do małych podzbiorów. W tym przypadku proponuje się hipotezę opartą na zestawie genów, które potencjalnie mogą mieć związek z interesującym nas fenotypem [116].

Wśród kryteriów doboru genów kandydujących wymienia się:

- funkcję kodowanego przez dany gen białka w odniesieniu do jednostki chorobowej lub cechy,
- mechanizmy odpowiedzi na lek w jakie zaangażowane jest białko,

- identyfikacja genów ludzkich w oparciu o modele zwierzęce,
- geny, w których rzadkie mutacje prowadzą do powstawania chorób monogenowych lub zespołów chorobowych (mogą przyczyniać się do chorób wielogenowych),
- informacje z genetycznych badań sprzężeń lub asocjacji [65,181].

Badania prowadzone na genach kandydujących mają dwojakie korzyści: zwiększają statystyczną wydajność analiz asocjacyjnych złożonych chorób oraz pozwalają na biologiczne poznanie fenotypu, tkanek, genów i białek, które prawdopodobnie zaangażowane są w chorobę. Mają one na celu wykrywanie od niskiego do umiarkowanego względnego ryzyka w kontekście etiologii i genetycznej heterogenności [181].

#### 5.4. Analiza sprzężeń

Poszukiwanie genów odpowiedzialnych za wystąpienie choroby rozpoczyna się od analizy sprzężeń. Genetyczna analiza sprzężeń jest metodą statystyczną, którą wykorzystuje się w celu określenia potencjału funkcjonalnego genu z jego lokalizacją na chromosomie. Opiera się na zasadzie, że markery sąsiadujące ze sobą mają tendencję do wspólnej segregacji podczas rekombinacji chromosomowej w czasie przekazywania ich potomstwu. Z tego powodu, jeżeli choroba dziedziczona jest wraz ze specyficznymi markerami, można wnioskować, że gen lub geny odpowiedzialne za chorobę zlokalizowane są w pobliżu tych markerów na chromosomie [19]. Metoda ta przydatna jest w przypadku rzadkich jednogenowych chorób, a zwłaszcza tych, które oparte są na mendlowskim wzorze dziedziczenia, mniej natomiast w przypadku złożonych chorób. W celu poprawy prognozowania i badania prawdopodobieństwa występowania złożonych cech, stosuje się analizę nierównowagi sprzężeń (ang. *linkage disequilibrium*, LD). LD polega na obserwacji wariantów genetycznych osobników, którzy są nosicielami konkretnego polimorfizmu w jednym miejscu, a często predysponują do bycia nosicielami innego specyficznego polimorfizmu w innych pobliskich miejscach [145]. W odniesieniu do polimorfizmów SNP, LD opisuje w jakim stopniu allel jednego SNP jest dziedziczony lub koreluje z allelem innego SNP w obrębie populacji [19].

Charakterystyka wzoru LD w genomie okazała się istotna dla badań asocjacyjnych choroby czy też genów podatności na chorobę, jak również dla zrozumienia takich zjawisk jak: rekombinacja, mutacja i selekcja. Wykazano, że wiele wariantów genetycznych pojedynczych genów odgrywa ważną rolę w podatności na specyficzne choroby. Przykładem może być gen ryzyka raka piersi i prostaty *BRCA1* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 17 (17q21) i *BRCA2* zlokalizowany również na długim ramieniu chromosomu 13 (13q12.3). Produkty tych genów zaangażowane są w procesy naprawy DNA [145].

Wyniki badań asocjacyjnych mogą być bezpośrednie, przyczynowe lub niebezpośrednie i nieprzyczynowe. W pierwszym przypadku związek występuje, gdy różne allele w locus markera są bezpośrednio zaangażowane w etiologię choroby poprzez szlaki biologiczne, w których biorą udział. Takie asocjacje zazwyczaj znajdują się we wstępnych badaniach GWAS lub

w badaniach genów kandydujących, w których poszczególne funkcjonalne polimorfizmy są ukierunkowane. W przypadku wyników niebezpośrednich i nieprzyczynowych, związki pojawiają się, gdy allele w locus markera są skorelowane (są w LD) z allelami w pobliżu locus przyczynowego, ale nie wpływają bezpośrednio na ryzyko choroby [19, 30]. Mogą się również pojawić sprzeczne wyniki będące konsekwencją jakości danych czy też próbkowania statystycznego lub z powodu problemów związanych z nakładaniem się populacji i ich mieszaniem [30].

Pozyskane wyniki muszą zostać poddane analizie statystycznej oraz dodatkowym badaniom na poziomie białka, komórki czy na zwierzętach w celu weryfikacji związku pomiędzy proponowaną mutacją genetyczną a patologią [145]. SNP występują w całym genomie, w rejonach kodujących, niekodujących oraz rejonach nieulegających translacji. Tego typu zmiany analizuje się w celu sprawdzenia czy dany wariant genetyczny jest związany z chorobą. Nosicielstwo jednego lub dwóch kopii allelu wysokiego ryzyka zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju choroby. Wśród powszechnie stosowanych wykorzystuje się dwa modele badawcze: badania kliniczno-kontrolne (ang. *case-control study*, CCS) oraz test nierównowagi transmisji (ang. *transmission disequilibrium test*, TDT) [109]. Badania CCS polegają na porównywaniu częstości alleli i genotypów SNP między dwoma zdefiniowanymi grupami: grupą pacjentów, która została zdiagnozowana pod kątem danej choroby oraz grupą kontrolną, w której nie wykazano obecności danej choroby. Wzrost częstości allelu lub genotypu badanego SNP w grupie pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną wskazuje na fakt, że obecny allel może zwiększać ryzyko choroby. Celem metody jest zatem oszacowanie czy istnieje statystyczny związek pomiędzy wystąpieniem choroby, a genetycznym markerem [30, 106, 109]. W analizie wyników badań CCS dokonuje się również określenia ryzyka choroby wyznaczonego przez allele/genotypy polimorfizmu SNP. Parametrem wykorzystywanym w tym celu jest iloraz szans (ang. *odds ratio*, OR) będący stosunkiem alleli nosicieli do nie-nosicieli w grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną [30, 109].

Za pomocą testu TDT określa się liczbę przekazanych i nieprzekazanych alleli rozpatrywanego wariantu polimorficznego od zdrowych rodziców choremu potomstwu [109, 181].

## 6. Steroidooporność – geny kandydujące

Badania asocjacyjne powszechnie testują serię SNP wśród genów kandydujących, aby oszacować czy jakiś SNP może zwiększać ryzyko rozwoju choroby. W oparciu o te informacje typuje się również geny kandydujące i markery genetyczne biorące udział w zjawisku steroidooporności w poszczególnych jednostkach chorobowych.

### 6.1. Gen *NR3C1*

Ludzki gen receptora GR - *NR3C1* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 5 (5q31.3) i składa się z 9 eksonów [37, 113, 224] (Ryc. 4). Eksony pierwszy i ostatni ulegają alternatywnemu splicingowi. Alternatywny splicing generuje różne warianty receptora GR. Najważniejsze z nich, to izoformy GR $\alpha$  i GR $\beta$ , będące wynikiem alternatywnego splicingu eksonu 9. Analizy nad składem aminokwasowym wykazały, że izoformy te są identyczne od końca aminowego do aminokwasu 727, następnie GR $\alpha$  posiada dodatkowe 50 aminokwasów, natomiast GR $\beta$  dodatkowe niehomologiczne 15 aminokwasów.

Ekspresja GR $\alpha$  zachodzi we wszystkich narządach oraz tkankach, a jego aktywność w komórce zależna jest od obecności GKS. Natomiast zmieniona domena LBD w receptorze GR $\beta$  powoduje, że nie ma on zdolności wiązania GKS oraz różni się od GR $\alpha$  również tym, że wykazuje większą specyficzność tkankową. Ulega ekspresji w komórkach nabłonkowych, które wyściełają oskrzeliki końcowe płuc, formują zewnętrzną warstwę ciała Hassala w grasicy i przewody żółciowe w wątrobie, przy czym limfocyty grasicy i inne komórki nabłonkowe w tych narządach mają niewielką ilość GR $\beta$ . Zwraca to uwagę na fakt, że ekspresja GR $\alpha$  i GR $\beta$  może różnić się między sobą w różnych komórkach. Wykazano, że względnie wysoki poziom ekspresji GR $\beta$  w porównaniu z GR $\alpha$  koreluje z występowaniem glikokortykosteroidooporności [113]. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję GR $\beta$  w PBMC u pacjentów ze zdiagnozowanym RZS, co wiązało się z występowaniem u nich glikokortykosteroidooporności [26]. Zwiększony poziom GR $\beta$  wykazano również w komórkach T dróg oddechowych, PBMC oraz indukowanych tuberkuliną zmianach zapalnych u osób ze stwierdzoną astmą glikokortykoooporną [154]. Jednakże nie wykazano związku pomiędzy poziomem mRNA GR $\alpha$  a opornością na GKS u pacjentów z ostrą białaczką limfatyczną [103].

Mutacje inaktywujące receptor GR $\alpha$  są przyczyną rodzinnej oporności na GKS. Większość z nich wpływa na funkcje domen: LBD i DBD [207]. Zmiany te prowadzą do: zmniejszenia potencjału transaktywacyjnego, opóźnionej translokacji jądrowej receptora, zaburzeń w wiązaniu ligandu, zmniejszonej ekspresji GR $\alpha$ , zaburzeń w oddziaływaniu z koaktywatorami czy alternatywnego składania genu [217]. Również polimorfizmy SNP powiązane ze zmianami wrażliwości na GKS. Mogą one osłabiać formowanie kompleksu GKS-GR $\alpha$  i w konsekwencji zmieniać procesy transaktywacji i/lub transrepresji [37]. W genie tym wyróżniono także polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragments length polymorphism*, RFLP) *TthIII* (rs10052957). Zlokalizowany jest on w rejonie promotorowym



i związany jest ze zmianą cytozyny (C) na tyminę (T) w pozycji 3807 łańcucha DNA. Powiązany został on ze zredukowaną odpowiedzią na deksametazon oraz niższym poziomem insuliny i cholesterolu [215] oraz podwyższonym dobowym poziomem kortyzolu [157]. W intronie 2 zidentyfikowano również inny polimorfizm RFLP *BcII* (rs 41423247). Jest to substytucja C>G w pozycji 646 w DNA, który powiązano ze zwiększoną wrażliwością na GKS u niektórych osób. Sugerowano, że polimorfizm N363S oraz *BcII* mogą być związane z terapeutycznymi korzyściami w ostrej białaczce limfoblastycznej [85], jednak nie udało się tego potwierdzić [185].

## 6.2. Gen *ABCB1*

Ludzki gen *ABCB1*(*MDR1*), kodujący glikoproteinę P, zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 7 (7q21.12) [37, 224]. Składa się z 29 eksonów, z czego ekson 1 jest niekodujący [224, 226] (Ryc. 10). Gen ten nie posiada kasety TATA (ang. *TATA box*) w części promotorowej. W kontroli tego typu genów bierze udział sekwencja inicjatora (Inr), która obejmuje miejsce startu transkrypcji (+1). Poza tym gen ten posiada odwróconą sekwencję CCAAT oraz wyspy bogate w CG, które oddziałują z czynnikami transkrypcyjnymi. W rejonie promotora wiązane są również takie czynniki, jak EGR-1 (ang. *early growth response 1*) czy WT-1 (ang. *Wilm's tumor suppressor protein*), które odpowiednio wzbudzają lub hamują ekspresję genu w sytuacji ekspozycji na chemiczny czynnik aktywujący. Wskazuje się także wpływ na ekspresję genu *ABCB1* takich czynników środowiskowych jak: cytostatyki, metale ciężkie, szok termiczny czy promieniowanie UV i X [140]. Wiele badań dostarcza informacji na temat znaczenia polimorfizmów genu *ABCB1*, prowadzących do zmian funkcjonalnych oraz fenotypowego zróżnicowania w ekspresji glikoproteiny P [37].

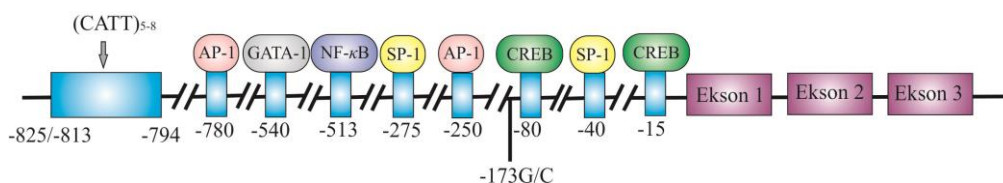
## 6.3. Gen *HSP90AA1*

Gen *HSP90AA1* zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 14 (14q32.33) koduje on białko Hsp90 $\alpha$  [224, 226]. W wyniku alternatywnego splicingu powstają dwie izoformy białka Hsp90 $\alpha$ : dłuższa, składająca się z 854 aminokwasów (izoforma 1) oraz krótsza, składająca się z 732 aminokwasów (izoforma 2) [194] (Ryc. 11).

Wskazuje się na związek nieprawidłowości w białkach opiekuńczych i białkach im towarzyszących (ang. *co-chaperones*), które mogą prowadzić do zmian w odpowiedzi na GKS [37]. Wykazano, że zmiany w Hsp90 i Hsp70 skutkują spadkiem wrażliwości na GKS w ludzkich komórkach białaczkowych [96]. Zmiany w poziomie Hsp90 odnotowano w PBMC u osób chorych na astmę steroidooporną [150], IZN [137] oraz stwardnienie rozsiane [121]. Opisano polimorfizmy w genach *HSP90AA1* i *HSP90AB1* kodujących odpowiednio białka Hsp90-1 $\alpha$  i Hsp90-1 $\beta$ . Niestety nie wykazano powiązania między badanymi SNP (w genie *HSP90AA1*: 3'-UTR+307, rs3736807, rs4906178, rs3809386, promotor -32 oraz *HSP90AB1*: rs504697 i rs3757286), a odpowiedzią na leczenie GKS u pacjentów ze zdiagnozowaną astmą [66].

## 6.4. Gen *MIF*

Ludzki gen *MIF* zlokalizowany jest na długim ramieniu 22 chromosomu (22q11.2). Składa się z 3 eksonów, odpowiednio: 107, 172 i 66 par zasad, między którymi znajdują się sekwencje intronów, odpowiednio: 188 i 94 pary zasad [224, 226]. W rejonie regulatorowym genu 5' znajduje się wiele sekwencji wiążących czynniki transkrypcyjne, takie jak: AP-1, NF- $\kappa$ B, SP-1, GATA czy białka CREB. Zwraca się szczególną uwagę na polimorfizmy rejonu promotorowego genu *MIF*: polimorfizm STR sekwencji czteronukleotydowej CATT w liczbie od pięciu do ośmiu powtórzeń w pozycji -794 oraz polimorfizm SNP polegający na zamianie guaniny (G) na cytozynę (C) w pozycji -173, które powiązано m.in. z RZS czy młodzieńczym idiopatycznym zapaleniem stawów (ang. *juvenile idiopathic arthritis*, JIA), [17, 21] (Ryc. 12).



**Rycina 12.** Schemat struktury genu *MIF* z uwzględnieniem rejonów wiązania czynników transkrypcyjnych w rejonie 5'UTR genu oraz polimorfizmów: (CATT)<sub>5-8</sub> i -173G/C [21, zmodyfikowane].

Cytokina MIF (ang. *macrophage migration inhibitory factor*, MIF) posiada właściwości prozapalne w przebiegu wielu chorób, w tym RZS i miażdżycy. MIF opisano jako rozpuszczalny czynnik ulegający ekspresji w komórkach T w nadwrażliwości typu późnego (ang. *delayed-type hypersensitivity*, DTH). DTH to przykład odpowiedzi komórkowej na antygeny, w której głównymi komórkami odpowiedzi immunologicznej są limfocyty Th1. MIF jest nietypową cytokiną, ponieważ może być zarówno indukowana przez GKS, jak i wykazywać zdolność hamowania ich działania. Uważa się, że MIF jest endogennym antagonistą GKS w oddziaływaniu na układ immunologiczny. Podczas gdy GKS wyciszają ekspresję i osłabiają wydzielanie większości cząsteczek prozapalnych, MIF jest uwalniany z makrofagów, komórek T i innych komórek wewnątrzwydzielniczych w dwojaki sposób: niskie stężenia GKS indukują jego sekrecję, natomiast wysokie stężenia hamują ją [126]. Dodatkowo badania wykazały, że wyciszanie przeciwwzapalnego efektu GKS przez MIF, związane jest głównie z hamowaniem indukcji kinazy MKP1 [9]. Odnotowano wzmocnienie ekspresji MIF w komórkach jednojądrzastych okrężnicy u chorych ze steroidoopornym UC, gdzie podanie przeciwciał anti-MIF przywracało odpowiedź komórek na GKS [76]. Przypuszcza się związek polimorfizmu genu *MIF* z opornością na GKS u pacjentów ze zdiagnozowanym RZS i CD [11, 57]. Terapia anti-MIF może być efektywna w wielu chorobach steroidoopornych [9].

## 7. Zespół nerczycowy

Zespół nerczycowy (ZN) jest konstelacją objawów klinicznych będących wynikiem utraty białka z moczem. Objawia się ciężką proteinurią u dzieci powyżej 50 mg/kg masy ciała/dobę lub stosunkiem białko:kreatynina powyżej 200 mg/mmol, hipoalbuminemią (poniżej 30 mg/l), hiperlipidemią i obrzękami [100, 197]. Białkomocz może mieć wiele przyczyn, stąd uznaje się, że ZN nie jest odrębną jednostką chorobową, ale manifestacją wielu różnych chorób kłębuszkowych.

Szczyt zachorowań na ZN pojawia się u dzieci poniżej 16 roku życia. Rocznie odnotowuje się około 2-7 przypadków ZN na 100 tys. dzieci [44, 100, 197]. Zdecydowanie częściej pojawia się u chłopców aniżeli u dziewczynek, gdzie stosunek ten wynosi 1,5-2:1 [45, 56, 100, 105].

Zakłada się, że ZN związany jest z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu układu immunologicznego. Sugeruje się, że populacja limfocytów T uwalnia limfokiny, które oddziałują na barierę filtracyjną kłębuszka, zwiększając filtrację białka [100]. Ściana kłębuszkowej bariery składa się z trzech elementów, które wpływają na selektywność bariery. Są nimi komórki śródbłonna okienkowego, błona podstawna oraz wyspecjalizowane komórki nabłonkowe (podocyty), które łączą się ze sobą za pomocą błon szczelinowych [44, 56, 105].

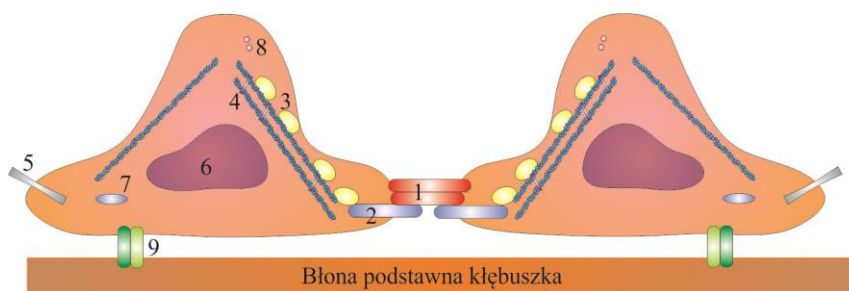
### 7.1. Klasyfikacja zespołu nerczycowego

ZN można podzielić na wrodzony lub nabyty. Nabyty ZN może być idiopatyczny (pierwotny) lub wtórny. Idiopatyczny ZN (IZN) poddawany jest klasyfikacji na podstawie klinicznej odpowiedzi na steroidy oraz w zależności od typu histologicznego [56, 100, 105, 197].

#### 7.1.1. Wrodzony zespół nerczycowy

Wrodzony ZN (ang. *congenital nephrotic syndrome*, CNS) pojawia się w pierwszych latach życia (głównie w przeciągu 3 miesięcy). ZN ujawniający się w wieku 3-12 miesięcy określany jest jako niemowlęcy [55, 200]. Defekty w budowie określonych elementów wchodzących w skład błony filtracyjnej kłębuszków nerkowych, powiązane są z mutacjami genetycznymi lub mogą być jako wtórne wywołane przez wrodzone infekcje (spowodowane kiłą czy toksoplazmozą). Ze względu na nieimmunologiczny charakter tego ZN, cechuje go zwykle oporność na glikokortykosteroidoterapię i immunosupresję, czasami również na nieswoiste leczenie antyproteinuryczne [55, 197].

Defekty genetyczne zaburzają budowę, a co za tym idzie funkcje kluczowych białek bariery filtracyjnej, do których należą: nefryna, podocyna,  $\alpha$  aktynina-4, laminina  $\beta$  a także czynnik transkrypcyjny WT1, który pełni ważną rolę w rozwoju nerek i gonad [200]. Rycina 13 przedstawia lokalizację kluczowych białek bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego. W tabeli 2 zestawiono typy wrodzonego ZN w oparciu o defekty genetyczne tych białek.



**Rycina 13.** Lokalizacja produktów genów uczestniczących w etiologii wrodzonego ZN; 1 – Nefryna, 2 – Podocyna, 3 – Białko związane z CD2, 4 –  $\alpha$  aktynina-4, 5 – Kanał wapniowy, 6 – Białko guza Wilms'a, 7 – Fosfolipaza C, epsilon 1, 8 – Odwrotna formina 2, 9 –  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integryny [44, 55, zmodyfikowane].

**Tabela 2.** Typy wrodzonego zespołu nerczycowego w oparciu o defekty genetyczne kluczowych białek bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego [44, 55, 60, 87, 100, 102, 139, 171, 224].

Gen	Lokalizacja	Białko	Funkcja fizjologiczna	Rodzaj ZN
1. <i>NPHS1</i>	19q13.1	Nefryna	Tworzy szkielet błony szczelinowatej; białko adhezyjne; cząsteczka sygnałowa; brak skutkuje zanikiem wyrostków stopowatych	ZN typu fińskiego
2. <i>NPHS2</i>	1q25	Podocyna	Tworzy połączenia z nefryną i CD2AP; stanowi rusztowanie błony szczelinowatej	ZN typu 2
3. <i>CD2AP</i>	6p12	Białko związane z CD2	Oddziałuje z nefryną; zaangażowane w łączenie nefryny z aktyną cytoszkieletu podocyty	FSGS typ 3
4. <i>ACTN4</i>	19q13	$\alpha$ aktynina-4	Tworzy wiązania krzyżowe z aktyną cytoszkieletu podocyty	FSGS typ 1
5. <i>TRPC6</i>	11q22.1	Kanał jonowy (wapniowy)	Indukowana jonami $Ca^{2+}$ transdukcja sygnału dla wzrostu podocyty; homeostaza jonowa	FSGS typ 2
6. <i>WT1</i>	11p13	Białko guza Wilms'a	Czynnik transkrypcyjny; bierze udział w prawidłowym rozwoju nerek i gonad; supresja nowotworowa	Zespół Frasier'a, Zespół Denis-Drash
7. <i>PLCE1</i>	10q23	Fosfolipaza C, epsilon 1	Enzym podocyty odpowiedzialny za wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnałów; regulacja wzrostu i różnicowania komórki, ekspresji genów	ZN typ 3
8. <i>INF2</i>	14q32.33	Odwrotna formina 2	Białko z rodziny regulujących aktynę; przyspiesza polimeryzację i depolimeryzację aktyny	FSGS typ 5
9. <i>ITGA3, ITGB1</i>	17q21.33 10p11.2	$\alpha$ 3 $\beta$ 1, integryny	Cząsteczki łączące podocyty z błoną podstawną kłębuszka	NEP

ZN - zespół nerczycowy, FSGS - ogniskowe segmentalne szklwienie kłębuszków nerkowych, NEP - zespół nerczycowy-pęcherzowe oddzielanie się naskórka-choroba płuc (ang. *nephrotic syndrome-epidermolysis bullosa-pulmonary disease*)

### 7.1.1.1. Wrodzony zespół nerczycowy typu fińskiego

Wrodzony ZN typu fińskiego związany jest z mutacjami w genie *NPHS1*, który koduje nefrynę niezbędną do prawidłowej funkcji podocyty. Głównym objawem klinicznym jest masowy białkomocz, który zaczyna się już w życiu płodowym. ZN typu fińskiego występuje na całym świecie, ale częstość występowania w Finlandii wynosi 1:200 porodów (1:800 wynosi nosicielstwo zmutowanego genu w populacji fińskiej) [55, 105]. W obrazie uzyskanym za pomocą mikroskopii elektronowej, obserwuje się zmiany w podocytach oraz brak błon

szczelinowatych [105]. Dzieci fińskie z objawami choroby posiadają jedną z dwóch mutacji tego genu:

- a) mutacja typu Fin-major, która prowadzi do delecji dwóch par zasad w obrębie eksonu 2, konsekwencją jest produkcja skróconego białka nefryny z 1241 do 90 aminokwasów
- b) mutacja Fin-minor, mutację typu nonsense w eksonie 26, skracającą białko do 1109 aminokwasów [55, 200].

W tej grupie pacjentów obserwuje się oporność na leczenie zachowawcze z progresją w kierunku końcowego stadium niewydolności nerek (ang. *end-stage renal disease*, ESRD). W populacjach innych niż fińska występują inne rozmaite mutacje typu delecje, utraty sensu, nonsense, insercje czy mutacje miejsca splicingowego [200].

#### **7.1.1.2. Rodzinny zespół nerczycowy**

Podocyna jest bardzo ważnym elementem strukturalnym bariery filtracyjnej w kłębuszkach nerkowych, który łączy się z nefryną i białkiem związanym z CD2 (ang. *cluster of differentiation 2*, CD2AP). Mutacje w genie *NPHS2* kodującym podocynę powiązane są z rodzinnym steroidoopornym ZN [55, 105]. We wczesnym stadium choroby obserwuje się minimalne zmiany w obrazie histologicznym (ang. *minimal change nephrotic syndrome*, MCNS) z tendencją do przejścia w ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków nerkowych (ang. *focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS) [105]. Przyczyną rodzinnie występującego FSGS jest mutacja genu *ACTN4* kodującego  $\alpha$  aktyninę-4. Zmiana ta wpływa na zaburzenia czynnościowe błony szczelinowatej na skutek usztywnienia sieci aktynowo-aktyninowej, czego efektem jest białkomocz [55].

#### **7.1.2. Nabyty zespół nerczycowy**

##### **7.1.2.1. Idiopatyczny zespół nerczycowy**

Idiopatyczny zespół nerczycowy (IZN) jest najczęściej spotykaną glomerulopatią u dzieci. Pierwszą linią leczenia są GKS. Uznaje się, że odpowiedź na leczenie GKS ma większą wartość prognostyczną w porównaniu z wynikiem biopsji [130].

Wśród najczęściej spotykanych typów histologicznych wymienia się:

- a) Zespół nerczycowy z obecnością zmian minimalnych (MCNS) – w mikroskopie elektronowym obserwuje się fuzję wypustek podocytów w kłębuszkach nerkowych, podczas gdy w mikroskopie świetlnym brak zmian lub są one minimalne [105]; spotykany u około 80% dzieci z ZN [45].
- b) Ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków nerkowych (FSGS) – obserwuje się ogniskowe i segmentalne zagęszczenie i szkliwienie mezangium z obliteracją naczyń

włosowatych kłębuszka. Częściej spotykany u dzieci ze steroidoopornym ZN [102, 105].

- c) Błoniasto-rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek (ang. *membranoproliferative glomerulonephritis*, MPGN) charakteryzuje się pogrubieniem ściany włośniczek oraz proliferacją komórek mezangium [161].
- d) Rozlana proliferacja mezangium (ang. *diffuse mesangial proliferation*, DMP) oraz mezangialna proliferacja (ang. *mesangial proliferation*, MP) [71]
- e) Błoniasta nefropatia (ang. *membranous nephropathy*, MN) [160].

MCNS i FSGS występują najczęściej u dzieci, podczas gdy MN u dorosłych [105].

### 7.1.2.2. Wtórny zespół nerczycowy:

Czynniki mogące prowadzić do wtórnego ZN:

- choroby układowe, takie jak: toczeń rumieniowaty układowy, nefropatia IgA, anemia sierpowata, choroba Schönleina-Henocha,
- infekcje: zapalenie wątroby typu B (HBV), HIV/AIDS, malaria, toksoplazmoza, kiła,
- leki, takie jak: penicylina, interferon, pamidronian, heroina, lit, rtęć, niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ),
- choroby immunologiczne/alergiczne, m.in. choroba Castlemana, choroba Kimura,
- nowotwory złośliwe, takie jak: chłoniak, białaczka [105].

## 7.2. Leczenie zespołu nerczycowego

### 7.2.1. Glikokortykosteroidy i leki immunosupresyjne

Podstawą leczenia ZN są GKS. Terapia powinna opierać się o przebieg choroby i dobranie odpowiedniej formy leczenia. Powszechnie stosowanym syntetycznym GKS w leczeniu ZN jest prednizolon. Zgodnie z protokołem ISKDC (ang. *International Study of Kidney Disease*), międzynarodowego konsorcjum do spraw chorób nerek u dzieci, podawanie leku zaczyna się od maksymalnej dawki 60 mg/m<sup>2</sup> dziennie przez okres 4 tygodni, następnie 40 mg/m<sup>2</sup> w alternatywne dni przez następne 4 tygodnie [223]. Za wyznacznik podawane są 4 tygodnie, jako że wydłużanie tego czasu wiąże się z efektami ubocznymi. W sytuacji braku odpowiedzi na dzienne dawkowanie, po tym okresie rozważa się podawanie wysokich dawek dożylnego metylprednizolonu przez następne 3 tygodnie. Jeżeli i w tym wypadku nie ma reakcji na lek, włącza się immunosupresanty [100, 197]. O nawrotach mówi się, jeżeli w moczu obserwuje się obecność białka (+++) przez trzy kolejne dni. Około 70% dzieci ma przynajmniej jeden epizod nawrotu choroby. Leczone są one również steroidami. Gdy okazuje się, że pacjent jest steroidozależny lub z częstymi nawrotami, wówczas należy odstawić steroidy na dłuższy czas. Drugą linią leczenia są leki niesteroidowe [100].

Na podstawie klinicznej odpowiedzi na steroidy wyróżnia się więc:

- a) Steroidowrażliwy ZN (SWZN), jeżeli odpowiedź na steroidy pojawia się w ciągu pierwszych 4 tygodni trwania terapii,
- b) Steroidooporny ZN (SOZN), jeżeli brak pozytywnej odpowiedzi na terapię steroidami w ciągu pierwszych 4 tygodni [100]; jest główną przyczyną ESRD [45].

Dodatkowo w oparciu o SWZN:

- a) Często nawracający ZN (ang. *frequently relapsing nephrotic syndrome*, FRNS), gdy pojawiają się dwa lub więcej nawroty choroby w przeciągu pierwszych 6 miesięcy lub więcej niż cztery nawroty w okresie 12 miesięcy,
- b) Steroidozależny ZN (ang. *steroid dependent nephrotic syndrome*, SDNS), w sytuacji, gdy nawroty pojawiają się podczas zmniejszania dawki steroidów lub w ciągu 2 tygodni po zakończonej terapii [56, 100].

### 7.2.2. Niesteroidowe leki

Niesteroidowe leki stosowane są u pacjentów z częstymi nawrotami choroby, są steroidozależni lub steroidooporni [60]. Wśród powszechnie stosowanych znajdują się: lewamizol, związki alkilujące: cyklofosfamid i chlorambucyl, inhibitory kalcyneuryny: cyklosporyna i takrolimus, mykofenolan mofetylu, rituximab i NLPZ (Tabela 3).

**Tabela 3.** Zestawienie powszechnie stosowanych niesteroidowych leków [31, 44, 100, 105, 129, 133, 138, 197].

Lek		Mechanizm działania
1. Lewamizol		Środek przeciworobaczy z właściwościami immunostymulującymi; wpływa na indukcję transkrypcji IL-18 oraz stymuluje limfocyty Th1 do produkcji cytokin, zmniejszając w ten sposób odpowiedź Th2
2. Związki alkilujące	Cyklofosfamid	Leki cytostatyczne; metabolizowane w wątrobie do aktywnych alkilujących form, które wnikają do komórki wchodząc w reakcje z jej komponentami, w tym z DNA, prowadząc do jej zniszczenia
	Chlorambucyl	
3. Inhibitory kalcyneuryny	Cyklosporyna A	Immunosupresyjny efekt: wiążą się z immunofilinami: cyklosporyna A z cyklofiliną, takrolimus z FKBP a następnie wiążą i hamują kalcyneurynę (fosfatazę białkową), co skutkuje redukcją ekspresji IL-2 a tym samym wzrostem immunosupresji
	Takrolimus	
4. Mykofenolan mofetylu		Działanie cytotoksyczne na limfocyty B i T; hamowanie dehydrogenazy monofosforanu inozyny, w wyniku czego dochodzi do zaburzonej syntezy nukleozydów guanozynowych niezbędnych do budowy DNA
5. Rituximab		Przeciwciała monoklonalne anti-CD20 hamujące proliferację limfocytów B
6. NLPZ, np. kwas acetylosalicylowy		Hamowanie syntezy prostaglandyn, głównie PGI <sub>2</sub> i PGE <sub>2</sub>

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

## CELE PRACY

Idiopatyczny zespół nerczycowy należy do najczęściej spotykanych glomerulopatii u dzieci. Podstawą leczenia są glikokortykosteroidy, ze względu na ich właściwości przeciwzapalne, przeciwobrzękowe i immunosupresyjne. Niestety u około 60-80% pacjentów wstępnie odpowiadających pozytywnie na terapię, pojawiają się nawroty białkomoczu, a część z nich staje się steroidozależna lub steroidooporna, pomimo wstępnej całkowitej remisji. W celu eliminacji nawrotów wydłuża się czas terapii, co niestety wiąże się z ryzykiem licznych poważnych komplikacji. Zmienność osobnicza w odpowiedzi na egzogenne glikokortykosteroidy może wynikać z różnic w aktywności czynników, które związane są z ich biodostępnością, dystrybucją tkankową i eliminacją. Wskazuje się, że zmiany w sekwencjach genów kodujących białka zaangażowane w odpowiedź na lek, mogą determinować wynik terapii. Na tej podstawie typuje się geny kandydujące związane ze zjawiskiem steroidooporności. Wśród nich zwraca się uwagę na geny, których produkty białkowe związane są z genomowym mechanizmem działania glikokortykosteroidów, angażującym receptor glikokortykosteroidowy czy geny kodujące transportery błonowe, w tym glikoproteinę P. Dokonując korelacji zmian w sekwencjach konkretnych genów z fenotypem steroidooporności, można pozyskać profil genetyczny pacjenta odpowiadającego pozytywnie lub negatywnie na terapię glikokortykosteroidami. Dążenie do rozwoju medycyny spersonalizowanej dałoby szansę na wyeliminowanie zbędnych zabiegów leczniczych związanych często ze skutkami ubocznymi, jak również na zmniejszenie kosztów leczenia.

Głównymi celami niniejszej pracy było:

1. Poszukiwanie genów kandydujących związanych z odpowiedzią na leczenie steroidami, których zmiany w sekwencjach mogą być przydatne w różnicowaniu pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym i wyodrębnieniu wśród nich chorych steroidoopornych oraz steroidowrażliwych w celu zastosowanie odpowiedniej terapii.
2. Określenie przydatności badań nad zmianami w wytypowanych genach w prognozowaniu steroidooporności związanej z idiopatycznym zespołem nerczycowym.

Wyznaczono również następujące cele szczegółowe:

1. Identyfikacja mutacji oraz znanych i opisanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu oraz krótkich powtórzeń tandemowych wytypowanych genów: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1*, *MIF* w grupie pacjentów ze steroidoopornym i steroidowrażliwym zespołem nerczycowym oraz w całej grupie pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym i grupie kontrolnej.
2. Analiza asocjacji pomiędzy częstością występowania genotypów i alleli zidentyfikowanych polimorfizmów wyżej wymienionych genów w grupie pacjentów ze steroidoopornym i steroidowrażliwym zespołem nerczycowym oraz wskazanie ich



- potencjalnego związku ze steroidoopornym fenotypem lub steroidowrażliwym fenotypem.
3. Analiza asocjacji pomiędzy częstością występowania genotypów i alleli zidentyfikowanych polimorfizmów badanych genów w grupie pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym i grupie kontrolnej oraz wskazanie ich potencjalnego związku z idiopatycznym zespołem nerczycowym.
  4. Analiza nierównowagi sprzężeń pomiędzy zidentyfikowanymi polimorfizmami w obrębie wytypowanych genów oraz wygenerowanie bloków haplotypowych w obrębie badanych grup.
  5. Analiza asocjacji pomiędzy częstością haplotypów poszczególnych polimorfizmów wybranych genów w grupie pacjentów ze steroidoopornym oraz steroidowrażliwym zespołem nerczycowym oraz wskazanie ich potencjalnego związku ze steroidoopornym fenotypem lub steroidowrażliwym fenotypem.
  6. Analiza asocjacji pomiędzy częstością haplotypów poszczególnych polimorfizmów genów kandydujących w grupie pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym i grupie kontrolnej oraz wskazanie ich potencjalnego związku z idiopatycznym zespołem nerczycowym.
  7. Analiza nierównowagi sprzężeń haplotypów wszystkich zidentyfikowanych polimorfizmów łącznie w obrębie badanych genów.

## GRUPA BADANA

Grupę badaną stanowiły dzieci rasy kaukaskiej z populacji polskiej (z terenu województwa wielkopolskiego). Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu wyraziła akceptację na przeprowadzenie badań (Uchwała nr 526/12, Załącznik 1). Opiekunowie prawni pacjentów wyrazili pisemną zgodę na przeprowadzenie badań genetycznych, po wcześniejszym poinformowaniu ich o charakterze badań oraz ich celu. Zgoda została udokumentowana w postaci stosownego oświadczenia (Załącznik 2). Dodatkowo wśród pacjentów przeprowadzono ankietę, stworzoną w oparciu o kwestionariusz Prof. Friedhelma Hildebrandta, w celu pozyskania informacji na temat objawów początkowych, wyników laboratoryjnych, wyników biopsji (jeśli była przeprowadzana), podjętego leczenia, występowania schorzeniach współistniejących oraz chorób nerek u rodziców i krewnych dzieci (Załącznik 3).

### 1. Pacjenci

W badaniu uczestniczyło 71 niespokrewnionych pacjentów z ZN hospitalizowanych w Klinice Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozpoznanie ZN nastąpiło w wieku od 3 miesięcy do 16 lat (średnia wieku wyniosła 4,1 lat). Liczba dziewcząt wynosiła 30 (42%), natomiast liczba chłopców 41 (58%). Pacjenci zostali poddani leczeniu steroidami w dawce 2 mg/kg masy ciała, do dawki maksymalnej 2 x 30 mg/kg masy ciała. Na podstawie odpowiedzi pacjentów na leczenie, wyodrębniono dwie grupy: steroidowrażliwi (SW), którzy odpowiedzieli na leczenie w przeciągu 6-8 tygodni i uzyskali remisję białkomoczu już po 2-4 tygodniach, oraz steroidooporni (SO), którzy nie uzyskali remisji w ciągu 8 tygodni.

Na grupę pacjentów ze steroidoopornym zespołem nerczycowym (SOZN) składało się 41 pacjentów, wśród nich 16 dziewcząt (39%) oraz 25 chłopców (61%). Najniższy wiek rozpoznania wynosił 3 miesiące, natomiast najwyższy – 15 lat (średnia 4,1 lat). Z powodu braku pozytywnej odpowiedzi pacjentów na leczenie GKS, u 33 pacjentów wykonano biopsję, u 7 biopsji nie wykonano, u jednego była nieudana biopsja. Badanie histopatologiczne bioptatów nerek pobranych od pacjentów wykonano w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Wśród pacjentów u których wykonano biopsję, dominowały zmiany w postaci mezangialnej proliferacji (MP), ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków nerkowych (FSGS), obecność zmian minimalnych (MCNS), rozproszony rozplam (DMP), obecność zmian minimalnych z cechami niedojrzałości w bioptacie nerki (MCNS, N), zmiany w postaci mezangialnej proliferacji z cechami niedojrzałości w bioptacie nerki (MP, N), błoniasto – rozplamowe kłębuszkowe zapalenie nerek (MPGN), zmiany w postaci mezangialnej proliferacji ze stwardnieniem kłębuszków (MP, GS), MP z przybytkiem, MCNS z przybytkiem oraz DMP z N (Tabela 4). Pierwsza terapia obejmowała leczenie GKS, brak odpowiedzi wymagał

zastosowania innych niesteroidowych leków, wśród nich znalazły się inhibitory kalcyneuryny: cyklosporyna (CsA), mykofenolan mofetylu (MMF), rituximab (Rtx), związki alkilujące: cyklofosfamid (CF) i chlorambucyl, a także zabiegi plazmaferezy (Pf). W wyniku zastosowanego leczenia do remisji doszło u 23 pacjentów (56,1%), w przypadku 4 pacjentów (9,8%) odnotowano kolejny rzut ZN, białkomocz o innej niż nerczycowej etiologii pojawił się u 13 pacjentów (31,7%), natomiast jeden pacjent zmarł z powodu powikłań. Spośród 41 pacjentów z SOZN, u 25 (61%) występowały współistniejące schorzenia. Dodatkowo 14 pacjentów było nosicielami mutacji w genach kodujących kluczowe białka błony filtracyjnej: *NPHS1*, *NP SI*, *WT1*. Tabela 5 zawiera szczegółową charakterystykę grupy pacjentów z SOZN z uwzględnieniem płci, rozpoznania histopatologicznego, zastosowanego leczenia, aktualnego stanu zdrowia, aktualnego wieku, obecności schorzeń współistniejących oraz genetycznego podłoża ZN.

Na grupę ze steroidowrażliwym ZN (SWZN) składało się 30 pacjentów, z czego 14 (47%) - stanowiły dziewczęta, natomiast 16 (53%) - stanowili chłopcy. Minimalny wiek rozpoznania ZN wynosił 18 miesięcy, natomiast maksymalny – 16 lat. Biopsje wykonano tylko w przypadku 10 pacjentów. Decyzje o wykonaniu biopsji uzależnione były od stanu zdrowia pacjenta. Wśród rozpoznań histopatologicznych wyodrębniono: FSGS, MCNS, DMP, MP, MCNS z N, MCNS z rozplemem (Tabela 4). W przypadku 15 pacjentów (50%) jedynym stosowanym lekiem były GKS. Analogicznie do grupy SOZN, oprócz GKS, stosowano również inne niesteroidowe leki, takie jak: CF, CsA, MMF, Rtx. Zastosowanie alternatywnych leków w leczeniu ZN związane było z pojawiającymi się skutkami ubocznymi długotrwałego dawkowania GKS. U 13 pacjentów (43,3%) występowały schorzenia współistniejące. Na skutek leczenia GKS w przypadku 7 pacjentów (23,3%) doszło do steroidozależnego ZN (SZZN), u 27 pacjentów (90,0%) doszło do remisji choroby, u 2 pacjentów (6,7%) odnotowano drugi rzut ZN (6,7%), a u 1 pacjenta (3,3%) pojawił się białkomocz o innej niż nerczycowa etiologii. Spośród 30 pacjentów z SWZN, u 13 (43%) odnotowano współistniejące schorzenia oraz jeden pacjent był nosicielem mutacji w genie kodującym nefrynę – *NPHS1*.

Tabela 6 zawiera szczegółową charakterystykę grupy pacjentów z SWZN z uwzględnieniem płci, rozpoznania histopatologicznego, zastosowanego leczenia, aktualnego stanu zdrowia, aktualnego wieku, obecności schorzeń współistniejących oraz genetycznego podłoża ZN.

**Tabela 4.** Charakterystyka grupy pacjentów z SOZN i SWZN z uwzględnieniem płci, wieku rozpoznania oraz wyniku biopsji.

Liczba pacjentów ze SOZN		41
Płeć Dz/Ch		16 (39%) / 25 (61%)
Wiek rozpoznania	≤ 6 lat	34 (83%)
	> 6 lat	7 (17%)
Wynik biopsji	MP	11 (26,8%)
	FSGS	8 (19,5%)
	MCNS	4 (9,8%)
	DMP	2 (4,9%)
	MCNS, N	2 (4,9%)
	MP, N	1 (2,4%)
	MP, GS	1 (2,4%)
	MP z przybytkiem	1 (2,4%)
	MCNS z przybytkiem	1 (2,4%)
	DMP, N	1 (2,4%)
	MPGN	1 (2,4%)
	Brak biopsji	9 (22,0%)
	Uwagi	1 nieudana biopsja

Liczba pacjentów ze SWZS		30
Płeć Dz/Ch		14 (47%) / 16 (53%)
Wiek rozpoznania	≤ 6 lat	27 (90%)
	> 6 lat	3 (10%)
Wynik biopsji	MCNS, rozplem	1 (3,3%)
	MCNS, N	1 (3,3%)
	nefropatia	1 (3,3%)
	MCNS/MP	1 (3,3%)
	MCNS	7 (23,3%)
	DMP	1 (3,3%)
	MP	1 (3,3%)
	FSGS	1 (3,3%)
	Brak biopsji	20 (66,7%)

Ch – chłopcy, DMP - rozproszony rozplem, Dz – dziewczynki, FSGS - ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków nerkowych, GS – stwardnienie kłębuszków, MCNS - obecność zmian minimalnych, MP - mezangialna proliferacja, MPGN – rozplemowe kłębuszkowe zapalenie nerek, N – cechy niedojrzałości w biopsji nerkowej, SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym

**Tabela 5.** Szczegółowa charakterystyka pacjentów z SOZN.

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie histopatologiczne	Leczenie	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące/Genetyczne podłoże ZN
1.	K77	Dz	N, MP	GKS, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	11 l	cukrzyca typu I, choroba Hashimoto / <i>NPHS1</i> (intron 1)
2.	K94	Ch	MCNS, N	GKS, CF, CsA, MMF	remisja	13 l	osteoporoza, stan po złamaniu kręgow L3 i L4
3.	K100	Ch	MCNS	GKS, CF, CsA	białkomocz	17 l	brak / <i>NPHS1</i> - Ser421Asn, Arg1008Lys
4.	K103	Dz	FSGS	GKS, CF, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	24 l	naczyniak wątroby / <i>NPHS1</i> - Ile183Leu, Asp310Asn
5.	K115	Dz	MP	GKS, CF, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	23 l	brodawczak / <i>NPHS1</i> - Ala423Pro
6.	K119	Dz	FSGS	GKS, CsA	zgon	nie dotyczy	brak / <i>NPHS1</i> - Thr18Ser, intron 1; <i>NPHS2</i> - Arg229Gln
7.	K123	Ch	FSGS	GKS, CF, CsA	remisja	23 l	brak / <i>NPHS1</i> - Val655Met
8.	K128	Ch	-	GKS, CF	białkomocz	8 l	astma oskrzelowa, alergia / <i>NPHS1</i> - Pro227Arg, <i>WT1</i> - Pro257Pro
9.	K132	Ch	-	GKS, CsA	remisja	5 l	SNN, transplantacja / <i>NPHS1</i> - Thr42Arg, Ser1157Phe
10.	K72	Ch	MP, GS	GKS, CF, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	14 l	niskorosłość / <i>WT1</i> - Val303Ile
11.	K162	Ch	MCNS, N	GKS, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	7 l	brak
12.	K98	Ch	MP	GKS, CF, CsA, MMF	białkomocz	22 l	WZW C
13.	K42	Ch	FSGS	GKS, CsA, MMF, Rtx	remisja	18 l	otyłość, niskorosłość
14.	K75	Ch	MP	GKS, CsA, MMF, Rtx	remisja	16 l	padaczka
15.	K82	Dz	MCNS	GKS, CsA, MMF, Rtx	remisja	14 l	brak
16.	K102	Ch	MP	GKS, CsA, MMF, Rtx	ZN	22 l	brak / <i>NPHS2</i> - Val290Met
17.	K108	Ch	MP	GKS, CsA, MMF	remisja	18 l	łuszczyca / <i>NPHS2</i> (intron 7)
18.	K109	Dz	DMP	GKS, CsA, MMF, Rtx	remisja	14 l	łojotokowe zapalenie skóry
19.	K126	Ch	MP	GKS, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	15 l	cukrzyca typu I, choroba Hashimoto / <i>NPHS2</i> (intron 7)
20.	K134	Ch	MP	GKS, CsA, CF, MMF	białkomocz	20 l	SNN, transplantacja / <i>NPHS2</i> (intron 7)
21.	K84	Dz	MPGM	GKS, CsA, MMF, Rtx	białkomocz	22 l	brak
22.	K139	Ch	-	GKS, CF	remisja	6 l	brak / <i>NPHS1</i> - Thr761Ser, Arg1008Lys, Arg1088Gln
23.	K142	Dz	DMP	GKS, CF, CsA, Chlorambucyl, Rtx	remisja	13 l	nawracające infekcje w drogach oddechowych, otyłość
24.	K160	Ch	MP	GKS, CF, CsA	remisja	9 l	brak
25.	K169	Ch	MP	GKS, Chlorambucyl, CsA	remisja	14 l	astma oskrzelowa, ASD II z przeciekami L-P i przerostem prawego przedsionka
26.	K170	Dz	MP	GKS, CF, CsA, rtx	białkomocz	18 l	brak
27.	K175	Ch	nieudana biopsja	GKS	remisja	20 l	zespół krótkiego jelita
28.	K177	Dz	FSGS	GKS, CsA	remisja	13 l	brak
29.	K183	Dz	MCNS	GKS, CsA, CF, Pf	ZN	7 l	brak

**Tabela 5.** (kontynuacja)

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie histopatologiczne	Leczenie	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące/Genetyczne podłoże ZN
30.	K207	Ch	-	GKS, CsA, Pf	remisja	51	stenoza aortalna, stan po udarze niedokrwiennym mózgu
31.	K51	Ch	MP z przybytkiem macierzy	GKS, CF, Chlorambucyl, CsA, Rtx	remisja	171	PChN
32.	K217	Dz	MCNS z przybytkiem macierzy	GKS, CsA	remisja	171	brak
33.	K202	Ch	MP	GKS, CsA, Rtx	remisja	181	nadciśnienie tętn., bradykardia, osteoporoza, II etap PChN
34.	K214	Dz	-	GKS, CsA	ZN	61	ASD II (stan po op.), stan po udarze niedokrwiennym mózgu, trombofilia
35.	K258	Dz	FSGS	GKS, CsA, Pf	ZN	61	brak
36.	K146	Ch	DMP, N	GKS, CF, CsA	remisja	111	choroba Leśniowskiego - Crohna, nadwaga, cytomegalia
37.	K193	Ch	FSGS	GKS, CF, CsA	remisja	181	PChN – stan po transplantacji nerki, choroba Leśniowskiego - Crohna
38.	K199	Dz	FSGS	GKS, CF, CsA, Chlorambucyl, Pf	białkomocz	211	padaczka, upośledzenie umysłowe
39.	K262	Ch	-	GKS, CsA	białkomocz	131	wodogłowie wrodzone, zespół wad wrodzonych, hipoplazja płuca lewego, padaczka
40.	K259	Dz	MCNS	GKS, CF, CsA, Rtx	białkomocz	71	brak
41.	K265	Ch	-	GKS, CF	remisja	41	brak

ASD – ubytek przegrody międzyprzedsionkowej, CF – cyklofosamid, Ch – chłopcy, CsA - cyklosporyna A, DMP - rozproszony rozplam, Dz – dziewczynki, FSGS - ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków nerkowych, GKS – glikokortykosteroidy, GS – stwardnienie kłębuszków, MCNS - obecność zmian minimalnych, MMF – mykofenolan mofetylu, MP - mezangialna proliferacja, MPGN –rozplamowe kłębuszkowe zapalenie nerek, N – cechy niedojrzałości w biopsji nerki, PChN – przewlekła choroba nerek, Pf – plazmafereza, Rtx – rituksimab, SNN – schyłkowa niewydolność nerek, SOZN - pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, WZW C – wirusowe zapalenie wątroby typu C, ZN – rzut zespołu nerczycowego

**Tabela 6.** Szczegółowa charakterystyka pacjentów z SWZN.

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie histopatologiczne	Leczenie	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące/Genetyczne podłoże ZN	Uwagi
1.	K43	Ch	MCNS, rozplem mezangium	GKS, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	9 l	brak	SZZN
2.	K127	Dz	MCNS, N	GKS, CF, CsA, MMF, Rtx	remisja	16 l	niskorosłość, osteoporoza, próchnica	SZZN
3.	K130	Ch	nefropatia toczniowa	GKS, CF, Pf	remisja	21 l	toczeń układowy	
4.	K131	Dz	MCNS	GKS, CF	remisja	8 l	nawracające ZUM / <i>NPHSI</i> – Ser1157Phe	
5.	K133	Ch	-	GKS	remisja	9 l	brak	
6.	K136	Ch	-	GKS, CF, CsA	remisja	8 l	brak	
7.	K168	Ch	MCNS/MP	GKS	remisja	21 l	osteoporoza	
8.	K161	Ch	MCNS	GKS, CF, CsA	remisja	7 l	brak	SZZN
9.	K140	Dz	MCNS	GKS, CF, CsA	remisja	10 l	matka dziecka -SNN, stan po transplantacji nerki	rodzinny ZN
10.	K191	Dz	DMP	GKS, CF, CsA	remisja	13 l	brak	SZZN
11.	K198	Ch	-	GKS, CF, CsA, Rtx	remisja	9 l	brak	SZZN
12.	K254	Ch	MP	GKS, CF	ZN	11 l	krótkowzroczność, stan po ONN w przebiegu ZN	
13.	K256	Dz	-	GKS	remisja	8 l	nadreaktywność oskrzeli o typie atopii	
14.	K101	Dz	-	GKS	remisja	14 l	brak	
15.	K111	Dz	-	GKS, CsA	remisja	7 l	brak	
16.	K154	Dz	MCNS	GKS, CF	remisja	12 l	cytomegalia	
17.	K156	Ch	-	GKS	remisja	11 l	brak	
18.	K179	Dz	-	GKS	remisja	7 l	brak	
19.	K180	Ch	-	GKS	remisja	14 l	stan po op. przepukliny pachwinowej prawostronnej	
20.	K182	Ch	-	GKS	remisja	7 l	brak	
21.	K186	Ch	MCNS	GKS	ZN	7 l	osteopenia	
22.	K189	Dz	-	GKS	remisja	14 l	brak	
23.	K263	Dz	-	GKS	remisja	6 l	brak	
24.	K266	Ch	-	GKS	remisja	7 l	brak	
25.	K267	Ch	MCNS	GKS, CsA	remisja	13 l	choroba Recklinghausena, osteopenia, niskorosłość, nadciśnienie tętnicze	
26.	K269	Dz	-	GKS	remisja	8 l	brak	
27.	K272	Ch	MCNS	GKS, CF, CsA, Rtx	remisja	20 l	cukrzyca typu I	SZZN
28.	K273	Dz	-	GKS	białkomocz	16 l	brak	SZZN

**Tabela 6.** (kontynuacja).

L.p.	Kod pacjenta	Płeć pacjenta	Rozpoznanie histopatologiczne	Leczenie	Aktualny stan kliniczny	Aktualny wiek	Schorzenia współistniejące/Genetyczne podłoże ZN	Uwagi
29.	K279	Ch	-	GKS	remisja	81	brak	
30.	K280	Dz	FSGS	GKS, CF	remisja	171	niskorosłość, osteoporoza, próchnica	

CF – cyklofosfamid, Ch – chłopcy, CsA - cyklosporyna A, DMP - rozproszony rozplam, Dz – dziewczynki, FSGS - ogniskowe segmentalne szkliwienie kłębuszków nerkowych, GKS – glikokortykosteroidy, MCNS - obecność zmian minimalnych, MMF – mykofenolan mofetylu, MP - mezangialna proliferacja, N – cechy niedojrzałości w biopsji nerki, ONN – ostra niewydolność nerek, Pf – plazmafereza, Rtx – rituksimab, SNN – schyłkowa niewydolność nerek, SWZN - pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym, ZN – rzut zespołu nerczycowego, ZUM – zakażenia układu moczowego



## **2. Grupa kontrolna**

Grupę kontrolną stanowiło 30 dzieci niespokrewnionych ze sobą w wieku od 4 do 18 lat (średnia wieku - 9,7 lat), w tym dziewczynki – 11 (37%) oraz chłopcy – 19 (63%). Pacjenci byli hospitalizowani na Oddziale Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w celu przeprowadzenia zabiegu wycięcia migdałków. Opiekunowie dzieci wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniach, po uprzednim poinformowaniu o ich charakterze oraz celu (Załącznik 2, analogiczne jak w przypadku grup pacjentów). U dzieci z grupy kontrolnej na podstawie przeprowadzonych ankiet wyeliminowano obecność schorzeń nefrologicznych bezpośrednio u nich, jak również wśród członków ich rodzin (Załącznik 4).

W związku z ochroną danych osobowych, pozyskany materiał biologiczny zarówno od grup badanych, jak i grupy kontrolnej, kodowano odpowiednimi oznaczeniami, którymi posługiwano się przez cały czas trwania analiz.

# MATERIAŁY I METODY

## 1. Materiały

### 1.1. Aparatura

Nazwa sprzętu (model)	Firma
Aparat do sekwencjonowania (Genetic Analyzer ABI Prism 3130)	Applied Biosystems
Aparat do elektroforezy poziomej (Mupid <sup>®</sup> -One)	TaKaRa
Autoklaw Classic (Standard)	Prestige Medical
Cieplarka (Seria BD)	BINDER
Elektroniczna waga laboratoryjna (WPE 30)	Radwag
Mieszadło wirowe (MS 3 basic)	IKA
Mikrowirówka (Mini Spin, speed x1000)	Eppendorf
Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000)	ThermoScientific
pH-metr (Accumet Basic)	Fisher Scientific
Pipety (Research Plus)	Eppendorf
System dokumentacji żeli (Gel Doc-It <sup>™</sup> )	UVP
Termocykler (Veriti <sup>®</sup> Thermal Cycler)	Applied Biosystems
Termomikser (Thermomixer Comfort)	Eppendorf
Wirówka (Centrifuge 5810R)	Eppendorf

### 1.2. Odczynniki

Odczynnik	Nr katalogowy
Alkohol etylowy, bezwodny, 99,8% (POCH)	396480111
Agaroz (Lab Empire)	AGA001.500
Bromek etydyny (roztwór 10 mg/ml) (Sigma)	E1510
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O (Sigma)	E0399
Formamid (Hi-Di Formamide) (Applied Biosystems)	4311320
Kwas borowy (Sigma)	B7901
Polimer (POP-7 Polymer for 3130) (Applied Biosystems)	4363785
Polimer (POP-4 Polymer for 3130) (Applied Biosystems)	4363752
Standard wielkości DNA (GeneScan 600 LIZ) (Applied Biosystems)	4408399
Tris Base (Sigma)	T-6066
Woda wolna od nukleaz (Ambion)	AM9930
Wodorotlenek sodu (NaOH) (POCH)	czda-810925112

Płytki do oczyszczania produktu PCR (MultiScreen – PCR <sub>96</sub> Filter Plate) (Merck Millipore)	MSNU03010
Płytki do reakcji sekwencjonowania (MicroAmp Optical Reaction Plate) (Applied Biosystems)	N8010560

### 1.3. Roztwory i bufony

Roztwór	Nr katalogowy
Alkohol etylowy 70%	
Bufor EDTA 10x (Applied Biosystems)	402824
Bufor obciążający 6x (Fermentas)	R0611
BigDye Terminator 5x Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)	4337455
- Bufor BD (BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer) (Applied Biosystems)	4336697
- BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)	4336911
FastStart Taq DNA Polymerase dNTPack 5U/μl (Roche)	04738381001
- Bufor GC (GC-Rich Solution 5x) (Roche)	10939000
- Bufor +MgCl <sub>2</sub> (PCR buffer 10x, with MgCl <sub>2</sub> ) (Roche)	11441400
- dNTP (PCR Grade Nucleotide Mix, 10 mM) (Roche)	13154900
- Polimeraza (Fast Start Taq DNA Polymerase, 1000 U) (Roche)	13539700
Marker DNA (Gene Ruler 1 kb DNA ladder 0,5 μg/μl) (Fermentas)	SM0311

#### Bufory

##### 0,5 M EDTA (pH=8,0)

Składniki	na litr
EDTA	186,1 g
NaOH	20 g
Woda destylowana	do 1000 ml

##### 125 mM EDTA

Składniki	na 15 ml
Woda wolna od nukleaz	11,25 ml
0,5 M EDTA	3,75 ml

**Bufor 10x TBE (pH=7,4)**

Składniki	na litr
Tris	108 g
Kwas borowy	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml
Woda destylowana	do 1000 ml

**Bufor 1x TBE**

Składniki	na litr
Woda destylowana	900 ml
Bufor 10x TBE	100 ml

**1.4. Zestawy komercyjne**

Zestaw do izolacji DNA z krwi (QIAamp DNA Mini Kit 250)	QIAGEN	51106
--	--------	-------

Odczynniki	Nr katalogowy
Bufor elucyjny AE	1014591
Bufor lizujący	1014604
Bufor płuczący AW1	1014795
Bufor płuczący AW2	1014577
Proteinaza K	1045099
Kolumny QIAamp Spin	
Probówki odbierające 2 ml	

**1.5. Żel agarozowy**

1,5% żel agarozowy (100 ml)

Składniki	na 100 ml
Agaroza	1,5 g
Bufor 1x TBE	100 ml
Bromek etydyny (10 mg/ml)	5 $\mu$ l

## 1.6. Programy

Programy wykorzystywane do analizy wyników:

- EH Program (*Estimating Haplotype – frequencies*)
- FASTA serwer Uniwersytetu Virginia
- GraphPad Prism (wersja 5)
- HaploView (wersja 4.2)
- Peak Scanner Software (wersja 1.0)
- PHASE (wersja 2.1)
- Sequencing Analysis (wersja 5.2)

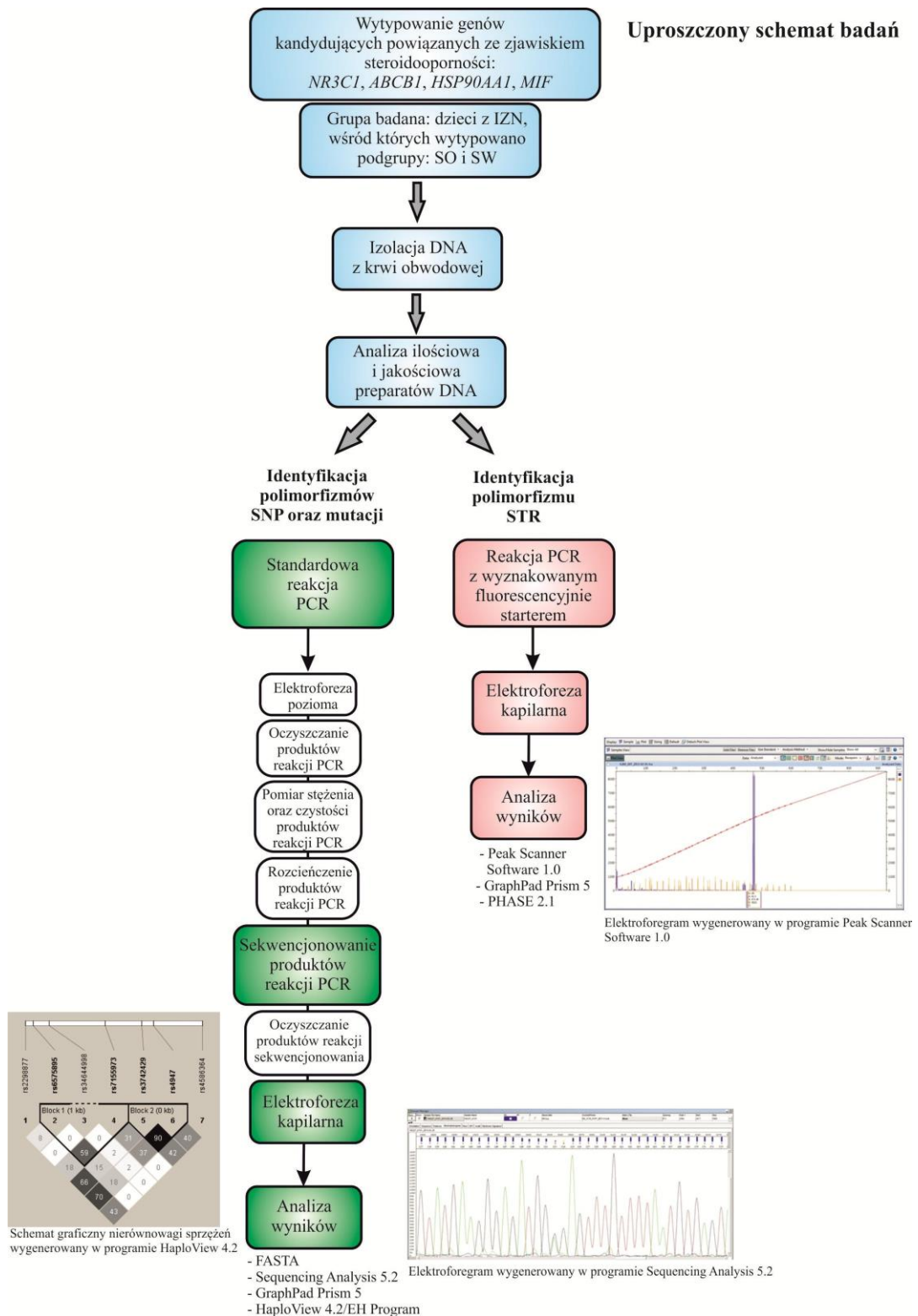
## 1.7. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiła krew obwodowa pobrana podczas rutynowych badań od pacjentów zaliczonych do grup badanych i grupy kontrolnej, odpowiednio na Oddziale Kardiologii i Nefrologii Dziecięcej oraz Oddziale Otolaryngologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Krew pobierana była do próbek typu monoweta ze złożem EDTA. Wyizolowany DNA przechowywano w temperaturze -20°C w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

## 2. Metody

Analizy laboratoryjne zostały przeprowadzone w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Badaniu poddano następujące geny: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF* (Tab. 7), a schemat postępowania przedstawiono na rycinie 14.



**Rycina 14.** Ogólny schemat badań; IZN – idiopatyczny zespół nerczycowy, PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy, SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, STR – krótkie powtórzenia tandemowe, SO – steroidooporny, SW – steroidowrażliwy.

**Tabela 7.** Charakterystyka badanych genów w oparciu o bazy danych NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), Ensembl, SNPper (*CHIP Bioinformatics Tools*).

Gen	ID wg NCBI	Sekwencja genu wg Ensembl	Lokalizacja na chromosomie	Struktura genu analizowanego transkryptu	Transkrypt	Kodowane białko	Analizowane fragmenty	Kodowane białko	Wielkość białka (aa)
<i>NR3C1</i>	2908	ENSG00000113580	5q31.3	9 eksonów (1. ekson niekodujący)	NM_000176.2	NP_000167	Odcinki kodujące oraz około 100 - 200 nukleotydowe odcinki flankujące odcinków kodujących	GR $\alpha$	777
				9 eksonów (1. ekson niekodujący)	NM_001020825.1	NP_00101866.1	Odcinki kodujące oraz około 100 - 200 nukleotydowe odcinki flankujące odcinków kodujących	GR $\beta$	742
<i>ABCBI (MDR1)</i>	5243	ENSG00000085563	7q21.12	29 eksonów, (1. ekson niekodujący)	NM_000927.4	NP_000918.2	Odcinki kodujące oraz około 100 - 200 nukleotydowe odcinki flankujące odcinków kodujących	P-gp	1280
<i>HSP90AA1</i>	3320	ENSG00000080824	14q32.33	11 eksonów, (1. ekson niekodujący)	NM_005348.3	NP_00533.9	Odcinki kodujące oraz około 100 nukleotydowe odcinki flankujące odcinków kodujących	Hsp90 $\alpha$ izoforma 2	732
<i>MIF</i>	4282	ENSG00000240972	22q11.23	3 eksony	NM_002415.1	NP_002406.1	Odcinki kodujące oraz około 100 - 200 nukleotydowe odcinki flankujące, rejon 5'UTR, rejon promotorowy oraz rejon 3'UTR	MIF	115

## 2.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej

Izolacja DNA z krwi pacjentów grupy badanej oraz kontrolnej została przeprowadzona zgodnie z protokołem załączonym do zestawu QIAamp DNA Mini Blood (QIAGEN). Izolacja opierała się o system kolumnowy z krzemionkowym złożem. Wszystkie etapy izolacji zostały przeprowadzone w temperaturze pokojowej.

Na dno pustej probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodawano 20 µl proteiny K oraz 200 µl krwi obwodowej i 200 µl buforu lizującego AL. Całość dokładnie mieszano przez około 15 sekund za pomocą mieszadła wirowego. W celu lizy erytrocytów i białek związanych z DNA, probówkę umieszczano w bloku grzejnym w temperaturze 56°C na 10 minut. Widok brunatno-zielonej mieszaniny świadczył o prawidłowo przeprowadzonej lizie. W celu usunięcia mieszaniny z wieczka, probówkę wirowano przez kilka sekund w mikrowirówce. Następnie dodawano 200 µl czystego alkoholu o stężeniu 96 - 100% i mieszano przez worteksowanie przez 15 sekund. Ponownie, w celu usunięcia mieszaniny z wieczka, wirowano probówkę przez kilka sekund w mikrowirówce. Całość przenoszono pipetą na złożę kolumny QIAamp Spin umieszczonej w probówce odbierającej. Próby umieszczano w wirówce i wirowano przy szybkości 8000 rpm przez 1 sekundę. DNA wiązało się ze złożem krzemionkowym, natomiast rozpuszczalnik przenikał przez nie do probówki odbierającej. Po zakończeniu wirowania kolumny umieszczano w nowych probówkach odbierających. W celu usunięcia zanieczyszczeń ze złoża, na kolumnę do izolacji nakładano 500 µl buforu płuczającego AW1 i wirowano przy prędkości 8000 rpm przez 1 sekundę. Ponownie, po zakończeniu wirowania, kolumnę umieszczano w nowej probówce odbierającej. Złoże przepłukiwano nakładając na kolumnę 500 µl buforu płuczającego AW2 oraz wirując przy prędkości 14000 rpm przez 3 minuty. Kolumnę przenoszono do nowej probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml. Następnie na dno kolumny nakładano 200 µl buforu wymywającego AE oraz inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po tym czasie próby wirowano przy prędkości 8000 rpm przez minutę. Na skutek zmiany pH złoża krzemionkowego dochodziło do wymycia związanego z nim DNA. Zawartość probówki typu Eppendorf stanowiło DNA, będące materiałem wyjściowym do dalszych analiz, bez konieczności oczyszczania. Próby przechowywano w temperaturze -20°C.

## 2.2. Analiza ilościowa i jakościowa preparatów DNA

Pomiar stężenia i czystości wyizolowanego DNA przeprowadzono za pomocą spektrofotometru Nano-Drop ND-1000 (ThermoScientific). Czystość oceniano na podstawie stosunku wartości absorbancji mierzonej przy długości fali elektromagnetycznej 260 nm (maksimum absorpcji dla DNA) do 280 nm (maksimum absorpcji dla białek). Wartość 1,5 tego stosunku oznacza, że w preparacie DNA zawarte jest 50% białka. O wysokiej czystości DNA stanowi wartość stosunku zawarta w przedziale 1,8 – 2,0.

Pomiar rozpoczynano od naniesienia na punkt pomiarowy 1 µl wody wolnej od nukleaz firmy Ambion, w celu kalibracji urządzenia. Następnie usuwano kroplę wody za pomocą ligniny



i nakładano 1  $\mu\text{l}$  rozpuszczalnika – buforu elucyjnego AE, w którym zawieszono izolat DNA. W ten sposób wykonano ślepą, zerową próbę w celu ustalenia wielkości tła pomiaru. Po przetarciu ligniną punktu pomiarowego nakładano po 1  $\mu\text{l}$  izolatu DNA i odczytywano wartości stężeń w  $\text{ng}/\mu\text{l}$  oraz stosunek A260/A280, odzwierciedlający czystość badanych prób.

### 2.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy

Reakcja łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) została przeprowadzona w celu powielenia (amplifikacji) docelowych fragmentów badanych genów. Na mieszaninę reakcyjną składały się: woda wolna od nukleaz, bufor reakcyjny z jonami  $\text{Mg}^{2+}$ , mieszanina trifosforanów deoksynukleotydów (dNTP), mieszanina specyficznych starterów w obydwu orientacjach (ang. *forward* i *reverse*) komplementarnych do sekwencji docelowych, bufor GC oraz polimeraza FastStart Taq. Do dołków płytek 96-dołkowych naniesiono po 10,5  $\mu\text{l}$  mieszaniny reakcyjnej, a następnie dodawano po 2  $\mu\text{l}$  genomowego DNA badanych grup. Dodatkowo wykonywano kontrolną próbę negatywną, w której zamiast DNA dodawano 2  $\mu\text{l}$  wody wolnej od nukleaz, w celu potwierdzenia czystości stosowanych odczynników. Końcowa całkowita objętość mieszaniny wynosiła 12,5  $\mu\text{l}$ . Tabela 8 przedstawia spis składników mieszaniny do reakcji PCR z uwzględnieniem stężeń początkowych, końcowych oraz zastosowanych objętości na próbę.

Sekwencje starterów stosowane w reakcji PCR zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer3 v.0.4.0, dostępnego na stronie internetowej: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Syntezę oligonukleotydów zlecono Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, przez serwis [www.oligo.pl](http://www.oligo.pl). Startery otrzymywano w formie liofilizatu, który rozpuszczano w odpowiedniej objętości wody wolnej od nukleaz w celu uzyskania stężenia końcowego 100  $\mu\text{M}$ .

**Tabela 8.** Skład mieszaniny do reakcji PCR.

Skład mieszaniny do reakcji PCR			
Składnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe	Objętość/próbę [ $\mu\text{l}$ ]
H <sub>2</sub> O	-	-	5,53
Bufor z MgCl <sub>2</sub>	10x	1x	1,25
dNTP	10 mM	0,48 mM	0,6
Startery F+R	12,5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$	0,5
Bufor GC	5x	1x	2,5
Polimeraza FastStart Taq	5 U/ $\mu\text{l}$	0,048 U/ $\mu\text{l}$	0,12
DNA	20 - 150 ng/ $\mu\text{l}$	3,2 - 24 ng/ $\mu\text{l}$	2
Całkowita objętość reakcji	-	-	12,5

Startery zaprojektowano dla każdego eksonu z uwzględnieniem około 100-200 nukleotydowych fragmentów flankujących. Dłuższe odcinki (powyżej 500-700 nukleotydów), dzielono na mniejsze fragmenty. W przypadku genu *MIF* w oparciu o dane literaturowe,

dotatkowo wzięto pod uwagę regiony: 5'UTR, promotor genu oraz 3'UTR. Dla eksonu 6 genu *HSP90AA1* z powodu trudności w zaprojektowaniu starterów, zastosowano sekwencje z bazy Probe dostępnej na stronie NCBI. Numeracja eksonów odpowiadała tym obecnym w bazach: Ensembl oraz SNPper, jedynie w przypadku genu *ABCBI* zastosowano numerację w oparciu o dane literaturowe, które wskazywały na rozpoczęcie numeracji od eksonu kodującego białko, w celu ujednolicenia interpretacji wyników. W załączniku 5 w tabelach 9, 10, 11, 12 zamieszczono nazwy i sekwencje zastosowanych starterów dla odpowiednich regionów, temperatury i czas przyłączania starterów oraz wielkość uzyskanych produktów PCR dla poszczególnych fragmentów badanych genów.

W załączniku 6 w tabelach 13, 14, 15, 16 zestawiono temperatury ( $T_m$ ), czasy przyłączania starterów (sek) oraz liczbę cykli amplifikacji dla poszczególnych fragmentów analizowanych genów.

Wszystkie reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze Veriti® (Applied Biosystems). Tabela 17 przedstawia zastosowany profil termiczny dla wszystkich reakcji. Różnice dotyczyły temperatur ( $x^{\circ}\text{C}$ ) oraz czasów ( $y$  sek) przyłączania starterów dla poszczególnych fragmentów genów.

**Tabela 17.** Ogólny wzór profilu termicznego reakcji PCR dla badanych genów, różnice dotyczyły temperatur oraz czasu przyłączania starterów;  $x^{\circ}\text{C}$  - temperatura przyłączania startera,  $y$  sek - czas przyłączania startera.

Wstępna denaturacja	Denaturacja	Przyłączanie starterów	Elongacja	Liczba cykli	Amplifikacja
94°C/4 min	95°C/30 sek	$x^{\circ}\text{C}/y$ sek	72°C/60 sek	35 cykli	72°C/7 min

## 2.4. Elektroforeza pozioma

W celu dokonania wizualnej analizy ilościowej i jakościowej produktów zastosowano elektroforezę poziomą. Przygotowano 1,5% żel agarozowy z dodatkiem 1,5 $\mu\text{l}$  bromku etydy (EtBr) umożliwiającym detekcję rozdzielanych produktów w świetle UV. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 100V w aparacie Mupid®-One (TaKaRa) w buforze 1x TBE. Do kieszonek nakładano mieszaninę pozyskanego produktu w reakcji PCR i buforu obciążającego (6x Loading Dye). Dodatkowo na żel nakładano marker DNA (Gene Ruler 1kb DNA Ladder), pozwalający na oszacowanie wielkości rozdzielanych produktów. Tabela 18 przedstawia skład mieszaniny rozdzielanej w żelu agarozowym.

**Tabela 18.** Skład mieszaniny nakładanej na żel agarozowy dla markera wielkości oraz próby badanej.

	Odczynnik	Objętość
<b>Marker wielkości</b>	H <sub>2</sub> O	9,5 $\mu\text{l}$
	Marker DNA	0,5 $\mu\text{l}$
	Bufor obciążający 6x	2 $\mu\text{l}$
		12 $\mu\text{l}$ /kieszonkę
<b>Próba badana</b>	H <sub>2</sub> O	8 $\mu\text{l}$
	Bufor obciążający 6x	2 $\mu\text{l}$
	Produkt reakcji PCR	2 $\mu\text{l}$
		12 $\mu\text{l}$ /kieszonkę

## 2.5. Oczyszczanie produktów reakcji PCR

Po weryfikacji produktów reakcji PCR na żelu agarozowym, oczyszczono je z wolnych, niewykorzystanych składników reakcji, takich jak: startery czy dNTP, które mogłyby zaburzać reakcje sekwencjonowania. Oczyszczanie zostało przeprowadzone na płytkach 96-dołkowych MultiScreen-PCR<sub>96</sub> Filter Plate (Merck Millipore). Dołki tych płytek wyposażone są w specjalne membrany o punkcie odcięcia 100 pz, co znaczy, że zatrzymują na swojej powierzchni właściwe produkty reakcji PCR, natomiast krótsze produkty swobodnie przenikają. Ponieważ do oceny na żelu agarozowym wykorzystano 2µl z całkowitej objętości produktu reakcji PCR, procesowi oczyszczania poddawano pozostałe 10,5µl. Do takiej objętości produktu dodawano 200µl wody wolnej od nukleaz, a następnie kilkakrotnie mieszano za pomocą pipety wielokanałowej. Całość przenoszono na płytkę 96-dołkową MultiScreen-PCR<sub>96</sub> Filter Plate, a następnie wirowano przy prędkości 800×g przez około 10 minut w temperaturze pokojowej, w celu usunięcia cząsteczek DNA mniejszych niż 100 pz. Po wirowaniu w celu wypłukania oraz rozpuszczenia osadzonych na membranie produktów, dodawano po 20µl wody wolnej od nukleaz. Całość przenoszono do probówek typu Eppendorf o pojemności 200µl lub na płytkę 96-dołkową.

## 2.6. Pomiar stężenia oraz czystości oczyszczonych produktów reakcji PCR

Oczyszczone produkty reakcji PCR również poddano ocenie jakościowej oraz ilościowej za pomocą spektrofotometru Nano-Drop ND-1000 na drodze pomiaru spektrofotometrycznego. Pomiar został przeprowadzony analogicznie do analizy jakościowej i ilościowej preparatów DNA wyizolowanych z krwi obwodowej grup badanych oraz grupy kontrolnej. Dodatkowo dokonywano pomiaru próby negatywnej, na którą składała się próba, w której zamiast 2µl DNA dodawano 2µl wody wolnej od nukleaz. Tym samym w mieszaninie znajdowały się niezwiązane produkty reakcji, takie jak startery czy dNTP-y. Wynik pomiaru próby negatywnej odejmowano od wyniku uzyskanego dla prób badanych. W ten sposób otrzymywano pozbawiony tła, właściwy wynik otrzymanych fragmentów.

## 2.7. Rozcieńczenie produktów reakcji PCR

Pozyskane wyniki pomiaru stężenia i czystości prób badanych były niezbędne w celu oszacowania właściwego stężenia matrycy wykorzystywanej do reakcji sekwencjonowania. Stężenia były różne dla poszczególnych odcinków badanych genów, co wynikało z ich długości (ilość par zasad). Właściwe stężenia prób uzyskiwano rozcieńczając je odpowiednią ilością wody wolnej od nukleaz. W załączniku 7 w tabelach 19 i 20 zestawiono stężenia docelowe poszczególnych odcinków badanych genów zastosowane w reakcji sekwencjonowania odpowiednio dla genów: *NR3C1* i *ABCB1* oraz *HSP90AA1* i *MIF*.

## 2.8. Sekwencjonowanie produktów reakcji PCR

Powielone w reakcji PCR poszczególne fragmenty badanych genów poddano analizie pod kątem składu nukleotydowego w celu identyfikacji potencjalnych mutacji oraz polimorfizmów. Sekwencjonowanie produktów przeprowadzono klasyczną metodą terminacji łańcucha (metoda Sanger), przy użyciu znakowanych terminatorów – dideoksynukleotydów (ddNTP). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły następujące odczynniki:

- 1) matryca – oczyszczone DNA badanych prób o odpowiednim stężeniu (Załącznik 7, Tabele 19 i 20)
- 2) starter do sekwencjonowania (Załącznik 8, Tabela 21) – jeden z dwóch starterów wykorzystanych w pierwszej reakcji PCR (*forward* lub *reverse*); jeden, ponieważ celem było uzyskanie jednej nici DNA,
- 3) Big Dye Terminator 5x Cycle Sequencing Kit, na który składały się: Big Dye Terminatorv3.1 Ready Reaction Mix, zawierający termostabilną polimerazę DNA, bufor Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer oraz wolne trifosforany deoksynukleotydów (dNTP) i odpowiadające im znakowane fluorescencyjnie trifosforany dideoksynukleotydów (ddNTP), które zamiast grupy hydroksylowej (-OH) przy węglu C3 pozwalającej na przyłączanie kolejnego nukleotydu do wydłużanego łańcucha DNA, zawierają jedynie atom wodoru, co skutkuje tym, iż w momencie przyłączenia ddNTP do nowosyntetyzowanego łańcucha DNA, synteza łańcucha zostaje przerwana,
- 4) woda wolna od nukleaz.

Skład mieszaniny zastosowany do reakcji sekwencjonowania z uwzględnieniem stężeń początkowych, końcowych oraz pobieranych objętości odczynników na próbę przedstawia tabela 22.

**Tabela 22.** Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania.

Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania			
Składnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe	Objętość/próbę [μl]
H <sub>2</sub> O	-	-	6,8
Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer	5x	0,5 x	1
Specyficzny starter	12,5 μM	1,25 μM	1
Big Dye Terminatorv3.1 Ready Reaction Mix	100x	2x	0,2
Oczyszczony produkt reakcji PCR	w zależności od fragmentu		1
<b>Całkowita objętość reakcji</b>	-	-	10

Reakcje sekwencjonowania były przeprowadzone na płytkach 96-dołkowych MicroAmp Optical Reaction Plate (Applied Biosystems) w objętości 10 μl mieszaniny reakcyjnej/próbę/dołek z wykorzystaniem termocyklera Veriti® Thermal Cyler (Applied Biosystems). Do wszystkich analizowanych fragmentów zastosowano jednolity program amplifikacji (Tabela 23). W każdym cyklu reakcji, na matrycy DNA, syntetyzowane są nici

komplementarne w oparciu o wbudowywanie dNTP z pewną częstością do rosnącego łańcucha komplementarnego. W momencie wbudowania komplementarnego wyznakowanego ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), synteza łańcucha zostaje przerwana. Na tej podstawie uzyskuje się mieszaninę fragmentów wyznakowanych różnymi barwnikami fluorescencyjnymi, którą po oczyszczeniu poddaje się rozdzielaniu w żelach sekwencyjnych.

**Tabela 23.** Ogólny wzór profilu termicznego reakcji sekwencjonowania.

Wstępna denaturacja	Denaturacja	Przyłączanie starterów	Elongacja	Liczba cykli
96°C/1 min	96°C/10 sek	52°C/5 sek	60°C/4 sek	25 cykli

## 2.9. Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania

Proces oczyszczania produktów reakcji sekwencjonowania ma na celu usunięcie pozostałości mieszaniny reakcyjnej, w tym: niewykorzystanych starterów czy wyznakowanych ddNTP, jako że mogłyby one zaburzać odczyt sekwencji badanego DNA z powodu wprowadzanej tła. W tym celu do produktów reakcji sekwencjonowania na płytkach 96-dołkowych dodawano 125mM roztwór EDTA (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*), po 2,5µl na dno każdego dołka. EDTA jest związkiem chelatującym wiele jonów metali, które są kofaktorami enzymów, w tym DNaz, w związku z czym chroni DNA przed enzymatyczną degradacją. Następnie dodawano po 30µl 99,8% etanolu o temperaturze pokojowej w celu precipitacji DNA. Całość mieszano poprzez 4-krotne pipetowanie. Następnie prowadzono inkubację bez dostępu światła w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Był to zabieg niezbędny, mający uchronić próby przed dużymi dawkami światła, a tym samym przed zbyt szybkim rozpadem fluorochromów związanych z ddNTP. Następnie próby wirowano przy prędkości 4150rpm przez 30 minut w temperaturze 4°C. W wyniku wirowania, na dnie dołków znajdowały się wytrącone produkty sekwencjonowania, natomiast na supernatant składały się zbędne składniki mieszaniny reakcyjnej, które zlewano. Osad przemywano poprzez dodawanie do każdego dołka po 30µl 70% etanolu o temperaturze pokojowej i wirowanie przy prędkości 3150rpm przez 15 minut w temperaturze 4°C i ponownie zlewano mieszaninę z dna osadu. W celu dokładnego usunięcia resztek etanolu, płytkę wirowano w pozycji odwróconej na ligninie przez kilka sekund. Do osuszonych osadów dodawano po 15µl 100% formamidu, a następnie produkty denaturowano przez 3 minuty w temperaturze 96°C w celu uzyskania pojedynczych nici DNA. Po upływie wyznaczonego czasu denaturacji, płytkę od razu umieszczano na bloku chłodzącym w celu zatrzymania tego procesu. Całość wirowano przez kilka sekund, co miało prowadzić do osadzenia kropel mieszaniny na dnie dołków. Uzyskana mieszanina wyznakowanych fragmentów była poddawana rozdzielaniu elektroforetycznemu.

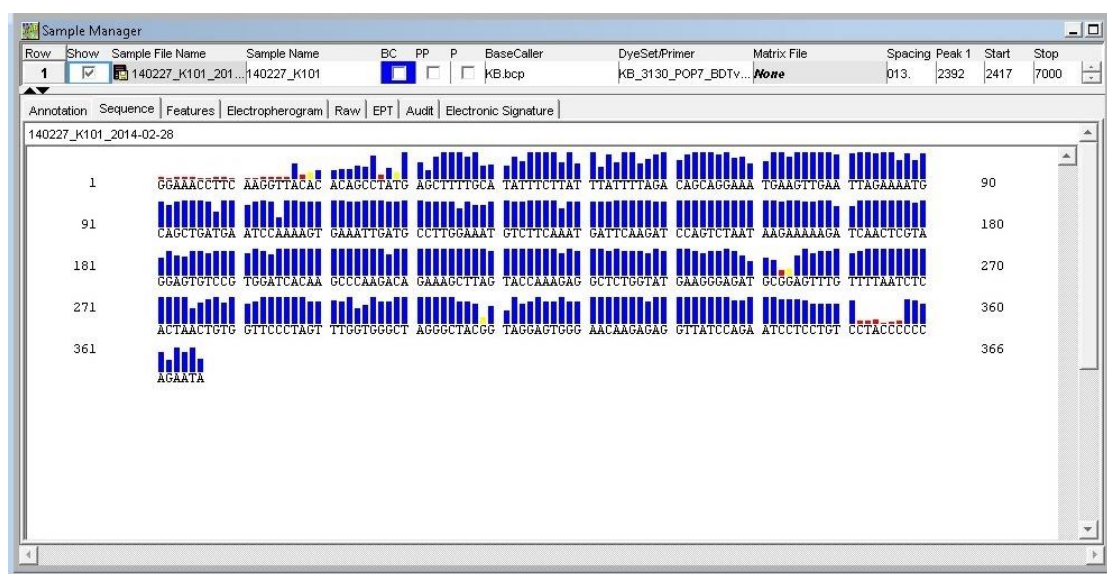
## 2.10. Rozdział elektroforetyczny produktów sekwencjonowania

Pozyskaną mieszaninę produktów reakcji sekwencjonowania rozdzielano w automatycznym analizatorze ABI Prism 3130 (Applied Biosystems), przy dobraniu odpowiednich parametrów

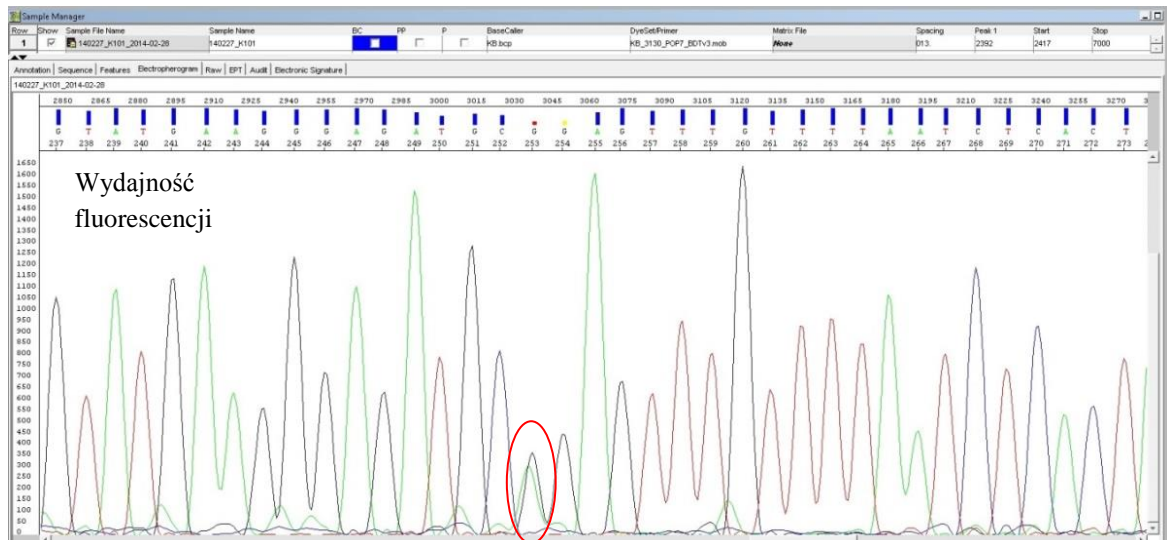
uwzględniających typy wykorzystywanych do sekwencjonowania odczynników oraz oczyszczania. Zasada rozdziału opierała się o elektroforezę kapilarną znakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA wraz z jednoczesną detekcją kolejno ułożonych nukleotydów. Elektroforezę przeprowadzono w cienkich kapilarach o długości 36 cm w żelu POP-7 będącym polimerem o właściwościach poliakryloamidu. Wyznakowane fluorescencyjnie fragmenty DNA migrowały przez okienko lasera, który emitował fale o długościach odpowiadających maksimum absorpcji zastosowanych barwników fluorescencyjnych. Światło lasera wzbudzało fluorescencję, a sygnał ten był rejestrowany przez kamerę i przekazywany dalej do komputera. W komputerze sygnał był dodatkowo przetwarzany i zapisywany w postaci plików w formacie .fsa, które zawierały odczyt sekwencji DNA.

## 2.11. Analiza wyników sekwencjonowania

Uzyskane dane analizowano za pomocą programu odczytującego sekwencje – SequencingAnalysis v. 5.2 (Applied Biosystems). Program umożliwił odczyt sekwencji zarówno w formie tekstowej, jak i w postaci pików w elektroforegramu. Obraz pików pozwalał na dodatkową weryfikację jakości pozyskanego sygnału fluorescencyjnego. Przykładowy odczyt sekwencji w formie pliku tekstowego przedstawia rycina 15. Rycina 16 natomiast przedstawia odczyt sekwencji w formie pików. Odczyt sekwencji w formie pliku tekstowego zawierał bloki zawierające po 10 nukleotydów. Nad każdym nukleotydem znajdował się słupek o odpowiednim kolorze i wysokości, co dawało informacje o jakości sygnału. Dobra jakość odczytu obrazowana była przez słupki wysokie oraz niebieskie, natomiast gorsza jakość odczytu przez słupki niskie oraz żółte (średnia jakość odczytu) lub czerwone (słaba jakość odczytu). Kolory żółty i czerwony wynikały ze słabego sygnału fluorescencyjnego lub były związane z nakładaniem się kilku sygnałów o tej samej długości, co jest charakterystyczne dla układów heterozygotycznych.



Rycina 15. Obraz wyniku sekwencjonowania w formie tekstowej (pacjent K101).



**Rycina 16.** Obraz wyniku sekwenjonowania z układem heterozygotycznym (w czerwonym owalu) w postaci pików – elektroforegram (pacjent K101).

Otrzymane sekwencje poddano analizie pod kątem zmian o charakterze mutacji, jak również zmian polimorficznych SNP oraz nowych zmian punktowych w sekwencji DNA. Analizie poddawano amplifikowane fragmenty poszczególnych genów.

## 2.12. Analiza mutacji

W celu identyfikowania potencjalnych mutacji w badanych fragmentach poszczególnych genów, pozyskane sekwencje porównywano z sekwencjami referencyjnymi z ogólnodostępnej bazy danych NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Porównania dokonywano poprzez wprowadzenie sekwencji do ogólnodostępnego programu FASTA ([www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta\\_www2/fasta\\_list2.shtml](http://www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_list2.shtml)).

Zidentyfikowane zmiany w sekwencji genu poddawano charakterystyce pod kątem lokalizacji w sekwencji genu oraz jej typu i wpływu na sekwencję polipeptydową białka w oparciu o narzędzie CCDS (ang. *consensus coding sequence*) z baz danych NCBI dostępnego na stronie internetowej [www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi).

## 2.13. Analiza polimorfizmów SNP

Identyfikacja i analiza polimorfizmów była analogiczna jak w przypadku mutacji. Informacje na temat polimorfizmów zaczerpnięto z baz danych, takich jak:

- dbSNP NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)),
- SNPper ([www.snpper.chip.org](http://www.snpper.chip.org)),
- Ensembl ([www.ensembl.org/index.html](http://www.ensembl.org/index.html)).

Uzyskane dla poszczególnych grup badanych wyniki zestawiano w programie Microsoft Office Excel. Tabele zawierały genotypy dla poszczególnych polimorfizmów zidentyfikowanych w obrębie badanych genów.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono częstości występowania genotypów oraz alleli dla poszczególnych grup badanych (SOZN, SWZN, IZN, grupa kontrolna). Dla wszystkich polimorfizmów sprawdzono czy rozkład genotypów jest zgodny z prawem równowagi Hardy'ego-Weinberga (ang. *Hardy-Weinberg Equilibrium*, HWE) wykorzystując ogólnodostępny kalkulator Michael H. Court'a (2005–2008), który można znaleźć na stronie internetowej: [www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls](http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls).

Badanie polimorfizmów oparto o model asocjacyjny CCS, porównując częstości alleli i genotypów między grupami (SOZN vs SWZN oraz IZN vs grupa kontrolna). Zakładając, że analizie poddawano polimorfizm SNP bialleliczny z allelami A i B (gdzie allel B jest potencjalnym allelem ryzyka), możliwe było wystąpienie genotypów: AA, AB i BB. W celu poszukiwania związku pomiędzy genotypem a fenotypem, posłużono się trzema modelami badawczymi rozważając parametr genetyczny poszukiwania związku z chorobą  $\gamma$  ( $\gamma > 1$ ):

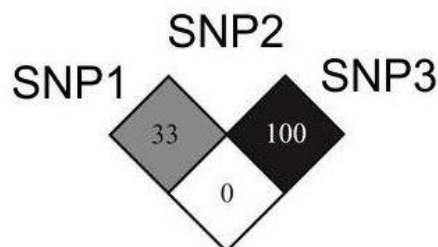
- model dominujący, w którym zakładano, że jedna lub dwie kopie allelu B prowadzą do zwiększenia lub zmniejszenia  $\gamma$ -razy ryzyka choroby; na tej podstawie heterozygoty i homozygoty powodują takie samo ryzyko, czyli dokonuje się porównania AB+BB vs AA (jest to szczególnie ważne w przypadku, gdy allel B jest rzadkim allelem lub w sytuacji, gdy otrzymano małą liczbę genotypów BB),
- model recesywny, w którym zakładano, że dwie kopie allelu B są konieczne, aby zwiększyć lub zmniejszyć ryzyko choroby  $\gamma$ -razy; rozpatrywano więc porównania BB vs AB+AA,
- model addytywny, w którym każda kopia allelu B ma znaczenie: obserwuje się wzrost lub zmniejszenie ryzyka  $\gamma$ -razy dla genotypu AB i  $2\gamma$ -razy dla genotypu BB; rozpatrywane są więc porównania AB vs AA oraz BB vs AA.

W celu sprawdzenia czy uzyskane różnice w częstościach występowania genotypów i alleli mają istotny statystycznie związek z fenotypem steroidooporności związanym z IZN jak również z samym IZN, obliczano wartość ilorazu szans (ang. *odds ratio*, OR) i 95% przedziału ufności (ang. *confidence intervals*, 95% CI). W tym celu zastosowano dokładny dwustronny test Fishera (ang. *Fisher's exact test*), który stosowany jest w przypadku małych liczebności niektórych alleli i genotypów badanych grup. Analizy dokonywano za pomocą programu GraphPad Prism 5. Wynik uznano za istotny statystycznie przy  $p \leq 0,05$ . Wartość OR pozwalała oszacować z jaką wielokrotnością dany allel lub genotyp danego polimorfizmu był związany z daną grupą badaną. Wartość  $OR < 1$  wskazywała, że dany allel lub genotyp może mieć charakter ochronny przed wystąpieniem fenotypu danej grupy badanej.  $OR \sim 1$  wskazuje na brak związku rozpatrywanych alleli i genotypów z daną grupą badaną.  $OR > 1$  wskazuje, że nosiciele danego allelu lub genotypu są w grupie ryzyka zachorowania.



## 2.14. Analiza nierównowagi sprzężeń

Stopień powiązania ze sobą badanych biallelicznych SNP dla poszczególnych genów między badanymi grupami dokonano za pomocą programu HaploView 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>). Program wykorzystuje trzy różne algorytmy: algorytm Gabriel *et al.*, regułę 4 gamet (ang. *four gamete rule*) i rdzeń nierównoważenia sprzężeń (ang. *solid spine of LD*). W niniejszej pracy posłużono się algorytmem Gabriel *et al.*, jako że jest najbardziej wymagający i wiarygodny, tym samym redukuje ryzyko pozyskania wyników fałszywie pozytywnych. Definiowanie nierównowagi sprzężeń (LD) opiera się na oszacowaniu różnicy pomiędzy częstością obserwowaną współwystępowania dwóch alleli (tj. dwumarkerowy haplotyp), a częstością oczekiwaną, jeżeli dwa markery są niezależne. Pomiar LD opiera się o wielkości  $D'$  i  $r^2$ . Wielkość  $D'$  (wskaźnik  $D'$  Lewontine'a) jest miarą genetyki populacyjnej, powiązaną ze zjawiskami rekombinacji między markerami i przyjmuje wartości od 0 do 1. Wartość  $D'=0$  wskazuje na całkowitą równowagę sprzężenia (brak LD), czyli na częstą rekombinację pomiędzy markerami. Natomiast  $D'=1$  mówi o całkowitej nierównowadze sprzężenia LD między dwoma markerami, czyli braku rekombinacji. Dla celów analiz genetycznych, LD definiuje się również za pomocą wielkości  $r^2$ , która jest miarą statystycznej korelacji i wyraża się wartościami od 0 do 1. Im wyższa wartość  $r^2$ , tym silniejsze LD między dwoma SNP. Wartość współczynnika  $r^2=1$  wskazuje, że dwa SNP przekazują podobną informację, czyli jeden allel pierwszego SNP jest często obserwowany z allelem drugiego SNP. Taki układ dziedziczonych razem alleli tworzy haplotyp. Na tej podstawie, tylko jeden z dwóch SNP może być genotypowany, żeby uchwycić zmianę alleliczną. Między tymi dwoma wielkościami istnieją zależności. Współczynnik  $r^2$  jest wrażliwy na częstość alleli markerów i może być wysoki tylko w regionach o wysokiej wartości  $D'$ . Na podstawie uzyskanych genotypów badanych polimorfizmów wygenerowano rekonstrukcje haplotypów. Porównanie obserwowanego rozkładu haplotypów w grupach SOZN z SWZN oraz IZN z grupą kontrolną umożliwiło określenie związków polimorfizmów z fenotypami: SOZN oraz IZN na poziomie haplotypowym. Graficzne przedstawienie interakcji między badanymi SNP w oparciu o parametr  $r^2$  przedstawia rycina 17.



**Rycina 17.** Schemat graficznego przedstawienia nierównowagi sprzężeń pomiędzy trzema SNP. Kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2=100\%$ .

Zgodność z prawem HWE dla triallelicznych SNP obliczano wykorzystując kalkulator ogólnodostępny na stronie: <http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-3-alleles.html>. W celu testowania oraz oszacowania nierównowagi sprzężeń w przypadku triallelicznych SNP zastosowano ogólnodostępny program EH (ang. *Estimating Haplotype-frequencies*) dostępny na [www.linkage.rockefeller.edu/software/eh](http://www.linkage.rockefeller.edu/software/eh). Działanie programu opiera się o algorytm maksymalizacji wartości oczekiwanej (ang. *Expectation-maximization algorithm*, EM). W oparciu o wprowadzone dane, program oblicza częstości wygenerowanych haplotypów w badanych grupach. Program nie generuje jednak graficznego obrazu uzyskanych wyników. W celu sprawdzenia czy istnieją istotne statystycznie różnice w częstościach wygenerowanych haplotypów, zastosowano dokładny dwustronny test Fishera.

## 2.15. Identyfikacja polimorfizmu krótkich powtórzeń tandemowych

### 2.15.1. Łańcuchowa reakcja polimerazy z wyznakowanym fluorescencyjnie starterem

W celu identyfikacji polimorfizmu krótkich powtórzeń tandemowych (STR) w rejonie promotorowym genu *MIF* przeprowadzono reakcję PCR z wyznakowanym fluorescencyjnie na końcu 5' starterem *forward*. Zastosowanym barwnikiem fluorescencyjnym był FAM. Skład mieszaniny oraz objętości zastosowanych odczynników były analogiczne jak w przypadku reakcji PCR, przygotowującej produkty do sekwencjonowania (Tabela 8). W tabeli 24. zamieszczono nazwy oraz sekwencje zastosowanych starterów oraz wielkość uzyskanego produktu PCR, natomiast tabela 25 przedstawia zastosowany profil termiczny reakcji PCR.

**Tabela 24.** Sekwencje starterów zastosowane do identyfikacji polimorfizmu STR genu *MIF* oraz długość amplifikowanego fragmentu.

Gen	Analizowany fragment		Startery do sekwencjonowania		Wielkość produktu [pz]
			Nazwa startera	Sekwencja startera	
<i>MIF</i>	5'UTR	Fragment 2	MIF5UF	5'-FAM-ATGGCCTTCACTGAGACTGG-3'	468
			MIF5R2	5'-GAATCACCATCCAGGGAAGT-3'	

**Tabela 25.** Profil termiczny reakcji PCR.

Wstępna denaturacja	Denaturacja	Przyłączenie starterów	Elongacja	Liczba cykli	Amplifikacja
94°C/4 min	95°C/30 sek	55°C/60 sek	72°C/60 sek	35 cykli	72°C/7 min

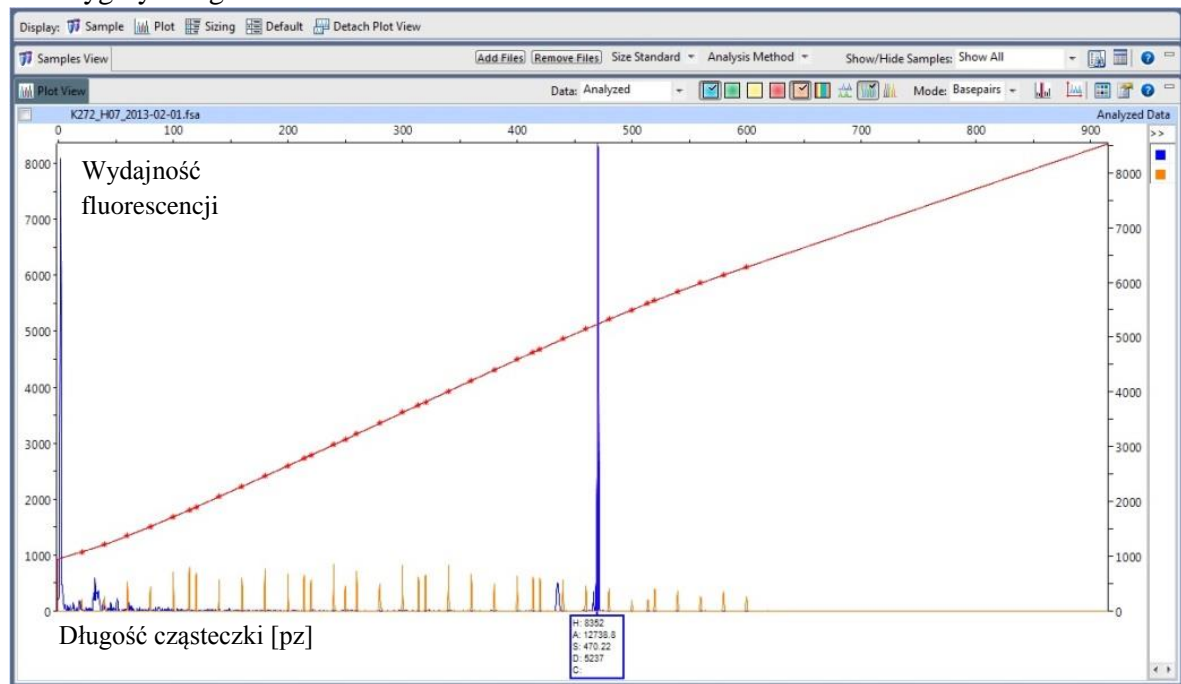
### 2.15.2. Analiza długości znakowanych produktów za pomocą elektroforezy kapilarnej

W celu oznaczenia długości produktów wyznakowanych fluorescencyjnie zastosowano elektroforezę kapilarną z wykorzystaniem automatycznego sekwenatora Genetic Analyser 3110 (Applied Biosystems). Środowisko denaturujące do elektroforezy oparte było o roztwór polimeru POP-4. Dodatkowo do produktu PCR dodawano wewnętrzny standard wielkości GeneScan 600 LIZ. Fluorescencja wyznakowanych fragmentów była wzbudzana przez lasery. Sygnał ten był

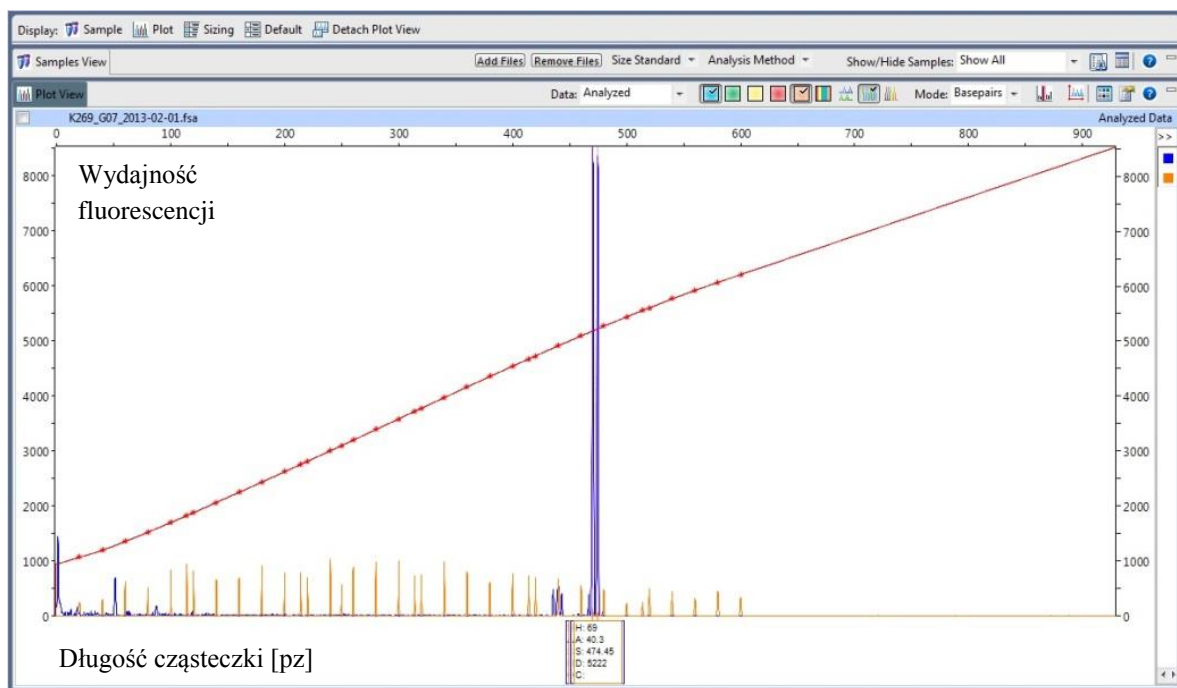
przez komputer przetwarzany i zapisywany w postaci plików w formacie .fsa. Rozdział fragmentów został wykonany w Wydziałowej Pracowni Technik Biologii Molekularnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

### 2.15.3. Analiza wyników uzyskanych za pomocą elektroforezy kapilarnej

Wwyniki uzyskane na drodze elektroforezy kapilarnej, analizowano za pomocą programu Peak Scanner Software v1.0. Poszczególne fragmenty DNA przedstawiane były graficznie w postaci pików na elektroforegramie, pozwalających na stosunkowo łatwą identyfikację fragmentów. Wielkość alleli szacowano na podstawie generowanej przez program krzywej wzorcowej zależności wielkości fragmentów DNA od czasu migracji. wewnętrznego standardu wielkości. W oparciu o uzyskane elektroforegramy, obecność jednego pików fluorescencji klasyfikowano jako homozygotę, natomiast obecność dwóch pików jako heterozygotę. Rycina 18 przedstawia elektroforegram dla układu homozygotycznego, natomiast rycina 19 dla układu heterozygotycznego.



**Rycina 18.** Elektroforegram badanego polimorfizmu STR w obecności markera wielkości oraz krzywej wzorcowej – próbka homozygotyczna (pacjent K272).



**Rycina 19.** Elektroforegram badanego polimorfizmu STR w obecności markera wielkości oraz krzywej wzorcowej – próbka heterozygotyczna (pacjent K269).

Uzyskane wyniki pozwoliły przypisać ilość powtórzeń CATT do długości fragmentu i tak: 466 par zasad odpowiadało liczbie powtórzeń 5, 470 par zasad – 6 oraz 474 par zasad – 7. W ten sposób odczytywano wyniki dla każdego pacjenta.

Na podstawie pozyskanych wyników obliczono częstości genotypów oraz alleli dla poszczególnych grup badanych (SOZN, SWZN, IZN, grupa kontrolna). Dla analizowanego polimorfizmu sprawdzono czy badane genotypy są zgodne z prawem HWE. Następnie dokonano porównań częstości alleli i genotypów między grupami (SOZN vs SWZN oraz IZN vs grupa kontrolna) opierając się na modelu asocjacyjnym. W celu sprawdzenia czy zaobserwowane różnice są istotne statystycznie, obliczono wartości OR, 95% CI za pomocą dokładnego dwustronnego testu Fishera z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 5.

#### **2.15.4. Analiza nierównowagi sprzężeń dla polimorfizmu krótkich powtórzeń tandemowych**

W celu oszacowania czy badany polimorfizm STR wykazuje sprzężenie z wytypowanym polimorfizmem SNP, zastosowano program PHASE wersja 2.1, dostępny na stronie: <http://stephenslab.uchicago.edu/software.html>. Program pozwala na skonstruowanie haplotypów z zebranych genotypów populacji, przy czym wyróżnia się od HaploView możliwością analizowania polimorfizmów STR, mikrosatelit i innych multiallelicznych loci. Zasada działania opiera się o metody statystyczne Bayesa. Nie generuje jednak wyników w formie graficznej. W celu sprawdzenia czy występują istotne statystycznie różnice w częstościach wygenerowanych haplotypów badanych grup, zastosowano dokładny dwustronny test Fishera.

## WYNIKI

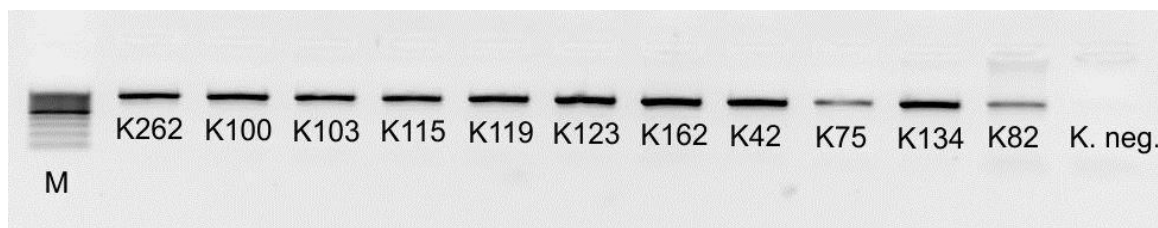
### 1. Izolacja genomowego DNA z krwi obwodowej - ocena ilości i jakości produktu

Wyniki izolacji DNA z krwi obwodowej pacjentów oraz grupy kontrolnej stanowi załącznik 9. W zależności od jakości materiału biologicznego, zakres stężeń wynosił od około 10 do około 100 ng/μl, z czystością mieszczącą się w granicach od 1,7 do 2,0.

### 2. Wyniki amplifikacji fragmentów badanych genów

Matryce wykorzystywane w dalszych analizach uzyskiwano z zastosowaniem reakcji PCR, w której amplifikowano docelowe fragmenty badanych genów (*NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF*). Wszystkie otrzymane produkty reakcji PCR, zarówno od pacjentów, jak i grupy kontrolnej losowo poddawano rozdzielowi elektroforetycznemu.

Widoczny na żelu agarozowym lity prążek wizualizował dobrą jakość, jak i ilość produktu. Rycina 20 przedstawia przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR pacjentów z SOZN dla genu *MIF*.



**Rycina 20.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR wybranych pacjentów z SOZN dla genu *MIF* (produkt 867 pz); M – marker wielkości; K. neg. – kontrola negatywna; 1,5% żel agarozowy.

### 3. Identyfikacja mutacji punktowych w genach kandydujących

W przypadku genów *NR3C1* oraz *ABCB1* nie wykazano obecności mutacji punktowych w obrębie badanych grup pacjentów z SOZN i SWZN oraz w grupie kontrolnej.

W genie *MIF* zlokalizowano mutację w rejonie 5'UTR u pacjenta o numerze identyfikacyjnym K127 należącego do grupy z SWZN. Mutacja miała status heterozygoty i położona była w odległości 937 par zasad od miejsca startu translacji (-937 C>T). Kolejną mutację punktową w genie *MIF* zlokalizowano w rejonie 3'UTR u pacjenta o numerze identyfikacyjnym K139, należącego do grupy pacjentów z SOZN oraz K111 należącego do grupy pacjentów z SWZN. Mutacja miała status heterozygoty i była zlokalizowana w odległości 809 par zasad od miejsca końca translacji (\*809 C>T).

W genie *HSP90AA1* w przypadku pacjenta K102 należącego do grupy SOZN w rejonie intronu 7 zlokalizowano mutację punktową o statusie heterozygoty w odległości 38 par zasad od eksonu 7 (ekson7 + 38 T>C).

Wszystkie zidentyfikowane mutacje zlokalizowane były w rejonach niekodujących genów, w związku z czym nie wpływały na zmianę sekwencji aminokwasów badanych białek. W tabeli 26 zestawiono mutacje zidentyfikowane w genach: *HSP90AA1* i *MIF*.

**Tabela 26.** Mutacje zidentyfikowane w genach *HSP90AA1* oraz *MIF*.

Mutacja	Gen	Lokalizacja	Kod pacjenta	Grupa badana	Status mutacji
ekson7 + 38 T>C	<i>HSP90AA1</i>	Intron 7	K102	SOZN	heterozygota
-937 C>T	<i>MIF</i>	5'UTR	K127	SWZN	heterozygota
*809 C>T	<i>MIF</i>	3'UTR	K139	SOZN	heterozygota
	<i>MIF</i>		K111	SWZN	heterozygota

SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym

#### 4. Identyfikacja polimorfizmów w wytypowanych genach

Na podstawie pozyskanych wyników zidentyfikowano i poddano analizie 50 SNP, spośród 351 wytypowanych według baz danych: Ensembl, NCBI oraz SNPper, z czego 9 SNP (spośród 124 SNP) w genie *NR3C1*, 26 SNP (spośród 122 SNP) w genie *ABCB1*, 7 SNP (spośród 56 SNP) w genie *HSP90AA1* i 7 SNP (spośród 49 SNP) oraz 1 STR w genie *MIF*.

W przypadku genu *NR3C1* jeden SNP zlokalizowano w intronie, pięć SNP w częściach kodujących oraz trzy SNP w rejonie 3'UTR. W przypadku trzech SNP w częściach kodujących była to zmiana niesynonimiczna typu zmiany sensu, natomiast dwa SNP były synonimiczne (Załącznik 10, Tabela 27).

W genie *ABCB1* w wyniku genotypowania, jeden SNP zlokalizowano w rejonie 5'UTR, sześć SNP w częściach kodujących oraz osiemnastę SNP w intronach, jeden SNP w rejonie 3'UTR. Spośród SNP rejonów kodujących, trzy SNP były niesynonimiczne typu zmiany sensu, a inne trzy SNP były synonimiczne (Załącznik 10, Tabela 28).

W genie *HSP90AA1* zidentyfikowano 2 SNP w częściach kodujących genów, natomiast cztery SNP w intronach. W przypadku SNP części kodujących był to typ zmiany synonimicznej (Załącznik 10, Tabela 29).

W genie *MIF* w wyniku genotypowania, zidentyfikowano dwa SNP oraz jeden STR w rejonie promotorowym, dwa SNP w intronach oraz trzy SNP w rejonie 3'UTR (Załącznik 10, Tabela 30).

Odczyty genotypów dla zidentyfikowanych polimorfizmów we wszystkich badanych grupach stanowią załączniki: dla genu *NR3C1* – załączniki 11, 12, 13, dla genu *ABCB1* – załączniki 14, 15, 16, dla genu *HSP90AA1* – załączniki 17, 18, 19 oraz dla genu *MIF* – załączniki 20, 21, 22.

Weryfikację otrzymanych polimorfizmów wytypowanych genów pod kątem zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu  $\chi^2$  w badanych populacjach stanowią załączniki: 23, 24, 25, 26, 27, 28.

## 5. Analiza asocjacyjna polimorfizmów wytypowanych genów

Polimorfizmy rozpatrywano w oparciu o trzy modele porównawcze: model addytywny, dominujący oraz recesywny. Poszukiwano zależności pomiędzy różnymi wariantami polimorficznymi, a podatnością na SOZN (porównanie grup SOZN i SWZN), jak również ewentualnego związku z IZN (porównanie grupy z IZN i grupy kontrolnej). Zakładając, że „D” to allel dominujący (ang. *major allele*), a „d” to allel rzadszy (ang. *minor allele*), stosowane modele porównawcze przedstawiające się następująco:

- model addytywny: Dd vs DD i dd vs DD,
- model dominujący: dd+Dd vs DD,
- model recesywny: dd vs Dd+DD.

### 5.1. Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu *NR3C1*

#### rs72555801

Polimorfizm rs72555801 genu *NR3C1* znajduje się w sekwencji intronu 1 i polega na substytucji guaniny (G) adeniną (A) (G>A). Dokonując analizy tego polimorfizmu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów i alleli w porównaniu pacjentów z SOZN i SWZN, jak również w całej grupie pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich rozpatrywanych modelach porównawczych ( $p>0,05$ ), (Załącznik 29, Tabela 31).

#### rs6189/rs6190 (ER22/23ER)

Polimorfizmy rs6189 i rs6190 występują w sąsiadujących kodonach i są ze sobą sprzężone.

#### rs6189 (E22E, Glu22Glu)

Polimorfizm rs6189 (E22E, gdzie E to kwas glutaminowy) genu *NR3C1* zlokalizowany jest w eksonie 2 i związany jest z substytucją guaniny adeniną (G>A) w kodonie 22. Zmiana ta nie prowadzi do zmiany aminokwasu - mamy do czynienia ze zmianą synonimiczną – zarówno wariant z guaniną (GAG) jak i z adeniną (GAA) kodują kwas glutaminowy (Glu).

Porównując częstości genotypów oraz alleli w podgrupie pacjentów z SOZN i SWZN, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między analizowanymi grupami, jednak zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu A w układzie heterozygotycznym (GA) z podgrupą z SWZN w addytywnym modelu (GA vs GG), wskazując na jego potencjalny charakter ochronny w stosunku do fenotypu SOZN ( $p=0,071$ ; OR=0,10; 95% CI=0,005-1,906). Podobne wyniki uzyskano dla modelu dominującego (AA+GA vs GG;  $p=0,071$ ; OR=0,10; 95% CI=0,005-1,906). Trend w kierunku asocjacji allelu A z SWZN potwierdza również porównanie alleli A vs G ( $p=0,073$ ; OR=0,10; 95% CI=0,005-1,965). W analizie porównawczej pacjentów z IZN z grupą

kontrolną nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli w zastosowanych modelach porównawczych ( $p > 0,05$ ). Nie zaobserwowano występowania allelu A w układzie homozygotycznym (AA) w żadnej z rozpatrywanych grup (Załącznik 29, Tabela 31).

#### **rs6190 (R23K, Arg23Lys)**

Polimorfizm rs6190 (R23K, gdzie R to arginina, natomiast K to lizyna) genu *NR3C1* zlokalizowany jest w eksonie 2 i związany jest z substytucją guaniny adeniną (G>A) w kodonie 23. Zmiana ta prowadzi do zmiany aminokwasu, jest to więc typ zamiany określanej jako zmiana sensu (ang. *missense*) – wariant z guaniną (AGG) koduje argininę (Arg), natomiast wariant z adeniną (AAG) koduje lizynę (Lys).

Analizując ten polimorfizm nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów i alleli w porównaniu pacjentów z SOZN i SWZN w oparciu o rozpatrywane modele porównawcze. Zaobserwowano natomiast trend w kierunku asocjacji allelu A w układzie heterozygotycznym (GA) w modelu addytywnym, jak również w modelu dominującym (AA+GA vs GG) z podgrupą SWZN ( $p=0,073$ ; OR=0,10; 95% CI=0,005-1,965 dla obydwu przypadków). Wskazuje to na potencjalne zmniejszone ryzyko wystąpienia fenotypu SO związanego z IZN u nosicieli allelu A. Trend w kierunku asocjacji allelu A z SWZN potwierdza również porównanie samych alleli: A vs G ( $p=0,073$ ; OR=0,10; 95% CI=0,005-1,965). Porównując częstości genotypów i alleli pacjentów z IZN z grupą kontrolną, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ). Nie zaobserwowano występowania allelu A w układzie homozygotycznym (AA) w żadnej z rozpatrywanych grup (Załącznik 29, Tabela 31).

#### **rs72542742 (A229T, Ala229Thr)**

Polimorfizm rs72542742 (A229T, gdzie A to alanina, a T to treonina) genu *NR3C1* znajduje się w eksonie 2. Jest to polimorfizm polegający na substytucji guaniny adeniną (G>A), który angażuje zmianę w kodonie 229, jest to więc zamiana typu zmiany sensu. Na poziomie białka prowadzi to do zamiany aminokwasu alaniny (Ala) na treoninę (Thr). Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli polimorfizmu A229T pomiędzy pacjentami z SOZN w porównaniu z SWZN, jak również w całej grupie pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną we wszystkich rozpatrywanych modelach ( $p > 0,05$ ). Nie zaobserwowano występowania allelu T w układzie homozygotycznym (TT) w żadnej z rozpatrywanych grup (Załącznik 29, Tabela 31).

#### **rs6195 (N363S, Asn363Ser)**

Polimorfizm rs6195 (N363S, gdzie N to asparagina, natomiast S to seryna) genu *NR3C1* zlokalizowany jest w eksonie 2 i angażuje zmianę w kodonie 363. Polega na substytucji adeniny guaniną (A>G), która skutkuje zamianą aminokwasu asparaginy (Asn) na serynę (Ser), jest to więc zamiana typu zmiany sensu. Analiza polimorfizmu nie wykazała istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów i alleli zarówno porównując pacjentów z SOZN



z SWZN, jak i zestawiając całą grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną we wszystkich rozpatrywanych modelach ( $p>0,05$ ). Nie zaobserwowano występowania allelu G w układzie homozygotycznym (GG) w żadnej grupie (Załącznik 29, Tabela 32).

#### **rs6196 (N766N, Asn766Asn)**

Polimorfizm rs6196 (N766N, gdzie N to asparagina) znajduje się w eksonie 9 $\alpha$ . Jest to polimorfizm polegający na substytucji tyminy (T) cytozyną (C), (T>C). Zmiana ta angażuje kodon 766. Jest to typ polimorfizmu, który nie wpływa na zmianę aminokwasu, zarówno wariant z tyminą (AAT), jak i wariant z cytozyną (AAC) kodują asparaginę (Asn). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów i alleli porównując grupy pacjentów z SOZN i SWZN oraz porównując całą grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną w rozpatrywanych modelach ( $p>0,05$ ), (Załącznik 29, Tabela 32).

#### **rs6191**

Polimorfizm rs6191 zlokalizowany jest w regionie 3'UTR i polega na zastąpieniu guaniny cytozyną (G>C). Analizując ten polimorfizm nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów i alleli porównując pacjentów z SOZN i SWZN, jak również porównując całą grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną w rozpatrywanych modelach ( $p>0,05$ ), (Załącznik 29, Tabela 32).

#### **rs10482714**

Polimorfizm rs10482714 znajduje się w regionie 3'UTR i związany jest z substytucją guaniny adeniną (G>A). Rozkład genotypów i alleli nie różnił się w sposób istotny statystycznie porównując pacjentów z SOZN i SWZN, jak i porównując całą grupę z IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele ( $p>0,05$ ). Nie zaobserwowano występowania allelu A w układzie homozygotycznym (AA) w żadnej grupie (Załącznik 29, Tabela 33).

#### **rs6198 (9 $\beta$ )**

Polimorfizm rs6198 znajduje się w sekwencji 3'UTR i polega na substytucji adeniny guaniną (A>G). Uzyskane wyniki wykazały brak istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów i alleli w badanych grupach: pacjenci z SOZN w porównaniu z pacjentami ze SWZN oraz cała grupa pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną. Nie zaobserwowano występowania allelu G w układzie homozygotycznym (GG) w żadnej z grup (Załącznik 29, Tabela 33).

## **5.2. Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu *ABCB1* (*MDR1*)**

#### **rs2214102**

Polimorfizm rs2214102 genu *ABCB1* zlokalizowany jest w regionie 5'UTR i polega na substytucji adeniny guaniną (A>G), gdzie rzadkim allelem jest A. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w oparciu o rozpatrywane modele w porównaniu pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ). Porównanie

grupy pacjentów ze SOZN i SWZN zostało wyłączone z analiz z powodu braku zgodności z prawem równowagi HWE dla grupy SOZN ( $p=0,002$ ) (Załącznik 24 oraz Załącznik 30, Tabela 34).

#### **rs9282564 (Asn21Asp)**

Polimorfizm rs9282564 genu *ABCB1* znajduje się w eksonie 2 i polega na substytucji adeniny guaniną (A>G). Punktowa zamiana skutkuje zmianą aminokwasu. Wariant z adeniną AAT koduje asparaginę (Asn), natomiast wariant z guaniną GAT koduje asparaginian (Asp). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli rozpatrywanych grup (SOZN w porównaniu z SWZN oraz IZN w porównaniu z grupą kontrolną) w oparciu o rozpatrywane modele ( $p>0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 34).

#### **rs2235074**

Polimorfizm rs2235074 genu *ABCB1* zlokalizowany jest w intronie 3 i polega na substytucji cytozyny tyminą (C>T). Z powodu braku zgodności z prawem HWE ( $p<0,05$ ) dla grup SOZN oraz IZN, nie poddano go dalszym analizom statystycznym (Załącznik 24 oraz Załącznik 30, Tabela 34).

#### **rs2235015**

Polimorfizm rs2235015 genu *ABCB1* zlokalizowany jest w intronie 4 i związany jest z substytucją guaniny tyminą (G>T). Dokonując analizy tego polimorfizmu nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli na podstawie zastosowanych modeli porównując grupy: SOZN z SWZN oraz IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 35).

#### **rs2235023**

Polimorfizm rs2235023 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 8 i związany jest z zamianą guaniny na adeninę (G>A). Analiza wyników nie wykazała istotnie statystycznych różnic w częstościach genotypów oraz alleli badanych grup: SOZN w porównaniu z SWZN oraz IZN w porównaniu z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele porównawcze: recesywny, addytywny oraz dominujący ( $p>0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 35).

#### **rs1922240**

Polimorfizm rs1922240 genu *ABCB1* związany jest z substytucją adeniny guaniną (A>G) w intronie 8. Na podstawie otrzymanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w badanych grupach: SOZN w porównaniu z SWZN oraz IZN w porównaniu z grupą kontrolną w badanych modelach porównawczych ( $p>0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 35).

#### **rs10276036**

Polimorfizm rs10276036 genu *ABCB1* angażuje zmianę nukleotydową w intronie 9. Zmiana ta polega na substytucji adeniny guaniną (A>G). Analiza polimorfizmu nie stwierdziła istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu pacjentów

SOZN z SWZN w żadnym z modeli ( $p > 0,05$ ). W przypadku porównania całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu G w układzie homozygotycznym (GG) z grupą z IZN w modelu recesywnym (GG vs AG+AA), wskazując na potencjalne zwiększone ryzyko zachorowania na IZN u osób będących nosicielami tego allelu ( $p = 0,052$ ; OR=4,41, 95% CI=0,950-20,449). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 36).

#### **rs2229109 (Ser400Asn)**

Polimorfizm rs2229109 genu *ABCB1* zlokalizowany jest w eksonie 11. Związany jest z substytucją guaniny adeniną (G>A) w kodonie 400, co powoduje zmianę aminokwasu z seryny (Ser) na asparaginę (Asn) (AGT → AAT) lub z substytucją guaniny tyminą (G>T) w kodonie 400, co skutkuje zmianą z seryny (Ser) na izoleucynę (Ile) (AGT → ATT). Uzyskane dane wskazują na obecność wariantów zawierających G i A w badanej grupie. Nie odnotowano wariantów, w których występowało T. W porównaniu grup pacjentów z SOZN i SWZN, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli ( $p > 0,05$ ). Nie wykazano obecności allelu A w układzie homozygotycznym (AA), natomiast w układzie heterozygotycznym GA odnotowano tylko u jednego pacjenta z SOZN. Porównując całą grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną wykazano istotne statystycznie zmniejszone ryzyko zachorowalności na IZN u nosicieli allelu A w modelu porównawczym: addytywnym (GA vs GG) oraz dominującym (AA+GA vs GG) ( $p = 0,026$ ; OR=0,09; 95% CI=0,010-0,870, dla obu modeli). Stwierdzono również asocjację allelu A z potencjalnym zmniejszonym ryzykiem zachorowania na IZN ( $p = 0,030$ ; OR=0,10; 95% CI=0,011-0,907), (Załącznik 30, Tabela 36).

#### **rs1128503 (Gly412Gly, 1236T>C)**

Polimorfizm rs1128503 genu *ABCB1* znajduje się w eksonie 12 i polega na substytucji tyminy cytozyną (T>C) w kodonie 412. Zmiana ta nie skutkuje zmianą na poziomie białka, zarówno wariant z T jak i z C koduje glicynę (Gly) (GGT → GGC). Allel T jest allelem rzadkim. Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów z SOZN oraz SWZN we wszystkich trzech rozpatrywanych modelach porównawczych ( $p > 0,05$ ). Porównując całą grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli ( $p > 0,05$ ), aczkolwiek zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu T w układzie homozygotycznym TT z grupą z IZN w modelu recesywnym ( $p = 0,052$ ; OR=4,41; 95% CI=0,950-20,449). Wskazuje to na potencjalne 4,41 razy zwiększone ryzyko wystąpienia IZN u osób będących nosicielami tego allelu w porównaniu do grupy kontrolnej (Załącznik 30, Tabela 36).

#### **rs2032588**

Polimorfizm rs2032588 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 12. Polega na substytucji cytozyny tyminą (C>T). Analiza polimorfizmu nie wykazała istotnych statystycznie różnic

w częstościach występowania genotypów oraz alleli zarówno w porównaniu grup pacjentów z SOZN i SWZN, jak i w porównaniu całej grupy z IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele porównawcze ( $p > 0,05$ ). Dla żadnej z badanych grup nie wykazano obecności homozygot TT (Załącznik 30, Tabela 37).

#### **rs2235033**

Polimorfizm rs2235033 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 13. Związany jest z zamianą tyminy na cytozynę (T>C). Na podstawie pozyskanych wyników porównania pacjentów z SOZN z SWZN, stwierdzono związek homozygot CC w modelu recesywnym z SWZN, co wskazywałoby na potencjalne zmniejszone ryzyko wystąpienia fenotypu SO związanego z IZN u tych nosicieli ( $p = 0,026$ ; OR=0,26; 95% CI=0,083-0,798). Dodatkowo porównując grup pacjentów z SOZN z SWZN, wykazano trend w kierunku asocjacji allelu C z SWZN, który wskazuje na jego potencjalne działanie ochronne ( $p = 0,09$ ; OR=0,54; 95% CI= 0,276-1,062).

Porównując całą grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną stwierdzono potencjalny związek nosicieli allelu C ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na IZN, zarówno w modelu addytywnym dla heterozygot TC (TC vs TT) ( $p = 0,031$ ; OR=0,23; 95% CI=0,060-0,866), jak i w modelu dominującym dla homozygot i heterozygot (CC+TC vs TT) ( $p = 0,013$ ; OR=0,21; 95% CI=0,057-0,780). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 37).

#### **rs2235035**

Polimorfizm rs2235035 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 13. Związany jest z substytucją cytozyny tyminą (C>T). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w oparciu o rozpatrywane modele porównawcze w porównaniu grupy pacjentów z SOZN i SWZN, jak również w porównaniu całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 37).

#### **rs2235013**

Polimorfizm rs2235013 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 14. Polega na substytucji guaniny adeniną (G>A). Otrzymane wyniki nie wykazały istotnych statystycznie różnic w występowaniu częstości genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów z SOZN i SWZN oraz w porównaniu całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną w rozpatrywanych trzech modelach porównawczych ( $p > 0,05$ ). Zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu A z potencjalnym zmniejszonym ryzykiem zachorowania na IZN w modelu addytywnym dla heterozygot GA ( $p = 0,09$ ; OR=0,28; 95% CI=0,073-1,080), (Załącznik 30, Tabela 38).

#### **rs28381916**

Polimorfizm rs28381916 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 15 i polega na substytucji guaniny adeniną (G>A). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup

pacjentów SOZN z SWZN oraz w porównaniu całej grupy z IZN z grupą kontrolną w rozpatrywanych trzech modelach porównawczych ( $p>0,05$ ). W badanych grupach nie odnotowano występowania allelu rzadkiego w układzie homozygotycznym AA (Załącznik 30, Tabela 38).

#### **rs191864178**

Polimorfizm rs191864178 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 16 i polega na substytucji guaniny adeniną (G>A). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w oparciu o rozpatrywane modele w porównaniu grup pacjentów SOZN z SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 38).

#### **rs2235046**

Polimorfizm rs2235046 genu *ABCB1* zlokalizowany jest w intronie 16 i związany jest z substytucją guaniny adeniną (G>A). Analizując polimorfizm nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w trzech modelach porównawczych w badanych grupach: SOZN w porównaniu z SWZN oraz pacjenci z IZN w porównaniu z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ). Odnotowano natomiast trend w kierunku asocjacji homozygot AA w modelu recesywnym (AA vs GA+GG) ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na IZN w porównaniu z grupą kontrolną ( $p=0,09$ ; OR=3,75; 95% CI=0,801-17,555), (Załącznik 30, Tabela 39).

#### **rs1922242**

Polimorfizm rs1922242 znajduje się w intronie 16 i polega na substytucji adeniny tyminą (A>T). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w rozpatrywanych modelach porównawczych w porównaniu grup pacjentów SOZN z SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 39).

#### **rs2235040**

Polimorfizm rs2235040 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 20 i związany jest z substytucją guaniny adeniną (G>A). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w rozpatrywanych trzech modelach porównawczych porównując grup pacjentów SOZN z SWZN oraz całą grupę pacjentów IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ). W badanych grupach nie odnotowano występowania allelu rzadkiego w układzie homozygotycznym AA (Załącznik 30, Tabela 39).

#### **rs9282563 (Leu884Leu)**

Polimorfizm rs9282563 genu *ABCB1* znajduje się w eksonie 21 i polega na substytucji cytozyny tyminą (C>T) w kodonie 884. Zmiana ta nie skutkuje zmianą na poziomie białka, gdyż zarówno wariant z C jak i z T kodują leucynę (Leu) (CTG -> TTG). Analiza polimorfizmu nie wykazała istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównywanych grupach: SOZN z SWZN oraz cała grupa z IZN z grupą kontrolną w oparciu

o modele porównawcze ( $p > 0,05$ ). W grupie badanej nie odnotowano występowania allelu rzadkiego w układzie homozygotycznym TT, natomiast tylko w trzech przypadkach w grupie pacjentów z SOZN zaobserwowano występowanie allelu rzadkiego w układzie heterozygotycznym CT (Załącznik 30, Tabela 40).

#### **rs2032582 (Ala893Ser/Thr, G2677T/A)**

Polimorfizm rs2032582 genu *ABCB1* znajduje się w eksonie 21. Polega on na substytucji tyminy guaniną (T>G) lub adeniną (T>A) w kodonie 893. Zmiana ta skutkuje zmianą na poziomie białka. Wariant z T (**T**CT) koduje serynę (Ser), natomiast w wyniku substytucji wariant z G (**G**CT) koduje alaninę (Ala) a wariant z A (**A**CT) - treoninę (Thr). Analizując polimorfizm nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów i alleli w porównaniu grup: pacjenci z SOZN w porównaniu z pacjentami z SWZN oraz cała grupa pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele porównawcze ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 30, Tabela 40).

#### **rs2032583**

Polimorfizm rs2032583 genu *ABCB1* zlokalizowany jest w intronie 21 i związany jest z substytucją tyminy cytozyną (T>C). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w badanych grupach: pacjenci z SOZN i SWZN oraz cała grupa pacjentów z IZN i grupa kontrolna w oparciu o rozpatrywane modele badawcze ( $p > 0,05$ ). W badanych grupach nie odnotowano występowania allelu rzadkiego w układzie homozygotycznym CC (Załącznik 30, Tabela 40).

#### **rs61040122**

Polimorfizm rs61040122 genu *ABCB1* zlokalizowany jest w intronie 25 i związany jest z substytucją cytozyny tyminą (C>T). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w badanych grupach: pacjenci z SOZN i SWZN oraz cała grupa pacjentów z IZN i grupa kontrolna w oparciu o rozpatrywane modele badawcze ( $p > 0,05$ ). W badanych grupach nie zaobserwowano występowania allelu rzadkiego w układzie homozygotycznym TT (Załącznik 30, Tabela 41).

#### **rs1045642 (Ile1145Ile, 3435C>T/A)**

Polimorfizm rs1045642 genu *ABCB1* znajduje się w eksonie 26 i związany jest z substytucją cytozyny tyminą (C>T) lub adeniną (C>A) w kodonie 1145. Jest to typ zamiany, który nie angażuje zmiany na poziomie białka, zarówno wariant z C (**A**TC), jak i z T (**A**TT) lub A (**A**TA), kodują aminokwas izoleucynę (Ile). W badanych grupach zaobserwowano jedynie substytucję cytozyny tyminą (C>T). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w rozpatrywanych modelach porównawczych w porównaniu grupy pacjentów z SOZN z grupą z SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ). Zaobserwowano natomiast trend w kierunku asocjacji allelu T w układzie homozygotycznym (TT) ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia fenotypu SO związanego z IZN w porównaniu z grupą pacjentów z SWZN w modelu

recesywnym (TT vs CC+CT) ( $p=0,085$ ;  $OR=2,57$ ;  $95\% CI= 0,903-7,327$ ). Wskazywałoby to na 2,57 razy potencjalnie większe ryzyko wystąpienia SOZN u nosicieli dwóch alleli T w porównaniu z grupą SWZN (Załącznik 30, Tabela 41).

#### **rs2235047**

Polimorfizm rs2235047 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 26 i polega na substytucji tyminy guaniną (T>G). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów z SOZN i SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele ( $p>0,05$ ). W badanych grupach nie wykazano obecności osobników z allelem rzadkim w układzie homozygotycznym GG (Załącznik 30, Tabela 41).

#### **rs2235048**

Polimorfizm rs2235048 genu *ABCB1* znajduje się w intronie 26. Związany jest on z substytucją tyminy cytozyną (T>C). Analizując polimorfizm nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w modelach porównawczych w porównaniu grup pacjentów SOZN z SWZN i całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ). Zaobserwowano natomiast trend w kierunku asocjacji homozygot CC w modelu recesywnym z wystąpieniem fenotypu SOZN w porównaniu z SWZN ( $p=0,085$ ;  $OR=2,57$ ;  $95\% CI=0,903-7,327$ ). Wskazywałoby to na 2,57 razy potencjalnie większe ryzyko wystąpienia fenotypu SOZN u nosicieli dwóch alleli C w porównaniu z grupą SWZN (Załącznik 30, Tabela 42).

#### **rs17064**

Polimorfizm rs17064 genu *ABCB1* znajduje się w rejonie 3'UTR i polega na substytucji adeniny tyminą (A>T). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w badanych grupach: SOZN w porównaniu z SWZN oraz całej grupie badanej z IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele ( $p>0,05$ ). W badanych grupach nie wykazano obecności homozygot z allelem rzadkim TT (Załącznik 30, Tabela 42).

### **5.3. Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu *HSP90AA1***

#### **rs4586364**

Polimorfizm rs4586364 genu *HSP90AA1* znajduje się w intronie 3 i polega na substytucji tyminy cytozyną (T>C). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów SOZN z SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ) w oparciu o rozpatrywane modele porównawcze (Załącznik 31, Tabela 43).

#### **rs4947 (Asn360Asn)**

Polimorfizm rs4947 genu *HSP90AA1* zlokalizowany jest w eksonie 6 i polega na substytucji cytozyny tyminą (C>T) w kodonie 360. Zmiana ta nie angażuje zmiany na poziomie białka, gdyż zarówno wariant z cytozyną (AAC), jak i wariant z tyminą (AAT)

kodują aminokwas asparaginę (Asn). Analizując otrzymane wyniki nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli porównując pacjentów z SOZN i SWZN oraz całą grupę pacjentów z IZN i grupę kontrolną ( $p > 0,05$ ) w oparciu o rozpatrywane modele (Załącznik 31, Tabela 43).

#### **rs3742429**

Polimorfizm rs3742429 genu *HSP90AA1* znajduje się w intronie 6 i związany jest z substytucją cytozyny tyminą (C>T). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów z SOZN i SWZN oraz całej grupy pacjentów z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ). Zaobserwowano natomiast trend w kierunku zmniejszonego ryzyka zachorowania na IZN dla nosicieli allelu C w układzie heterozygotycznym w modelu addytywnym (CT vs TT;  $p = 0,094$ ; OR=0,43; 95% CI=0,172-1,055) oraz w modelu dominującym (CC+CT vs TT;  $p = 0,065$ ; OR=0,42; 95% CI=0,172-1,016) w porównaniu z grupą kontrolną. Stwierdzono również asocjację allelu C ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na IZN ( $p = 0,069$ ; OR=0,49; 95% CI=0,232-1,043), (Załącznik 31, Tabela 43).

#### **rs7155973**

Polimorfizm rs7155973 genu *HSP90AA1* zlokalizowany jest w intronie 8 i polega na substytucji tyminy cytozyną (T>C). Analizując polimorfizm nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli badanych grup: SOZN w porównaniu z SWZN oraz całej grupy z IZN z grupą kontrolną dla zastosowanych modeli porównawczych ( $p > 0,05$ ). Nie wykazano występowania homozygot TT w badanych grupach (Załącznik 31, Tabela 44).

#### **rs34644998 (Arg612Arg)**

Polimorfizm rs34644998 genu *HSP90AA1* znajduje się w eksonie 10 i związany jest z substytucją adeniny cytozyną (A>C) w kodonie 612. Zmiana ta nie jest związana ze zmianą na poziomie białka, zarówno wariant z adeniną (AGA) jak i wariant z cytozyną (CGA) kodują aminokwas argininę (Arg). W badanych grupach pacjentów z SOZN oraz SWZN polimorfizm ten nie wystąpił. Zaobserwowano występowanie allelu C w układzie heterozygotycznym jedynie u jednej osoby z grupy kontrolnej (Załącznik 31, Tabela 44).

#### **rs6575895**

Polimorfizm rs6575895 genu *HSP90AA1* znajduje się w intronie 10 i polega na substytucji guaniny adeniną (G>A). Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów SOZN z SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele porównawcze ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 31, Tabela 44).

#### **rs2298877**

Polimorfizm rs2298877 genu *HSP90AA1* również znajduje się w intronie 10 i związany jest z substytucją adeniny guaniną (A>G). Analizując polimorfizm w grupach SOZN i SWZN



nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli badanych grup ( $p > 0,05$ ). W porównaniu całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu A ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na IZN (A vs G;  $p = 0,054$ ;  $OR = 0,450$ ;  $95\% CI = 0,204-0,979$ ) oraz w dominującym modelu porównawczym (AA+GA vs GG;  $p = 0,091$ ;  $OR = 0,44$ ;  $95\% CI = 0,174-1,093$ ), (Załącznik 31, Tabela 45).

#### **5.4. Analiza asocjacyjna polimorfizmów genu *MIF***

##### **5.4.1. Analiza asocjacyjna polimorfizmów pojedynczego nukleotydu rs755622 (-173G>C)**

Polimorfizm rs755622 genu *MIF* zlokalizowany jest w rejonie promotorowym w pozycji -173 od miejsca startu transkrypcji. Związany jest z substytucją guaniny cytozyną (G>C). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów: SOZN z SWZN oraz IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 32, Tabela 46).

##### **rs112568463 (-74A>T)**

Polimorfizm rs112568463 genu *MIF* znajduje się w rejonie promotorowym w pozycji -74 od miejsca startu transkrypcji i polega na substytucji adeniny tyminą (A>T). Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów SOZN z grupą z SWZN oraz w porównaniu całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele badawcze ( $p > 0,05$ ). Zaobserwowano natomiast trend w kierunku asocjacji allelu T ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na SOZN w porównaniu grupy z SOZN z grupą z SWZN ( $p = 0,070$ ;  $OR = 0,10$ ;  $95\% CI = 0,005-1,906$ ). Widoczny był również trend w kierunku asocjacji allelu T w układzie heterozygotycznym ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia fenotypu SO u pacjentów z IZN w addytywnym modelu porównawczym (AT vs AA) oraz w modelu recesywnym (TT+AT vs AA) ( $p = 0,070$ ;  $OR = 0,10$ ;  $95\% CI = 0,005-1,906$  dla obydwu przypadków). W badanych grupach nie odnotowano występowania rzadkiego allelu w układzie homozygotycznym TT (Załącznik 32, Tabela 46).

##### **rs2096525**

Polimorfizm rs2096525 genu *MIF* znajduje się w intronie 1 i związany jest z substytucją tyminy cytozyną (T>C). Analizując pozyskane wyniki, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów: SOZN i SWZN oraz IZN i grupy kontrolnej w oparciu o rozpatrywane modele ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 32, Tabela 46).

##### **rs2070766**

Polimorfizm rs2070766 genu *MIF* znajduje się w intronie 2 i polega na substytucji cytozyny guaniną (C>G) lub tyminą (C>T). W analizowanych grupach nie wykazano występowania

wariantu z allelem T. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grup pacjentów SOZN z grupą SWZN oraz w porównaniu całej grupy z IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele ( $p>0,05$ ), (Załącznik 32, Tabela 47).

#### **rs2070767**

Polimorfizm rs2070767 genu *MIF* znajduje się w rejonie 3'UTR i związany jest z substytucją tyminy cytozyną (T>C). W porównaniu grup pacjentów: SOZN z grupą ze SWZN zaobserwowano związek allelu T w układzie heterozygotycznym (CT) z fenotypem SOZN w addytywnym modelu porównawczym (CT vs CC), ( $p=0,047$ ; OR=3,00; 95% CI=1,043-8,628). Dodatkowo zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu T z fenotypem SO związanej z IZN, w porównaniu grup: SOZN i SWZN w dominującym modelu porównawczym (TT+CT vs CC) ( $p=0,091$ ; OR=2,45; 95% CI=0,908-6,609). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównywanych grupach ( $p>0,05$ ). Nie wykazano także istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli w porównaniu całej grupy z IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ), (Załącznik 32, Tabela 47).

#### **rs2000466**

Polimorfizm rs2000466 zlokalizowany jest w rejonie 3'UTR i polega na substytucji tyminy guaniną (T>G). Na podstawie pozyskanych wyników częstości genotypów zaobserwowano związek allelu G w układzie heterozygotycznym (TG) z SWZN w addytywnym modelu porównawczym (TG vs TT) oraz w dominującym modelu porównawczym (GG+TG vs TT) w porównaniu grup SOZN z SWZN ( $p=0,036$ ; OR=0,30, 95%CI=0,105-0,858 oraz  $p=0,028$ ; OR=0,32; 95% CI=0,119-0,869 odpowiednio), wskazując na jego potencjalny charakter protekcyjny. W porównaniu częstości alleli grupy pacjentów ze SOZN z grupą ze SWZN zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu G z SWZN ( $p=0,063$ ; OR=0,44; 95% CI=0,196-0,988). W porównaniu całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w rozpatrywanych modelach porównawczych ( $p>0,05$ ), (Załącznik 32, Tabela 47).

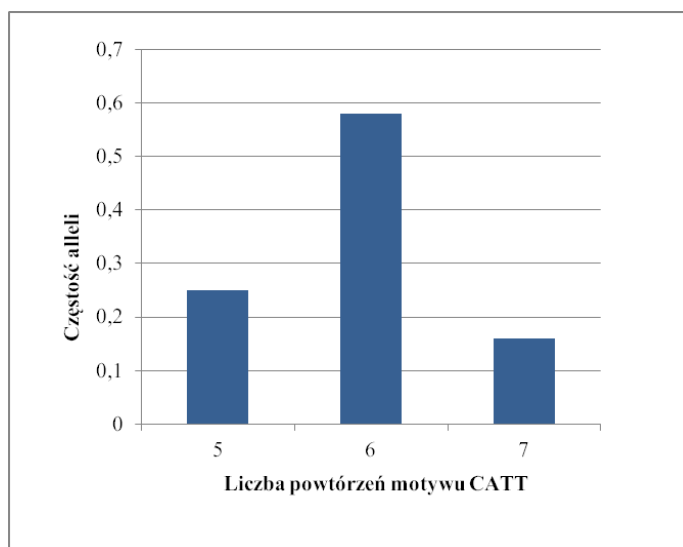
#### **rs34383331**

Polimorfizm rs34383331 znajduje się w rejonie 3'UTR i polega na substytucji tyminy adeniną (T>A). Zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu A z fenotypem SW związanym z IZN w heterozygotycznym układzie TA w addytywnym modelu porównawczym (TA vs TT) w porównaniu grup SOZN z SWZN wskazując na jego działanie ochronne ( $p=0,070$ ; OR=0,34; 95% CI=0,123-0,968). Wyniki bliskie istotności statystycznej otrzymano w modelu dominującym (AA+TA vs TT) porównując grupy: SOZN i SWZN. Wskazano na potencjalny charakter ochronny allelu A przed SOZN ( $p=0,051$ ; OR=0,362; 95% CI=0,135-0,968). W pozostałych przypadkach nie wykazano istotnych statystycznie różnic ( $p>0,05$ ). Nie zaobserwowano istotnych

statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli w porównaniu grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ), (Załącznik 32, Tabela 48).

#### 5.4.2. Analiza asocjacyjna polimorfizmów krótkich powtórzeń tandemowych rs5844572 (-/CATT)

W rejonie promotorowym genu *MIF* zidentyfikowano polimorfizm krótkich powtórzeń tandemowych (STR). Polimorfizm rs5844572 (CATT<sub>5-8</sub>), zlokalizowany jest w pozycji -794 od miejsca startu transkrypcji i polega na powtórzeniach czteronukleotydowego motywu CATT. Dane literaturowe wskazują na liczbę 8 powtórzeń. W badanej populacji polskiej (z regionu wielkopolski) pozyskano powtórzenia motywu CATT w liczbie 5, 6 lub 7 i określono częstości zidentyfikowanych alleli (Ryc. 21.). Uzyskano następujące genotypy: CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>5</sub>, CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>6</sub>, CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>7</sub>, CATT<sub>6</sub>/CATT<sub>6</sub>, CATT<sub>6</sub>/CATT<sub>7</sub>, CATT<sub>7</sub>/CATT<sub>7</sub>. Tabela 49 przedstawia rozkład obserwowanych genotypów oraz alleli we wszystkich badanych grupach. Analizując polimorfizm STR genu *MIF*, zaobserwowano najczęstsze występowanie genotypu CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>6</sub> w grupie pacjentów z SOZN (41,46%) oraz CATT<sub>6</sub>/CATT<sub>7</sub> w grupie kontrolnej (33,33%). Wykazano istotną statystycznie większą częstość występowania genotypu CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>6</sub> u pacjentów z SOZN w porównaniu z grupą SWZN ( $p = 0,017$ ; OR=4,60; 95% CI=1,356-15,632). Genotyp CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>6</sub> występował około 3 razy częściej w grupie SOZN w porównaniu z SWZN. Nie zaobserwowano genotypu CATT<sub>7</sub>/CATT<sub>7</sub> w grupie kontrolnej. W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów oraz alleli w porównaniu grupy pacjentów z SOZN z grupą SWZN oraz w porównaniu całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ).



**Rycina 21.** Rozkład częstości alleli polimorfizmu krótkich powtórzeń tandemowych (STR) rs5844572 (CATT<sub>5-8</sub>) genu *MIF* w badanej populacji polskiej.

**Tabela 49.** Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu rs5844572 (CATT<sub>5-8</sub>) genu *MIF* w grupie pacjentów ze SOZN z grupą pacjentów ze SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.

Genotypy	SOZN n=41	SWZ n=30	OR (95% CI)	p
5/5	2(4,88%)	4(13,33%)	0,33 (0,057-1,954)	0,233
5/6	17(41,46%)	4(13,33%)	4,60 (1,356-15,632)	<b>0,017</b>
5/7	2(4,88%)	2(6,67%)	0,72 (0,095-5,408)	>0,999
6/6	13(31,71%)	12(40,00%)	0,70 (0,621-1,861)	0,616
6/7	6(14,63%)	7(23,33%)	0,56 (0,168-1,890)	0,371
7/7	1(2,40%)	1(3,33%)	0,73 (0,044-12,076)	>0,999
<b>Allele</b>				
5	23 (28,00%)	14 (23,33%)	1,28 (0,594-2,761)	0,567
6	49 (59,80%)	35 (58,33%)	1,06 (0,539-2,087)	0,865
7	10 (12,20%)	11 (18,33%)	0,62 (0,244-1,568)	0,345
Genotypy	IZN n=71	Grupa kontrolna n=30	OR (95%CI)	p
5/5	6 (8,45%)	2 (6,67%)	1,29 (0,246-6,800)	>0,999
5/6	21 (29,58%)	8 (26,67%)	1,16 (0,444-3,006)	0,815
5/7	4 (5,63%)	2 (6,67%)	0,84 (0,145-4,828)	>0,999
6/6	25 (35,21%)	8 (26,67%)	1,50 (0,581-3,843)	0,490
6/7	13 (18,31%)	10 (33,33%)	0,45 (0,170-1,181)	0,122
7/7	2 (2,82%)	0 (0,00%)	-	>0,999
<b>Allele</b>				
5	37 (26,06%)	14 (23,33%)	1,16 (0,572-2,345)	0,727
6	84 (59,15%)	34 (56,67%)	1,11 (0,602-2,039)	0,757
7	21 (14,79%)	12 (20,00%)	0,69 (0,317-1,521)	0,406

SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym, IZN – pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym, OR – iloraz szans, p – istotność statystyczna (kolor czerwony – wynik istotny statystycznie)

Zakładając, że liczba powtórzeń CATT może wpływać na poziom ekspresji genu, dokonano podziału obserwowanych genotypów na „genotypy wysokiej ekspresji”: 5/7; 6/7; 7/7 oraz „genotypy niskiej ekspresji”: 5/5; 5/6; 6/6. Dokonano porównań w obrębie grup: SOZN z SWZN oraz IZN z grupą kontrolną zestawionych genotypów: 5/5, 5/X, X/X, gdzie X to 6 lub 7 oraz Y/Y, 7/Y, 7/7, gdzie Y to 5 lub 6. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano istotne statystycznie częstsze występowanie genotypu 5/X (5/6+5/7 vs 6/6+7/7) w grupie SOZN w porównaniu z SWZN (p=0,043; OR=3,17; 95% CI=1,046-9,585). Ryzyko wystąpienia fenotypu SOZN jest 3,17 razy większe u nosicieli genotypów CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>6</sub> („niskiej ekspresji”) lub CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>7</sub> („wysokiej ekspresji”) w porównaniu z SWZN. W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania „genotypów wysokiej i niskiej ekspresji” (p>0,05), (Tabela 50).

**Tabela 50.** Porównanie rozkładu liczebności i częstości tzw. „genotypów wysokiej i niskiej ekspresji” polimorfizmu rs5844572 (CATT<sub>5,8</sub>) genu *MIF* w grupie pacjentów ze SOZN z grupą pacjentów ze SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.

MIF		n=41	n=30	p	OR	95% CI	n=71	n=30	p	OR	95% CI
rs5844572 (CATT <sub>5,8</sub> )	Genotypy	Grupy badane					Grupy badane				
		SOZN	SWZN				IZN	Grupa kontrolna			
	X/X	20 (48,78%)	20 (66,67%)				40 (56,34%)	18 (60%)			
	5/X	19 (46,34%)	6 (20,00%)	<b>0,043<sup>a</sup></b>	3,17 <sup>a</sup>	(1,046-9,585) <sup>a</sup>	25 (35,21%)	10 (33,33%)	>0,999 <sup>a</sup>	1,13 <sup>a</sup>	(0,448-2,824) <sup>a</sup>
	5/5	2 (4,88%)	4 (13,33%)	0,667 <sup>b</sup>	0,50 <sup>b</sup>	(0,082-3,046) <sup>b</sup>	6 (8,45%)	2 (6,67%)	>0,999 <sup>b</sup>	1,35 <sup>b</sup>	(0,248-7,348) <sup>b</sup>
<b>a - 5/X vs X/X</b>											
<b>b - 5/5 vs X/X</b>											
	Y/Y	32 (78,05%)	20 (66,67%)				52 (73,24%)	18 (60,00%)			
	7/Y	8 (19,51%)	9 (30,00%)	0,397 <sup>c</sup>	0,56 <sup>c</sup>	(0,184-1,676) <sup>c</sup>	17 (23,94%)	12 (40,00%)	0,151 <sup>c</sup>	0,49 <sup>c</sup>	(0,197-1,222) <sup>c</sup>
	7/7	1 (2,44%)	1 (3,33%)	>0,999 <sup>d</sup>	0,63 <sup>d</sup>	(0,037-10,566) <sup>d</sup>	2 (2,82%)	0 (0,00%)	>0,999 <sup>d</sup>	1,76 <sup>d</sup>	(0,081-38,425) <sup>d</sup>
<b>c - 7/Y vs Y/Y</b>											
<b>d - 7/7 vs Y/Y</b>											

X – 6 lub 7 powtórzeń, Y – 5 lub 6 powtórzeń; 5/7, 6/7, 7/7 – genotypy „wysokiej ekspresji”; 5/5, 5/6, 6/6 – genotypy „niskiej ekspresji”; SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym, IZN – pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym, OR – iloraz szans, 95% CI – 95% przedział ufności, p – istotność statystyczna

### 5.4.3. Korelacja polimorfizmów rejonu promotorowego genu *MIF* ze zjawiskiem steroidooporności

Porównano między sobą polimorfizmy rejonu promotorowego: rs755622G>C (-173G>C) i rs5844572 (CATT<sub>5-8</sub>). Na podstawie wyników zaobserwowano istotne statystycznie różnice w częstościach występowania genotypu (CATT)5/6\_GG w grupie SOZN w porównaniu z SWZN ( $p=0,002$ , OR=8,96; 95% CI=1,872-42,888). Wskazuje to na około 9-krotnie zwiększone ryzyko wystąpienia fenotypu steroidooporności u osób z IZN będących nosicielami tego genotypu. Częstość genotypu (CATT)5/6\_GG była około 5,8 razy wyższa w grupie SOZN w porównaniu z grupą SWZN (39,0% i 6,7% odpowiednio), (Tabela 51). W pozostałych przypadkach nie otrzymano istotnych statystycznie różnic zarówno w porównaniu grup pacjentów SOZN z SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ).

**Tabela 51.** Porównanie korelacji rozkładu liczebności i częstości genotypów polimorfizmów: rs5844572 (CATT<sub>5-8</sub>) i rs755622G>C genu *MIF* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.

Genotypy	SOZN	SWZN	OR (95% CI)	p
(CATT)5/5_GG	1 (2,4%)	4 (13,3%)	0,16 (0,017-1,536)	0,155
(CATT)5/5_GC	1 (2,4%)	0 (0,0%)	2,26 (0,089-57,398)	>0,999
(CATT)5/6_GG	16 (39,0%)	2 (6,7%)	8,96 (1,872-42,888)	<b>0,002</b>
(CATT)5/6_GC	1 (2,4%)	2 (6,7%)	0,35 (0,030-4,050)	0,570
(CATT)5/7_GC	2 (4,9%)	2 (6,7%)	0,72 (0,095-5,408)	>0,999
(CATT)6/6_GG	11 (26,8%)	9 (30,0%)	0,86 (0,302-2,427)	0,795
(CATT)6/6_GC	2 (4,9%)	3 (10,0%)	0,46 (0,072-2,951)	0,645
(CATT)6/7_GC	5 (12,2%)	6 (20,0%)	0,56 (0,152-2,027)	0,509
(CATT)6/7_CC	1 (2,4%)	1 (3,3%)	0,72 (0,044-12,076)	>0,999
(CATT)7/7_CC	1 (2,4%)	1 (3,3%)	0,72 (0,044-12,076)	>0,999
Genotypy	Grupa kontrolna	IZN	OR (95%CI)	p
(CATT)5/5_GG	2 (6,7%)	5 (7,0%)	1,06 (0,194-5,796)	>0,999
(CATT)5/5_GC	0 (0,0%)	1 (1,4%)	0,77 (0,031-19,453)	>0,999
(CATT)5/6_GG	8 (26,7%)	18 (25,4%)	0,93 (0,354-2,464)	>0,999
(CATT)5/6_GC	0 (0,0%)	3 (4,2%)	0,32 (0,016-0,405)	0,553
(CATT)5/7_GC	2 (6,7%)	4 (5,6%)	0,84 (0,145-4,828)	>0,999
(CATT)6/6_GG	6 (20%)	20 (28,2%)	1,57 (0,558-4,408)	0,462
(CATT)6/6_GC	2 (6,7%)	5 (7,0%)	1,06 (0,195-5,796)	>0,999
(CATT)6/7_GC	9 (30,0%)	11 (15,5%)	0,43 (0,156-1,176)	0,108
(CATT)6/7_CC	1 (3,3%)	2 (2,8%)	0,84 (0,073-9,638)	>0,999
(CATT)7/7_CC	0 (0,0%)	2 (2,8%)	0,46 (0,021-9,779)	>0,999

(CATT)5/5\_GG – niskie ryzyko; (CATT)7/7\_CC – wysokie ryzyko; SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym, IZN – pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym, OR – iloraz szans, 95% CI – 95% przedział ufności, p – istotność statystyczna

## 6. Analiza nierównowagi sprzężeń genów kandydujących: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF*

Zidentyfikowane polimorfizmy SNP wytypowanych genów poddano analizie nierównowagi sprzężeń (LD) za pomocą programu HaploView 4.2. LD dla wszystkich genów badano w grupach: SOZN i SWZN oraz IZN i grupa kontrolna.

### 6.1 Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *NR3C1*

Analizie LD poddano dziewięć zidentyfikowanych polimorfizmów SNP w genie *NR3C1*.

#### 6.1.1. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *NR3C1* dla grupy pacjentów z SOZN i SWZN

Program HaploView wygenerował charakterystyki zidentyfikowanych w trakcie sekwencjonowania SNP. Wszystkie analizowane polimorfizmy wykazywały zgodność z prawem HWE ( $p > 0,05$ ), dzięki czemu wszystkie zostały poddane interpretacji. Charakterystykę polimorfizmów uwzględniającą ich pozycję chromosomową, test zgodności z prawem HWE, allele wchodzące w ich skład oraz częstości alleli rzadszych w badanych grupach przedstawia tabela 52.

**Tabela 52.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *NR3C1* w grupach pacjentów z SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs6198	142657621	0,50	0,134	A:G
rs10482714	142657904	1,00	0,028	G:A
rs6191	142658156	0,86	0,493	T:G
rs6196	142661490	0,41	0,155	T:C
rs56149945	142779317	1,00	0,056	A:G
rs72542742	142779720	1,00	0,007	G:A
rs6190	142780337	1,00	0,021	G:A
rs6189	142780339	1,00	0,021	G:A
rs72555801	142814062	1,00	0,007	G:A

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE – prawo Hardy’ego Weinberga, MAF – częstość allelu rzadszego

W analizie asocjacji poszczególnych polimorfizmów zaobserwowano istotne statystycznie częstsze występowanie allelu G dla polimorfizmu rs6190 ( $p=0,041$ ) oraz dla polimorfizmu rs6189 ( $p=0,041$ ) w grupie SOZN w porównaniu z SWZN. Pozostałe analizowane polimorfizmy genu *NR3C1* nie wykazały istotnego statystycznie związku z SOZN w porównaniu z SWZN. W przypadku rs10482714 zaobserwowano trend w kierunku asocjacji allelu A z podgrupą SOZN ( $p=0,083$ ), (Tabela 53).

**Tabela 53.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *NR3C1* w grupach SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Sprzężony allel	Stosunek częstości SOZN/SWZN	$\chi^2$	p
rs6198	A	0,890 / 0,833	0,968	0,325
rs10482714	A	0,049 / 0,000	3,012	0,083
rs6191	T	0,524 / 0,483	0,234	0,629
rs6196	C	0,183 / 0,117	1,162	0,281
rs56149945	A	0,951 / 0,933	0,208	0,648
rs72542742	G	1,000 / 0,983	1,376	0,241
rs6190	G	1,000 / 0,950	4,188	0,041
rs6189	G	1,000 / 0,950	4,188	0,041
rs72555801	A	0,012 / 0,000	0,737	0,391

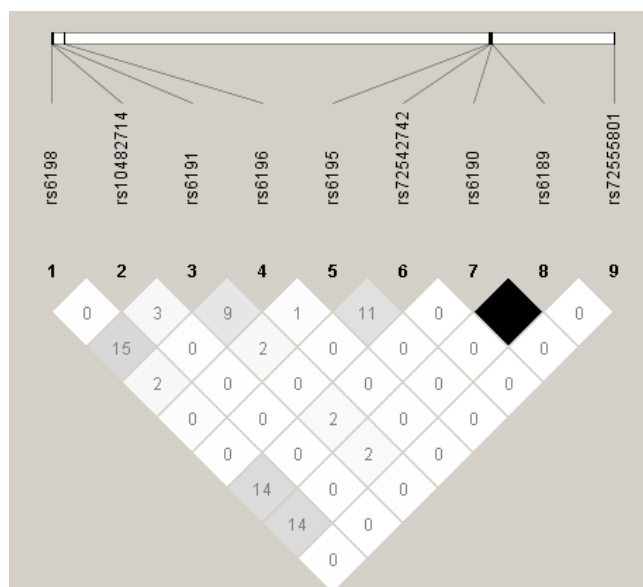
SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności (kolor czerwony – wynik istotny statystycznie, kolor zielony – wynik bliski istotności statystycznej)

Na podstawie analizy LD, dwa spośród dziewięciu polimorfizmów wskazują na silne powiązanie. Są to polimorfizmy rs6190 i rs6189. Pomimo stwierdzenia silnej korelacji pomiędzy tymi markerami ( $D'=1$ ) i wysokiej wartości współczynnika korelacji  $r^2$  (Tabela 54), wartość  $MAF < 0,05$  uniemożliwiła połączenie ich w bloki (Ryc. 22). W pozostałych przypadkach pomimo wartości  $D'=1$  sugerującej całkowite sprzężenie, stwierdzono niskie  $r^2$  ( $0 < r^2 < 1$ ), co sugeruje, że sprzężenie jest mało prawdopodobne.

**Tabela 54.** Polimorfizmy SNP genu *NR3C1* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	$D'$	$r^2$	95% CI	Odległość w pz
rs6190_rs6189	1,00	1,00	0,59-1,00	2,00

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu,  $D'$  – wskaźnik Lewontine'a,  $r^2$  – kwadrat współczynnika siły korelacji pomiędzy częstościami alleli, 95% CI – 95% przedział ufności, pz – pary zasad

**Rycina 22.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *NR3C1* w badanych grupach pacjentów z SOZN i SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$ , biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2=100\%$ ).



W związku z zastosowaniem testów wielokrotnych, przeprowadzono korektę wartości istotności statystycznej  $p$  wyników asocjacyjnych w celu wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych. Test 10 000 permutacji podniósł wartość poziomu istotności  $p$  dla polimorfizmów rs6190 i rs6189 do  $p=0,194$ , co nie potwierdziło związku allelu G tych polimorfizmów z grupą pacjentów z SOZN w porównaniu z grupą SWZN. Również w przypadku polimorfizmu rs10482714, test permutacji 10 000 nie potwierdził potencjalnego związku allelu A z SOZN w porównaniu z SWZN. Wartość poziomu istotności  $p$  dla tego polimorfizmu wzrosła do  $p=0,456$  (Tabela 55).

**Tabela 55.** Test permutacji dla polimorfizmów rs6190, rs6189 oraz rs10482714 genu *NR3C1* badanych w grupach SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	$\chi^2$	P
rs6190	4,188	0,194
rs6189	4,188	0,194
rs10482714	3,012	0,456

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat,  $p$  – poziom istotności

### 6.1.2. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *NR3C1* dla grupy pacjentów z IZN oraz grupy kontrolnej

Wszystkie dziewięć analizowanych polimorfizmów było zgodnych z prawem HWE (Tabela 56), w związku z czym poddano je dalszej analizie LD.

**Tabela 56.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *NR3C1* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs6198	142657621	0,19	0,144	A:G
rs10482714	142657904	1,00	0,035	G:A
rs6191	142658156	1,00	0,500	G:G
rs6196	142661490	0,29	0,149	T:C
rs56149945	142779317	1,00	0,059	A:G
rs72542742	142779720	1,00	0,005	G:A
rs6190	142780337	1,00	0,020	G:A
rs6189	142780339	1,00	0,020	G:A
rs72555801	142814062	1,00	0,005	G:A

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE – prawo Hardy'ego Weinberga, MAF – częstość allelu rzadszego

Analizując asocjację poszczególnych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji w występowaniu sprzężonych alleli poszczególnych polimorfizmów w grupie z IZN w porównaniu z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ), (Tabela 57).

Na podstawie analizy LD, w oparciu o wygenerowaną w programie strukturę genu dla grupy pacjentów z IZN oraz grupy kontrolnej (Ryc. 23) wykazano, że dwa polimorfizmy spośród dziewięciu wskazują na silne powiązanie między markerami. Jest to korelacja pomiędzy polimorfizmami: rs6190 i rs6189. W przypadku zestawu tych markerów, pomimo wysokiej wartości  $D'$  oraz współczynnika korelacji  $r^2$  (Tabela 58), wartość  $MAF<0,05$  dla tych polimorfizmów uniemożliwiła wygenerowanie bloków haplotypowych. W pozostałych

przypadkach, pomimo wartości  $D'=1$  sugerującej całkowite sprzężenie, stwierdzono niskie wartości  $r^2$  ( $0 < r^2 < 1$ ), co sugeruje, że sprzężenie jest mało prawdopodobne.

**Tabela 57.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *NR3C1* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

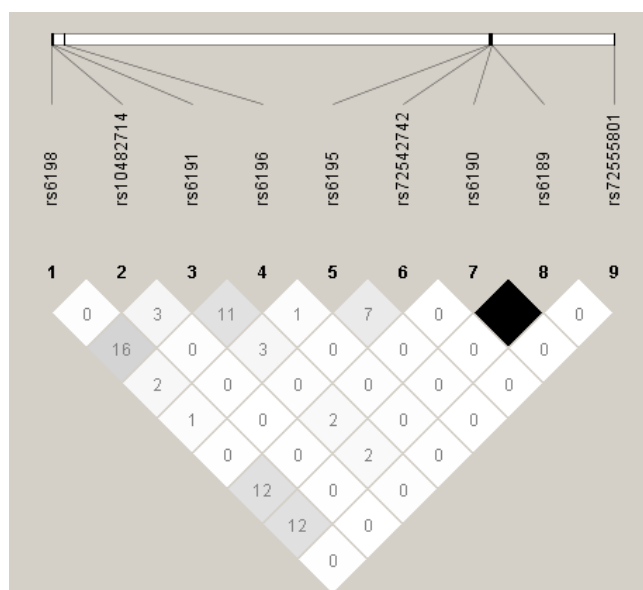
Polimorfizm SNP	Sprężony allel	Stosunek częstości SOZN/SWZN	$\chi^2$	p
rs6198	A	0,866 / 0,833	0,37	0,5427
rs10482714	G	0,972 / 0,950	0,601	0,4382
rs6191	T	0,507 / 0,483	0,095	0,7581
rs6196	C	0,155 / 0,133	0,156	0,6933
rs56149945	A	0,944 / 0,933	0,081	0,7766
rs72542742	A	0,007 / 0,000	0,425	0,5146
rs6190	A	0,021 / 0,017	0,043	0,8353
rs6189	A	0,021 / 0,017	0,043	0,8353
rs72555801	A	0,007 / 0,000	0,425	0,5146

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, IZN – pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

**Tabela 58.** Polimorfizmy SNP genu *NR3C1* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	D'	$r^2$	95% CI	Odległość w pz
rs6190_rs6189	1,00	1,00	0,67-1,00	2

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, D' – wskaźnik Lewontine'a,  $r^2$  –kwadrat współczynnika siły korelacji pomiędzy częstościami alleli, 95% CI – 95% przedział ufności, pz – pary zasad



**Rycina 23.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *NR3C1* w badanych grupach pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0 < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2 = 100\%$ ).

## 6.2. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *ABCB1*

Analizie LD poddano 26 polimorfizmów SNP genu *ABCB1*, otrzymanych w wyniku sekwencjonowania. Program HaploView 4.2 nie ma możliwości dokonywania analiz

trialelicznych SNP, w związku z czym jeden ze zidentyfikowanych polimorfizmów (rs2032582), nie został do nich włączony.

### 6.2.1. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *ABCB1* dla grupy pacjentów z SOZN i SWZN

Wygenerowano charakterystyki zidentyfikowanych SNP uwzględniające ich pozycje chromosomowe, test na zgodność z prawem HWE, allele wchodzące w ich skład oraz częstości alleli rzadszych w badanych grupach (Tabela 59). W przypadku jednego polimorfizmu (rs2235074) odnotowano odstępstwo od prawa HWE, w związku z czym nie uwzględniano go w dalszej interpretacji.

W analizie asocjacji poszczególnych SNP zaobserwowano trend w kierunku związku allelu T polimorfizmu rs2235033 z grupą pacjentów ze SOZN w porównaniu z SWZN ( $p=0,073$ ). W pozostałych przypadkach nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstościach sprzężonych alleli z SOZN w porównaniu z SWZN ( $p>0,05$ ), (Tabela 60).

**Tabela 59.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *ABCB1* w grupach pacjentów z SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs17064	87133470	1,00	0,05	A:T
rs2235048	87138511	0,64	0,42	C:T
rs2235047	87138532	1,00	0,03	T:G
rs1045642	87138645	0,64	0,42	T:C
rs61040122	87138847	1,00	0,01	C:T
rs2032583	87160561	1,00	0,06	T:C
rs9282563	87160645	1,00	0,02	C:T
rs2235040	87165750	1,00	0,06	G:A
rs1922242	87173667	0,39	0,47	T:A
rs2235046	87174066	0,60	0,44	G:A
rs191864178	87174122	1,00	0,04	G:A
rs28381916	87175141	1,00	0,02	G:A
rs2235013	87178626	0,52	0,48	A:G
rs2235035	87179086	0,14	0,39	C:T
rs2235033	87179143	0,52	0,48	T:C
rs2032588	87179443	1,00	0,04	C:T
rs1128503	87179601	0,40	0,46	C:T
rs2229109	87179809	1,00	0,01	G:A
rs10276036	87180198	0,40	0,46	A:G
rs1922240	87183354	0,14	0,39	A:G
rs2235023	87190452	1,00	0,03	G:A
rs2235015	87199564	0,70	0,13	G:T
rs2235074	87225046	<b>0,02</b>	0,06	C:T
rs9282564	87229440	0,42	0,14	A:G
rs2214102	87229501	0,38	0,06	G:A

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE – prawo Hardy'ego Weinberga, MAF – częstość allelu rzadszego

**Tabela 60.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *ABCB1* w grupach SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Sprzężony allel	Stosunek częstości SOZN/SWZN	$\chi^2$	p
rs17064	A	0,951 / 0,950	0,001	0,974
rs2235048	C	0,610 / 0,533	0,829	0,363
rs2235047	T	0,988 / 0,950	1,809	0,179
rs1045642	T	0,610 / 0,533	0,829	0,363
rs61040122	T	0,024 / 0,000	1,484	0,223
rs2032583	T	0,963 / 0,900	2,347	0,126
rs9282563	T	0,037 / 0,000	2,242	0,134
rs2235040	G	0,963 / 0,900	2,347	0,126
rs1922242	T	0,549 / 0,500	0,331	0,565
rs2235046	A	0,463 / 0,400	0,566	0,452
rs191864178	G	0,976 / 0,950	0,669	0,413
rs28381916	A	0,037 / 0,000	2,242	0,134
rs2235013	G	0,512 / 0,433	0,863	0,353
rs2235035	C	0,659 / 0,550	1,72	0,190
rs2235033	T	0,585 / 0,433	3,209	0,073
rs2032588	T	0,037 / 0,033	0,011	0,917
rs1128503	T	0,500 / 0,400	1,396	0,237
rs2229109	A	0,012 / 0,000	0,737	0,391
rs10276036	G	0,500 / 0,400	1,396	0,237
rs1922240	A	0,659 / 0,550	1,72	0,190
rs2235023	G	0,976 / 0,967	0,101	0,750
rs2235015	G	0,902 / 0,817	2,199	0,138
rs2235074	T	0,073 / 0,033	1,034	0,309
rs9282564	A	0,866 / 0,850	0,072	0,789
rs2214102	G	0,951 / 0,933	0,208	0,648

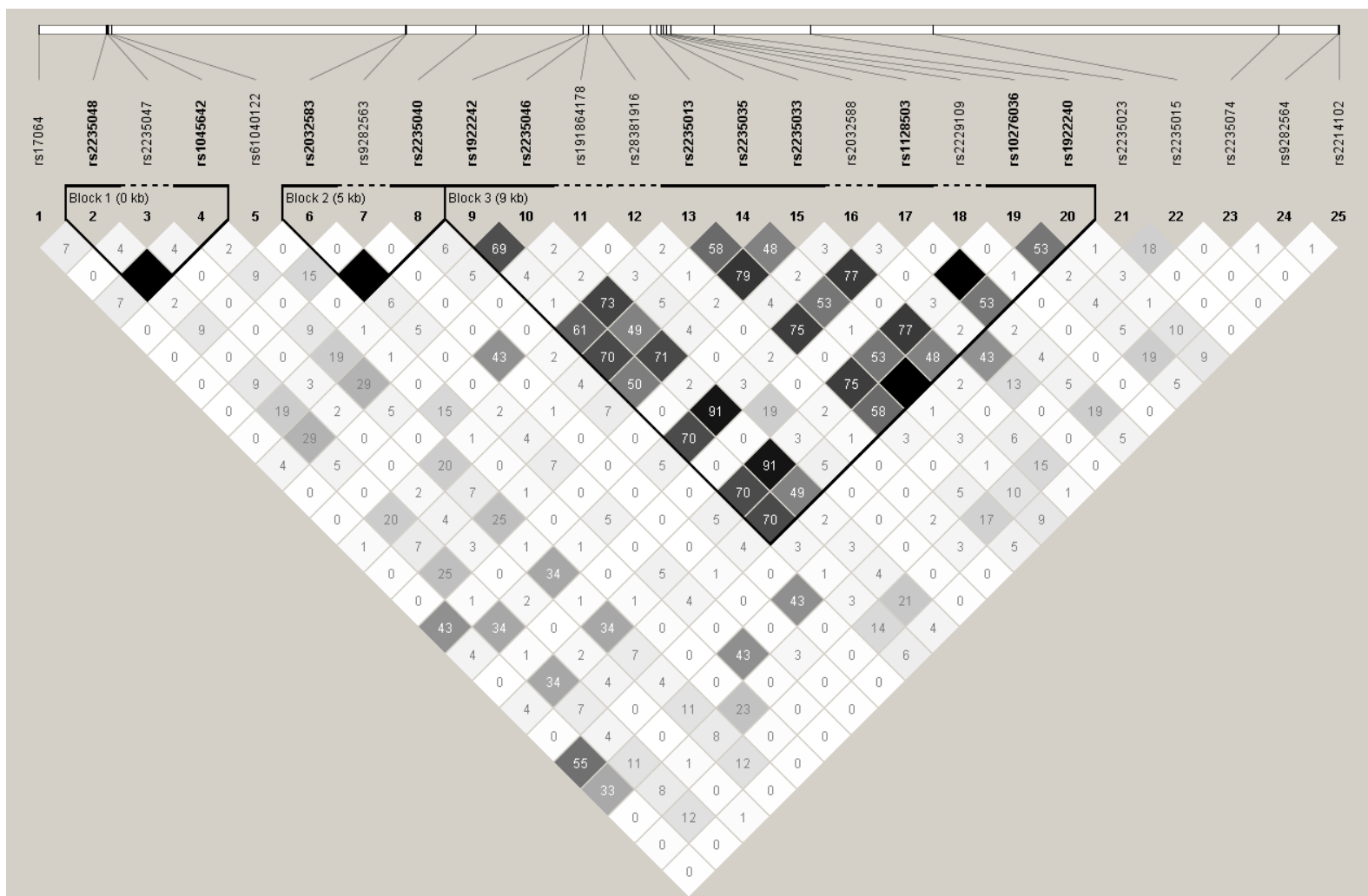
W analizie LD silne sprzężenie zaobserwowano pomiędzy dwunastoma spośród dwudziestu pięciu polimorfizmów. Najsilniejsze sprzężenie wykazano między następującymi polimorfizmami: rs2235048 i rs1045642, rs2032583 i rs2235040, rs1922242 i rs2235035, rs2235046 i rs2235013, rs1922242 i rs10276036, rs1922242 i rs1922240, rs2235046 i rs2235033, rs2235046 i rs1128503, rs2235046 i rs10276036, rs2235013 i rs2235033, rs2235013 i rs1128503, rs2235013 i rs10276036, rs2235035 i rs1922240, rs2235033 i rs1128503, rs2235033 i rs10276036, rs1128503 i rs10276036 ( $D' > 0,90$ ,  $r^2 > 0,70$ ). Słabsze sprzężenia odnotowano dla następujących par polimorfizmów: rs1922242 i rs2235013, rs1922242 i rs2235033, rs2235046 i rs2235035, rs2235046 i rs1922240, rs2235013 i rs2235035, rs2235013 i rs1922240, rs2235035 i rs1128503, rs2235035 i rs10276036, rs1128503 i rs1922240, rs10276036 i rs1922240 ( $D' > 0,72$ ,  $r^2 = 0,49-0,62$ ), (Tabela 61). W pozostałych przypadkach zestawów markerów wykazano stosunkowo niskie wartości  $D'$  oraz  $r^2$ , w wyniku czego pojawienie się sprzężenia między nimi jest mało prawdopodobne.

**Tabela 61.** Polimorfizmy SNP genu *ABCB1* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN

Polimorfizm SNP	D'	r <sup>2</sup>	95% CI	Odległość w pz
rs2235048_rs1045642	1,00	1,00	0,95-1,00	134
rs2032583_rs2235040	1,00	1,00	0,83-1,00	5189
rs1922242_rs2235013	0,87	0,62	0,73-0,94	4959
rs1922242_rs2235035	1,00	0,71	0,90-1,00	5419
rs1922242_rs2235033	0,72	0,51	0,58-0,82	5476
rs1922242_rs10276036	0,97	0,70	0,85-1,00	6531
rs1922242_rs1922240	1,00	0,71	0,90-1,00	9687
rs2235046_rs2235013	0,94	0,74	0,82-0,98	4560
rs2235046_rs2235035	1,00	0,49	0,87-1,00	5020
rs2235046_rs2235033	1,00	0,71	0,90-1,00	5077
rs2235046_rs1128503	1,00	0,92	0,93-1,00	5535
rs2235046_rs10276036	1,00	0,92	0,93-1,00	6132
rs2235046_rs1922240	1,00	0,49	0,87-1,00	9288
rs2235013_rs2235035	1,00	0,58	0,88-1,00	460
rs2235013_rs2235033	0,97	0,79	0,87-1,00	517
rs2235013_rs1128503	0,91	0,76	0,80-0,97	975
rs2235013_rs10276036	0,91	0,76	0,80-0,97	1572
rs2235013_rs1922240	1,00	0,58	0,88-1,00	4728
rs2235035_rs1128503	1,00	0,53	0,88-1,00	515
rs2235035_rs10276036	1,00	0,53	0,88-1,00	1112
rs2235035_rs1922240	1,00	1,00	0,95-1,00	4268
rs2235033_rs1128503	1,00	0,78	0,91-1,00	458
rs2235033_rs10276036	1,00	0,78	0,91-1,00	1055
rs1128503_rs10276036	1,00	1,00	0,95-1,00	597
rs1128503_rs1922240	1,00	0,53	0,88-1,00	3753
rs10276036_rs1922240	1,00	0,53	0,88-1,00	3156

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, D' – wskaźnik Lewontine'a, r<sup>2</sup> – kwadrat współczynnika korelacji nierównowagi sprzężeń, 95% CI – 95% przedział ufności, pz – pary zasad

Spośród analizowanych polimorfizmów, dwanaście SNP wykazywało na tyle silną nierównowagę sprzężeń, że wygenerowano trzy bloki haplotypów (Ryc. 24.). Najczęściej występującym haplotypem okazał się haplotyp z bloku drugiego, utworzony z allelu T polimorfizmu rs2032583 oraz allelu G polimorfizmu rs2235040 (częstość haplotypu TG=0,937), (Tabela 62). Natomiast najrzadziej występowały dwa haplotypy z bloku trzeciego z częstością wynoszącą zaledwie 0,014. Pierwszy haplotyp TAACTTGA utworzony był z allelu T polimorfizmu rs1922242, allelu A polimorfizmu rs2235046, allelu A polimorfizmu rs2235013, allelu C polimorfizmu rs2235035, allelu T polimorfizmu rs2235033, allelu T polimorfizmu rs1128503, allelu G polimorfizmu rs10276036 oraz allelu A polimorfizmu rs1922240. Drugi haplotyp TGGCTTGA składał się z allelu T polimorfizmu rs1922242, allelu G polimorfizmu rs2235046, allelu G polimorfizmu rs2235013, allelu C polimorfizmu rs2235035, allelu T polimorfizmu rs2235033, allelu T polimorfizmu rs1128503, allelu G polimorfizmu rs10276036 oraz allelu A polimorfizmu rs1922240 (Tabela 62).



**Rycina 24.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *ABCB1* w badanych grupach pacjentów z SOZN i SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2 = 100\%$ ).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w rozkładzie częstości wygenerowanych haplotypów w porównaniu grupy pacjentów z SOZN z SWZN, jednakże zaobserwowano trend w kierunku asocjacji haplotypów bloku trzeciego: AGATCCAG z grupą SWZN ( $p=0,054$ ) oraz haplotypu AGATTCAG z grupą SOZN ( $p=0,083$ ), (Tabela 62).

**Tabela 62.** Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN i SWZN.

Haplotyp	Częstość haplotypu	Stosunek częstości SOZN/SWZN	$\chi^2$	p
<b>Blok 1</b>				
CT	0,577	0,610 / 0,533	0,829	0,363
TC	0,423	0,390 / 0,467	0,829	0,363
<b>Blok 2</b>				
TG	<b>0,937</b>	0,963 / 0,900	2,347	0,126
CA	0,063	0,037 / 0,100	2,347	0,126
<b>Blok 3</b>				
TAGCTTGA	0,422	0,439 / 0,400	0,217	0,642
AGATCCAG	0,359	0,293 / 0,450	3,726	<b>0,054</b>
TGACCCAA	0,063	0,036 / 0,100	2,348	0,125
AGACCCAA	0,049	0,073 / 0,017	2,36	0,125
AGGCTCAA	0,028	0,024 / 0,033	0,101	0,750
AGATTCAG	0,028	0,049 / 0,000	3,012	<b>0,083</b>
TAACTTGA	<b>0,014</b>	0,024 / 0,000	1,469	0,226
TGGCTTGA	<b>0,014</b>	0,024 / 0,000	1,484	0,223

IZN – pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności (kolor czerwony – wynik istotny statystycznie, kolor zielony – wynik bliski istotności statystycznej)

Dla danych wykazujących tendencję do asocjacji, dokonano korekty poziomu istotności p za pomocą testu permutacji. Korekta nie potwierdziła związku polimorfizmu rs2235033 oraz haplotypów: AGATCCAG i AGATTCAG w badanych grupach (Tabela 63).

**Tabela 63.** Test permutacji dla polimorfizmu: rs2235033 oraz haplotypów bloku 3: AGATCCAG i AGATTCAG genu *ABCBI* badanych w grupie pacjentów z SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP/haplotyp	$\chi^2$	p
<b>Blok 3: AGATCCAG</b>	3,726	0,650
<b>rs2235033</b>	3,209	0,679
<b>Blok 3: AGATTCAG</b>	3,012	0,816

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

### 6.2.2. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *ABCBI* dla grupy pacjentów z IZN oraz grupy kontrolnej

W programie HaploView 4.2 wygenerowano charakterystykę zidentyfikowanych w trakcie sekwencjonowania polimorfizmów SNP. Spośród 25, jeden polimorfizm (rs2235074) nie był zgodny z prawem HWE ( $p<0,05$ ), w związku z czym został on wyłączony z dalszych analiz (Tabela 64).

**Tabela 64.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *ABCB1* w grupach pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs17064	87133470	1,00	0,05	A:T
rs2235048	87138511	0,85	0,44	C:T
rs2235047	87138532	1,00	0,02	T:G
rs1045642	87138645	0,85	0,44	T:C
rs61040122	87138847	1,00	0,02	C:T
rs2032583	87160561	1,00	0,08	T:C
rs9282563	87160645	1,00	0,02	C:T
rs2235040	87165750	1,00	0,08	G:A
rs1922242	87173667	0,46	0,49	T:A
rs2235046	87174066	1,00	0,42	G:A
rs191864178	87174122	1,00	0,03	G:A
rs28381916	87175141	1,00	0,02	G:A
rs2235013	87178626	1,00	0,46	A:G
rs2235035	87179086	0,32	0,40	C:T
rs2235033	87179143	0,96	0,50	C:T
rs2032588	87179443	1,00	0,04	C:T
rs1128503	87179601	1,00	0,43	C:T
rs2229109	87179809	1,00	0,03	G:A
rs10276036	87180198	1,00	0,44	A:G
rs1922240	87183354	0,22	0,41	A:G
rs2235023	87190452	1,00	0,03	G:A
rs2235015	87199564	1,00	0,15	G:T
rs2235074	87225046	<b>0,02</b>	0,05	C:T
rs9282564	87229440	0,19	0,14	A:G
rs2214102	87229501	0,17	0,07	G:A

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE – prawo Hardy’ego Weinberga, MAF – częstość allelu rzadszego

W analizie asocjacji poszczególnych polimorfizmów zaobserwowano istotnie częstsze występowanie allelu G polimorfizmu rs2229109 w grupie pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną ( $p=0,013$ ). W pozostałych przypadkach nie odnotowano istotnych statystycznie asocjacji z IZN (Tabela 65).

W analizie LD silne sprzężenie zaobserwowano pomiędzy dwunastoma spośród dwudziestu pięciu polimorfizmów. Najsilniejsze sprzężenie wykazano między następującymi polimorfizmami: rs2235048 i rs1045642, rs2032583 i rs2235040, rs2235046 i rs2235013, rs2235046 i rs2235033, rs2235046 i rs1128503, rs2235046 i rs10276036, rs2235013 i rs2235035, rs2235013 i rs2235033, rs2235013 i rs1128503, rs2235013 i rs10276036, rs2235013 i rs1922240, rs2235013 i rs2235033, rs2235035 i rs1128503, rs2235035 i rs10276036, rs2235035 i rs1922240, rs2235033 i rs1128503, rs2235033 i rs10276036, rs1128503 i rs10276036 ( $D' > 0,90$ ,  $r^2 > 0,70$ ). Słabsze sprzężenia odnotowano dla następujących par polimorfizmów: rs2235033 i rs1922240, rs2235046 i rs2235035, rs2235046 i rs1922240, rs1128503 i rs1922240, rs10276036 i rs1922240 ( $D' > 0,80$ ,  $r^2 = 0,45-0,58$ ), (Tabela 66). W pozostałych przypadkach zestawów markerów wykazano stosunkowo niskie wartości  $D'$  oraz  $r^2$ , w wyniku czego pojawienie się sprzężenia między nimi jest mało prawdopodobne. Siła nierównowagi sprzężeń jedenastu polimorfizmów SNP pozwoliła na wygenerowanie trzech bloków haplotypów (Ryc. 25).



**Tabela 65.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *ABCB1* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

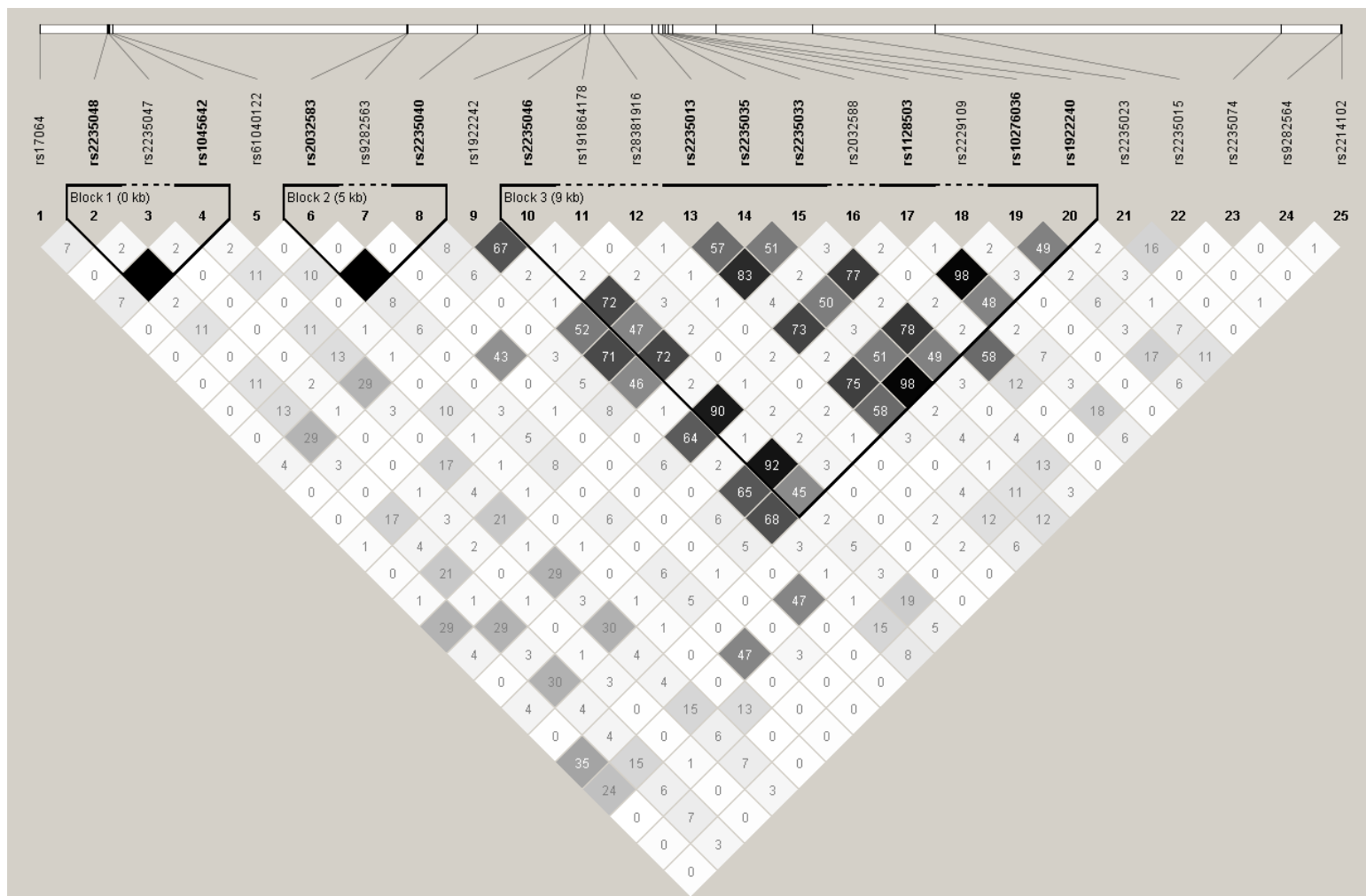
Polimorfizm SNP	Sprzężony allele	Stosunek częstości IZN/grupa kontrolna	$\chi^2$	P
rs17064	A	0,951 / 0,933	0,247	0,619
rs2235048	C	0,577 / 0,533	0,334	0,563
rs2235047	G	0,028 / 0,000	1,724	0,189
rs1045642	T	0,577 / 0,533	0,334	0,563
rs61040122	C	0,986 / 0,983	0,019	0,890
rs2032583	T	0,937 / 0,883	1,642	0,200
rs9282563	T	0,021 / 0,000	1,287	0,257
rs2235040	G	0,937 / 0,883	1,642	0,200
rs1922242	T	0,528 / 0,483	0,339	0,560
rs2235046	A	0,437 / 0,367	0,85	0,357
rs191864178	A	0,035 / 0,000	2,166	0,141
rs28381916	A	0,021 / 0,000	1,287	0,257
rs2235013	G	0,479 / 0,417	0,657	0,418
rs2235035	C	0,613 / 0,567	0,372	0,542
rs2235033	T	0,521 / 0,433	1,301	0,254
rs2032588	T	0,035 / 0,033	0,004	0,947
rs1128503	T	0,458 / 0,367	1,427	0,232
rs2229109	G	0,993 / 0,933	6,212	<b>0,013</b>
rs10276036	G	0,458 / 0,383	0,95	0,330
rs1922240	A	0,613 / 0,550	0,687	0,407
rs2235023	G	0,972 / 0,967	0,039	0,843
rs2235015	G	0,866 / 0,800	1,423	0,233
rs2235074	T	0,056 / 0,017	1,559	0,212
rs9282564	A	0,859 / 0,850	0,029	0,865
rs2214102	G	0,944 / 0,883	2,233	0,135

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, IZN – idiopatyczny zespół nerczycowy,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

**Tabela 66.** Polimorfizmy SNP genu *ABCB1* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	D'	r <sup>2</sup>	95% CI	Odległość w pz
rs2235048_rs1045642	1,00	1,00	0,97-1,0	134
rs2032583_rs2235040	1,00	1,00	0,9-1,0	5189
rs2235046_rs2235013	0,93	0,72	0,84-0,98	4560
rs2235046_rs2235035	1,00	0,48	0,9-1,0	5020
rs2235046_rs2235033	1,00	0,73	0,93-1,0	5077
rs2235046_rs1128503	0,98	0,90	0,91-1,0	5535
rs2235046_rs10276036	1,00	0,92	0,95-1,0	6132
rs2235046_rs1922240	0,97	0,45	0,84-1,0	288
rs2235013_rs2235035	1,00	0,57	0,91-1,0	460
rs2235013_rs2235033	0,98	0,83	0,9-1,0	517
rs2235013_rs1128503	0,91	0,73	0,82-0,96	975
rs2235013_rs10276036	0,91	0,75	0,82-0,96	1572
rs2235013_rs1922240	1,00	0,58	0,91-1,0	4728
rs2235035_rs2235033	0,89	0,52	0,76-0,95	57
rs2235035_rs1128503	1,00	0,51	0,9-1,0	515
rs2235035_rs10276036	1,00	0,52	0,9-1,0	1112
rs2235035_rs1922240	1,00	0,98	0,95-1,0	4268
rs2235033_rs1128503	1,00	0,77	0,93-1,0	458
rs2235033_rs10276036	1,00	0,79	0,93-1,0	1055
rs2235033_rs1922240	0,86	0,49	0,73-0,93	4211
rs1128503_rs10276036	1,00	0,98	0,96-1,0	597
rs1128503_rs1922240	0,97	0,48	0,85-1,0	3753
rs10276036_rs1922240	0,97	0,49	0,85-1,0	3156

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, D' – wskaźnik Lewontine'a, r<sup>2</sup> – kwadrat współczynnika korelacji nierównowagi sprzężeń, 95% CI – 95% przedział ufności, pz – pary zasad



**Rycina 25.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *ABCB1* w badanych grupach pacjentów z IZN i grupie kontrolnej wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2 = 100\%$ ).

Najczęściej występującym haplotypem okazał się haplotyp z bloku drugiego, utworzony z allelu T polimorfizmu rs2032583 oraz allelu G polimorfizmu rs2235040 (częstość haplotypu TG=0,921). Natomiast najrzadziej występował haplotyp z bloku trzeciego z częstością wynoszącą zaledwie 0,01. Był to haplotyp AACTTGA utworzony z allelu A polimorfizmu rs2235046, allelu A polimorfizmu rs2235013, allelu C polimorfizmu rs2235035, allelu T polimorfizmu rs2235033, allelu T polimorfizmu rs1128503, allelu G polimorfizmu rs10276036 oraz allelu A polimorfizmu rs1922240 (Tabela 67).

**Tabela 67.** Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu *ABCB1* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Haplotyp	Częstość haplotypu	Stosunek częstości IZN/grupa kontrolna	$\chi^2$	p
<b>Blok 1</b>				
CT	0,564	0,577 / 0,533	0,334	0,563
TC	0,436	0,423 / 0,467	0,334	0,563
<b>Blok 2</b>				
TG	<b>0,921</b>	0,937 / 0,883	1,642	0,200
CA	0,079	0,063 / 0,117	1,642	0,200
<b>Blok 3</b>				
AGCTTGA	0,396	0,422 / 0,333	1,388	0,239
GATCCAG	0,381	0,359 / 0,433	0,981	0,322
GACCCAA	0,119	0,113 / 0,133	0,171	0,679
GGCTCAA	0,039	0,035 / 0,050	0,239	0,625
GATTCAG	0,020	0,028 / 0,000	1,697	0,193
GGCTTGA	0,015	0,015 / 0,017	0,011	0,915
AACTTGA	<b>0,010</b>	0,015 / 0,000	0,875	0,350

IZN – pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w rozkładzie częstości wygenerowanych haplotypów w porównaniu grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ), (Tabela 67).

W przypadku polimorfizmu rs2229109, dokonano korekty poziomu istotności  $p$  za pomocą testu permutacji. Korekta nie potwierdziła związku allelu G tego polimorfizmu z IZN w porównaniu z grupą kontrolną ( $p = 0,318$ ,  $\chi^2 = 6,212$ ).

### 6.2.3. Analiza nierównowagi sprzężeń triallelicznego polimorfizmu genu *ABCB1*

W przypadku polimorfizmu triallelicznego zlokalizowanego w genie *ABCB1* – rs2032582 (T>A/G), w celu oszacowania częstości haplotypów w badanych grupach, zastosowano program EH. W oparciu o literaturę wytypowano dwa polimorfizmy: rs2235033 (T>C) i rs1045642 (C>T/A), które poddano analizie sprawdzenia stopnia ich sprzężenia z polimorfizmem rs2032582. Program wygenerował 12 haplotypów, spośród których haplotyp TTT oraz CCG występowały najczęściej w badanych grupach (Tabele 68 i 69). Na podstawie pozyskanych wyników, zaobserwowano istotne statystycznie częstsze występowanie haplotypu TTA w grupie pacjentów z SOZN w porównaniu z SWZN ( $p = 0,003$ ). W pozostałych przypadkach nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania haplotypów w żadnej z badanych grup ( $p > 0,05$ ). Wygenerowane haplotypy i ich częstości dla każdej z badanych grup

z uwzględnieniem testowanych hipotez oraz wartości logarytmu naturalnego i  $\chi^2$  stanowi załącznik 33 i 34.

**Tabela 68.** Rozkład liczby i częstości wygenerowanych haplotypów polimorfizmów: rs2032582, rs2235033, rs1045642 genu *ABCB1* w grupie pacjentów z SOZN oraz SWZN.

Haplotypy	SOZN		SWZN		p*
	Częstość	Liczba	Częstość	Liczba	
CCG	0,263	32	0,359	35	0,106
CCA	0,000	0	0,031	3	0,083
CCT	0,017	2	0,000	0	0,505
CTG	0,123	15	0,172	17	0,336
CTA	0,012	2	0,000	0	0,505
CTT	0,000	0	0,000	0	-
TCG	0,052	6	0,109	10	0,189
TCA	0,000	0	0,000	0	-
TCT	0,011	1	0,000	0	>0,999
TTG	0,087	11	0,000	0	<b>0,003</b>
TTA	0,000	0	0,000	0	-
TTT	0,436	54	0,328	31	0,094

SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym, \* - test dwustronny Fishera, obliczenia w odniesieniu do pozostałych haplotypów

**Tabela 69.** Rozkład liczby i częstości wygenerowanych haplotypów polimorfizmów: rs2032582, rs2235033, rs1045642 genu *ABCB1* w grupie pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej.

Haplotypy	IZN		Grupa kontrolna		p*
	Częstość	Liczba	Częstość	Liczba	
CCG	0,314	67	0,335	29	0,786
CCA	0,014	3	0,017	2	0,630
CCT	0,009	2	0,000	0	>0,999
CTG	0,135	29	0,196	17	0,218
CTA	0,007	1	0,000	0	>0,999
CTT	0,000	0	0,020	2	0,083
TCG	0,079	17	0,107	9	0,504
TCA	0,000	0	0,000	0	-
TCT	0,006	1	0,024	2	0,203
TTG	0,036	8	0,000	0	0,110
TTA	0,000	0	0,000	0	-
TTT	0,400	85	0,300	26	0,115

IZN – idiopatyczny zespół nerczycowy, \* - test dwustronny Fishera, obliczenia w odniesieniu do pozostałych haplotypów

### 6.3. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *HSP90AA1*

#### 6.3.1. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *HSP90AA1* dla grupy pacjentów z SOZN i SWZN

Wszystkie polimorfizmy genu *HSP90AA1* (7 SNP) poddane analizie LD zachowywały zgodność z prawem HWE ( $p > 0,05$ ). Charakterystyka polimorfizmów, z uwzględnieniem ich

pozycji chromosomowej, testu na zgodność z prawem HWE, alleli wchodzące w ich skład oraz częstości alleli rzadszych w badanych grupach, została przedstawiona w tabeli 70.

**Tabela 70.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *HSP90AA1* w grupach pacjentów z SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs2298877	102548224	1,00	0,120	G:A
rs6575895	102548384	1,00	0,113	A:G
rs34644998	102548703	1,00	0,000	A:A
rs7155973	102549839	1,00	0,056	C:T
rs3742429	102550569	1,00	0,141	T:C
rs4947	102550803	1,00	0,148	T:C
rs4586364	102551788	0,98	0,099	T:C

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE – prawo Hardy’ego Weinberga, MAF – częstość allelu rzadszego

W analizie asocjacji poszczególnych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie związków sprzężonych alleli z grupą pacjentów z SOZN w porównaniu z grupą pacjentów z SWZN ( $p > 0,05$ ). Spośród analizowanych SNP, jeden (rs34644998) nie wykazał różnicowania, w związku z czym został wyeliminowany z dalszych analiz (Tabela 71).

**Tabela 71.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *HSP90AA1* w grupach SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Sprzężony allel	Stosunek częstości SOZN/SWZN	$\chi^2$	P
rs2298877	A	0,134 / 0,100	0,383	0,536
rs6575895	G	0,134 / 0,083	0,895	0,344
rs7155973	T	0,073 / 0,033	1,034	0,309
rs3742429	C	0,171 / 0,100	1,432	0,231
rs4947	C	0,183 / 0,100	1,891	0,169
rs4586364	C	0,122 / 0,067	1,192	0,275

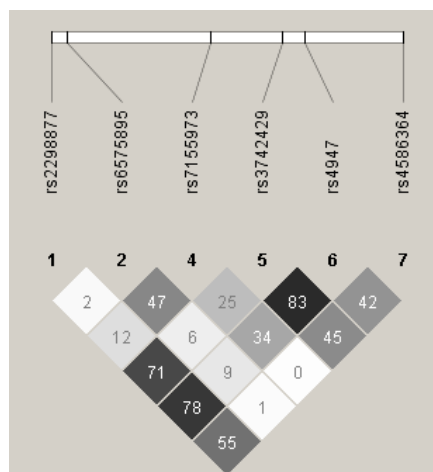
SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

W analizie LD stosunkowo silne sprzężenia odnotowano między trzema polimorfizmami spośród sześciu: rs2298877 i rs3742429 ( $D' = 0,93$ ;  $r^2 = 0,72$ ), rs2298877 i rs4947 ( $D' = 1,00$ ;  $r^2 = 0,78$ ) oraz rs3742429 i rs4947 ( $D' = 0,94$ ;  $r^2 = 0,84$ ), (Tabela 72). Sprzężenia te nie były na tyle silne, aby utworzyć bloki haplotypowe (Ryc. 26.). W pozostałych przypadkach zestawów markerów, wykazano stosunkowo niskie wartości  $D'$  oraz  $r^2$ , w wyniku czego pojawienie się sprzężenia między nimi jest mało prawdopodobne ( $D' \leq 1$ ,  $r^2 < 0,47$ ).

**Tabela 72.** Polimorfizmy SNP genu *HSP90AA1* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN.

Polimorfizm	$D'$	$r^2$	95% CI	Odległość w pz
rs2298877_rs3742429	0,93	0,72	0,75-0,99	2345
rs2298877_rs4947	1,00	0,78	0,84-1,0	2579
rs2298877_rs4586364	0,83	0,56	0,61-0,94	3564
rs3742429_rs4947	0,94	0,84	0,8-0,99	234

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu,  $D'$  – wskaźnik Lewontine’a,  $r^2$  – kwadrat współczynnika korelacji nierównowagi sprzężeń, 95% CI – 95% przedział ufności, pz – pary zasad



**Rycina 26.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *HSP90AA1* w badanych grupach pacjentów z SOZN i SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2 = 100\%$ ).

### 6.3.2. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *HSP90AA1* dla grupy pacjentów z IZN oraz grupy kontrolnej

Wszystkie zaobserwowane polimorfizmy (7SNP) zachowywały zgodność z prawem HWE. Szczagółową charakterystykę polimorfizmów, zawierającą lokalizację na chromosomie, test zgodności z prawem HWE, częstość allelu rzadszego w badanych grupach oraz allele je tworzące, przedstawia tabela 73.

**Tabela 73.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs2298877	102548224	0,84	0,153	G:A
rs6575895	102548384	1,00	0,119	A:G
rs34644998	102548703	1,00	0,005	A:C
rs7155973	102549839	1,00	0,074	C:T
rs3742429	102550569	0,79	0,173	T:C
rs4947	102550803	0,70	0,178	T:C
rs4586364	102551788	1,00	0,104	T:C

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE – prawo Hardy'ego Weinberga, MAF – częstość allelu rzadszego

W analizie asocjacji poszczególnych polimorfizmów zaobserwowano istotny statystycznie związek allelu G dla polimorfizmu rs2298877 ( $p=0,041$ ) w porównaniu grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną. Zaobserwowano również trend w kierunku asocjacji allelu T polimorfizmu rs3742429 oraz allelu T polimorfizmu rs4947 z IZN w porównaniu z grupą kontrolną ( $p=0,061$  i  $p=0,083$  odpowiednio). W pozostałych przypadkach nie zaobserwowano istotnych statystycznie asocjacji sprzężonych alleli w porównywanych grupach ( $p>0,05$ ), (Tabela 74).

W analizie LD silne sprzężenie zaobserwowano pomiędzy pięcioma spośród siedmiu polimorfizmów: rs2298877 z rs3742429 ( $D'=0,93$ ,  $r^2=0,72$ ), rs2298877 z rs4947 ( $D'=1,00$ ,  $r^2=0,78$ ), rs6575895 z rs7155973 ( $D'=1$ ,  $r^2=0,60$ ) oraz rs3742429 z rs4947 ( $D'=0,97$ ;  $r^2=0,90$ ),

(Tabela 75). Sprzężenia te wykazywały wystarczającą siłę do wygenerowania dwóch bloków haplotypowych (Ryc. 27.). W pozostałych przypadkach, z powodu stosunkowo niskich wartości  $D'$  oraz współczynnika korelacji  $r^2$ , zaistnienie sprzężenia między nimi jest mało prawdopodobne.

**Tabela 74.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

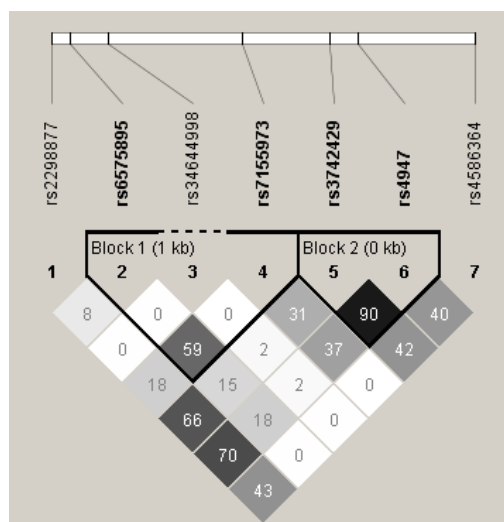
Polimorfizm SNP	Sprzężony allel	Stosunek częstości IZN/Grupa kontrolna	$\chi^2$	p
rs2298877	G	0,880 / 0,767	4,191	<b>0,041</b>
rs6575895	A	0,887 / 0,867	0,172	0,678
rs34644998	A	1,000 / 0,983	2,378	0,123
rs7155973	C	0,944 / 0,883	2,233	0,135
rs3742429	T	0,859 / 0,750	3,508	<b>0,061</b>
rs4947	T	0,852 / 0,750	3,003	<b>0,083</b>
rs4586364	T	0,901 / 0,883	0,148	0,701

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, IZN – idiopatyczny zespół nerczycowy,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności (kolor czerwony – wynik istotny statystycznie, kolor zielony – wynik bliski istotności statystycznej)

**Tabela 75.** Polimorfizmy SNP genu *HSP90AA1* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	$D'$	$r^2$	95% CI	Odległość w pz
rs2298877_rs3742429	0,88	0,67	0,74-0,95	2345
rs2298877_rs4947	0,92	0,71	0,79-0,98	2579
rs6575895_rs7155973	1,00	0,60	0,81-1,0	1455
rs3742429_rs4947	0,97	0,90	0,87-1,0	234

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu,  $D'$  – wskaźnik Lewontine'a,  $r^2$  – kwadrat współczynnika korelacji nierównowagi sprzężeń, 95% CI – 95% przedział ufności, pz – pary zasad



**Rycina 27.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *HSP90AA1* w badanych grupach pacjentów z IZN i grupie kontrolnej wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2=100\%$ ).

Spośród haplotypów utworzonych bloków, najczęściej występował haplotyp AC bloku 1, który składał się z allelu A polimorfizmu rs6575895 oraz allelu C polimorfizmu rs7155973 (częstość AC wynosiła 0,8810). Haplotyp GC również z bloku 1, utworzony przez allel G

polimorfizmu rs6575895 oraz allel C polimorfizmu rs7155973, okazał się najrzadszym z częstością występowania 0,045. Analiza danych wykazała istotną statystycznie różnicę w rozkładzie częstości haplotypu CC z bloku 2 między całą grupą pacjentów z IZN a grupą kontrolną ( $p=0,044$ ) – haplotyp CC częściej występował w grupie kontrolnej (Tabela 76).

**Tabela 76.** Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Haplotyp	Częstość haplotypu	Stosunek częstości IZN/grupa kontrolna	$\chi^2$	p
<b>Blok 1</b>				
AC	<b>0,881</b>	0,887 / 0,867	0,172	0,678
GT	<b>0,074</b>	0,056 / 0,117	2,233	0,135
GC	0,045	0,056 / 0,017	1,559	0,212
<b>Blok 2</b>				
TT	0,817	0,845 / 0,750	2,549	0,110
CC	0,168	0,134 / 0,250	4,067	<b>0,044</b>

IZN – pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

Z powodu przeprowadzanych testów wielokrotnych, w przypadku danych wykazujących zarówno istotność statystyczną, jak i wynik bliski istotności statystycznej, dokonano korekty poziomu istotności p za pomocą testu permutacji. Korekta nie potwierdziła związku polimorfizmów rs2298877, rs3742429, rs4947 oraz haplotypu bloku 2: CC z IZN w porównaniu z grupą kontrolną ( $p>0,05$ ), (Tabela 77).

**Tabela 77.** Test permutacji dla polimorfizmów: rs2298877, rs3742429, rs4947 oraz haplotypu bloku 2: CC genu *HSP90AA1* badanych w grupie z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP/haplotyp	$\chi^2$	p
rs2298877	4,191	0,153
rs3742429	3,508	0,248
rs4947	3,003	0,339
Blok 2: CC	4,067	0,169

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, IZN – idiopatyczny zespół nerczycowy,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

## 6.4. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *MIF*

### 6.4.1. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *MIF* dla grupy pacjentów z SOZN i SWZN

Polimorfizmy zidentyfikowane w trakcie sekwencjonowania genu *MIF* (7SNP), analizowano pod kątem sprzężenia. Wygenerowano charakterystykę SNP, na podstawie której uzyskano informacje o ich lokalizacji chromosomowej, allelach wchodzących w ich skład, częstościach alleli rzadkich, jak również testu zgodności z prawem HWE ( $p>0,05$ ), (Tabela 78).



**Tabela 78.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *MIF* w grupach pacjentów z SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs755622	24236392	0,98	0,23	G:C
rs112568463	24236588	1,00	0,02	A:T
rs2096525	24236819	0,52	0,20	T:C
rs2070766	24237221	0,98	0,23	C:G
rs2070767	24237463	0,90	0,23	C:T
rs2000466	24237862	0,86	0,22	T:G
rs34383331	24238079	0,98	0,23	T:A

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE – prawo Hardy’ego Weinberga, MAF – częstość allelu rzadszego

W analizie asocjacji poszczególnych polimorfizmów zaobserwowano istotne statystycznie częstsze występowanie allelu A polimorfizmu rs112568463 oraz częstsze występowanie allelu T polimorfizmu rs2000466 w grupie SOZN w porównaniu z grupą SWZN ( $p=0,041$  i  $p=0,044$  odpowiednio). Zaobserwowano również trend w kierunku asocjacji allelu T polimorfizmu rs34383331 z grupą SOZN w porównaniu z grupą SWZN ( $p=0,069$ ). W pozostałych przypadkach analizowanych polimorfizmów genu *MIF*, program nie wykazał istotnie statystycznych różnic w częstościach występowania sprzężonego allelu między grupami SOZN i SWZN ( $p>0,05$ ), (Tabela 79).

**Tabela 79.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *MIF* w grupach SOZN i SWZN.

Polimorfizm SNP	Sprzężony allel	Stosunek częstości SOZN/SWZN	$\chi^2$	p
rs755622	G	0,817/ 0,717	2,001	0,157
rs112568463	A	1,000/ 0,950	4,188	<b>0,041</b>
rs2096525	T	0,829/ 0,767	0,858	0,354
rs2070766	C	0,817/ 0,717	2,001	0,157
rs2070767	T	0,268/ 0,183	1,402	0,236
rs2000466	T	0,841/ 0,700	4,063	<b>0,044</b>
rs34383331	T	0,829/ 0,700	3,317	<b>0,069</b>

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności (kolor czerwony – wynik istotny statystycznie, kolor zielony – wynik bliski istotności statystycznej)

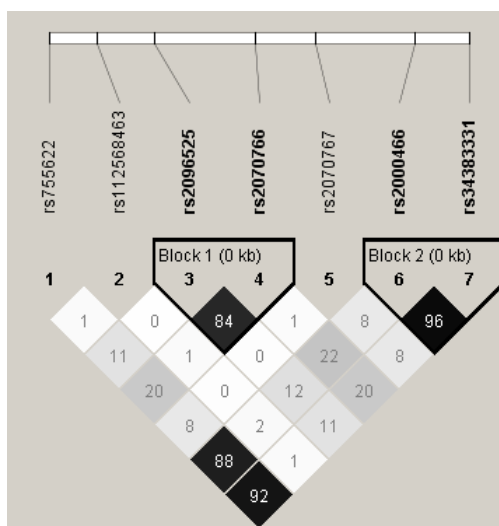
Na podstawie analizy LD cztery spośród siedmiu polimorfizmów wskazują na silne powiązania. Są to polimorfizmy: rs2096525 i rs2070766 ( $D'=1,00$ ;  $r^2=0,84$ ) oraz rs2000466 i rs34383331 ( $D'=1,00$ ;  $r^2=0,96$ ), (Tabela 80). Sprzężenia były na tyle silne, że markery te zostały połączone w bloki (Ryc. 28.). Stosunkowo silne korelacje wykazano także pomiędzy polimorfizmami: rs755622 i rs2000466 ( $D'=0,96$ ;  $r^2=0,88$ ) oraz rs755622 i rs34383331 ( $D'=0,96$ ;  $r^2=0,92$ ), jednakże markery te nie zostały połączone w bloki. W pozostałych przypadkach, z powodu stosunkowo niskich wartości  $D' \leq 1$  oraz  $0 < r^2 < 0,23$  sugeruje się, że sprzężenie między nimi jest mało prawdopodobne.

**Tabela 80.** Polimorfizmy SNP genu *MIF* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN

Polimorfizm SNP	D'	r <sup>2</sup>	95% CI	Odległość w pz
rs755622_rs2000466	0,96	0,88	0,85-0,99	1470
rs755622_rs34383331	0,96	0,92	0,86-0,99	1687
rs2096525_rs2070766	1,00	0,84	0,89-1,00	402
rs2000466_rs34383331	1,00	0,96	0,92-1,00	217

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, D' – wskaźnik Lewontine'a, r<sup>2</sup> – kwadrat współczynnika korelacji nierównowagi sprzężeń, 95% CI – 95% przedział ufności, pz – pary zasad

Najwyższą częstość (0,775) występowania wykazały dwa haplotypy. Był to haplotyp TC z bloku 1 utworzony z allelu T polimorfizmu rs2096525 i allelu C polimorfizmu rs2070766 oraz haplotyp TT z bloku 2 utworzony z allelu T polimorfizmu rs2000466 i allelu T polimorfizmu Rs34383331. Natomiast najrzadziej występował haplotyp TG utworzony z allelu T polimorfizmu rs2096525 oraz allelu G polimorfizmu rs2070766 z bloku 1 z częstością 0,028 (Tabela 81).

**Rycina 28.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *MIF* w badanych grupach pacjentów z SOZN oraz SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji r<sup>2</sup> w procentach (kolor rombu odpowiada wartości r<sup>2</sup> wyrażonej w procentach: biały – r<sup>2</sup>=0%, szary – 0% < r<sup>2</sup> < 100%, czarny – r<sup>2</sup> = 100%).**Tabela 81.** Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu *MIF* w grupie pacjentów z SOZN i SWZN

Haplotyp	Częstość haplotypu	Stosunek częstości SOZN/SWZN	χ <sup>2</sup>	p
<b>Blok 1</b>				
TC	0,775	0,817/ 0,717	2,001	0,157
CG	0,197	0,171/ 0,233	0,858	0,354
TG	<b>0,028</b>	0,012/ 0,050	1,809	0,179
<b>Blok 2</b>				
TT	<b>0,775</b>	0,829/ 0,700	3,317	<b>0,069</b>
GA	<b>0,218</b>	0,159/ 0,300	4,063	<b>0,044</b>

SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym, χ<sup>2</sup> – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

Na podstawie pozyskanych wyników wykazano, że haplotyp GA z bloku 2 występował istotnie statystycznie częściej w grupie SWZN (p=0,044). Zaobserwowano również trend w kierunku asocjacji haplotypu TT z bloku 2 z grupą SOZN (p=0,0690). W pozostałych

przypadkach nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania wygenerowanych haplotypów dla grup SOZN vs SWZN ( $p > 0,05$ ), (Tabela 84).

Z powodu przeprowadzanych testów wielokrotnych, dokonano korekty wartości poziomu istotności, zarówno dla pojedynczych markerów SNP, jak i dla haplotypów bloku 2. Analiza permutacji 10 000 nie potwierdziła siły asocjacji sprzężonych alleli polimorfizmów rs112568463, rs2000466 oraz rs34383331, jak i haplotypów bloku 2: GA i TT (Tabela 82).

**Tabela 82.** Test permutacji dla polimorfizmów: rs112568463, rs2000466 oraz rs34383331 oraz haplotypów bloku 2: GA i TT genu *MIF* badanych w grupie pacjentów z SOZN oraz SWZN.

Polimorfizm SNP / haplotyp	$\chi^2$	p
rs112568463	4,188	0,225
rs2000466	4,063	0,248
Blok 2: GA	4,063	0,248
rs34383331	3,317	0,334
Blok 2: TT	3,317	0,334

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu,  
IZN - idiopatyczny zespół nerczycowy,  
 $\chi^2$  - rozkład chi kwadrat, p - poziom istotności

#### 6.4.2. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genu *MIF* dla grupy pacjentów z IZN oraz grupy kontrolnej

Wszystkie zaobserwowane polimorfizmy (7SNP) zachowywały zgodność z prawem HWE ( $p > 0,05$ ). Charakterystyka polimorfizmów została przedstawiona w tabeli 83.

**Tabela 83.** Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu *MIF* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	Pozycja chromosomowa	HWE	MAF	Allele
rs755622	24236392	1,00	0,23	G:C
rs112568463	24236588	1,00	0,03	A:T
rs2096525	24236819	1,00	0,23	T:C
rs2070766	24237221	1,00	0,24	C:G
rs2070767	24237463	1,00	0,23	C:T
rs2000466	24237862	1,00	0,22	T:G
rs34383331	24238079	1,00	0,23	T:A

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, HWE - prawo Hardy'ego Weinberga, MAF - częstość allelu rzadszego

W analizie asocjacji poszczególnych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania alleli w porównaniu grupy z IZN z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ), (Tabela 84).

**Tabela 84.** Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu *MIF* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

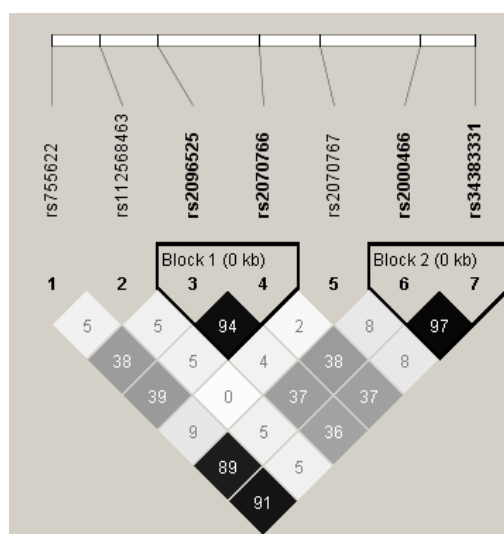
Polimorfizm SNP	Sprzężony allel	Stosunek częstości IZN/grupa kontrolna	$\chi^2$	p
rs755622	G	0,775 / 0,750	0,144	0,705
rs112568463	A	0,979 / 0,950	1,220	0,269
rs2096525	T	0,782 / 0,750	0,241	0,624
rs2070766	C	0,775 / 0,733	0,397	0,528
rs2070767	C	0,768 / 0,767	0,000	0,989
rs2000466	T	0,782 / 0,767	0,055	0,815
rs34383331	T	0,775 / 0,767	0,015	0,902

Na podstawie analizy LD cztery spośród siedmiu polimorfizmów wskazują na silne powiązanie. Są to polimorfizmy: rs2096525 i rs2070766 ( $D'=1,00$ ;  $r^2=0,95$ ) oraz rs2000466 i rs3438331 ( $D'=1,00$ ;  $r^2=0,97$ ), (Tabela 88). Sprzężenia były na tyle silne, że markery te zostały połączone w bloki (Ryc. 29). Stosunkowo silne korelacje wykazano także pomiędzy polimorfizmami: rs755622 i rs2000466 oraz rs755622 i rs34383319 (Tabela 85), jednakże markery te nie zostały połączone w bloki. W pozostałych przypadkach, z powodu stosunkowo niskich wartości  $D' \leq 1$  oraz  $0 < r^2 < 0,39$  sugeruje się, że sprzężenie między nimi jest mało prawdopodobne.

**Tabela 85.** Polimorfizmy SNP genu *MIF* wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Polimorfizm SNP	D'	r <sup>2</sup>	95% CI	Odległość w pz
rs755622_rs2000466	0,97	0,89	0,89-1,00	1470
rs755622_rs3438331	0,97	0,92	0,9-1,00	1687
rs2096525_rs2070766	1,00	0,95	0,93-1,00	402
rs2000466_rs3438331	1,00	0,97	0,94-1,00	217

SNP - polimorfizm pojedynczego nukleotydu, D' - wskaźnik Lewontine'a, r<sup>2</sup> - kwadrat współczynnika korelacji nierównowagi sprzężeń, 95% CI - 95% przedział ufności, pz - pary zasad



**Rycina 29.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu *MIF* w badanych grupach pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej, wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały -  $r^2=0\%$ , szary -  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny -  $r^2=100\%$ ).

Najczęściej występował haplotyp TT z bloku 2 utworzony z allelu T polimorfizmu rs2000466 i allelu T polimorfizmu rs34383319 z częstością 0,772. Natomiast najrzadziej występował haplotyp GA z bloku 2 składający się z allelu G polimorfizmu rs2000466 oraz allelu A polimorfizmu rs3438331 z częstością 0,223. Na podstawie pozyskanych wyników nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania wygenerowanych haplotypów w porównaniu całej grupy pacjentów z IZN z grupą kontrolną ( $p > 0,05$ ), (Tabela 86).

**Tabela 86.** Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu *MIF* w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

Haplotyp	Częstość haplotypu	Stosunek częstości SOZN/SWZN	$\chi^2$	p
<b>Blok 1</b>				
TC	0,762	0,775 / 0,733	0,397	0,528
CG	0,228	0,218 / 0,250	0,241	0,624
<b>Blok 2</b>				
TT	<b>0,772</b>	0,775 / 0,767	0,015	0,902
GA	<b>0,223</b>	0,218 / 0,233	0,055	0,815

SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym,  $\chi^2$  – rozkład chi kwadrat, p – poziom istotności

#### 6.4.3. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmu krótkich powtórzeń tandemowych genu *MIF* w obrębie badanych grup

Dokonano również analizy LD dla polimorfizmów: -173G/C (rs755622) i -794 CATT (rs5844572) zlokalizowanych w rejonie promotorowym. Haplotypy oraz ich częstości wygenerowano za pomocą programu PHASE. We wszystkich rozpatrywanych grupach najczęściej występował haplotyp CATT6\_G (SOZN – 55,3%; SWZN – 49,1%, IZN – 52,5%; grupa kontrolna – 51,2%). Natomiast najrzadziej występował haplotyp CATT7\_G w grupach SOZN, SWZN i IZN (0,1%, 0,3% i 0,03% odpowiednio) oraz haplotyp CATT5\_C w grupie kontrolnej (0,03%). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania wygenerowanych haplotypów w grupach: pacjenci z SOZN w porównaniu z pacjentami z SWZN oraz cała grupa pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną (Tabela 87).

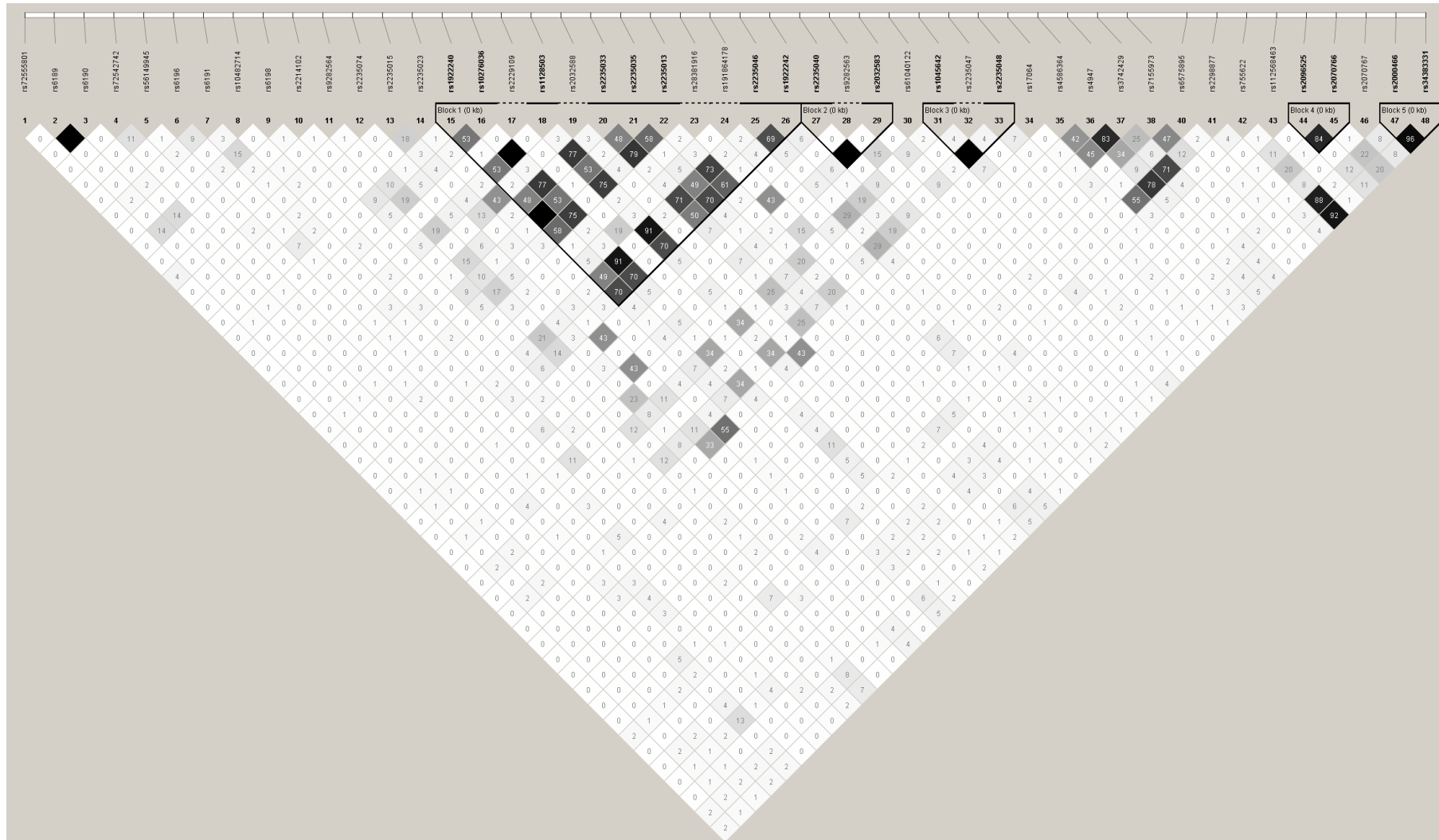
**Tabela 87.** Rozkład liczby i częstości wygenerowanych haplotypów polimorfizmów: rs755622 (-173G/C) i rs5844572 (-794CATT) genu *MIF* w grupie pacjentów z SOZN i SWZN oraz całej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.

SOZN			SWZN			p*
Haplotyp	częstość	Liczba	Haplotyp	częstość	Liczba	
CATT <sub>5</sub> _G	0,263 (26,2%)	22	CATT <sub>5</sub> _G	0,223 (22,2%)	14	0,415
CATT <sub>5</sub> _C	0,006 (0,6%)		CATT <sub>5</sub> _C	0,010 (1,0%)		
CATT <sub>6</sub> _G	0,553 (55,3%)	45	CATT <sub>6</sub> _G	0,491 (49,1%)	29	0,274
CATT <sub>6</sub> _C	0,057 (5,7%)	5	CATT <sub>6</sub> _C	0,093 (9,3%)	6	0,292
CATT <sub>7</sub> _G	0,001 (0,1%)		CATT <sub>7</sub> _G	0,003 (0,3%)		
CATT <sub>7</sub> _C	0,121 (12,1%)	10	CATT <sub>7</sub> _C	0,180 (18,0%)	11	0,217
<b>IZN</b>			<b>Grupa kontrolna</b>			
Haplotyp	częstość		Haplotyp	częstość		
CATT <sub>5</sub> _G	0,249 (24,9%)	36	CATT <sub>5</sub> _G	0,233 (23,3%)	14	0,455
CATT <sub>5</sub> _C	0,004 (0,4%)		CATT <sub>5</sub> _C	0,0003 (0,03%)		
CATT <sub>6</sub> _G	0,525 (52,5%)	74	CATT <sub>6</sub> _G	0,513 (51,2%)	31	0,538
CATT <sub>6</sub> _C	0,073 (7,3%)	11	CATT <sub>6</sub> _C	0,054 (5,4%)	3	0,357
CATT <sub>7</sub> _G	0,0003 (0,03%)		CATT <sub>7</sub> _G	0,004 (0,4%)		
CATT <sub>7</sub> _C	0,148 (14,8%)	21	CATT <sub>7</sub> _C	0,196 (19,6%)	12	0,237

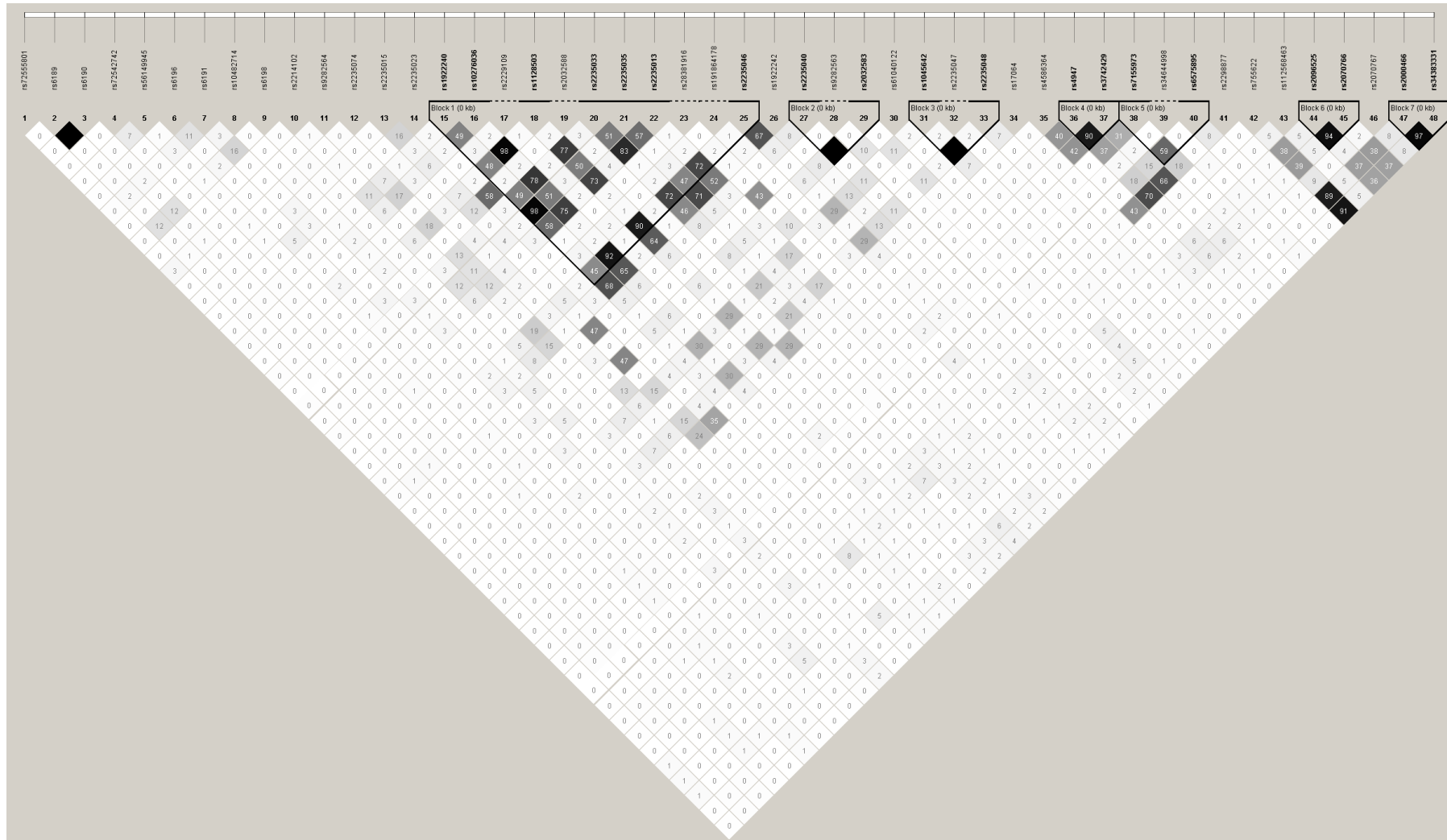
SOZN – pacjenci ze steroidoopornym zespołem nerczycowym, SWZN – pacjenci ze steroidowrażliwym zespołem nerczycowym, IZN - pacjenci z idiopatycznym zespołem nerczycowym, p – poziom istotności; \* - test dwustronny Fishera, obliczenia w odniesieniu do pozostałych haplotypów

**6.5. Analiza nierównowagi sprzężeń polimorfizmów genów *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1*, *MIF* dla grupy pacjentów z SOZN i SWZN oraz całej grupy pacjentów z IZN i grupy kontrolnej**

Analizie LD poddano również wszystkie polimorfizmy wytypowanych genów w obrębie badanych grup. Wygenerowane schematy dla wszystkich genów łącznie, nie wskazują na nierównowagę sprzężeń pomiędzy analizowanymi polimorfizmami zarówno w grupach pacjentów z SOZN i SWZN, jak i całej grupie badanej z IZN i grupie kontrolnej (Ryc. 30 i 31).



**Rycina 30.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genów: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF* w badanych grupach pacjentów z SOZN oraz SWZN, wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$ : biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\%<r^2<100\%$ , czarny –  $r^2=100\%$ ).



**Rycina 31.** Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genów: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF* w badanych grupach pacjentów z IZN i grupie kontrolnej, wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2=100\%$ ).



## OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Badania z zakresu biologii molekularnej wskazują, że zmiany w sekwencjach kluczowych genów mogą zwiększać podatność na rozwój wielu chorób oraz prowadzić do ujawnienia zmienionego fenotypu. Dodatkowo zmienność osobnicza warunkuje indywidualną odpowiedź pacjenta na konkretny lek, co jest ograniczeniem wielu terapii. Na to zróżnicowanie mogą wpływać: podłoże choroby, czynniki środowiskowe i genetyczne czy reakcje nadwrażliwości organizmu. Odpowiedź na pytanie, jak różnice genetyczne między osobnikami wpływają na ich różnorodną odpowiedź na leki, udziela farmakogenomika [92, 155]. Natomiast farmakokinetyka ocenia skuteczność i toksyczność leków w zależności od zmian w genach zaangażowanych w ich transport i/lub metabolizm [15, 37]. Dąży się więc do zindywidualizowania terapii lekowej, której celem jest zminimalizowanie lub wyeliminowanie efektów ubocznych, a tym samym zmaksymalizowanie korzyści terapeutycznych. Założono więc, że genetyczne warianty w wytypowanych genach, mogą posłużyć jako markery odpowiedzi na steroidy w terapii IZN.

Glikokortykosteroidy (GKS) stanowią pierwszą linię leczenia IZN u dzieci. Jednak, pomimo że znacząco redukują śmiertelność, około 60-80% pacjentów odpowiadających pozytywnie na terapię cierpi z powodu nawrotów białkomoczu, SZZN, jak również wtórnego SOZN [5]. Pośród badanej grupy 71 dzieci z terenu Wielkopolski z IZN u ponad połowy z nich (41 pacjentów) ujawnił się fenotyp steroidooporności. Wrażliwość na steroidy jest bardzo często powiązana z MCNS w obrazie histologicznym biopsji nerki oraz korzystnym długoterminowym prognozowaniem [105, 175]. W przypadku steroidooporności najczęściej dotyczy ona FSGS i niesie ze sobą duże ryzyko progresji do ESRD [5, 105, 175]. Z tego powodu, steroidooporność jest najtrudniejszym problemem do przezwyciężenia w leczeniu ZN [5]. Wzór tych zależności podobnie przedstawiał się w badanych grupach. Dla SOZN: FSGS stanowiło 19,5% a MCNS 9,8%, podczas gdy dla grupy z SWZN: FSGS stanowiło 3,3% a MCNS 23,3%.

W podłożu IZN na pierwszym miejscu wskazuje się raczej na zaburzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej, aniżeli na pierwotne defekty błony filtracyjnej. W dużej mierze immunologiczne podłoże choroby związane jest z nierównowagą pomiędzy podtypami limfocytów pomocniczych Th, mianowicie Th1 a Th2, ze wskazaniem przewagi Th2 [35]. Bliski związek pomiędzy atopią a MCNS sugeruje również udział ścieżek immunologicznych. Stymulanty, takie jak alergeny mogą aktywować powszechne mechanizmy immunologiczne, co skutkuje białkomoczem u dzieci z MCNS [81]. Stawiane przez klinicystów pytanie dotyczy kwestii czy docelowym punktem terapii w ZN jest nadreaktywny układ immunologiczny czy może defekt cytoszkieletu podocytów. Zakładając, że problem związany jest z zaburzeniami układu immunologicznego, gdzie głównymi czynnikami sprawczymi są limfocyty T i B, oczywista wydaje się być terapia immunosupresyjna [122]. Uszkodzenie podocytów wynika z dysfunkcji białek spowodowanych głównie mutacjami w kodujących je genach: *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1* oraz w mniejszym stopniu *LAMB2* i *PLCE1* [123, 205], a także indukcją białka CD80 na podocytach na skutek infekcji, co prowadzi do zaburzeń aktywności, a tym samym cytoszkieletu

podocytów [122]. Źródła steroidooporności, która często towarzyszy pacjentom w trakcie leczenia steroidami, należy doszukiwać się w zmianach wzoru histopatologicznego z MCNS do MN czy FSGS [149], mutacjach genów kodujących białka: nefrynę, podocynę, CD2AP,  $\alpha$  aktyninę 4, prowadzących do uszkodzenia błony filtracyjnej oraz w roli czynników modulujących odpowiedź na farmakologiczną interwencję, takich jak transport przez błony z udziałem Pgp [82], poziom enzymów aktywujących/deaktywujących endogenne, jak i egzogenne steroidy, a mianowicie 11 $\beta$ -dehydrogenaz hydroksysteroidowych typu I i II (11 $\beta$ -HSD I i II) [120] czy enzymów z grupy cytochromów P-450 metabolizujących leki [27]. Jaroniec i wsp. [83] wskazali na obecność polimorfizmów w genie *NPHS2* u dzieci z rejonu Wielkopolski sugerując, że w przypadku grupy pacjentów z SOZN mogą one wskazywać na możliwość modyfikacji leczenia immunosupresyjnego z wykorzystaniem innych niesteroidowych leków. Za główną sprawczą mutację w genie *NPHS2* uznaje się R138Q (Arg138Gln). Szczególnie często występuje ona w podgrupie dzieci z SOZN w krajach arabskich [180]. W badanej populacji dzieci z IZN nie wykazano jej obecności. Natomiast u 14 pacjentów ze steroidoopornym fenotypem zidentyfikowano inne mutacje w genach: *NPHS1*, *NPHS2* i *WT1* oraz u jednego pacjenta ze steroidowrażliwym fenotypem mutację w genie *NHPS1*.

Przedmiotem niniejszych badań było poszukiwanie genów kandydujących powiązanych z odpowiedzią na leczenie steroidami, których zmiany w sekwencjach mogą być przydatne w różnicowaniu pacjentów z IZN i wyodrębnieniu wśród nich chorych steroidoopornych (SO) i steroidowrażliwych (SW) oraz wskazanie ich praktycznego zastosowania. Zwrócono uwagę na kluczowe białka zaangażowane w transport, metabolizm i ścieżki sygnalizacyjne GKS. W oparciu o dane literaturowe z zakresu zjawiska steroidooporności wytypowano cztery geny: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF*, kodujące odpowiednio: receptor glikokortykosteroidowy (GR), transporter błonowy Pgp, białko szoku cieplnego Hsp90 $\alpha$  oraz cytokinę MIF. Przeprowadzono analizę molekularną przy wykorzystaniu metody sekwencjonowania, biorąc pod uwagę zarówno odcinki kodujące jak i niekodujące genów (około 100-200 nukleotydowe rejony flankujące eksonów) oraz w jednym przypadku region promotorowy. W przypadku genu *NR3C1*, badaniu poddano osiem eksonów, w wyniku czego zidentyfikowano dziewięć zmian typu SNP, w genie *ABCB1* – dwadzieścia osiem eksonów i dwadzieścia sześć SNP, w genie *HSP90AA1* – dziesięć eksonów i siedem SNP oraz w genie *MIF* – trzy eksony oraz region promotorowy, otrzymując siedem SNP i jeden STR. Identyfikowano również nowe mutacje w obrębie tych genów. Przeprowadzono analizę asocjacyjną uzyskanych wariantów polimorficznych z odpowiedzią na leczenie GKS, co miałyby uwidoczniać markery wrażliwości na steroidy. Doszukiwano się również ich korelacji z podatnością zachorowania na IZN u nosicieli zidentyfikowanych wariantów genetycznych. Dodatkowo sprawdzono w jakim stopniu zidentyfikowane zmiany są ze sobą sprzężone (analiza LD) oraz czy wygenerowane haplotypy były związane z którąś z badanych grup.

## Gen receptora glikokortykosteroidowego (*NR3C1*)

Gen *NR3C1* jest przedmiotem zainteresowania wielu badaczy w aspekcie zjawiska steroidooporności, a wynika to z faktu, że kodowana przez niego izoforma receptora GR $\alpha$  jest niezbędna, aby GKS mogły wywierać swoje terapeutyczne efekty w genomowym mechanizmie [156]. Pojawia się pytanie czy steroidooporność jest pierwotnym zjawiskiem wynikającym z nieprawidłowości dziedziczonych w receptorze GR $\alpha$  czy może zdolność przeciwzapalna GKS jest po prostu maskowana przez nadmierną aktywność różnych wewnątrzkomórkowych czynników transkrypcyjnych, które mogą redukować powinowactwo receptora GR $\alpha$  do jego wewnątrzkomórkowego ligandu. Rolę zmian w genie *NR3C1*, prowadzących do zmniejszenia wrażliwości na GKS, a także częściowo przyczyniających się do wzmocnienia zapalenia prowadzącego do zaostrzenia choroby, zaobserwowano w wielu autoimmunologicznych schorzeniach, takich jak: astma [141], RZS [218] czy stwardnienie rozsiane [219]. Lokalizacja GR $\alpha$  okazuje się ważna dla oceny wrażliwości na syntetyczne GKS w różnych chorobach dotyczących kłębuszków. Yan i wsp. [203] wykazali, że receptor GR $\alpha$  zlokalizowany jest w podzbiorach prawidłowych komórek kłębuszka i najprawdopodobniej pośredniczą one we wpływaniu na syntetyczne GKS. Spekuluje się, że endogenne i egzogenne GKS wiążą cytoplazmatyczny GR $\alpha$  komórek kłębuszka, co skutkuje formowaniem kompleksu hormon-receptor, a jego translokacja jądrowa wpływa na genomową i transkrypcyjną regulację wybranych genów. Jednakże docelowe komórki dla GKS w chorobach kłębuszków, to nie tylko uszkodzone komórki samych kłębuszków, ale i komórki pochodzące z krwi obwodowej, które zaangażowane są w proces ich uszkodzenia [203].

Zwraca się uwagę na wiele czynników mogących wpływać na wiązanie GKS z receptorem GR $\alpha$ , wśród nich wymienia się: dostępne kofaktory, interakcje z białkami inhibitorowymi, wczesne leczenie GKS, jak również mechanizmy potranskrypcyjne [152]. W tej sytuacji gen *NR3C1* wydał się być adekwatnym kandydatem dla genetycznych badań asocjacyjnych. W analizowanej grupie dzieci z IZN, w genie tym zidentyfikowano dziewięć zmian typu SNP. Należały one do już wykrytych polimorfizmów, w związku z czym znajdowały się w bazie SNP NCBI. Polimorfizmy zlokalizowane były w eksonach, intronach oraz w odcinkach 3'UTR genu. Z praktycznego punktu widzenia, najbardziej istotne wydają się być zmiany dotyczące odcinków kodujących, zwłaszcza jeśli są to zmiany typu zmiany sensu. Mogą one bowiem wyjaśnić, jak zamiana nukleotydu w sekwencji DNA wpływa na kodowany przez dany kodon aminokwas, czy prowadzi do zmiany jego polarności, charakteru z zasadowego na kwasowy lub *vice versa*, a tym samym na całkowitą strukturę białka. W przeprowadzonych badaniach pięć polimorfizmów znajdowało się w odcinkach kodujących genu *NR3C1*, z czego dwa były synonimiczne: rs6189 (E22E/Glu22Glu), rs6196 (N766N/Asn766Asn), a trzy niesynonimiczne typu zmiany sensu i skutkowały zmianą aminokwasu w białku: rs6190 (R23K/Arg23Lys), rs72542742 (A229T/Ala229Thr), rs6195 (N363S/Asn363Ser). Zmiany

te dotyczyły N-końcowej domeny (NTD) receptora GR $\alpha$ . W obrębie analizowanych grup nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli, jednakże ze względu na funkcjonalność oraz szerokie zainteresowanie badaczy, wymagają one głębszej interpretacji. Polimorfizmy odcinków kodujących, nawet jeśli nie są związane z zamianą aminokwasu, mogą wpływać na ujawnienie się konkretnego fenotypu poprzez strukturalne zmiany mRNA czy też inaktywację genów, a także indukcję maszynierii splicingowej, aby zatrzymać zmutowane eksony [205]. Modyfikacje w intronach, mimo mniejszej siły, nie pozostają bez znaczenia. Mogą dotyczyć zmian w miejscach ich wycinania w trakcie obróbki potranskrypcyjnej, co może wpływać na alternatywny splicing, a także proces translacji. Poza tym, bardzo często przypisuje im się wartość prognostyczną. Wykryty wariant intronu 1 (5:c.-14+35G>A) ze względu na niską częstość występowania allelu rzadkiego (MAF=0,01), pojawił się tylko u jednego pacjenta w układzie heterozygotycznym. Był to pacjent należący do grupy z SOZN z obrazem histopatologicznym FSGS. Niska częstość występowania tego wariantu genetycznego oraz lokalizacja w intronie powodują, że nie wnosi on żadnej istotnej informacji w badanej grupie. W przypadku polimorfizmów odcinków UTR mogą one wpływać na stabilność mRNA oraz proces syntezy białka. W badanych grupach zidentyfikowano trzy polimorfizmy odcinków 3'UTR: rs6191, rs10482714, rs6198 (9 $\beta$ ), z czego ostatni z nich dotyczy eksonu 9 $\beta$ . Również w tych przypadkach nie pozyskano istotnych statystycznie różnic dla wszystkich analizowanych SNP, jednakże bazując na literaturze, wskazuje się na najistotniejszą rolę rs6198 (9 $\beta$ ) w patomechanizmie steroidooporności. Polimorfizm ten analizowano uprzednio w aspekcie chorób afektywnych dwubiegunowych, łącząc je z epizodami depresji [176] oraz odpowiedzią na leczenie litem [177]. Natomiast rs10482714 jest rzadkim polimorfizmem (MAF=0,01), dlatego brakuje danych literaturowych na temat jego powiązania z jednostkami chorobowymi. Również w analizowanej populacji dzieci z IZN polimorfizm ten w układzie heterozygotycznym pojawił się u zaledwie czterech osób ze sklasyfikowanym fenotypem SO.

W ciągu ostatnich kilku lat zidentyfikowano wiele mutacji w receptorze GR, które przyczyniły się do ujawnienia fenotypu steroidooporności. Wiążą się one z objawami hiperkortyzolizmu bez cech zespołu Cushinga. Mutacje te głównie dotyczyły domeny wiążącej ligand (LBD), prowadząc do spadku transaktywacyjnej pojemności receptora, zredukowania jego ekspresji, zmniejszenia zdolności wiązania ligandu, zahamowania translokacji do jądra, nieprawidłowych interakcji z koaktywatorami, alternatywnego splicingu czy ich kombinacji, wpływając na funkcjonowanie receptora GR $\alpha$  [97]. Ruiz i wsp. [158] zidentyfikowali dwie nowe mutacje receptora GR $\alpha$ : Arg477His i Gly679Ser. Mutacja Arg477His wpływała na zmniejszenie zdolności wiązania receptora do DNA, podczas gdy obydwie wykazują dominujący negatywny efekt na aktywność transkrypcyjną GR $\alpha$  typu dzikiego [158]. Badania *in vitro* Donner i wsp. [42] wykazały, że delecja dwunukleotydomowa (CT w kodonie 773) w domenie LBD receptora GR $\alpha$  eliminuje jego zdolność funkcjonalną, co wiąże się z opornością na GKS [42]. Trebble i wsp.

[187] zidentyfikowali w eksonie 6 nową mutację zmiany ramki odczytu ( $\Delta 612GR$ ) przyczyniającą się do rozwoju rodzinnej oporności na GKS. Przypuszcza się, że pojawienie się tej mutacji prowadzi do ujawnienia się negatywnej dominującej aktywności poprzez zmianę zdolności translokacji receptora typu dzikiego. Pozwoliło to szerzej spojrzeć na molekularny mechanizm steroidooporności, aczkolwiek nieustannie mamy do czynienia z pacjentami z niewytlumaczalną opornością na GKS. U takich osób nie zidentyfikowano mutacji w receptorze GR $\alpha$  [216].

Do najczęściej analizowanych polimorfizmów receptora GR należą: *TthIII* (rs10052957), ER22/23EK (rs6189/rs6190), N363S (rs6195), *BcII* (rs41423247) oraz GR9 $\beta$  (rs6198). Wiąże się je z chorobami autoimmunologicznymi i układu sercowo-naczyniowego oraz ze zmianami we wrażliwości na GKS czy zmienionym poziomem kortyzolu [37, 130]. N363S i *TthIII* powiązано z nadwrażliwością na GKS [85, 218], natomiast ER22/23EK i 9 $\beta$  z opornością [215, 218]. Analiza molekularna genu *NR3C1* w grupie dzieci z IZN oraz grupie kontrolnej z rejonu Wielkopolski, pozwoliła na ujawnienie trzech spośród nich: ER22/23EK, N363S, GR9 $\beta$ . Pozostałe dwa nie mogły zostać zidentyfikowane, co wynikało z ich lokalizacji odległej od badanych regionów: *TthIII* – 630 pz w górę od pierwszego inicjującego kodonu oraz *BcII* – intron 2, 646 pz w dół od końca eksonu 2 [98].

Polimorfizmy ER22/23EK są zlokalizowane w eksonie 2 i są ze sobą sprzężone. E22E jest zmianą synonimiczną (Glu22Glu), natomiast R23K – niesynonimiczną, typu zmiany sensu (Arg23Lys). Wskazuje się, że zmiana aminokwasu w kodonie 23 może wpływać na strukturę trzeciorzędową domeny receptora, która jest odpowiedzialna za jego aktywność transaktywacyjną i/lub trans represyjną genów docelowych [37, 120, 141]. Wykazano również, że nosiciele tego polimorfizmu mają wyższy poziom ekspresji wariantu translacyjnego receptora GR-A, który jest mniej aktywny [159]. Polimorfizmy te nie ujawniły się w układzie homozygot alleli rzadkich. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ich występowaniu w obrębie badanych grup, aczkolwiek zaobserwowano tendencję w kierunku asocjacji z fenotypem, wskazując na ich potencjalny charakter ochronny w stosunku do fenotypu steroidooporności. Pozyskane wyniki nie stanowią potwierdzenia wcześniejszych badań, w których to polimorfizm ER22/23EK został powiązany z klinicznym fenotypem zredukowanej wrażliwości na GKS [98, 120]. Możliwym wytłumaczeniem rozbieżności wyników może być stosunkowo mała grupa badana i niski MAF (MAF=0,01), w wyniku czego badany polimorfizm nie mógł się ujawnić w danej grupie. Podobne wnioski końcowe uzyskali Ye i wsp. [205], którzy poszukiwali zmian genetycznych w genie *NR3C1* w odniesieniu do IZN u dzieci. Udało im się zidentyfikować sześć SNP już znanych (w tym ER22/23EK), sześć nowych SNP i dwa nowe haplotypy. Żadnych sprawczych mutacji nie znaleziono. Oni również nie wykazali związku zidentyfikowanych zmian z fenotypem steroidooporności [205]. Brak związku polimorfizmu ER22/23EK receptora GR $\alpha$  ze steroidoopornością stwierdzono także w innych jednostkach chorobowych, takich jak: IBD [24], w tym UC i CD [119, 118], orbitopatia Gravesa [221] czy astma oskrzelowa [141].

Kolejny zidentyfikowany polimorfizm N363S (rs6195) powiązany jest z klinicznym fenotypem wzrostu wrażliwości na GKS [98, 131]. Dotyczy on zamiany aminokwasu asparaginy na serynę w kodonie 363. Obserwacje wskazują, że polimorfizm ten może wpływać na interakcje domeny NTD receptora GR $\alpha$  z koaktywatorami i/lub korepresorami. Dodatkowo zaznacza się, że fosforylacja nowej reszty serynowej nie odgrywa tutaj istotnej roli [98, 120]. Fenotyp polimorfizmu N363S jest wynikiem różnych efektów na regulację genu. Ciągłe nie rozpoznano mechanizmów i konkretnych genów, które byłyby w te procesy zaangażowane [120]. Analiza polimorfizmu nie pozwoliła na zademonstrowanie fenotypu steroidowrażliwości z powodu braku istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli badanych grup. Jednakże w oparciu o wskaźnik OR, którego wartość była poniżej jedności, wskazuje to na charakter ochronny przed ujawnieniem się fenotypu steroidooporności zarówno u nosicieli allelu G (OR=0,722), jak i genotypu AG (OR=0,714) we wszystkich rozpatrywanych modelach, porównując grupy pacjentów z SOZN i SWZN, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami. Dodatkowo taką samą relację obserwuje się, porównując pacjentów z IZN z grupą kontrolną, jednak wyniki wymagają potwierdzenia na większej grupie badanej. Również van Oosten i wsp. [218] wskazali na potencjalne działanie ochronne polimorfizmu N363S w odniesieniu do RZS. Teoretycznie, nosiciele polimorfizmu N363S powinni wykazywać zmniejszoną podatność zachorowania na choroby autoimmunologiczne, ponieważ są bardziej wrażliwi na GKS [120]. Wiedząc, że IZN związany jest z nieprawidłowymi mechanizmami immunologicznymi, pozyskane wyniki potwierdzałyby te przypuszczenia (większy odsetek zmutowanych heterozygot w grupie kontrolnej). Hipotezy tej nie potwierdzili Chen i wsp. [24], którzy nie wykazali związku polimorfizmu N363S z odpowiedzią na leczenie steroidami u pacjentów z IBD. Brak korelacji przedstawili również Koper i wsp. [97], którzy nie wykazali związku polimorfizmu N363S z odpowiedzią na steroidy w analizowanej grupie zdrowych osób. Zdrową grupę badawczą podzielono na steroidooporną i steroidowrażliwą na GKS w oparciu o test hamowania deksametazonem (ang. *dexamethasone suppression test*, DTH), podając deksametazon i mierząc podeksametazynowy poziom kortyzolu [97]. Maltese i wsp. [118] badali polimorfizm N363S receptora GR $\alpha$  u zdrowych osób i pacjentów z CD. Nie stwierdzili jego roli w podatności na rozwój i przebieg choroby [118]. N363S nie wpływał także na terapeutyczne wyniki działania steroidów w orbitopatii Gravesa [221]. Poza tym polimorfizm ten może prowadzić do rozwoju trudnej do leczenia odpornej formy astmy oskrzelowej w populacji polskiej [141]. Na tej podstawie nie jest możliwe wskazanie jednoznacznej roli polimorfizmu N363S.

Polimorfizm 9 $\beta$  zlokalizowany jest w motywie „ATTTA” obszaru 3'UTR eksonu 9 $\beta$ , i polega na substytucji adeniny guaniną [120]. Motyw ATTTA destabilizuje mRNA i zmniejsza ekspresję receptora GR $\beta$  *in vitro*. Zmiana ATTTA na GTTTA stabilizuje mRNA, jak również ekspresję białka *in vitro* [40, 216]. Zlokalizowana w jądrze komórkowym izoforma GR $\beta$  powstaje w wyniku alternatywnego splicingu genu *NR3C1* i może być ważnym wskaźnikiem odpowiedzi komórkowej na GKS. Nie wiąże ona GKS, ale współzawodniczy z GR $\alpha$  o wiązanie z GRE,

tworząc transkrypcyjnie nieaktywny heterodimer GR $\alpha$ /GR $\beta$ . Działa więc jako dominujący negatywny inhibitor izoformy GR $\alpha$ , co przejawia się brakiem aktywacji genów odpowiedzi na GKS [120, 132]. Spekuluje się, że zwiększona ekspresja i stabilność GR $\beta$  prowadzą do oporności na GKS. Nosiciele polimorfizmu GR9 $\beta$  mają bardziej reaktywny układ immunologiczny. Ważny jest fakt, że GR $\beta$  zostało zidentyfikowane w komórkach układu immunologicznego, a nie w innych tkankach, co sugeruje, że wpływ polimorfizmu GR $\beta$  na inne niż komórki i tkanki układu immunologicznego jest ograniczony [120]. W badanej grupie dzieci populacji polskiej nie wykazano związku tego polimorfizmu z odpowiedzią na GKS, jak również z podatnością zachorowania na IZN. W przeciwieństwie do tych rezultatów, funkcjonalny polimorfizm GR9 $\beta$  powiązano z zaburzeniami we wrażliwości na GKS w populacji holenderskich dzieci z ZN [184]. Niezbędne wydaje się również pogłębienie badań na poziomie mRNA, co sugerują przeprowadzone już w tym kierunku analizy w odniesieniu do innych chorób, których dotyczy zjawisko steroidooporności, w tym IBD. Fujishima i wsp. [49] wykazali, że ilość komórek GR $\beta$  pozytywnych w materiale biopsyjnym u pacjentów ze steroidoopornym UC jest większa w porównaniu z grupą steroidowrażliwych [49]. Raddatz i wsp. [152] zaobserwowali brak zmian w poziomie ekspresji mRNA receptora GR $\alpha$  u pacjentów z IBD, aczkolwiek w grupie pacjentów UC z zaburzoną odpowiedzią na GKS wykazano niską ekspresję mRNA GR $\alpha$  w śluzówce jelita, co może stanowić wartość prognostyczną wyniku terapii. Dodatkowo wykazano niski poziom ekspresji GR $\beta$  u pacjentów z IBD oraz brak różnic w jego poziomie pomiędzy pacjentami odpowiadającymi na GKS a pacjentami z zaburzoną odpowiedzią. Kwestionuje to jego rolę w oporności na steroidy w tej grupie chorych [152]. Natomiast ogólny poziom ekspresji GR w PBMC nie różnił się między pacjentami UC i CD. Podczas analiz podtypów GR, niski poziom GR $\alpha$  stwierdzono u pacjentów UC opornych w porównaniu do wrażliwych na steroidy. Stwierdzono także dużo niższy poziom ekspresji GR $\beta$ . Stosunek GR $\alpha$ /GR $\beta$  nie różnił się między pacjentami z różną odpowiedzią na steroidy zarówno w materiale biopsyjnym, jak i PBMC. Hori i wsp. [73] również wykazali niższą ekspresję mRNA GR $\alpha$  i GR $\beta$  w komórkach PBMC u pacjentów z CD w porównaniu z grupą kontrolną [73]. Sugerowałoby to również konieczność zbadania korelacji poziomu ekspresji GR $\alpha$  i GR $\beta$  w komórkach kłębuszka nerkowego. Istotny jest fakt, że GR ulega ekspresji w różnych typach komórek układu immunologicznego w różnym stopniu. Ekspresja GR $\beta$  jest większa w neutrofilach aniżeli w komórkach PBMC, dzięki czemu może chronić je przed śmiercią indukowaną przez GKS [152]. Stąd pytanie czy ekspresja GR $\beta$  w neutrofilach jest zwiększona w IZN ze zmienioną odpowiedzią na GKS. Dodatkowo Shalaby i wsp. [168] wskazali na rolę limfocytów T CD3+ z ekspresją GR jako wskaźnika odpowiedzi na steroidy u dzieci z IZN z Arabii Saudyjskiej. Do podobnych wniosków doszli Zagan i wsp. [208] w badaniach nad populacją Egiptu. Dodatkowo Han i wsp. [62] poziom ekspresji kłębuszkowego GR uznali za miernik prognostyczny odpowiedzi na steroidy u dorosłych pacjentów z MCNS. Obniżoną ekspresję GR zaobserwowano u pacjentów późno reagujących na terapię GKS. Farrell i wsp. [47] wykazali, że

oporność na GKS jest indukowana w limfocytach T poprzez miejscowe środowisko zapalne (cytokiny zapalne) najprawdopodobniej poprzez redukcję powinowactwa wiązania wewnątrzkomórkowego GR z ligandem [47]. Indukowana cytokinami zwiększona ekspresja GR $\beta$  może być przyczyną niewrażliwości na GKS u pacjentów z chroniczną astmą [107]. Z obserwacji Leung i wsp. [107] wynikało, że układ immunologiczny indukuje GR $\beta$ , redukując funkcjonalną odpowiedź na GKS, co nawiązuje do koncepcji mówiącej, że proces zapalny tłumia odpowiedź na endogenne i egzogenne GKS [107]. Na tej podstawie można wnioskować, że interpretowanie wyników należy poszerzać o dokonywanie głębszych analiz obierając różne modele badawcze, co czyni wyniki bardziej wiarygodnymi. Tym samym również analizy sekwencjonowania powinny być podparte sprawdzeniem poziomu ekspresji mRNA, a następnie poziomu białka, ponieważ brak zmian na poziomie DNA nie wyklucza zmian na poziomie mRNA czy białka. Może wynikać to z faktu transkrypcyjnej kontroli GR dotyczącej wysp CpG i mechanizmów epigenetycznych [192]. Najprawdopodobniej podłoże steroidoporności powiązane z ekspresją białka GR, uwarunkowane jest poziomem mRNA. U organizmów eukariotycznych ekspresja kontrolowana jest przez różnorodne mechanizmy na poziomie transkrypcyjnym i translacyjnym, a wśród nich: kondensację chromatyny, inicjację transkrypcji DNA, metylację, alternatywny splicing RNA czy stabilność mRNA. Poziom mRNA i białka GR różni się między komórkami i typem tkanki (tkankowo-specyficzna kontrola poziomu GR). Istotny jest fakt, że pierwszy niekodujący ekson receptora GR jest pod kontrolą kilku promotorów, co może odgrywać ważną rolę w procesie translacji i przetwarzania pierwotnego transkryptu [191]. Duża ilość czynników transkrypcyjnych wiąże się w obszarze wysp CpG. Czynniki transkrypcyjne odgrywają znaczącą rolę w podstawowej ekspresji GR. Jako że GR sam jest również czynnikiem transkrypcyjnym, autoreguje również swoje własne wyspy CpG w promotorach. Metylacja cytozyny 5' wysp CpG jest związana z wyciszaniem genu poprzez hamowanie wiązania czynników transkrypcyjnych lub poprzez inaktywację chromatyny. Metylacja DNA reprezentuje związek pomiędzy wpływem środowiska a aktywnością genu. Poziom metylacji GR jest dość różnorodny w PBMC i wątrobie a stosunkowo niski w mózgu. Wskazuje się również na rolę mikroRNA (miRNA) zaangażowanego w regulację wielu ścieżek sygnałowych takich jak: czas rozwoju, różnicowanie komórek czy apoptoza. Właściwy mechanizm, poprzez który miRNA hamuje translację, pozostaje nieznanym, aczkolwiek wiadomo, że miRNA nie tylko indukuje deadenylację i degradację, ale również interferuje z syntezą białka [192]. Zmienioną regulację białek zaangażowanych w molekularny mechanizm GKS przez miRNA oraz ich potencjalną rolę jako molekularnych markerów użytecznych do przepowiadania odpowiedzi na GKS odnotowano w orbitopatii Gravesa [169], IBD [4] czy sepsie [104]. Przewiduje się, że region 3'UTR receptora GR zawiera wiele miejsc rozpoznawanych przez różne miRNA, w tym miR-18 i miR-124a. Obydwa redukują poziom białka GR i aktywność GR mierzoną poziomem ekspresji docelowych genów, co ogranicza przeciwzapalne działanie GKS [192]. Niewiele wiadomo o miejscach wiązania 5'UTR dla miRNA w receptorach GR czy epigenetycznej modulacji promotorów [192]. Funkcje



receptora GR regulowane są również poprzez strukturę chromatyny, epigenetykę, zmiany genetyczne. Wzór metylacji przekazywany jest dalszym pokoleniom komórek. Również istotne są modyfikacje potranslacyjne czy wspomniana powyżej rola miRNA, które modyfikują odpowiedź na GKS oraz zmieniają poziom pro- i antyapoptycznych białek [41]. Kluczowa rola 5'UTR zaangażowana w kontrolę translacyjną związana jest z jego długością, konsensusową sekwencją inicjacyjną, obszar powyżej miejsca startu, miRNA, IRES (wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu). Dodatkowo 5'UTR może zawierać sekwencje, które funkcjonują jako miejsca wiązania białek regulatorowych [191]. Aktywność GR $\alpha$  jako czynnika transkrypcyjnego może być modyfikowana poprzez potranslacyjne modyfikacje na poziomie białka [209]. Spośród pozyskanych wyników jedynie polimorfizm Ala229Thr był zlokalizowany blisko miejsca modyfikacji Ser226 na drodze fosforylacji, która według danych literaturowych może obniżać transdukcję sygnału GR $\alpha$  [23, 78]. Jednakże zmiana ta ujawniła się tylko u jednego pacjenta z SOZN, stąd trudno wyciągać jednoznaczne wnioski.

Ciekawym spostrzeżeniem jest zależność pomiędzy izoformą receptora GR $\beta$  a aktywnością deacetylazy histonowej 2 (HDAC2). Zakłada się, że aktywność HDAC2 jest regulowana nadekspresją GR $\beta$ . Butler i wsp. [20] badali ekspresję GR $\beta$  oraz HDAC1 i HDAC2 w drogach oddechowych pacjentów z ciężką astmą oraz poziom mRNA w PBMC. Poziom HDAC1 wzrósł u pacjentów z ciężką astmą przy podwyższonych dawkach GKS w porównaniu do grupy kontrolnej. Ekspresja białek HDAC2 i GR $\alpha$  wykazywała bliską korelację na poziomie transkrypcyjnym, co sugeruje, że molekuly te są koregulowane oraz że ich zwiększona ekspresja prowadzi do wzrostu reakcji na steroidy. mRNA GR $\beta$  ulegało ekspresji na niskim poziomie w drogach oddechowych bez różnic między fenotypem SO i SW. GR $\beta$  nie pełni więc roli w ciężkiej astmie, co również poddaje wątpliwościom o roli tej izoformy w steroidooporności. Regulacja w dół HDAC1 i HDAC2 nie występuje w ciężkiej astmie, w związku z czym mechanizm steroidooporności pozostaje nadal niewyjaśniony [20].

Dodatkowo analiza nierównowagi sprzężeń (LD) wykazała, że zarówno w grupie pacjentów z SOZN i SWZN, jak i całej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej, dwa polimorfizmy wykazują silne powiązanie między markerami rs6190 (E22E) i rs6189 (R23K). Niestety pomimo wysokiej wartości  $D'$  oraz współczynnika korelacji  $r^2$ , niska wartości MAF (MAF=0,01) uniemożliwiła utworzenie haplotypu, jednakże sprzężenie to jest potwierdzeniem dotychczasowych badań. Na siłę sprzężeń tych polimorfizmów wskazują badania van Winsen i wsp. [219], którzy badali haplotyp TAAG składający się z markerów *TthIII1/ER22/23EK/9 $\beta$*  w przebiegu stwardnienia rozsianego. Haplotyp ten powiązано z bardziej agresywnym przebiegiem tej choroby. Najprawdopodobniej związane jest to z polimorfizmem ER22/23EK, który obniża wrażliwość na GKS [219]. Teeninga i wsp. [184] zaobserwowali, że u pacjentów z ZN będących nosicielami haplotypu GR9 $\beta$ -*TthIII1* znacznie częściej dochodziło do incydentów steroidozależności w porównaniu do nie-nosicieli [184]. Także Zalewski i wsp. [209] badali polimorfizmy intronu B genu *NR3C1* w grupie dzieci z ZN. Wykazali obecność trójmarkerowego

haplotypu (*BcII/rs33389/rs33388*) genu *NR3C1*, związanego z odpowiedzią na prednizon. Haplotyp GTA związany był z większą wrażliwością na GKS w grupie wczesnej odpowiedzi na prednizon (odpowieź  $\leq 7$  dni) w porównaniu z grupą późną (odpowieź  $> 7$  dni). Natomiast dystrybucja haplotypu była taka sama między grupą kontrolną a pacjentami z SOZN [209]. Natomiast Mwinyi i wsp. [128] wykazali, że haplotypy receptora *NR3C1* nie są związane z wynikiem terapii steroidami u pacjentów z IBD w populacji szwajcarskiej [128]. Literatura szeroko opisuje wariant genetyczny *TthIII1*, jak również *BcII* w genie *NR3C1*, co sugerowałoby sprawdzenie i tych zmian w populacji dzieci z Wielkopolski. Być może któryś ze zidentyfikowanych polimorfizmów jest właśnie z nimi sprzężony.

Nasze wyniki mogą wykazywać różnice w stosunku do wcześniejszych badań z powodu różnych interakcji genów, które są zaangażowane w etiologię steroidooporności, interakcji ze środowiskiem, jak również stosunkowo małej grupy badanej. Różnice w obserwowanych asocjacjach mogą częściowo wynikać z tkankowo-specyficznych czynników i zmiennych niezależnych, które wpływają na ekspresję różnych form splicingowych i wariantów translacyjnych receptora GR, jak również potranslacyjnych modyfikacji tego receptora [120]. Dodatkowo wśród parametrów wpływających na obraz bloków haplotypowych oraz powiązań SNP wymienia się: populację, w której badania były przeprowadzane, wybrane markery, gęstość polimorfizmów czy wybrany do obliczeń algorytm. Poszukiwanie korelacji pomiędzy mutacjami a haplotypami jest ważnym narzędziem w badaniach genetycznych [145], jednakże należy pamiętać, że wyników haplotypów nie można przenosić na inne populacje i są one wartościowe tylko w obrębie badanej grupy [19]. Zdecydowanie dalsze badania powinny zostać wykonane, żeby sprawdzić czy wspomniane SNP mogą zmieniać ekspresję genu *NR3C1* i mogą dostarczać więcej informacji na ten temat. Co więcej, prawdopodobieństwo ustanowienia SNP jako wczesnego markera IZN i odpowiedzi na GKS powinno być uwidocznione przez bardziej szczegółowe badania.

Pozyskane wyniki również nie ujawniły sprawczych mutacji w genie *NR3C1*, co daje jednoznaczną odpowiedź, iż nie mamy w naszych badaniach do czynienia ze steroidoopornością wrodzoną.

### **Gen glikoproteiny P (*ABCB1*)**

Pgp odgrywa ważną rolę w procesach absorpcji, dystrybucji i eliminacji różnych endo- i egzogennych substancji, w tym leków. Ekspresja Pgp zachodzi w wielu tkankach oraz komórkach, w tym w kanalikach proksymalnych w nerkach, w wątrobie (udział w procesach usuwania ksenobiotyków i endogennych metabolitów do moczu i żółci), w barierze krew-mózg, łożysku oraz w licznych komórkach układu odpornościowego: PBMC, makrofagach, komórkach NK, komórkach dendrytycznych, także w limfocytach T i B. Ekspresja Pgp zachodzi także w komórkach kory nadnerczy, co wskazuje na jej rolę w sekrecji i metabolizmie endogennych

steroidów [15]. Główne domeny wiążące lek w Pgp zlokalizowane są wewnątrz błony w domenach: 4, 5, 6, 10 oraz 11. Sprawcze mutacje w Pgp, wpływające na specyficzność substratową dotyczą głównie regionu wewnątrz błonowego oraz pętli zewnątrz- i wewnątrz-komórkowych, a także domen wiążących ATP. Glikolizacja Pgp w trzech miejscach (N91, N94, N99) jest istotna dla przemieszczenia transportera na powierzchnię komórki, ale nie jest wymagana dla jego funkcji. Białko to ulega także fosforylacji przez kinazy (S661, S667, S671, S683), aczkolwiek nie wykazano wpływu tej modyfikacji na działanie Pgp [2].

Związek polimorfizmów genu *ABCB1* z odpowiedzią na przebieg i leczenie badano w wielu chorobach: RZS [43], IBD [14, 33], w tym chorobie Crohna [147] i UC [70, 147], raku piersi [114] i raku jelita grubego [148]. Wskazuje się na rolę Pgp w farmakokinetyce i farmakodynamice GKS stosowanych w leczeniu IZN. Badania Wasilewskiej i wsp. [198] wskazały na wyższą ekspresję Pgp w limfocytach CD3+ u dzieci z ZN, w tym steroidozależnych i z częstymi nawrotami. Wnioskowali oni, że profil odpowiedzi na GKS może być spowodowany nadekspresją Pgp. Prasad i wsp. [149] zaobserwowali, że ekspresja Pgp wzrasta w PBMC dzieci z IZN w stanach prozapalnych. Funaki i wsp. [50] skorelowali wzrost ekspresji Pgp w PBMC pacjentów z SWZN z pierwszym rzutem choroby i nawrotem, a spadek z pojawieniem się remisji. Jest to bardzo ciekawe spostrzeżenie, które tłumaczy dlaczego pacjenci podczas pierwszego rzutu i nawrotu wymagają wyższych dawek steroidów niż w trakcie remisji, żeby uzyskać takie samo działanie leku. Okazuje się bowiem, że IL-2 jest cytokiną, która wpływa na transkrypcyjną regulację Pgp w limfocytach [189]. Synteza IL-2 jest intensywna w ostrej fazie ZN w limfocytach. Na tej podstawie wnioskuje się, że aktywność choroby może mieć znaczenie w odpowiedzi na terapię steroidami u pacjentów z SWZN poprzez zmiany w ekspresji Pgp. Również Stachowski i wsp. [174] wykazali, że oporność na terapię u pacjentów z ZN może być wynikiem wzmocnionej ekspresji genu *ABCB1* w limfocytach oraz wysokiej aktywności eksportowej pompy Pgp. Ponieważ blokery kanałów wapniowych odwracają oporność związaną z *ABCB1*, analiza tego genu może pomóc wykryć podejrzenie oporności na terapię u pacjentów z ZN. W przypadku RZS limfocytarnej ekspresji Pgp przypisuje się ważną rolę potencjalnego użytecznego markera służącego do oszacowania odpowiedzi na lek, a także wyselekcjonowania właściwych leków do terapii [190]. Nadekspresja Pgp na limfocytach może wpływać na usuwanie GKS z limfocytów, co skutkuje opornością na lek u pacjentów. Celem staje się poszukiwanie inhibitorów Pgp lub jej redukcji, co pozwoliłoby na przezwycięzenie lekowej oporności. Potwierdza to, że indywidualna osobnicza odpowiedź na egzogenne GKS może wynikać z różnej aktywności czynników wpływających na ich biodostępność, dystrybucję tkankową i eliminację. Istotne jest więc poszukiwanie markerów tej odpowiedzi, w celu ujawnienia związku genotyp-fenotyp. Ponieważ podłoże ZN w dużej mierze związane jest z nadreaktywnością układu immunologicznego, badania dotyczą głównie limfocytów. Türkmen i wsp. [193] jako pierwsi zademonstrowali zwiększoną ekspresję nerkowej Pgp u pacjentów z ZN steroidozależnych, steroidoopornych oraz z częstymi nawrotami. Jednakże istotne jest przeprowadzenie badań, które

pozwołyby na uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy wzrost Pgp związany jest ze zmianami w genie *ABCBI* czy może wynika z odpowiedzi na GKS i jest skutkiem terapii steroidami. Pozwołyby to na wyciągnięcie wniosków czy niektórzy ludzie wykazują genetyczną predyspozycję na lepszą odpowiedź na GKS. Przedstawione powyżej badania nad ekspresją Pgp, sugerują konieczność uwzględnienia potencjalnych zmian na poziomie DNA, które mogłyby być czynnikami sprawczymi jej wzrostu.

Analiza molekularna genu *ABCBI* wśród pacjentów z IZN wykazała obecność dwudziestu sześciu polimorfizmów typu SNP w analizowanych grupach badawczych i grupie kontrolnej. Polimorfizmy były udokumentowane w bazie SNP NCBI. Spośród nich, aż osiemnaście dotyczyło intronów, pozostałe sześć SNP zlokalizowanych było w eksonach oraz po jednym w odcinkach 5'UTR i 3'UTR. Wśród dwunastu polimorfizmów odcinków intronowych nie uzyskano istotnych statystycznie różnic w częstościach genotypów oraz alleli dokonując porównań w obrębie grup: SOZN z SWZN i IZN z grupą kontrolną w oparciu o rozpatrywane modele badawcze. W przypadku substytucji C>T (rs2235074) w intronie 3 została ona całkowicie wyeliminowana z interpretacji z powodu braku zgodności z prawem HWE. Nie uzyskano również zgodności z prawem HWE dla substytucji A>G (rs2214102) w odcinku 5'UTR dla grupy SOZN. Trudno jest wskazywać konkretne przyczyny tej nieprawidłowości. Wśród nich wymienia się: obecność selekcji, migracji, mutacji, nielosowe kojarzenie osobników, zachodzenie na siebie populacji, dryf genetyczny, jak również błąd genotypowania [59, 145]. Jednakże w przypadku badań molekularnych bardzo często wskazuje się głównie właśnie na błąd genotypowania, jak również nieprawidłowo dobrane grupy badawcze, w tym mieszanie się różnych grup etnicznych. Odnosząc powyższe informacje do uzyskanych wyników, mało prawdopodobna wydaje się być heterogenność grup badanych, ponieważ wszystkie dzieci pochodziły z terenu Wielkopolski. Wykluczono również błąd genotypowania, jako że w trakcie analiz wykonywano próbę ślepą, której celem było sprawdzenie czy nie doszło do zanieczyszczenia używanych odczynników, co w rezultacie mogłoby dawać wyniki fałszywie pozytywne. Problemem może być również kwestia związana z niską częstością występowania polimorfizmu w populacji, co w przypadku grupy badawczej nie przekraczającej 100 osobników nie daje szansy na jego pełne ujawnienie się. Nakreśla to wizję konieczności weryfikacji pozyskanych wyników na większej grupie badawczej.

W przypadku polimorfizmu rs10276036 (A>G) intronu 9 oraz rs2235046 (G>A) intronu 16 zaobserwowano tendencję w kierunku asocjacji ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na IZN w porównaniu z grupą kontrolną odpowiednio dla homozygot AA oraz GG w modelu recesywnym. Natomiast w przypadku rs2235013 (G>A) w intronie 14 nosiciele heterozygoty GA wykazywali tendencję w kierunku asocjacji ze zmniejszonym ryzykiem zachorowaniem na IZN w modelu addytywnym. Tendencje w kierunku odpowiednich asocjacji wymagałyby potwierdzenia na większej grupie badanej. Pozyskane wyniki wskazują, że zmiany punktowe w sekwencji genu mogą pełnić rolę potencjalnego markera predykcyjnego wystąpienia lub nie choroby. Jednakże żadne z powyższych zmian nie wykazały związku z odpowiedzią na terapię

steroidami. Taką tendencję ujawnił polimorfizm w intronie 26 rs2235048 (T>C), wskazując na potencjalny związek ze zwiększonym ryzykiem pojawienia się fenotypu SOZN u nosicieli dwóch alleli C w porównaniu z grupą z SWZN, bez związku z IZN. Jedynie w przypadku polimorfizmu rs2235033 (T>C) intronu 13 zaobserwowano istotny statystycznie związek zarówno z podatnością na IZN, jak i odpowiedzią na terapię steroidami. Możliwy wpływ tego polimorfizmu na funkcje *ABCB1* nie jest znany, aczkolwiek nie można wykluczyć, że ten SNP zlokalizowany jest w regionie odpowiedzialnym za regulację genu. Inna możliwość jest taka, że polimorfizm może być w nierównowadze sprzężeń z innym, funkcjonalnym wariantem, który powiązany jest ze zwiększoną podatnością na IZN, jak również ujawnienia się fenotypu steroidooporności. Interesująca może być hipoteza, że intron 13 genu *ABCB1* może być docelową sekwencją dla specyficznego miRNA regulującego sieć genów zaangażowanych w patomechanizm steroidooporności, tym samym przyznając podatność na ujawnienie się tego fenotypu.

Zmiany punktowe w odcinkach 5'UTR oraz 3'UTR: rs2214102 (A>G) oraz rs17064 (A>T) nie wykazały żadnych zależności z badanymi grupami.

Szczególne znaczenie przypisuje się zmianom w eksonach, a szczególnie tym, które prowadzą do zmiany składu aminokwasowego kodowanego białka. Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji zidentyfikowanych zmian: ekson 2 - Asn21Asp (rs9282564), ekson 11 - Ser400Asn (rs2229109), ekson 12 - Gly412Gly (rs1128503, C1236T), ekson 21 - Leu884Leu (rs9282563), ekson 21 - Ala893Ser/Thr (rs2032582, G2677T/A), ekson 26 - Ile1145Ile (rs1045642, C3435T), z odpowiedzią na leczenie steroidami u pacjentów z IZN. W przypadku Ile1145Ile zaobserwowano tendencję w kierunku asocjacji homozygotycznego mutantu z SOZN. W przypadku polimorfizmu Ser400Asn wykazano związek ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia IZN. Tendencja w kierunku zwiększonej podatności zachorowania na IZN dotyczyła również polimorfizmu Gly412Gly. Polimorfizmy Gly412Gly i Ile1145Ile nie powodują zmiany sekwencji aminokwasowej białka, aczkolwiek mogą mieć wpływ na strukturę DNA, stabilność mRNA, regulację translacji lub inne molekularne efekty bezpośrednio lub pośrednio poprzez LD z innym funkcjonalnym polimorfizmem w genie *ABCB1* [82]. Polimorfizm może również prowadzić do alternatywnego splicingu, który także może tworzyć krótszą formę białka w porównaniu do typu dzikiego Pgp [2]. Zarówno polimorfizm Gly412Gly, jak i Ile1145Ile zlokalizowane są w jednej z wewnątrzkomórkowych pętli, przy czym Gly412Gly dokładnie dotyczy domeny wiążącej ATP w Pgp. Pozyskane wyniki dotyczące Gly412Gly są zgodne z doniesieniami Jafar i wsp. [82], którzy również nie wykazali związku tego polimorfizmu ze steroidoopornością u pacjentów z IZN w populacji indyjskiej, pomimo że spekuluje się, iż homozygotyczny mutant tego polimorfizmu redukuje aktywność Pgp. Pozyskane wyniki w badanej grupie dzieci z terenu Wielkopolski wskazały, że nosiciele tego polimorfizmu mogą wykazywać zwiększoną podatność na rozwój IZN, czego w swoich badaniach nie potwierdzili Jafar i wsp. [82]. Nie ujawnili również efektu dla zmiany Ile1145Ile. Natomiast nosiciele

homozygotycznych mutantów polimorfizmu Ala893Ser/Thr są podatni na ujawnienie fenotypu steroidooporności u pacjentów z IZN. Nie potwierdziły tego również wyniki badań niniejszej pracy. Polimorfizm Ala893Ser/Thr zlokalizowany jest również w wewnątrzkomórkowej pętli Pgp. Zmiana aminokwasu skutkuje zmianą charakteru aminokwasu z lipofilowej na hydrofilową, co może wpływać na geometryczną dokładność miejsc interakcji i strukturę II-rzędową białka. Spekuluje się, że konsekwencją może być wzrost wydajności zmutowanego białka, które będzie w stanie efektywniej usuwać GKS lub ich aktywne metabolity, prowadząc do steroidooporności. W badaniach Youssef i wsp. [206] nosiciele polimorfizmów Ile1145Ile oraz Ala893Ser/Thr znajdowali się w grupie ryzyka wczesnego ujawnienia ZN oraz słabej odpowiedzi na terapię steroidami w populacji egipskiej. W przypadku Gly412Gly również nie doszło do ujawnienia jego efektu, co sugeruje, że nie jest on ważnym patogennym czynnikiem ZN u dzieci. Natomiast wstępną odpowiedź na GKS powiązano z młodszym wiekiem rozpoznania. Badania Wasilewskiej i wsp. [199] wykazały, że częstość allelu rzadkiego polimorfizmów Gly412Gly, Ala893Ser/Thr i Ile1145Ile była wyższa u pacjentów późno reagujących na doustny prednizon (czas remisji >7 dni) w porównaniu z wcześnie reagującymi (czas remisji <7 dni) w populacji polskiej z terenu Podlasia. Korelowało to również z częstymi nawrotami objawów choroby. Jednakże wszyscy pacjenci należeli do grupy z SWZN, w związku z czym nie można na podstawie tych wyników wnioskować o związku z odpowiedzią na leczenie steroidami. Choi i wsp. [28] nie wykazali asocjacji polimorfizmów Ala893Ser/Thr i Ile1145Ile z odpowiedzią na terapię steroidami, jak również ze zwiększoną podatnością rozwoju dziecięcego ZN w populacji koreańskiej, natomiast wykazali, że częstości genotypów CC i CT oraz allelu C polimorfizmu Gly412Gly były wyższe u pacjentów odpowiadających pozytywnie na GKS w porównaniu do niereagujących na leczenie. Potwierdzają to również badania Chiou i wsp. populacji tajwańskiej [27]. Cizmarikowa i wsp. [29] wskazali na zwiększoną szansę na odpowiedź na leczenie GKS u dzieci z IZN będących nosicielami genotypu CT polimorfizmu Ile1145Ile. W przypadku Gly412Gly i Ala893Ser/Thr, punktowe zmiany były związane z wiekiem zachorowania. Dodatkowo w odniesieniu do wyniku biopsji, pacjenci z MCNS i wiekiem rozpoznania <6 lat częściej odpowiadali pozytywnie na leczenie niż z FSG i wiekiem rozpoznania ≥6 lat. Ameyaw i wsp. [3] odnieśli się do różnic w dystrybucjach częstości genotypów i alleli polimorfizmu Ile1145Ile pomiędzy rasami: afrykańską, kaukaską i azjatycką. Częstość allelu C w rasie afrykańskiej powiązali z nadekspresją Pgp, co może mieć ważną terapeutyczną i prognostyczną wartość w leczeniu pacjentów tej rasy. Jednocześnie wskazali, że częstość tego allelu w rasie kaukaskiej utrzymywała się średnio na poziomie 45%, co potwierdzają również wyniki uzyskane na badanej w niniejszej pracy populacji polskiej (allel C – 46%). Allel T występuje częściej w rasie kaukaskiej aniżeli afrykańskiej, co tłumaczy fakt, że częściej spotyka się u nich oporność na leki i bardziej agresywne postaci nowotworów. Staje się to istotnym faktem wskazującym na udział czynników środowiskowych oraz żywieniowych, a także informuje, że wyniki badań genetycznych można odnosić tylko do danej rasy, skąd wynika częsty brak powtarzalności badań asocjacyjnych [3, 91].

Analiza nierównowagi sprzężeń wskazała na tendencję w kierunku roli allelu T polimorfizmu rs2235033 jako markera ryzyka steroidooporności w porównaniu grup SOZN vs SWZN (przed permutacją  $p=0,073$ ). W związku z czym polimorfizm ten ujawnił się w haplocyocie. W przeprowadzonych badaniach analiza haplotypowa wykazała, że haplotyp TG występował najczęściej w obydwu grupach SOZN i SWZN, jak i całej grupie z IZN i grupie kontrolnej. Markerami były tutaj polimorfizmy intronów 21 i 20 (rs2032583 i rs2235040). Natomiast potencjalny związek z fenotypem steroidowrażliwości tworzył haplotyp AGATCCAG ( $p=0,054$ ), a tendencję w kierunku asocjacji z fenotypem steroidooporności haplotyp AGATTCAG ( $p=0,083$ ). Wśród markerów je tworzących jeden ulokowany był w części kodującej (Gly412Gly) a pozostałe dotyczyły intronów, wśród których był polimorfizm rs2235033 z intronu 13. Z powodu przeprowadzanych testów wielokrotnych konieczne było dokonanie testu permutacji, co niestety zmieniło istotność statystyczną wyników, ale wskazuje to na konieczność potwierdzenia uzyskanego ewentualnego związku na większej grupie badawczej. Żaden z haplotypów nie wykazał związku z grupą z IZN w porównaniu z grupą kontrolną. Niezależna analiza trzech markerów: rs2235033 (intron 13), Ile1145Ile i Ser893Thr/Ala programem EH wykazała, że najczęściej występującym haplotypem był TTT dla wszystkich grup badanych. Związek ze SOZN wykazał haplotyp TTG, natomiast tendencję w kierunku asocjacji z SWZN haplotyp CCA. Haplotyp wykazujący tendencję w kierunku ochrony przed ujawnieniem się IZN to CTT. Niestety efekty te zostały zniesione po permutacji. Inne badania również nie potwierdziły związku haplotypów z odpowiedzią na steroidy u pacjentów z IZN dla markerów: Gly412Gly, Ala893Ser/Thr, Ile1145Ile [29, 82, 206]. Wasilewska i wsp. [199] wykazali wyższą częstość występowania haplotypu TTT u pacjentów z późną odpowiedzią na steroidy (czas remisji  $>7$  dni) w porównaniu z pacjentami z wczesną odpowiedzią na steroidy (czas remisji  $< 7$  dni).

Istotny jest również fakt, że Pgp funkcjonalnie powiązana jest z cytochromami, które biorą udział w metabolizowaniu leków. Chiou i wsp. [27] badali polimorfizm CYP3A5 (A6986G) w odniesieniu do zjawiska steroidooporności u pacjentów z IZN. Wykazali trend związku, jednakże SNP nie osiągnął istotności statystycznej. Sugerowałyby to sprawdzenie polimorfizmów genów kodujących cytochromy również w badanej populacji polskiej.

### **Gen białka szoku cieplnego 90 $\alpha$ (HSP90AA1)**

Hsp90 jest bardzo ważnym białkiem, które bierze udział w aktywowaniu translokacji receptora GR $\alpha$  do jądra, jak i jego transaktywacji [53]. Domena NTD jest miejscem wiązania nukleotydów, w tym ATP, które stabilizuje rearanżację domeny w ten sposób, że ramiona spotykają się w dimeryzowanej zamkniętej konformacji, co promuje hydrolizę ATP. Receptor GR $\alpha$  jest białkiem „klientem” (ang. *clients*) dla Hsp90. Sama zaś aktywność GR $\alpha$  regulowana jest poprzez domenę wiążącą ligand (LBD), najbardziej helikalną strukturę z kieszonką wiążącą ligand zlokalizowaną w rdzeniu domeny [93].

Stosunkowo niewiele jest danych na temat zmian molekularnych w genie kodującym białko Hsp90 $\alpha$ . Pierwsze eksperymenty, które poszukiwały roli tego białka w zjawisku steroidooporności, skupione były na badaniu jego ekspresji. Ouyang i wsp. [137] wykazali, że ekspresja i jądrowa lokalizacja Hsp90 były zwiększone w PBMC pacjentów ze SOZN. Mechanizm ten nie był do końca poznany, w związku z czym w kolejnych badaniach podjęli próbę jego wytłumaczenia, w których wykazali, że to właśnie akumulacja Hsp90 w jądrze wzmacnia interakcje GR $\alpha$ -Hsp90, a tym samym zmniejsza zdolność wiązania receptora GR $\alpha$  do sekwencji GRE w DNA. Wskazuje to na fakt, że jądrowe wzmocnienie Hsp90 jest powiązane z opornością na GKS u pacjentów z IZN. Być może u tych pacjentów dochodzi do nieprawidłowości związanych z przemieszczaniem Hsp90, w wyniku czego akumuluje się ono w jądrze i nie może powrócić do cytoplazmy. Całkowita nadekspresja Hsp90 jest wtedy mniej istotna [138]. Natomiast Kang i wsp. [89] wykazali, że IL-6 zwiększa ekspresję Hsp90 w cytoplazmie, aczkolwiek ma to niewielki wpływ na jego jądrową dystrybucję i odpowiedź komórek PBMC na GKS, które pozostały niezmienione. Wynika to z faktu, że całkowity poziom Hsp90 nie jest kluczowym czynnikiem wpływającym na odpowiedź na GKS w komórkach PBMC. Wykazano również, że poziom ekspresji GR $\alpha$  był taki sam u pacjentów z IZN, jak i w grupie kontrolnej, podczas gdy ilość jądrowego Hsp90 związanego z GR $\alpha$  była znacząco wyższa u pacjentów z SOZN w porównaniu z grupą z SWZN i grupą kontrolną [89]. Mechanizm ten można wytłumaczyć tym, że GR $\alpha$  utrzymywany jest w cytoplazmie poprzez tworzenie kompleksu z Hsp90, który w ten sposób zasłania jego NLS. W tej sytuacji dysocjacja Hsp90 z kompleksu jest podstawowym warunkiem, aby doszło do translokacji GR $\alpha$  do jądra. Z drugiej strony, maszyna białek towarzyszących, w tym Hsp90, jest wymagana do regulowania translokacji i pełni ważną rolę regulacyjną wpływu GKS na utrzymywanie receptora GR $\alpha$  w jądrze w stanie fizjologicznym. Nadekspresja Hsp90 będzie wiązała się z jego kierowaniem do jądra, a skutkiem będzie hamowanie aktywności transkrypcyjnej genów zależnych od GR $\alpha$  [89]. Ouyang i wsp. [138] wykazali również, że poziom mRNA Hsp90 był znacząco wyższy u pacjentów z IZN w stosunku do kontroli oraz u pacjentów z SOZN w porównaniu z pacjentami z SWZN. Subkomórkowa lokalizacja Hsp90 u pacjentów z SOZN była wyższa w jądrze komórkowym w stosunku do grupy z SWZN. Sprecyzowano również, że zmieniony poziom Hsp90 wpływa na funkcje receptora GR $\alpha$  i odpowiedź na GKS, przy jednoczesnej niezmienionej ekspresji GR $\alpha$  czy stosunku ekspresji Hsp90 do GR $\alpha$  [137]. Jest kilka hipotez, które mogą tłumaczyć to zjawisko. Z jednej strony może być taka sytuacja, że receptor GR $\alpha$  ma obniżoną zdolność wiązania Hsp90 w cytoplazmie, w wyniku czego jest więcej wolnego Hsp90, które przemieszcza się do jądra. Z drugiej strony Hsp90 jest tak silnie związany z GR $\alpha$ , że nie oddysocjowuje od kompleksu GR $\alpha$ -Hsp90 i taki heterokompleks przemieszcza się do jądra i nie może wrócić do cytoplazmy. Skutek może być taki, że GR $\alpha$  nie jest w stanie prawidłowo funkcjonować, a GKS nie mogą prawidłowo wywierać swoich terapeutycznych właściwości.



Prowadzi to do obniżania lub zapobiegania wiązania GR $\alpha$  z GKS, a forma kompleksu Hsp90 zasłania w receptorze GR $\alpha$  domenę wiązania DNA (DBD).

Geldanamycyna (GA) jest inhibitorem Hsp90 wiążącym się do domeny NTD i regulującym jego konformację, a przez to hamuje jego aktywność jako białka opiekuńczego [137]. Eksperymenty *in vitro* na liniach komórkowych steroidoopornych i steroidowrażliwych z zastosowaniem GA wskazały, że hamowanie Hsp90 związane jest ze spadkiem wrażliwości na GKS. Potwierdza to rolę Hsp90 w odpowiedzi na GKS [137]. Badano również nieprawidłową ekspresję Hsp90 w kompleksie z receptorem GR $\alpha$  u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym w aspekcie terapii GKS. Molekularne mechanizmy braku odpowiedzi na GKS powiązano ze zwiększoną obecnością Hsp90 w cytoplazmatycznym kompleksie z GR $\alpha$ , prowadząc do zahamowania translokacji GR $\alpha$  do jądra. Hsp90 może też działać jako negatywny regulator aktywności promotora GR $\alpha$  [121]. O roli jądrowego Hsp90 w jądrowej retencji receptora GR $\alpha$  pisali także Tago i wsp. [182] wspomagając się badaniami *in vitro*. Wykazali oni również, że inhibitory Hsp90, takie jak: GA czy radikikol (Rad) znacząco przyspieszają eksport receptora GR $\alpha$  po usunięciu ligandów: deksametazonu, kortykosteronu. Pozwala to spojrzeć w sposób nowy na molekularną regulację mechanizmu działania GKS powiązaną z patogenezą steroidooporności w leczeniu klinicznym.

W genie *HSP90AA1* zidentyfikowano siedem zmian punktowych, z czego pięć z nich dominowało w intronach a pozostałe dwa były w eksonach. Wszystkie polimorfizmy posiadały adnotacje w bazie danych SNP NCBI. W przypadku trzech wariantów polimorficznych: rs4586364 (T>C), rs7155973 (T>C) i rs6575895 (G>A) zlokalizowanych odpowiednio w intronach 3, 8 i 10, nie zaobserwowano istotnych statystycznie związków porównując zarówno grupy pacjentów z SOZN i SWZN, jak i całą grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną. W pozostałych dwóch przypadkach intronowych zmian: rs3742429 (intron 6) i rs2298877 (intron 10), nie wykazano korelacji z odpowiedzią na leczenie steroidami w badanej grupie pacjentów z IZN. Aczkolwiek pierwszy z nich wykazywał tendencję w kierunku zmniejszania ryzyka zachorowania na IZN u nosicieli allelu C w układzie heterozygotycznym w modelu addytywnym (CT vs TT) oraz dominującym (CC+CT vs TT), jak i samego allelu C. Także kolejny badany polimorfizm wskazywał na bliską asocjację w kierunku zmniejszania ryzyka zachorowania na IZN dla samego allelu A, jak i w układzie homozygotycznym i/lub heterozygotycznym w dominującym modelu porównawczym (AA+GA vs GG). Zmiany synonimiczne w eksonie 6 - Asn360Asn (rs4947) oraz w eksonie 10 - Arg612Arg (rs346449988) nie wykazały związku zarówno z fenotypem steroidooporności, jak i podatnością na wystąpienie IZN. Polimorfizmy te dotyczyły odpowiednio domen NTD i C-końcowej (CTD). Brakuje danych literaturowych, które potwierdziłyby pozyskane wyniki w aspekcie zjawiska steroidooporności powiązanego z IZN.

Urban i wsp. [194] dokonali analizy molekularnej genów *HSP90AA1* oraz *HSP90AB1* mającej charakter poznawczej charakterystyki, bez korelacji ze schorzeniem. W przypadku genu *HSP90AA1* zidentyfikowali oni osiem SNP. Spośród pozyskanych wyników zidentyfikowali dwie

zmiany synonimiczne (Leu71Met i Glu554Asp) oraz jedną rzadką mutację wczesnej terminacji (Gln107X). Zmiana Glu555Asp była rzadkim polimorfizmem zlokalizowanym w środku domeny wiążącej substrat (MSBD), natomiast Leu71Met w obszarze domeny NTD. Badania ich wskazały, że mutacje w MSBD wpływają na zdolność dimeryzacji białka. Zlokalizowali oni również polimorfizm rs4947 (Asn482Asn), wskazując iż stanowi on pośredni czynnik ryzyka oraz że może wywierać potencjalny efekt funkcjonalny poprzez regulację splicingu. Zmiana ta zlokalizowana w populacji dzieci z IZN nie wykazała istotnego statystycznie związku, jednakże uwagę zwraca wysoka wartość OR w porównaniu grup SOZN z SWZN. OR wynosiło średnio 2, co wskazuje, że ujawnienie się tego polimorfizmu może stanowić o czynniku ryzyka ujawnienia się fenotypu steroidooporności w grupie pacjentów z IZN. Pomimo że jest to zmiana synonimiczna, wskazano, że ciche SNP mogą wpływać na alternatywny splicing w transkrypcie Hsp90, jednakże dalsze badania są wymagane w celu zwalidowania pozyskanych wyników [194].

Zmiany molekularne w ludzkich genach HSP90 $\alpha$  i HSP90 $\beta$  w populacji kaukaskiej badał Passarino i wsp. [143]. Udało im się zidentyfikować polimorfizmy w eksonach i ich regionach flankujących. Stosunkowo mało jest danych na temat zmienności genetycznej w ludzkich genach kodujących białka Hsp90. Powyższa grupa badawcza wykazała niską różnorodność w regionach kodujących obydwu genów. W przypadku Hsp90 $\alpha$  tylko jedna mutacja zmiany sensu i jedna mutacja nonsens zostały zaobserwowane u pojedynczych pacjentów o statusie heterozygoty. Mutacja zmiany sensu Gln488His zlokalizowana była w domenie CTD, gdzie zachodzi proces dimeryzacji. Zmiana aminokwasu jest neutralna, czyli funkcjonalnie nie wpływa na ten proces [143]. Aczkolwiek MacLean i wsp. [117] w oparciu o drożdżowy model stwierdzili, że mutacja Gln488His w ludzkim Hsp90 $\alpha$  prowadzi do defektu wzrostu drożdży i rozwoju, a więc nie jest ona bez znaczenia. Jednakże w przeprowadzonych badaniach na populacji polskich dzieci z terenu Wielkopolski z IZN, mutacja ta nie ujawniła się, co może sugerować, że być może nie odgrywa roli w podłożu steroidooporności. Bardziej znacząca okazała się natomiast mutacja zmiany ramki odczytu, zlokalizowana w eksonie 5 białka Hsp90 $\alpha$ . Tego typu mutacje prowadzą do osłabienia produktu genu. Ponieważ badano zdrową populację i w niej doszło do ujawnienia się tej zmiany, sugeruje to, że Hsp90 $\alpha$  może normalnie funkcjonować z defektem. Aczkolwiek na poziomie komórkowym może to mieć większe znaczenie, jako że sytuacje angażujące stres i akumulację źle sfałdowanych i zmutowanych białek, a niewystarczający poziom Hsp90 $\alpha$  mogą stanowić o czynniku ryzyka. Zaobserwowano, że mutacje w genie typu zmiany sensu zlokalizowane były w regionie odnoszącym się do domeny CTD, podczas gdy te nie wpływające na zmiany aminokwasu w domenie NTD. Sugeruje to, że domena NTD, gdzie zlokalizowane jest miejsce wiązania ATP, posiada silne funkcjonalne ograniczenia oraz że zmiany aminokwasu w tym regionie nie są dozwolone z powodu ewentualnych dominujących negatywnych efektów. Z drugiej strony, brak zmienności w domenie NTD potwierdza konieczność przeprowadzenia dalszych badań z punktu widzenia farmakogenetyki, ponieważ może być ona celem obiecujących nowych leków [143]. Wykazano również, że substytucje Ile76Leu w miejscach wiązania ATP

w domenie NTD i Gly66Val w dodatkowym miejscu wiązania ATP w domenie CTD mogą wpływać na zdolność wiązania ligandu przez receptor GR $\alpha$  i interakcje GR $\alpha$ -Hsp90, a w ten sposób destabilizować GR, prowadząc do wyczerpania GR $\alpha$  bardziej poprzez jego degradację, aniżeli redukcję Hsp90 [167, 173]. Odmienne do powyższych badań, Zhao i wsp. [211] wykazali, że to właśnie zmiany konformacyjne i strukturalne bardziej niż poziom ekspresji Hsp84 (mysia forma) mogą warunkować kliniczną oporność na GKS przy prawidłowym formowaniu kompleksu GR $\alpha$ -GKS. Dodatkowo, zwrócono uwagę na wpływ zmienności Hsp84 na wrażliwość na selektywny inhibitor Hsp90 – GA dla dalszych badań w celu wskazania roli Hsp90 w odpowiedzi na GKS.

W niniejszej pracy nie uzyskano haplotypów genu *HSP90AA1* związanych z SOZN w porównaniu z SWZN, aczkolwiek wartości D' oraz współczynnik korelacji  $r^2$  wskazały na silne sprzężenie między zmianą w eksonie 6 (rs4947) i intronie 6 (rs3742429). Siła sprzężenia była wystarczająco duża, aby efekt ten ujawnił się porównując grupę pacjentów z IZN z grupą kontrolną. Haplotyp CC częściej występował w grupie kontrolnej aniżeli w grupie z IZN ( $p=0,044$ ). Co prawda w wyniku permutacji efekt został zniesiony, aczkolwiek można mówić o potencjalnej protekcyjnej roli haplotypu CC przed ujawnieniem się IZN w badanej grupie pacjentów.

Pozyskane wyniki sugerują niewielką wartość sprawczą zmian na poziomie DNA oraz jednocześnie sugerują konieczność zbadania poziomu mRNA Hsp90.

### **Gen cytokiny MIF (*MIF*)**

MIF jest plejotropową cytokiną, która ulega ciągłej ekspresji w komórkach układu immunologicznego: limfocytach T, monocytach/makrofagach, a także w komórkach nabłonka kanalików nerkowych w tym cewek, kłębuszków, blaszki ściennej i trzewnej (podocyty), komórkach mezangium [101, 163]. Sekrecja MIF odbywa się również z komórek przysadki, co wskazuje na rolę MIF w regulowaniu układu neuroendokrynowego. Poziom MIF rośnie razem z ACTH w odpowiedzi na stres [18]. Wśród najważniejszych funkcji MIF wskazuje się na regulację funkcji makrofagów i limfocytów T w stymulowaniu ich do ekspresji prozapalnych cytokin, co odbywa się na drodze parakrynej lub autokrynej oraz oddziaływanie z GKS. MIF uwalniany jest z nerek i wywiera swoje biologiczne właściwości w wielu patologicznych stanach, takich jak: szok septyczny, zapalenie nerek czy cukrzyca. Funkcjonalne znaczenie MIF w chorobach nerek jest demonstrowane poprzez odkrycia, w których wykazano, że neutralizując cytokinę przeciwciałami anti-MIF, dochodzi do zapobiegania lub odwracania uszkodzeń nerek [101]. MIF jest dość trudną do badań cytokiną, jako że mechanizm jej działania nie jest do końca poznany. Dochodzi tutaj kwestia jej złożonej reakcji na GKS, bowiem MIF przeciwdziała ich efektom na układ immunologiczny, podczas gdy same GKS indukują sekrecję MIF przy niskich stężeniach fizjologicznych, natomiast hamują przy wysokich ( $>10^{-8}$ M) [101]. Przeciwdziałanie efektom GKS przez MIF może opierać się o kilka mechanizmów. Wymienia się dodatnią

regulację fosfolipazy A2, która jest hamowana przez GKS. Ponadto cytokina ta może osłabiać ekspresję I $\kappa$ B indukowanej przez GKS, tym samym promuje translokację NF- $\kappa$ B do jądra, w wyniku czego dochodzi do aktywacji prozapalnych szlaków, biorących udział w uszkodzeniu nerek (Ryc. 6). MIF tłumi także fosfatazę MKP-1, która inaktywuje prozapalne kinazy: ERK1/2, JNK i p38MAPK [1, 16, 101, 126, 127] (Ryc. 8, Ryc. 9g).

Nadekspresję cytokiny MIF w mysich podocytach powiązano z uszkodzeniem kłębuszków nerkowych, co prowadzi do kłębuszkowego zapalenia nerek oraz ESRD. U myszy tych dochodziło do zlewania się wyrostków stopowatych podocytów oraz białkomoczu [165]. Zwraca się uwagę na ekspresję cytokin prozapalnych, takich jak: TNF $\alpha$  czy IL-1 $\beta$  w podocytach, co jest wynikiem stymulacji komórek układu immunologicznego przez MIF [94]. Tym samym może to wpływać na funkcjonalność podocytów i prowadzić do ich chronicznego uszkodzenia, co w konsekwencji prowadzi do uszkodzenia kłębuszków nerkowych.

Wyraźna rola MIF i limfocytów T w pośredniczeniu w chorobach nerek wynika z obserwacji, że limfocyty T produkujące MIF są wyłącznie zlokalizowane w przestrzeni ostrego uszkodzenia tkanki, a prowadzi to do zajęcia kłębuszków z formowaniem półksiężyców, FSGS czy nekrotycznego zapalenia naczyń. MIF może również pośrednio lub bezpośrednio brać udział w rekrutowaniu limfocytów T do miejsca uszkodzenia zapalnego. Może się to odbywać poprzez zwiększenie ekspresji chemokin i cząsteczek adhezyjnych. MIF może działać jako stymulator proliferacji i aktywacji limfocytów T pośrednicząc w ten sposób w uszkodzeniach nerek poprzez nadwrażliwość typu późnego (ang. *delayed-type hypersensitivity*, DTH). W typowej reakcji DTH centralnymi komórkami odpowiedzi immunologicznej są limfocyty Th1, które przyciągają do miejsca toczącej się reakcji immunologicznej leukocyty krwi obwodowej, głównie monocyty i neutrofile [101].

W genie *MIF* w wyniku analizy molekularnej dokonano detekcji siedmiu SNP zlokalizowanych w odcinku promotorowym, 3'UTR i intronach oraz jednego mikrosatelitarnego STR w odcinku promotorowym. Wszystkie polimorfizmy znajdowały się w bazie SNP NCBI. Zmiany w intronach 1 i 2 (rs2096525 i rs2070766) nie wykazywały związku zarówno z fenotypem steroidooporności, jak i z IZN. Brak danych o wpływie tych zmian na steroidooporność związaną z IZN. Silne sprzężenie między tymi polimorfizmami wykazali Zheng i wsp. [212] w odniesieniu do choroby Behçeta związanej z układowym zapaleniem naczyń w populacji chińskiej. Nie stwierdzono również związku wariantów SNP odcinka promotorowego -173G>C (rs755622) oraz -74A>T (rs112568463) z SOZN, jak również z IZN w badanej grupie polskich dzieci. Jedynie w przypadku zmiany -74A>T można wskazywać na tendencję w kierunku asocjacji ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia fenotypu steroidooporności w porównaniu grup SOZN z SWZN. Brak danych literaturowych, które potwierdziłyby tę zależność.

Znaczenie polimorfizmu -173G>C wynika z faktu, że wariant C zwiększa ekspresję cytokiny MIF poprzez tworzenie miejsca odpowiedzi na białko aktywujące AP-4 (ang. *activator*

*protein 1*) w promotorze genu *MIF* [12]. Wyniki pozyskane dla niniejszej pracy różnią się od niektórych opublikowanych badań. Berdeli i wsp. [12] stwierdzili związek polimorfizmu -173G>C z SOZN w populacji tureckiej. Ponadto wykazali zwiększoną częstość występowania genotypu GC i allelu C u pacjentów z IZN, a po sklasyfikowaniu ich na SO i SW, zanotowali około 20-krotnie większą dystrybucję genotypu CC w grupie pacjentów z SOZN. Co więcej, nosicielstwo allelu C korelowało z obrazem histopatologicznym typu FSGS i nefropatii IgM. Pacjenci z genotypem CC byli w grupie zwiększonego ryzyka trwałej niewydolności nerek oraz ESRD [12].

Odnosząc się do specyficznej relacji pomiędzy cytokiną MIF a GKS sugeruje się, że może być ona potencjalnym terapeutycznym celem. Skorelowanie wyniku genotypu CC z parametrami klinicznymi typu: białkomocz, krwinkomocz, stopień uszkodzenia nerek, obraz histopatologiczny oraz odpowiedź na leczenie steroidami, może mieć bardzo dużą wartość predykcyjną przebiegu choroby. Określenie genotypu *MIF* w grupie pacjentów z IZN może być użytecznym narzędziem przepowiadania odpowiedzi na GKS, co dla klinicystów może stanowić ważny wskaźnik doboru odpowiedniej terapii. Vivarelli i wsp. [222] również wykazali, że częstość allelu wysokiej ekspresji C była wyższa u pacjentów z IZN w porównaniu z grupą kontrolną wśród populacji włoskiej oraz dodatkowo allel C występował częściej w grupie pacjentów z SO fenotypem w porównaniu z SW. Różnice te ściśle korelowały z wynikiem histopatologicznym FSGS. Dodatkowo nosiciele allelu C wykazali większe prawdopodobieństwo ESRD w porównaniu do homozygot GG. Uwidacznia to ważność przeszukiwania genotypów cytokiny MIF na początku choroby, w celu identyfikacji pacjentów oraz odpowiedniego podejścia terapeutycznego. Na możliwą patogenną rolę polimorfizmu -173G>C cytokiny MIF w chorobach nerek wskazali również Tripathi i wsp. [188], którzy zaobserwowali wyższą częstość allelu C u pacjentów z ESRD. Patogenność tej cytokiny można wytłumaczyć jej rolą fizjologicznego kontrregulatora przeciwzapalnych efektów GKS. Genetyczne predyspozycje do większej produkcji MIF mogą przyczyniać się do hamowania przeciwzapalnych właściwości endogennych GKS, przesuwając równowagę w swoją stronę, co będzie sprzyjało reakcjom zapalnym. Tong i wsp. [186] powiązali obecność polimorfizmu MIF -173G>C ze zwiększonym ryzykiem chorób nerek głównie u dzieci. Natomiast uzyskany w populacji polskiej wynik [179] korelował z wynikami Choi i wsp. [28], którzy wykazali brak związku polimorfizmu w genie *MIF* -173G>C z klinicznymi parametrami, obrazem histopatologicznym nerek i odpowiedzią na steroidy w populacji koreańskiej. W innych badaniach polimorfizm -173G>C nie wykazywał związku z UC w populacji japońskiej [170], jak również nie przyczyniał się do słabej odpowiedzi na prednizon w badaniach *in vivo* u dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną w populacji włoskiej [214]. Natomiast polimorfizm ten powiązано ze zwiększonym ryzykiem gruźlicy w populacji chińskiej [204] oraz z podatnością rozwoju łuszczykowego zapalenia stawów w populacji meksykańskich Metysów [125].

Polimorfizm mikrosatelitarny rs5844572 (CATT<sub>5-8</sub>) wiąże przysadkowy czynnik transkrypcyjny Pit-1 (ang. *pituitary transcription factor 1*) [18, 48]. Liczba powtórzeń CATT

związana jest ze zwiększoną ekspresją MIF [18]. Brak jest danych na temat roli tego polimorfizmu w odpowiedzi na steroidy u pacjentów z IZN. W badanej populacji polskich dzieci najliczniej występował allel CATT6, natomiast CATT8 nie ujawnił się [179]. Genotyp CATT<sub>5</sub>/CATT<sub>6</sub> opisywany w literaturze jako genotyp „niskiej ekspresji” [48] występował istotnie statystycznie częściej w grupie pacjentów z SOZN w porównaniu z SWZN. Natomiast Baugh i wsp. [11] badali ten polimorfizm u pacjentów z RZS. Powiązali oni allel CATT5 z łagodniejszą formą RZS, stąd homozygoty CATT5/5 uznano za marker ochronny przed rozwojem ciężkiej postaci choroby [11]. Allele „wysokiej ekspresji” -794 CATT7 i -173 C powiązano z wczesnym ujawnieniem RZS [112] oraz podatnością na SLE [39, 162]. Natomiast Yanlin i wsp. [204] skorelowali genotypy CATT7/X+CATT8/X ze zwiększonym ryzykiem gruźlicy. Również Shiroeda i wsp. [170] sugerowali, że ilość powtórzeń CATT w promotorze genu *MIF* może być powiązana z rozwojem UC oraz jego stopniem zaawansowania. Wykazali związek genotypu CATT5/5 z zahamowaniem rozwoju UC, natomiast CATT7/7 z rozwojem UC i wzrostem zapalenia. Jednakże pozyskane wyniki nie osiągnęły progu istotności statystycznych. Ishiguro i wsp. [76] potwierdzili rolę MIF w patomechanizmie steroidooporności u pacjentów UC opartą o ścieżkę sygnałową p38MAPK. Wskazuje to na fakt, że zmiany w genie *MIF* mogą predysponować do zmienionej podatności lub zaostrenia chorób zapalnych czy infekcyjnych [153]. Natomiast Wang i wsp. [196] wskazali na rolę MIF w powstawaniu steroidooporności u pacjentów z SLE poprzez wpływ na ścieżkę sygnałową NFκB/IκBα.

W niniejszej pracy polimorfizmy odcinków 3'UTR nie wykazały asocjacji z IZN w porównaniu z grupą kontrolną. Odnotowano natomiast rolę polimorfizmów rs2070767 (T>C) oraz rs2000466 (T>G) w odpowiedzi na terapię steroidami. Pierwszy z nich wykazał związek allelu T w układzie heterozygotycznym z fenotypem steroidooporności w addytywnym modelu w porównaniu grup SOZN i SWZN (CT vs CC), wskazując na jego rolę jako markera ryzyka. W przypadku drugiego polimorfizmu wariant genetyczny z G w układzie heterozygotycznym wykazywał związek z fenotypem staroidowrażliwości w modelu addytywnym oraz w układzie homozygotycznym w dominującym modelu w takim samym porównaniu jak powyżej (TG vs TT i GG+TG vs TT). Tendencję w stronę markera ochronnego przed ujawnieniem się fenotypu steroidooporności wykazywał trzeci polimorfizm obecny w obszarze 3'UTR rs34383331 (T>A). Rola zmian w tych obszarach wydaje się być bardzo istotna ze względu na kontrolę mRNA poprzez elementy regulatorowe w 3'UTR, jak sekwencja ARE, która kontroluje stabilność mRNA, a także sygnały, które regulują wewnątrzkomórkową lokalizację tran skryptu [16, 17]. Pośrednio można wnioskować o roli pozyskanych zmian w 3'UTR w funkcjonalności czy stabilności transkryptu.

Analiza korelacji między polimorfizmami -173G>C (rs755622) i CATT<sub>5-8</sub> (rs5844572) wykazała, że genotyp CATT<sub>5/6</sub>\_GG występował istotnie statystycznie częściej w grupie pacjentów z SOZN w porównaniu z SWZN. Haplotyp GA polimorfizmów obszaru 3'UTR (rs34383331 i rs2000466) wskazywał na związek z fenotypem steroidowrażliwości w porównaniu

grup pacjentów z SOZN z SWZN, jednakże analiza permutacji nie potwierdziła tego. Nie wykazano korelacji haplotypów z podatnością na IZN. Liczba powtórzeń i allel C powiązane są ze wzrostem aktywności promotora, jednakże nie ma wyraźnych danych wskazujących na związek pomiędzy tymi polimorfizmami a regulacją transkrypcji genu *MIF*. Analiza LD polimorfizmów -173G>C i -744 CATT wykazała, że w badanej populacji polskiej najczęściej występował haplotyp CATT6\_G, natomiast najrzadziej CATT7\_G, bez sprzężeń z badanymi grupami.

Praktyczne podejście analiz molekularnych wskazuje, że wiedza o genotypach pacjentów może oferować prognostyczną wartość, jak również być wskazaniem do zastosowania potencjalnej terapii anty-MIF. Neutralizacja MIF przeciwciałami wydaje się mieć same korzyści: redukcja uszkodzeń nerek czy śródmiąższowych zapaleń [18, 115]. Wśród testowanych inhibitorów MIF znalazły się chemiczne, takie jak: NAPQ1, ISO-1 czy roślinne: kurkuma, kwas kawowy, działanie ich opiera się na hamowaniu aktywności tautomerycznej MIF oraz antagoniści MIF-CD74 [34, 202]. Szczególnego znaczenia upatruje się w analizie cytokiny MIF krążącej we krwi jako biomarkera oporności na steroidy [16].

## Podsumowanie

Badania z zakresu molekularnego podłoża mechanizmu steroidooporności towarzyszącej IZN nie ograniczają się do szlaków receptora GR czy działania transporterów błonowych. Dotyczą również kaskad sygnalizacyjnych cytokin, enzymów metabolizujących leki czy białek bezpośrednio związanych ze strukturami bariery filtracyjnej kłębuszka nerwowego.

Wśród potencjalnych czynników zaanagażowanych w podłożu steroidooporności wskazuje się na rolę białek SOCS, które są negatywnymi regulatorami kaskady sygnalizacyjnej cytokin zależnej od szlaku JAK/STAT. Badana grupa pacjentów była poddana analizie przez zespół Ostalskiej-Nowickiej i wsp. [136], który powiązał wzrost ekspresji mRNA SOCS3 i SOCS5 w PBMC ze wskaźnikiem steroidooporności u dzieci z IZN. Zaorska i wsp. [210] poszukiwali przyczyn tych zmian na poziomie DNA. Niestety nie wykazano obecności sprawczych mutacji oraz polimorfizmów w genach *SOCS1*, *SOCS3* i *SOCS5*, co sugeruje, że wzrost ich ekspresji powiązany jest z innymi mechanizmami. W tej sytuacji trudno ocenić ich wartość jako biomarkerów steroidooporności. Jafar i wsp. [81] badali polimorfizmy w genach kodujących cytokiny wychodząc z założenia, że mogą one wpływać na podatność lub kliniczny przebieg IZN. Zaobserwowali silny związek dla wszystkich badanych polimorfizmów genów: IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  z IZN u dzieci z IZN w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te sugerują, że badane zmiany mogą wpływać na podatność zachorowania na IZN oraz odpowiedź na steroidy. Cheong i wsp. [25] analizowali również rolę białka kodowanego przez gen *GLCCII*. Białko to ulega ekspresji w podocytach i komórkach mezangium. Jego funkcja nie jest do końca poznana, ale brak białka powiązano z uszkodzeniami bariery filtracyjnej, zaś fakt, że ekspresja tego genu indukowana jest przez GKS, sugeruje, że może być on wczesnym markerem apoptozy

indukowanej przez GKS. Wykazano brak związku SNP genu *GLCCII* oraz odpowiedzią na GKS pacjentów z ZN w populacji koreańskiej. Odmienne polimorfizmy w genie *GLCCII* powiązane ze spadkiem odpowiedzi na inhalowane GKS u pacjentów z astmą [183], jak również mniej wydajną terapią GKS u pacjentów z RZS [151]. Na uwagę zasługuje również przedreceptorowy metabolizm GKS, w którym rolę odgrywają enzymy 11 $\beta$ -HSD I i 11 $\beta$ -HSD II. Enzymy te metabolizują nie tylko nieaktywne endogenne steroidy, jak kortyzon do aktywnego koryzolu, ale również egzogenne steroidy podlegające temu mechanizmowi. Przykładem jest przekształcanie pod wpływem 11 $\beta$ -HSD1 nieaktywnego prednizonu do aktywnego prednizolonu [63]. Spekulować można nad zaburzeniami w równowadze między tymi enzymami, które mogą prowadzić do oporności. Sai i wsp. [164] wykazali wzrost ekspresji 11 $\beta$ -HSD2 u pacjentów z oporną na leczenie sterydami białaczką limfoblastyczną u których zastosowano prednizon. Natomiast w przypadku deksametazonu, jest on słabo inaktywowany, co wskazuje na jego lepsze właściwości terapeutyczne. Ostalska-Nowicka i wsp. [135] wykazali również, że nadmierna ekspresja śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń krwionośnych (VEGF-C) w cytoplazmie podocytów i towarzyszące jej parakrynowe działanie tego czynnika na komórki śródbłonka, może wskazywać na potencjalną rolę tego czynnika w patomechanizmie SOZN u dzieci.

Bazując na powyższych informacjach, można wnioskować, że poszukiwanie podłoża steroidooporności jest bardzo ściśle związane z czynnikami sprawczymi jednostki chorobowej, w której to zjawisko się obserwuje. Badania wskazują na potencjalną rolę regulacji epigenetycznych, takich jak metylacja DNA czy ekspresja miRNA, które mogą odgrywać ważną rolę w indukowaniu steroidooporności wywołanej stresem [88].

Pozyskane wyniki muszą być interpretowane z ostrożnością, bowiem badania asocjacyjne nie są idealnym modelem badawczym. Główny problem w tego typu badaniach dotyczy doboru grup badanych. Próby powinny być pobierane z tych samych grup etnicznych [59]. Nakładanie się populacji prowadzi do wyników fałszywie pozytywnych [109]. Ważne jest również, aby próby od pacjentów oraz osób bez objawów choroby, były pobierane z tego samego obszaru geograficznego lub należy zebrać informację dotyczącą historii rodziny, w celu sprawdzenia podobnej dystrybucji pomiędzy grupą pacjentów a grupą kontrolną [59, 109]. Co w przypadku niniejszych badań w pełni zostało zrealizowane. Dodatkowo pojawiają się problemy interpretacyjne. Powodem niepowtarzalności wyników badań CCS może być fakt, że złożone choroby mogą mieć wiele genów sprawczych wywierających od małych do umiarkowanych efektów. Zdolność wykrycia tego efektu jest niska w pojedynczych badaniach i wówczas stwierdza się niepowtarzalność. Częsta niezgodność wyników podczas próby powielenia badań może również wynikać ze sposobu analizy, w której odrzuca się interpretację wartości  $p$ . Odbywa się to w oparciu o liczbę genów kandydujących czy testowanych SNP, mutacji genetycznych różnicujących częstość i wpływ populacji, z doboru pacjentów opartego na różnych kryteriach klinicznych oraz oddziaływania z czynnikami środowiskowymi, które różnicują populacje [109, 181].



Osiągnięte rezultaty niniejszej rozprawy wskazują, że steroidooporność nadal pozostaje mechanizmem nieznanym i skomplikowanym. Trudno określić pojedyncze czynniki sprawcze, które byłyby zaangażowane w jej etiologię. Dodatkowo z uwagi, że towarzyszy wielu złożonym autoimmunologicznym schorzeniom, w tym IZN, sugeruje się, że nie ma jednoznacznego wzorca jej patomechanizmu. Na tej podstawie konieczne jest poszerzenie warsztatu badawczego o kolejne geny oraz stworzenie sieci zależności między nowymi a już zbadanymi, celem tworzenia baz danych. Zgromadzony zasób informacji pozwoli zapewne w przyszłości poznać złożoność mechanizmu jakim jest steroidooporność.

## WNIOSKI

### Wnioski ogólne:

1. Stwierdzono, iż potencjalną rolę genów kandydujących związanych z odpowiedzią na leczenie steroidami mogą pełnić geny *ABCB1* i *MIF*, czego nie wykazano dla genów *NR3C1* i *HSP90AA1*.
2. Zidentyfikowane zmiany w wytypowanych genach mogą odgrywać rolę predykcyjną lub protekcyjną zarówno w odniesieniu do zjawiska steroidooporności związanego z idiopatycznym zespołem nerczycowym, jak i w odniesieniu do samego zespołu nerczycowego.

### Wnioski szczegółowe:

1. Analiza molekularna pozwoliła na zidentyfikowanie zmian w wytypowanych genach w badanej populacji, w tym siedem polimorfizmów w genie *NR3C1*, dwadzieścia sześć polimorfizmów w genie *ABCB1*, siedem polimorfizmów w genie *HSP90AA1*, osiem polimorfizmów w genie *MIF* oraz pojedyncze mutacje punktowe w rejonach niekodujących genów *HSP90AA1* i *MIF*.
2. W wyniku analizy asocjacyjnej polimorfizmów wyodrębnionych genów w podgrupach pacjentów ze steroidoopornym i steroidowrażliwym zespołem nerczycowym stwierdzono:
  - potencjalną protekcyjną rolę polimorfizmu rs2235033 (T>C) genu *ABCB1* przed ujawnieniem się fenotypu steroidooporności,
  - potencjalny związek polimorfizmów genu *MIF* rs2070767 (C>T) z ujawnieniem się fenotypu steroidooporności (rola predykcyjna) oraz rs2000466 (T>G) i rs34383331 (T>A) z ujawnieniem się fenotypu steroidowrażliwości (rola protekcyjna),
  - potencjalną rolę predykcyjną steroidooporności alleli „niskiej ekspresji” polimorfizmu -794CATT<sub>5-8</sub>,
  - korelację genotypów CATT5/6\_GG polimorfizmów -794CATT<sub>5-8</sub> i rs755622 oraz ich łączony związek z fenotypem steroidooporności,
  - brak związku polimorfizmów genów *NR3C1* i *HSP90AA1* z fenotypem steroidooporności lub steroidowrażliwości.
3. W wyniku analizy asocjacyjnej polimorfizmów wytypowanych genów w grupie pacjentów z idiopatycznym zespołem nerczycowym i grupie kontrolnej odnotowano:

- 
- potencjalny związek polimorfizmów genu *ABCB1* Ser400Asn i rs2235033 (T>C) ze zmniejszonym ryzykiem oraz rs10276036 (G>A) i Gly412Gly ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na idiopatyczny zespół nerczycowy
  - potencjalną rolę protekcyjną polimorfizmu rs2298877 (A>G) genu *HSP90AA1* przed ujawnieniem się idiopatycznego zespołu nerczycowego,
  - brak związku polimorfizmów genu *NR3C1* i *MIF* z idiopatycznym zespołem nerczycowym.
4. W analizie nierównowagi sprzężeń zaobserwowano silne sprzężenia między polimorfizmami:
- Glu22Glu i Arg23Lys genu *NR3C1*,
  - rs2235048, rs1045642, rs2032583, rs2235040, rs2235046, rs2235013, rs1128503, rs2235035, rs1922240, rs2235033, rs10276036, rs10276036, rs2032582 genu *ABCB1*,
  - rs2298877, rs3742429 i Asn460Asn genu *HSP90AA1*,
  - rs2096525, rs2070766, rs2000466, rs34383331 oraz -794CATT<sub>5-8</sub> i rs755622 genu *MIF*.
5. Analiza asocjacyjna haplotypów wytypowanych genów w badanej populacji dzieci ze steroidoopornym i steroidowrażliwym zespołem nerczycowym wykazała:
- potencjalny związek haplotypu TTG (rs2032582\_rs2235033\_rs1045642) genu *ABCB1* z fenotypem steroidooporności (rola predykcyjna),
  - brak związku haplotypów genów *NR3C1*, *HSP90AA1* oraz *MIF* z fenotypem steroidooporności lub steroidowrażliwości.
6. Analiza asocjacyjna haplotypów wytypowanych genów *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* oraz *MIF* w całej badanej grupie dzieci z idiopatycznym zespołem nerczycowym i grupie kontrolnej nie wykazała związku żadnego z nich z idiopatycznym zespołem nerczycowym.
7. Analiza nierównowagi sprzężeń wszystkich zidentyfikowanych polimorfizmów i ich haplotypów łącznie w obrębie genów *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF* nie wykazała korelacji między nimi w badanej populacji.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aeberli D, Leech M, Morand EF: Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. *Rheumatology*, 2006, 45(8): 937-943.
2. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM: P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, 2003; 22(47): 7468-7485.
3. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M i wsp.: MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*, 2001, 11(3): 217-221.
4. Archanioti P, Gazouli M, Theodoropoulos G, Vaiopoulou A i wsp.: Micro-RNAs as regulators and possible diagnostic bio-markers in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*, 2011, 5: 520-524.
5. Bai Y, Liu W, Guo Q, Zou Y: Screening for urinary biomarkers of steroid-resistant nephrotic syndrome in children. *Exp Ther Med*, 2013, 5(3): 860-864.
6. Barnes PJ: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci*, 1998; 94(6): 557-572.
7. Barnes PJ, Adcock M: How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med*, 2003; 139: 359-370.
8. Barnes PJ: How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol*, 2006; 148(3): 245-254.
9. Barnes PJ, Adcock IM: Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*, 2009; 373: 1905-1917.
10. Barnes PJ: Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010; 120(2-3): 76-85.
11. Baugh JA, Chitnis S, Donnelly SC, Monteiro J i wsp.: A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun*, 2002; 3: 170-176.
12. Berdeli A, Mir S, Ozkayin N, Serdaroglu E i wsp.: Association of macrophage migration inhibitory factor -173C allele polymorphism with steroid resistance in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20(11): 1566-1571.
13. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, Alfonso T i wsp.: Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared to non-severe asthma. *Thorax*, 2008; 63(9): 784-790.
14. Bonyadi MJ, Gerami SM, Somi MH, Khoshbaten M: Effect of the C3435T polymorphism of the multidrug resistance 1 gene on the severity of inflammatory bowel disease in Iranian Azeri Turks. *Saudi J Gastroenterol*, 2013, 19(4): 172-176.
15. Brinkmann U, Eichelbaum M: Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J*, 2001, 1(1): 59-64.
16. Bucala R: Approaching the immunophysiology of steroid resistance. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(3): 118.
17. Bucala R: MIF, *MIF* Alleles, and the Regulation of the Host Response. W: Bucala R (red.), *The MIF Handbook* (s. 3-22). Singapore 2012. Wydawnictwo: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
18. Bucala R: MIF, *MIF* alleles, and prospects for therapeutic intervention in autoimmunity. *J Clin Immunol*, 2013, 33(1): 72-78.
19. Bush WS, Moore JH: Chapter 11: Genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol*, 2012; 8(12): 1-11.
20. Butler C, McQuaid S, Taggart CC, Weldon S i wsp.: Glucocorticoid receptor  $\beta$  and histone deacetylase 1 and 2 expression in the airways of severe asthma. *Thorax*, 2012; 67(5): 392-398.
21. Calandra T, Roger T: Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3(10): 791-800.

22. Charmandari E, Kino T, Chrousos GP: Primary generalized familial and sporadic glucocorticoid resistance (Chrousos syndrome) and hypersensitivity. *Endocr Dev*, 2013; 24:67-85.
23. Chen W, Dang T, Blind RD, Wang Z i wsp. Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Differentially Affects Target Gene Expression. *Mol Endocrinol*, 2008; 22(8): 1754-1766.
24. Chen HL, Li LR: Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(12): 3065-3075.
25. Cheong HI, Kang HG, Schlondorff J: GLCCI1 single nucleotide polymorphisms in pediatric nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27(9): 1595-1599.
26. Chikanza IC: Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor  $\beta$  isoform. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 966: 39-48.
27. Chiou YH, Wang LY, Wang TH, Huang SP: Genetic polymorphisms influence the steroid treatment of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27(9): 1511-1517.
28. Choi HJ, Cho HY, Ro H, Lee SH i wsp.: Polymorphisms of the MDR1 and MIF genes in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26(11): 1981-1988.
29. Cizmarikova M, Podracka L, Klimcakova L, Habalova V i wsp.: MDR1 polymorphisms and idiopathic nephrotic syndrome in Slovak children: preliminary results. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 59-68.
30. Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR i wsp.: Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc*, 2011; 6(2): 121-133.
31. Colvin M: Alkylating Agents. W: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC i wsp. (red.), *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition*. Hamilton (ON) 2003: BC Decker.
32. Cruz-Topete D, Cidlowski JA: One hormone, two action: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*, 2015; 22: 20-32.
33. Cucchiara S, Latiano A, Palmieri O, Canani RB i wsp.: Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha but not MDR1 influence response to medical therapy in pediatric-onset inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2007; 44: 171-179.
34. Cvetkovic I, Stosic-Grujicic S: Neutralization of macrophage migration inhibitory factor-novel approach for the treatment of immunoinflammatory disorders. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(10): 1527-1534.
35. Davin JC, Rutjes NW: Nephrotic Syndrome in Children: From Bench to Treatment. *Int J Nephrol*, 2011, 2011:372304. doi: 10.4061/2011/372304.
36. De Bosscher K, Haegeman G: Minireview: Latest Perspectives on Antiinflammatory Actions of Glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 2009; 23(3): 281-291.
37. De Iudicibus S, Franca R, Martelossi S, Ventura A i wsp: Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2011; 17(9): 1095-1108.
38. De Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E: Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: About receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res*, 2009; 1293: 129-141.
39. De la Cruz-Mosso U, Bucala R, Palafox-Sánchez CA, Parra-Rojas i wsp.: Macrophage migration inhibitory factor: association of -794 CATT5-8 and -173 G>C polymorphisms with TNF- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*, 2014, 75(5): 433-439.
40. Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA i wsp.: A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 2001; 28(11): 2383-2388.
41. Desmet SJ, Beck I, Bougarne N, Clarisse D i wsp.: The increasing complexity of glucocorticoid receptor signaling and regulation. *P Belg Roy Acad Med*, 2014, 3: 33-52.
42. Donner KM, Hiltunen TP, Jänne OA, Sane T i wsp.: Generalized glucocorticoid resistance caused by a novel two-nucleotide deletion in the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. *Eur J Endocrinol*, 2012, 168(1): K9-K18.

43. Drozdziak M, Rudas T, Pawlik A, Kurzawski M i wsp.: The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006, 62(11): 933-937.
44. Eddy AA, Symons JM: Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*, 2003; 362(9384):629-639.
45. El Bakkali L, Pereira RR, Kuik DJ, Ket JCF, Wijk JAE: Nephrotic syndrome in The Netherlands: a population-based cohort study and a review of the literature. *Pediatr Nephrol*, 2011; 26(8): 1241-1246.
46. Farrell RJ, Menconi MJ, Keates AC, Kelly CP: P-glycoprotein-170 inhibition significantly reduces cortisol and ciclosporin efflux from human intestinal epithelial cells and T lymphocytes. *Alliment Pharmacol Ther*, 2002; 16(5): 1021-1031.
47. Farrell RJ, Kelleher D: Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J Endocrinol*, 2003, 178(3): 339-346.
48. Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R: The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol*, 2007, 21(6): 1267-1280.
49. Fujishima S, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M: The relationship between the expression of the glucocorticoid receptor in biopsied colonic mucosa and the glucocorticoid responsiveness of ulcerative colitis patients. *Clin Immunol*, 2009, 133(2): 208-217.
50. Funaki S, Takahashi S, Wada N, Murakami H i wsp.: Multiple drug-resistant gene 1 in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int*, 2008, 50(2): 159-1561.
51. Gagliardo R, Chanez P, Vignola AM, Bousquet J i wsp.: Glucocorticoid receptor alpha and beta in glucocorticoid dependent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000; 162(1): 7-13.
52. Galigniana MD, Piwien-Pilipuk G, Assreuy J: Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol Pharmacol*, 1999; 55(2): 317-323.
53. Grad I, Picard D: The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol*: 2007, 275(1-2): 2-12.
54. Grant SF: Pharmacogenetics and pharmacogenomics: tailored drug therapy for the 21<sup>st</sup> century. *Trends Pharmacol Sci*, 2001; 22(1): 3-4.
55. Grenda R, Jarmoliński T: Wrodzone choroby kłębuszków nerkowych. W: Książek A, Rutkowski B (red.), *Nefrologia* (s. 522-534). Lublin 2004: Wydawnictwo medyczne CZELEJ.
56. Grenda R, Litwin M: Choroby nerek u dzieci (wybrane zagadnienia). W: Książek A, Rutkowski B (red.), *Nefrologia* (s. 569-593). Lublin 2004: Wydawnictwo medyczne CZELEJ.
57. Griga T, Wilkens C, Wirkus N, Epplen i wsp.: A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is involved in the genetic predisposition of Crohn's disease and associated with cumulative steroid doses. *Hepatogastroenterology*, 2007; 54: 784-786.
58. Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA: Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol*, 2009; 300(1-2): 7-16.
59. Grzybowski T, Rogalla U: Podstawy genetyki populacyjnej i wybrane zagadnienia z genetyki ewolucyjnej człowieka. W: Drewna G, Ferenc T (red.), *Genetyka medyczna* (s. 853-881). Wrocław 2011: Wydawnictwo: Elsevier Urban & Partner sp. z o.o.
60. Gubler MC: Nephrotic syndrome: Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Rev Nephrol*, 2011; 7: 430-431.
61. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ, Tsicopoulos A i wsp.: Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999; 159(5 Pt 1): 1600-1604.
62. Han SH, Park SY, Li JJ, Kwak SJ i wsp.: Glomerular glucocorticoid receptor expression is reduced in late responders to steroids in adult-onset minimal change disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(1): 169-175.
63. Hardy RS, Raza K, Cooper MS: Endogenous glucocorticoids in inflammation: contributions of systemic and local responses. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: 13650.
64. Hartman FA, Thorn GW, Lockie ML, Greene CW, Bowen BD: Treatment of Addison's disease with an extract of supra-renal cortex (cortina). *JAMA*, 1932; 98(10): 788-793.

65. Hattersley AT, McCarthy MI: What makes a good genetic association study? *Lancet*, 2005; 366(9493): 1315-1323.
66. Hawkins GA, Lazarus R, Smith RS, Tantisira KG, Meyers DA I wsp.: The glucocorticoid receptor heterocomplex gene STIP1 is associated with improved lung function in asthmatic subjects treated with inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 123: 1376-1383.e7.
67. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF: The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 1949; 24(8): 181-197.
68. Hew M, Bhavsar P, Torrego A, Meah S i wsp.: Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006; 174(2): 134-141.
69. Hirano T, Onda K, Toma T, Miyaoka M i wsp.: MDR1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with ulcerative colitis in relation to glucocorticoid administration. *J Clin Pharmacol*, 2004; 44(5): 481-486.
70. Ho GT, Soranzo N, Nimmo ER, Tenesa A i wsp.: ABCB1/MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colitis: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(5): 797-805.
71. Holt RCL i Webb NJA: Management of nephrotic syndrome in childhood. *Curr Pediatr*, 2002, 12: 551-560.
72. Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S i wsp.: Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2000; 118(5): 859-866.
73. Hori T, Watanabe K, Miyaoka M, Moriyasu F i wsp.: Expression of mRNA for glucocorticoid receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(10): 1070-1077.
74. Horst-Sikorska W: Steroidoterapia – korzyści i zagrożenia. *Przew Lek*, 2008; 1:133-136.
75. Hudson WH, Youn C, Ortlund EA: The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol*, 2013; 20(1):53-58.
76. Ishiguro Y, Ohkawara T, Sakuraba H, Yamagata K i wsp.: Macrophage migration inhibitory factor has a proinflammatory activity via the p38 pathway in glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Clin Immunol*, 2006, 120(3): 335-541.
77. Ito K, Ito M, Elliott WM, Cosio B i wsp.: Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, 2005; 352(19): 1967-1976.
78. Ito K, Chung KF, Adcock IM: Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*, 2006; 117(3): 522-543.
79. Ito K, Getting SJ, Charron CE: Mode of glucocorticoid actions in airway disease. *Scientific World Journal*, 2006; 6: 1750-1769.
80. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B i wsp.: Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med*, 2006; 203(1): 7-13.
81. Jafar T, Agrawal S, Mahdi AA, Sharma RK i wsp.: Cytokine gene polymorphism in idiopathic nephrotic syndrome children. *Indian J Clin Biochem*, 2011, 26(3): 296-302.
82. Jafar T, Prasad N, Agarwal V, Mahdi A i wsp.: MDR-1 gene polymorphisms in steroid-responsive versus steroid-resistant nephrotic syndrome in children. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(12): 3968-3974.
83. Jaroniec M, Ostalska-Nowicka D, Śmiech M, Siwińska A i wsp.: Ocena polimorfizmów pojedynczego nukleotydu zlokalizowanych w bezpośrednim sąsiedztwie poznanych mutacji w genie NPHS2 u dzieci z zespołem nerczycowym. *Nephrol Dial Pol*, 2010, 14(3): 111-115.
84. Jääskeläinen T, Makkonen H, Palvimo JJ: Steroid up-regulation of FKBP51 and its role in hormone signaling. *Curr Opin Pharmacol*, 2011; 11(4): 326-331.
85. Jewell CM, Cidlowski JA: Molecular evidence for a link between the N363S glucocorticoid receptor polymorphism and altered gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(8): 3268-3277.

86. Jeziorowska A: Metody molekularne badania genomu. W: Drewa G, Ferenc T (red.), Genetyka medyczna (s. 701-736). Wrocław 2011: Wydawnictwo: Elsevier Urban & Partner sp. z o.o.
87. Joshi S, Andresen R, Jaspersen B, Rittig S: Genetic of steroid-resistant nephrotic syndrome: a review of mutation spectrum and suggested approach for genetic testing. *Acta Paediatr*, 2013; 102(9): 844-856.
88. Jung SH, Wang Y, Kim T, Tarr A i wsp.: Molecular mechanisms of repeated social defeat-induced glucocorticoid resistance: Role of microRNA. *Brain Behav Immun*, 2015, 44: 195-206.
89. Kang KI, Meng X, Devin-Leclerc J, Bouhouche I i wsp.: The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96; 1439-1444.
90. Keen M: Pharmacogenetics. W: Pongracz J, Keen M (red.), *Medical Biotechnology* (s. 113-124). Edinburg, 2009: Wydawnictwo: Churchill Livingstone Elsevier
91. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK i wsp.: Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 70: 189-199.
92. Kim JY, Cheong HS, Park TJ, Shin HJ i wsp.: Screening for 392 polymorphisms in 141 pharmacogenes. *Biomed Rep*, 2014, 2(4): 463-476.
93. Kirschke E, Goswami D, Southworth D, Griffin PR i wsp.: Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell*, 2014, 157(7): 1685-1697.
94. Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R i wsp.: Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, 2000, 408(6809): 211-216.
95. Kobayakawa T, Yamada S, Mizuno A, Ohara-Nemoto Y i wsp.: Single nucleotide polymorphism that accompanies a missense mutation (Gln488His) impedes the dimerization of Hsp90. *Protein J*, 2009; 28(1): 24-28.
96. Kojika S, Sugita K, Inukai T, Saito M i wsp.: Mechanisms of glucocorticoid resistance in human leukemic cells: implication of abnormal 90 and 70 kDa heat shock proteins. *Leukemia*, 1996; 10: 994-999.
97. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA i wsp.: Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet*, 1997, 99(5): 663-668.
98. Koper JW, van Rossum EF, van den Akker EL: Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids*, 2014, 92: 62-73.
99. Kozaci DL, Chernajovscy Y, Chikanza IC: The differential expression of corticosteroid-resistant and -sensitive patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2007; 46(4): 579-585.
100. Krishnan RG: Nephrotic syndrome. *Paediatr and Child Health*, 2012; 22(8): 337-340.
101. Lan HY: Role of macrophage migration inhibition factor in kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*, 2008, 109(3): 79-83.
102. Lane JC, Kaskel FJ: Pediatric Nephrotic Syndrome From the Simple to the Complex. *Semin Nephrol*, 2009; 29(4): 389-398.
103. Lauten M, Cario G, Asgedom G, Welte K, Schrappe M: Protein expression of the glucocorticoid receptor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2003; 88: 1253-1258.
104. Ledderose C, Möhnle P, Limbeck E, Schütz S i wsp.: Corticosteroid resistance in sepsis is influenced by microRNA-124--induced downregulation of glucocorticoid receptor- $\alpha$ . *Crit Care Med*, 2012, 40(10): 2745-2753.
105. Lennon R, Watson L, Webb NJA: Nephrotic syndrome in children. *Paediatr and Child Health*, 2009; 20(1): 36-42.
106. Lettre G, Lange C, Hirschhorn JN: Genetic Model Testing and Statistical Power in Population-Based Association Studies of Quantitative Traits. *Genet Epidemiol*, 2007; 31(4): 358-362.
107. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ i wsp.: Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med.*, 1997, 186(9): 1567-1574.
108. Leung DY, Bloom JW: Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111(1): 3-22.



109. Lewis CM: Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform*, 2002; 3(2): 146-153.
110. Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB i wsp.: Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol*, 2007; 27: 2266-2282.
111. Lin FY, Chen YH, Lin YW, Tsai JS i wsp.: The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26: 2622-2629.
112. Llamas-Covarrubias MA, Valle Y, Bucala R, Navarro-Hernández RE i wsp.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF): genetic evidence for participation in early onset and early stage rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2013, 61(3): 759-765.
113. Lu NZ, Cidlowski JA: Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol*, 2006; 16(6): 301-307.
114. Lu PH, Wei MX, Yang J, Liu X i wsp.: Association between two polymorphisms of ABCB1 and breast cancer risk in the current studies: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125(2): 537-543.
115. Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T i wsp.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect*, 2002, 4(4): 449-460.
116. Lunetta KL: Genetic association studies. *Circulation*, 2008; 118(1): 96-101.
117. MacLean MJ, Llordella MM, Bot N, Picard D: A yeast-based assay reveals a functional defect of the Q488H polymorphism in human Hsp90alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 133-137.
118. Maltese P, Canestrari E, Palma L, Ruzzo A i wsp.: High resolution melting (HRM) analysis for the detection of ER22/23EK, BclI, and N363S polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 113(3-5): 269-274.
119. Maltese P, Palma L, Sfara C, de Rocco P i wsp.: Glucocorticoid resistance in Crohn's disease and ulcerative colitis: an association study investigating GR and FKBP5 gene polymorphisms. *Pharmacogenomics J*, 2012, 12(5): 432-438.
120. Manenshijn L, van den Akker EL, Lamberts SW, van Rossum EF: Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1179: 179-198.
121. Matysiak M, Makosa B, Walczak A, Selmaj K: Patients with multiple sclerosis resisted to glucocorticoid therapy: abnormal expression of heat-shock protein 90 in glucocorticoid receptor complex. *Mult Scler*, 2008, 14(7): 919-926.
122. Mehls O, Hoyer PF: Dosing of glucocorticosteroids in nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26(12): 2095-2098.
123. Metz DK, Kausman JY: Childhood nephrotic syndrome in the 21st century: What's new? *J Paediatr Child Health*, 2014, doi: 10.1111/jpc.12734.
124. Miller AL, Webb MS, Copik AJ, Wang Y i wsp.: p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol*, 2005; 19(6): 1569-1583.
125. Morales-Zambrano R, Bautista-Herrera LA, De la Cruz-Mosso U, Villanueva-Quintero GD i wsp.: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promoter polymorphisms (-794 CATT5-8 and -173 G>C): association with MIF and TNF $\alpha$  in psoriatic arthritis. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(9): 2605-2614.
126. Morand EF, Leech M, Bernhagen J: MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5(5): 399-410.
127. Morand EF: Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 2007, 19(3): 302-307.
128. Mwinyi J, Wenger C, Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA: Glucocorticoid receptor gene haplotype structure and steroid therapy outcome in IBD patients. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(31): 3888-3896.

129. Myśliwiec M: Rola nerek w farmakoterapii. W: Książek A, Rutkowski B (red.), *Nefrologia* (s. 673-686). Lublin 2004: Wydawnictwo medyczne CZELEJ.
130. Nickavar A, Harahdashti AL.: Trends in Steroid Response Among Children With Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Iran J Kidney Dis*, 2014; 8(5): 389-393.
131. Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP: The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids*, 2010; 75(1): 1-12.
132. Oakley RH, Webster JC, Sar M, Parker CR Jr, Cidlowski JA: Expression and Subcellular Distribution of the  $\beta$ -Isoform of the Human Glucocorticoid Receptor. *Endocrinology*, 1997; 138(11): 5028-5038.
133. Oremus M, Zeidler J, Ensom M, Matsuda-Abedini M i wsp.: Utility of Monitoring Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplant Patients. Evidence Reports/Technology Assessments, No. 164. *AHRQ*, 2008; 08-E006.
134. Oorii F, Ashida T, Nomura M i wsp.: Quantitative analysis for human glucocorticoid receptor alpha/beta mRNA in IBD. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002; 296(5): 1286-1294.
135. Ostalska-Nowicka D, Zachwieja J, Nowicki M, Konwerska A i wsp.: Prawdopodobne parakrynowe oddziaływanie śródbłonkowego czynnika wzrostu naczyń krwionośnych C na wzrost przepuszczalności bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych w zespole nerczykowym u dzieci. *Przegl Pediatr*, 2006, 36(3): 210-214.
136. Ostalska-Nowicka D, Smiech M, Jaroniec M, Zaorska K i wsp.: SOCS3 and SOCS5 mRNA expressions may predict initial steroid response in nephrotic syndrome children. *Folia Histochem Cytobiol*, 2011, 49(4): 719-728.
137. Ouyang J, Jiang T, Tan M, Cui Y, Li X: Abnormal expression and distribution of heat shock protein 90: potential etiologic immunoendocrine mechanism of glucocorticoid resistance in idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Vaccine Immunol*, 2006;13: 496-500.
138. Ouyang J, Chen P, Jiang T, Chen Y i wsp.: Nuclear HSP90 regulates the glucocorticoid responsiveness of PBMCs in patients with idiopathic nephrotic syndrome. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(3): 334-340.
139. Pamuk F, Cetinkaya BO, Ayas B, Keles GC, Gacar A: Evaluation of gingival alterations in tars medicated with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus: a stereological study. *J Periodont Res*, 2014; doi: 10.1111/jre.12243.
140. Panczyk M, Sałagacka A, Mirowski M: Gen *MDR1* (*ABCB1*) kodujący glikoproteinę P (P-gp) z rodziny transporterów błonowych ABC: znaczenie dla terapii i rozwoju nowotworów. *Post Bioch*, 2007; 53(4): 1-13.
141. Panek M, Pietras T, Antczak A, Górski P i wsp.: The role of functional single nucleotide polymorphisms of the human glucocorticoid receptor gene NR3C1 in Polish patients with bronchial asthma. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 4749-4757.
142. Parente L: The development of synthetic glucocorticoids. W: Goulding NJ, Flower RJ (red.), *Glucocorticoids (Milestones in Drug Therapy)* (s. 35-50). Boston; Berlin 2001: Wydawnictwo: Birkhäuser Basel.
143. Passarino G, Cavalleri GL, Stecconi R, Franceschi C i wsp.: Molecular variation of human HSP90alpha and HSP90beta genes in Caucasians. *Hum Mutat*, 2003, 21(5): 554-555.
144. Pearce JMS: Thomas Addison. *J R Soc Med*, 2004; 97:297-300.
145. Pongracz J: Gene hunting. W: Pongracz J, Keen M (red.), *Medical Biotechnology* (s. 15-30). Edinburg, 2009: Wydawnictwo: Churchill Livingstone Elsevier
146. Pongracz J: Using genetic information. W: Pongracz J, Keen M (red.), *Medical Biotechnology* (s. 31-44). Edinburg, 2009: Wydawnictwo: Churchill Livingstone Elsevier
147. Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M: Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun*, 2004; 5:530-539.
148. Potocnik U, Glavac D, Dean M. Common germline MDR1/ABCB1 functional polymorphisms and haplotypes modify susceptibility to colorectal cancers with high microsatellite instability. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008, 183(1): 28-34.

149. Prasad N, Jaiswal AK, Agarwal V, Yadav B i wsp.: Differential alteration in peripheral T-regulatory and T-effector cells with change in P-glycoprotein expression in Childhood Nephrotic Syndrome: A longitudinal study. *Cytokine*, 2015, 72(2): 190-196.
150. Qian X, Zhu Y, Xu W, Lin Y: Glucocorticoid receptor and heat shock protein 90 in peripheral blood mononuclear cells from asthmatics. *Chin Med J*, 2001;114: 1051-1054.
151. Quax RA, Koper JW, Huisman AM, Weel A i wsp.: Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and in the glucocorticoid-induced transcript 1 gene are associated with disease activity and response to glucocorticoid bridging therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 2015 Feb 28. [Epub ahead of print]
152. Raddatz D, Middel P, Bockemühl M, Benöhr P i wsp.: Glucocorticoid receptor expression in inflammatory bowel disease: evidence for a mucosal down-regulation in steroid-unresponsive ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004, 19(1): 47-61.
153. Renner P, Roger T, Calandra T: Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(7): 513-519.
154. Rhen T, Cidlowski JA: Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*, 2005; 353(16): 1711-23.
155. Roses AD: Genome-based pharmacogenetics and the pharmaceutical industry. *Nat Rev Drug*, 2002; 1(7): 541-549.
156. Rose AJ, Vegiopoulos A, Herzig S: Role of glucocorticoids receptor in metabolism: Insights from genetic manipulations. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010; 122(1-3): 10-20.
157. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M i wsp.: A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res*, 2000; 8: 211-218.
158. Ruiz M, Hedman E, Gåfväls M, Eggertsen G i wsp.: Further characterization of human glucocorticoid receptor mutants, R477H and G679S, associated with primary generalized glucocorticoid resistance. *Scand J Clin Lab Invest*, 2013, 73(3): 203-207.
159. Russcher H, van Rossum EF, de Jong FH, Brinkmann i wsp.: Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Mol Endocrinol*, 2005, 19(7): 1687-1696.
160. Rutkowski B, Chodorowski Z, Rutkowski P: Choroby nerek u ludzi w wieku podeszłym. W: Książek A, Rutkowski B (red.), *Nefrologia* (s. 594-606). Lublin 2004: Wydawnictwo medyczne CZELEJ
161. Rutkowski B, Zdrojewski Z, Lizakowski S: Rozplemowe choroby kłębuszków nerkowych. W: Książek A, Rutkowski B (red.), *Nefrologia* (s. 249-269). Lublin 2004: Wydawnictwo medyczne CZELEJ.
162. Sánchez E, Gómez LM, Lopez-Nevot MA, González-Gay MA i wsp.: Evidence of association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*, 2006, 7(5): 433-436.
163. Sánchez-Niño MD, Sanz AB, Ruiz-Andres O, Poveda J i wsp.: MIF, CD74 and other partners in kidney disease: tales of a promiscuous couple. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013; 24(1): 23-40.
164. Sai S, Nakagawa Y, Yamaguchi R, Suzuki M i wsp.: Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 contributes to glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Res*, 2011, 35(12): 1644-1648.
165. Sasaki S, Nishihira J, Ishibashi T, Yamasaki Y i wsp.: Transgene of MIF induces podocyte injury and progressive mesangial sclerosis in the mouse kidney. *Kidney Int*, 2004, 65(2): 469-481.
166. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K: Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*, 2002; 96(1): 23-43.
167. Scheibel T, Siegmund HI, Jaenicke R, Ganz P i wsp.: The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(4): 1297-1302.
168. Shalaby SA, El Idrissy HM, Safar RA, Hussein ST: Glucocorticoid receptors and the pattern of steroid response in idiopathic nephrotic syndrome. *Arab J Nephrol Transplant*, 2012, 5(1): 13-17.
169. Shen L, Huang F, Ye L, Zhu W i wsp.: Circulating microRNA predicts insensitivity to glucocorticoid therapy in Graves' ophthalmopathy. *Endocrine*, 2015, [Epub ahead of print]

170. Shiroeda H, Tahara T, Nakamura M, Shibata T i wsp.: Association between functional promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene and ulcerative colitis in Japan. *Cytokine*, 2010, 51(2): 173-177.
171. Shukrun R, Vivante A, Pleniceanu O, Vax E i wsp.: A human integrin- $\alpha$ 3 mutation confers major renal developmental defects. *PLoS One*, 2014; 9(3): e90879.
172. Smoak KA, Cidlowski JA: Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev*, 2004; 125(10-11): 697-706.
173. Soti C, Vermes A, Haystead TA, Csermely P: Comparative analysis of the ATP-binding sites of Hsp90 by nucleotide affinity cleavage: a distinct nucleotide specificity of the C-terminal ATP-binding site. *Eur J Biochem*, 2003, 270(11): 2421-2428.
174. Stachowski J, Zanker CB, Runowski D, Zaniew M i wsp.: Resistance to therapy in primary nephrotic syndrome: effect of MDR1 gene activity. *Pol Merkur Lekarski*, 2000, 8(46): 218-221.
175. Straatmann C, Ayoob R, Gbadegesin R, Gibson K i wsp.: Treatment outcome of late steroid-resistant nephrotic syndrome: a study by the Midwest Pediatric Nephrology Consortium. *Pediatr Nephrol*, 2013, 28(8): 1235-1241.
176. Szczepankiewicz A, Leszczyńska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A i wsp.: Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord*, 2011, 134(1-3): 138-144.
177. Szczepankiewicz A, Rybakowski JK, Suwalska A, Hauser J: Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with lithium response in bipolar patients. *Neuro Endocrinol Lett*, 2011;32(4): 545-551.
178. Świerczewska M, Ostalska-Nowicka D, Kempisty B, Nowicki M i wsp.: Molecular basis of mechanisms of steroid resistance in children with nephrotic syndrome. *Acta Biochim Pol*, 2013, 60(3): 339-344.
179. Świerczewska M, Ostalska-Nowicka D, Kempisty B, Szczepankiewicz A i wsp.: Polymorphic variants of MIF gene and prognosis in steroid therapy in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Acta Biochim Pol*, 2014, 61(1): 67-75.
180. Tabassum A, Rajeshwari T, Soni N, Raju DS i wsp.: Structural characterization and mutational assessment of podocin - a novel drug target to nephrotic syndrome - an in silico approach. *Interdiscip Sci*, 2014, 6(1): 32-39.
181. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM: Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*, 2002; 3(5): 391-397.
182. Tago K, Tsukahara F, Naruse M, Yoshioka T i wsp.: Regulation of nuclear retention of glucocorticoid receptor by nuclear Hsp90. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 213(2): 131-138.
183. Tantisira KG, Lasky-Su J, Harada M, Murphy A i wsp.: Genomewide association between GLCCI1 and response to glucocorticoid therapy in asthma. *N Engl J Med*, 2011, 365(13): 1173-1183.
184. Teeninga N, Kist-van Holthe JE, van den Akker EL, Kersten MC i wsp.: Genetic and in vivo determinants of glucocorticoid sensitivity in relation to clinical outcome of childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int*, 2014, 85(6): 1444-1453.
185. Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Brinkhof B i wsp.: Genetic variations in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(16): 6050-6056.
186. Tong X, He J, Liu S, Peng S i wsp.: Macrophage migration inhibitory factor -173G/C gene polymorphism increases the risk of renal disease: a meta-analysis. *Nephrology*, 2015, 20(2): 68-76.
187. Trebble P, Matthews L, Blaikley J, Wayte AW i wsp.: Familial glucocorticoid resistance caused by a novel frameshift glucocorticoid receptor mutation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010; 95(12): E490-499.
188. Tripathi G, Borkar M, Akhter A, Sankhwar SN i wsp.: Association of proinflammatory cytokines with end stage renal disease. *Cytokine*, 2010, 50(3): 278-283.
189. Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Nakano K i wsp.: Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells*, 2004, 9(12): 1265-1273.

190. Tsujimura S, Saito K, Nawata M, Nakayamada S i wsp.: Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2008; 67(3): 380-388.
191. Turner JD, Schote AB, Macedo JA, Pelascini LP i wsp.: Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(11): 1529-1537.
192. Turner JD, Alt SR, Cao L, Vernocchi i wsp.: Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG island, epigenetics and more. *Biochem Pharmacol*, 2010; 80(12): 1860-1868.
193. Türkmen M, Torun Bayram M, Soylu A, Özer E i wsp.: The relationship between renal P-glycoprotein expression and response to steroid therapy in childhood nephrotic syndrome. *Turk J Pediatr*, 2013; 55(3): 260-265.
194. Urban JD, Budinsky RA, Rowlands JC: An Evaluation of Single Nucleotide Polymorphisms in the Human Heat Shock Protein 90 kDa Alpha and Beta Isoforms. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012; 27(2): 268-278.
195. Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ: Deciphering the Phosphorylation “Code” of the Glucocorticoid Receptor *In Vivo*. *J Biol Chem*, 2002; 277(29): 26573-26580.
196. Wang FF, Zhu LA, Zou YQ, Zheng H i wsp.: New insights into the role and mechanism of macrophage migration inhibitory factor in steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(3): R103.
197. Wang X, Xu H: New Insights into Treatment of Nephrotic Syndrome in Children. *Contrib Nephrol*, 2013; 181: 119-130.
198. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Pietruczuk M, Zalewski G: Expression of P-glycoprotein in lymphocytes from children with nephrotic syndrome, depending on their steroid response. *Pediatr Nephrol*, 2006, 21(9): 1274-1280.
199. Wasilewska A, Zalewski G, Chyczewski L, Zoch-Zwierz W: MDR-1 gene polymorphisms and clinical course of steroid-responsive nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol*, 2007, 22(1): 44-51.
200. Wong W, Morris MC, Kara T: Congenital nephrotic syndrome with prolonged renal survival without renal replacement therapy. *Pediatr Nephrol*, 2013; 28: 2313-2321.
201. Wrzeczono U, Zaprutko L: Chemia związków naturalnych. Poznań 2001: Wydawnictwo Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
202. Xu L, Li Y, Sun H, Zhen X i wsp.: Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors. *Drug Discov Today*, 2013, 18(11-12): 592-600.
203. Yan K, Kudo A, Hirano H, Watanabe T i wsp.: Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human Sidney glomerulus. *Kidney Int*, 1999; 56(1): 65-73.
204. Yanlin L, Tao Y, Weiping L, Ming i wsp.: Association of tuberculosis and polymorphisms in the promoter region of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in a Southwestern China Han population. *Cytokine*, 2012, 60(91): 64-67.
205. Ye J, Yu Z, Ding J, Chen Y i wsp.: Genetic variations of the NR3C1 gene in children with sporadic nephrotic syndrome: *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(2): 507-513.
206. Youssef DM, Attia TA, El-Shal AS, Abdelomety FA: Multi-drug resistance-1 gene polymorphisms in nephrotic syndrome: impact on susceptibility and response to steroids. *Gene*, 2013, 530(2): 201-207.
207. Yuang N, Ray DW, Matthews LC: Current concepts in glucocorticoid resistance. *Steroids*, 2012; 77(11): 1041-1049.
208. Zahran AM, Aly SS, Elsayh KI, Badawy A i wsp.: Glucocorticoid receptors expression and histopathological types in children with nephrotic syndrome. *Ren Fail*, 2014, 36(7): 1067-1072.
209. Zalewski G, Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Chyczewski L: Response to prednisone in relation to NR3C1 intron B polymorphisms in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23(7): 1073-1078.
210. Zaorska K, Ostalska-Nowicka D, Kempisty B, Nowicki M i wsp.: Association of SOCS1, SOCS3 and SOCS5 polymorphisms and steroid response in children with idiopathic nephrotic syndrome. *JNRT*, 2014, 6(1): 13-26.

211. Zhao Y, Shen HY, Chen XY, Xiong RP i wsp.: Genetic variations of heat shock protein 84 in mice mediate cellular glucocorticoid response. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 25(4-5): 359-366.
212. Zheng X, Wang D, Hou S, Zhang C i wsp.: Association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with Behçet's disease in a Han Chinese population. *Ophthalmology*, 2012, 119(12): 2514-2518.
213. Zhou J, Cidlowski JA: The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*, 2005; 70(5-7): 407-417.
214. Ziino O, D'Urbano LE, De Benedetti F, Conter V i wsp.: The MIF-173G/C polymorphism does not contribute to prednisone poor response in vivo in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2005, 19(12): 2346-2347.
215. Van Rossum EFC, Lamberts SWJ: Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res*, 2004; 59: 333-357.
216. Van Rossum EFC, Lamberts SWJ: Glucocorticoid resistance syndrome: a diagnostic and therapeutic approach. *Best Pract Res Endocrinol Metab*, 2006; 20(4): 611-626.
217. Van Rossum EFC, Lamberts SWJ (2011): Glucocorticoid Resistance. W: MD Bronstein (red.), *Contemporary Endocrinology: Cushing's Syndrome: Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*. (s. 235-248). Londyn: Springer Science+Business Media, LLC.
218. van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF i wsp.: Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2010;12(4): R159.
219. van Winsen LM, Manenschijn L, van Rossum EF, Crusius JB i wsp. A glucocorticoid receptor gene haplotype (TthIII1/ER22/23EK/9beta) is associated with a more aggressive disease course in multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(6): 2110-2114.
220. Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C: New Insights into the Anti-inflammatory Mechanisms of Glucocorticoid-Receptor-Mediated Transactivation. *Endocrinology*, 2013; 154(3): 993-1007.
221. Vannucchi G, Covelli D, Campi I, Origo D i wsp.: The therapeutic outcome to intravenous steroid therapy for active Graves' orbitopathy is influenced by the time of response but not polymorphisms of the glucocorticoid receptor. *Eur J Endocrinol*, 2013, 170(1): 55-61.
222. Vivarelli M, D'Urbano LE, Stringini G, Ghiggeri GM i wsp.: Association of the macrophage migration inhibitory factor -173\*C allele with childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23(5): 743-748.
223. (brak autorów) A Report of the International Study of Kidney Disease in Children. Primary nephrotic syndrome in children: clinical significance of histopathologic variants of minimal change and of diffuse mesangial hypercellularity. *Kidney Int*, 1981, 20: 765-771.
224. [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)
225. [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)
226. [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

## STRESZCZENIE

Idiopatyczny zespół nerczycowy (IZN) jest najczęściej spotykaną, stanowiącą ponad 90% przypadków, postacią ZN u dzieci pomiędzy 1 a 10 rokiem życia. Podstawą wyboru steroidów w leczeniu IZN, były wstępne hipotezy o roli czynników immunologicznych w patofizjologii choroby. Jednakże pacjenci wykazują różną odpowiedź na leczenie steroidami, co pozwoliło na zróżnicowanie ZN na steroidowrażliwy i steroidooporny.

Celem pracy było poszukiwanie genów kandydujących związanych z odpowiedzią na leczenie steroidami oraz identyfikacja zmian w tych genach w grupie 71 dzieci z IZN w tym 41 steroidoopornych i 30 steroidowrażliwych oraz w grupie 30 dzieci zdrowych. Na drodze analizy asocjacyjnej częstości genotypów i alleli wykrytych polimorfizmów, jak również ich haplotypów w badanych grupach, starano się oszacować ich potencjalny związek z fenotypem steroidooporności lub steroidowrażliwości, jak i z samym IZN.

Wytypowano cztery geny, które zostały poddane analizie genetycznej za pomocą techniki sekwencjonowania metodą Sanger (polimorfizmy typu SNP) oraz elektroforezy kapilarnej (polimorfizm powtórzeń tandemowych CATT, STR). Programy Sequencing Analysis oraz Peak Scanner Software umożliwiły zidentyfikowanie zmian w badanych genach. Całość poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem aplikacji GraphPad Prism, natomiast oszacowanie nierównowagi sprzężeń (LD) przeprowadzono za pomocą programów HaploView, PHASE i EH.

W wyniku genotypowania udało się zidentyfikować: w genie *NR3C1* dziewięć polimorfizmów, w genie *ABCB1* dwadzieścia sześć polimorfizmów, w genie *HSP90AA1* siedem, w genie *MIF* osiem polimorfizmów oraz pojedyncze mutacje punktowe w rejonach niekodujących genów *HSP90AA1* i *MIF*.

W niniejszym badaniu nie wykazano związku zidentyfikowanych polimorfizmów genu *NR3C1* z fenotypem steroidooporności lub steroidowrażliwości, jak i z samym IZN. W przypadku genu *ABCB1* stwierdzono potencjalny wpływ protekcyjny polimorfizmu rs2235033 (T>C) przed ujawnieniem się fenotypu steroidooporności oraz zachorowaniem na IZN w badanej grupie chorych. Związek ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na IZN odnotowano również w przypadku innego polimorfizmu tego genu - Ser400Asn. Odmiennie polimorfizmy rs10276036 (G>A) i Gly412Gly były związane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na IZN. Stwierdzono brak związku polimorfizmów genu *HSP90AA1* z fenotypem steroidooporności lub steroidowrażliwości, natomiast polimorfizm rs2298877 (A>G) tego genu wykazywał tendencję w kierunku roli protekcyjnej przed ujawnieniem się IZN. Odnotowano potencjalną rolę polimorfizmów genu *MIF*: rs2070767 (C>T) - w ujawnieniu się fenotypu steroidooporności oraz rs2000466 (T>G) i rs34383331 (T>A) - w ujawnieniu się fenotypu steroidowrażliwości. Ponadto powiązано allele „niskiej ekspresji” polimorfizmu STR -794CATT<sub>5-8</sub> tego genu ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia ZN opornego na terapię steroidami. Podobny związek uzyskano dla skorelowanych genotypów CATT5/6\_GG polimorfizmów -794CATT<sub>5-8</sub> i rs755622. Brak asocjacji polimorfizmów genu *MIF* z IZN.

W analizie LD odnotowano związek haplotypu TTG (rs2032582\_rs2235033\_rs1045642) genu *ABCB1* z fenotypem steroidooporności w badanej populacji, co sugeruje, że może pełnić rolę markera predykcyjnego odpowiedzi na steroidy. W pozostałych przypadkach nie wykazano istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania poszczególnych bloków haplotypowych między populacją pacjentów steroidoopornych a steroidowrażliwych, jak i całą grupą pacjentów z IZN a grupą kontrolną, w związku z czym nie były one związane ze steroidoopornością, jak i IZN w badanej grupie.

Podsumowując, powyższe dane wskazują, że za potencjalne geny kandydujące odpowiedzi na steroidy można uznać geny *ABCB1* oraz *MIF*.

Z uwagi na złożoność mechanizmu jakim jest zjawisko steroidooporności jak i samego ZN, trudno wskazywać na pojedyncze czynniki sprawcze. Na tej podstawie można jedynie zaznaczyć potencjalną rolę zidentyfikowanych polimorfizmów badanych genów jako czynników predykcyjnych lub protekcyjnych przed ujawnieniem fenotypu steroidooporności u dzieci z IZN. Dodatkowe kwestie, takie jak: liczebność analizowanych grup, trudności w doborze ściśle homogennych podgrup oraz istniejące różnice międzysubpopulacyjne, sugerują zachowanie ostrożności w interpretowaniu wyników.



## ABSTRACT

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is the most common form of NS including approximately 90% of cases in children between 1 and 10 years of age. According to the hypothesis that immunological factors are involved in the pathophysiology of this disease, steroids are typically used in treatment. Due to the fact that patients do not always react positively to steroid therapy, a different response to treatment divides NS into steroid-resistant and steroid-sensitive.

The aim of this study was to find candidate genes involved in response to steroid therapy and identification of changes in these genes. The study group was composed of 71 children with IZN including 41 steroid-resistant and 30 steroid-sensitive and 30 children belonging to the control group. The correlation analysis between the frequency of alleles and genotypes and haplotypes in studied groups were made to assess the potential connection with a steroid-resistant or steroid-sensitive phenotype as well as with the risk of INS.

The four selected genes were genotyped using Sanger sequencing (for single nucleotide polymorphisms, SNPs) and capillary electrophoresis (for short tandem repeats CATT, STR). Identification of changes in genes was assessed by Sequencing Analysis and Peak Scanner softwares. GraphPad Prism was used for statistical analysis, whereas HaploView, PHASE and EH programs for estimating linkage disequilibrium (LD).

As a result of genotyping, nine polymorphisms in *NR3C1* gene, twenty six polymorphisms in *ABCB1* gene, seven polymorphisms in *HSP90AA1* gene and eight polymorphisms in *MIF* gene were detected. Additionally, some single mutations were detected in noncoding regions of *HSP90AA1* and *MIF* genes.

In this study we found no relationships between detected polymorphisms of *NR3C1* gene and a steroid-resistant or steroid-sensitive phenotype as well as with INS. In *ABCB1* gene a potential protective role of polymorphism rs2235033 (T>C) against steroid-resistant phenotype and the risk of INS in studying groups were observed. Polymorphism Ser400Asn also revealed a protective role against INS. On the contrary, two other polymorphisms: rs10276036 (G>A) and Gly412Gly were associated with an increased risk of INS development. No association between polymorphisms of *HSP90AA1* gene and steroid-resistant or steroid-sensitive phenotype was found, whereas another polymorphism of this gene rs2298877 (A>G) revealed a trend toward a protective role against the risk of INS. The relationship between polymorphisms of *MIF* gene was observed: rs2070767 (C>T) with steroid-resistant NS and rs2000466 (T>G) and rs34383331 (T>A) with steroid-sensitive NS. Moreover, "low expression" alleles of STR -794CATT<sub>5-8</sub> polymorphism revealed a correlation with the risk of steroid-resistant NS. A similar effect was observed for linked polymorphisms -794CATT<sub>5-8</sub> and rs755622, for genotypes CATT5/6\_GG. No significant differences were found between polymorphisms in *MIF* gene and the risk of INS.

In LD analysis the relationship between haplotype TTG (rs2032582\_rs2235033\_rs1045642) of *ABCB1* gene and a steroid-resistant phenotype was found.

It suggests its role as a predictor of the result of steroid therapy. In other cases, no significant differences between frequency of haplotypes comparing steroid-resistant vs steroid-sensitive patients and the whole group of patients with INS vs the control group were observed. Therefore, there was no relationship with steroid resistance or susceptibility to INS in the analyzed group.

In summary, the aforesaid results indicate that *ABCB1* and *MIF* genes may play a potential role of candidate genes involved in response to steroid therapy.

Because of complexity of steroid resistance as well as the pathomechanism of INS, it is difficult to indicate an individual causative factor. According to this, it is only possible to reveal a potential predictive or protective role of studied polymorphisms against steroid-resistant phenotype in children with INS. Additional issues, such as: the size of analyzed groups, homogeneity of subgroups and differences within a population should be taken into account. That is why careful consideration always should be the base of obtained data analysis and interpretation.

## SPIS RYCIN

Rycina 1.	Schemat regulacji wydzielania endogennych glikokortykosteroidów przez oś podwzgórze-przysadka-nadnercze.....	8
Rycina 2.	Struktura steroidów: a) schemat budowy steranu – szkielet węglowy, b) ogólny wzór struktury steroidów, gdzie R <sub>1</sub> i R <sub>2</sub> , to zazwyczaj grupy metylowe, natomiast R <sub>3</sub> – łańcuch boczny [201, zmodyfikowane].....	9
Rycina 3.	Struktury chemiczne powszechnie stosowanych syntetycznych glikokortykosteroidów (GKS) [226]. .....	10
Rycina 4.	Uproszczony schemat struktury genu <i>NR3C1</i> . W wyniku alternatywnego splicingu pierwotnego transkryptu powstają dwie izoformy receptora: GR $\alpha$ i GR $\beta$ ; DBD – domena wiążąca DNA, H – region łączący, LBD – C-terminalna domena wiążąca ligand, NTD – N-terminalna domena [131, 178, zmodyfikowane]. .....	12
Rycina 5.	Molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów (GKS): a) – aktywacja i przemieszczanie receptora GR $\alpha$ do jądra, b) wiązanie receptora GR $\alpha$ do sekwencji GRE - aktywacja transkrypcji genów docelowych, c) wiązanie GR $\alpha$ do sekwencji nGRE - hamowaniem transkrypcji genów docelowych [172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście). .....	14
Rycina 6.	Hamowanie transkrypcji genów kodujących czynniki zapalne/prozapalne poprzez oddziaływanie receptora GR $\alpha$ z transkrypcyjnym czynnikiem NF- $\kappa$ B [172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście). .....	15
Rycina 7.	Hamowanie transkrypcji genów kodujących czynniki zapalne/prozapalne poprzez oddziaływanie receptora GR $\alpha$ z transkrypcyjnym czynnikiem AP-1 [172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście). .....	16
Rycina 8.	Destabilizacja mRNA czynników zapalnych/prozapalnych zawierających sekwencję ARE. GKS poprzez receptor GR $\alpha$ , wpływają na kaskadę kinaz MAPK na drodze aktywacji MKP-1, która jest inhibitorem p38 MAPK; MKK3/6 – kinazy 3 i 6 aktywujące p38MAPK, MAPKAPK2 – kinaza białkowa 2 aktywowana kinazami MAP; [10, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście). .....	18
Rycina 9.	Mechanizm działania glikokortykosteroidów (GKS) oraz czynniki zaangażowane w steroidooporność: a) współzawodniczego o wiązanie z GRE pomiędzy GR $\alpha$ i GR $\beta$ , b) modyfikacje potranslacyjne GR $\alpha$ : fosforylacja (P) i defosforylacja, sumoilacja (SUMO), ubikwitynacja (Ub) acetylacja (Ac) i deacetylacja, nitrozylacja (NO), c) rola P-gp, d) rola kinaz MAPK, e) modyfikacje heteromerycznego kompleksu receptora GR, f) działanie acetylaz i deacetylaz, g) wpływ cytokin [10, 172, zmodyfikowane] (szczegółowy opis w tekście). .....	21
Rycina 10.	Uproszczony schemat struktury genu <i>ABCB1</i> oraz model P-glikoproteiny. Region P-glikoproteiny kodowany przez odpowiedni ekson zaznaczono tymi samymi kolorami [2, zmodyfikowane]. .....	23
Rycina 11.	Uproszczony schemat struktury genu <i>HSP90AA</i> oraz kodowane przez niego białko Hsp90 $\alpha$ izoforma 2, składająca się z 732 aminokwasów; MSBD – domena wiążąca substrat, MEEVD – motyw pentapeptydu. ....	24
Rycina 12.	Schemat struktury genu <i>MIF</i> z uwzględnieniem rejonów wiązania czynników transkrypcyjnych w rejonie 5'UTR genu oraz polimorfizmów: (CATT) <sub>5-8</sub> i -173G/C [21, zmodyfikowane]. .....	34
Rycina 13.	Lokalizacja produktów genów uczestniczących w etiologii wrodzonego ZN; 1 – Nefryna, 2 – Podocyna, 3 – Białko związane z CD2, 4 – $\alpha$ aktynina-4, 5 – Kanał wapniowy, 6 – Białko guza Wilms'a, 7 – Fosfolipaza C, epsilon 1, 8 – Odwrotna formina 2, 9 – $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integryny [44, 55, zmodyfikowane]. .....	36

Rycina 14.	Ogólny schemat badań; IZN – idiopatyczny zespół nerczycowy, SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, SO – steroidooporny, SW – steroidowrażliwy, STR – krótkie powtórzenia tandemowe, PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy.....	54
Rycina 15.	Obraz wyniku sekwencjonowania w formie tekstowej (pacjent K101). .....	62
Rycina 16.	Obraz wyniku sekwencjonowania z układem heterozygotycznym (w czerwonym owalu) w postaci pików – elektroforegram (pacjent K101). .....	63
Rycina 17.	Schemat graficznego przedstawienia nierównowagi sprzężeń pomiędzy trzema SNP. Kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ . .....	65
Rycina 18.	Elektroforegram badanego polimorfizmu STR w obecności markera wielkości oraz krzywej wzorcowej – próbka homozygotyczna (pacjent K272). .....	67
Rycina 19.	Elektroforegram badanego polimorfizmu STR w obecności markera wielkości oraz krzywej wzorcowej – próbka heterozygotyczna (pacjent K269). .....	68
Rycina 20.	Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR wybranych pacjentów z SOZN dla genu <i>MIF</i> (produkt 867 pz); M – marker wielkości; K. neg. – kontrola negatywna; 1,5% żel agarozowy. ....	69
Rycina 21.	Rozkład częstości alleli polimorfizmu krótkich powtórzeń tandemowych (STR) rs5844572 (CATT <sub>5,8</sub> ) genu <i>MIF</i> w badanej populacji polskiej. ....	83
Rycina 22.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>NR3C1</i> w badanych grupach pacjentów z SOZN i SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ , biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	88
Rycina 23.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>NR3C1</i> w badanych grupach pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	90
Rycina 24.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>ABCB1</i> w badanych grupach pacjentów z SOZN i SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	94
Rycina 25.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>ABCB1</i> w badanych grupach pacjentów z IZN i grupie kontrolnej wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	98
Rycina 26.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>HSP90AA1</i> w badanych grupach pacjentów z SOZN i SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	102
Rycina 27.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>HSP90AA1</i> w badanych grupach pacjentów z IZN i grupie kontrolnej wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	103
Rycina 28.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>MIF</i> w badanych grupach pacjentów z SOZN oraz SWZN wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	106
Rycina 29.	Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genu <i>MIF</i> w badanych grupach pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej, wyrażonej wartością współczynnika korelacji $r^2$ w procentach (kolor rombu odpowiada wartości $r^2$ wyrażonej w procentach: biały – $r^2=0\%$ , szary – $0\%<r^2<100\%$ , czarny – $r^2=100\%$ ). .....	108

- Rycina 30. Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genów: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF* w badanych grupach pacjentów z SOZN oraz SWZN, wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$ : biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2 = 100\%$ )..... 111
- Rycina 31. Schemat graficzny nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy analizowanymi polimorfizmami SNP genów: *NR3C1*, *ABCB1*, *HSP90AA1* i *MIF* w badanych grupach pacjentów z IZN i grupie kontrolnej, wyrażonej wartością współczynnika korelacji  $r^2$  w procentach (kolor rombu odpowiada wartości  $r^2$  wyrażonej w procentach: biały –  $r^2=0\%$ , szary –  $0\% < r^2 < 100\%$ , czarny –  $r^2 = 100\%$ )..... 112

## SPIS TABEL

Tabela 1.	Potranslacyjne modyfikacje receptora GR $\alpha$ .....	22
Tabela 2.	Typy wrodzonego zespołu nerczycowego w oparciu o defekty genetyczne kluczowych białek bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego [44, 55, 60, 87, 100, 102, 139, 171, 224]. .....	36
Tabela 3.	Zestawienie powszechnie stosowanych niesteroidowych leków [31, 44, 100, 105, 129, 133, 138, 197].....	39
Tabela 4.	Charakterystyka grupy pacjentów z SOZN i SWZN z uwzględnieniem płci, wieku rozpoznania oraz wyniku biopsji.....	44
Tabela 5.	Szczegółowa charakterystyka pacjentów z SOZN.....	45
Tabela 6.	Szczegółowa charakterystyka pacjentów z SWZN.....	47
Tabela 7.	Charakterystyka badanych genów w oparciu o bazy danych NCBI ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> ), Ensembl, SNPper ( <i>CHIP Bioinformatics Tools</i> ).....	55
Tabela 8.	Skład mieszaniny do reakcji PCR.....	57
Tabela 9.	Wykaz sekwencji starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów genu <i>NR3C1</i> .....	Tom II, 12
Tabela 10.	Wykaz sekwencji starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów genu <i>ABCB1</i> .....	Tom II, 12
Tabela 11.	Wykaz sekwencji starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów genu <i>HSP90AA1</i> .....	Tom II, 13
Tabela 12.	Wykaz sekwencji starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów genu <i>MIF</i> .....	Tom II, 13
Tabela 13.	Temperatury (T <sub>m</sub> ) i czasy przyłączania starterów oraz liczba cykli reakcji PCR dla genu <i>NR3C1</i> .....	Tom II, 14
Tabela 14.	Temperatury (T <sub>m</sub> ) i czasy przyłączania starterów oraz liczba cykli reakcji PCR dla genu <i>ABCB1</i> .....	Tom II, 14
Tabela 15.	Temperatury (T <sub>m</sub> ) i czasy przyłączania starterów oraz liczba cykli reakcji PCR dla genu <i>HSP90AA1</i> .....	Tom II, 15
Tabela 16.	Temperatury (T <sub>m</sub> ) i czasy przyłączania starterów oraz liczba cykli reakcji PCR dla genu <i>MIF</i> .....	Tom II, 15
Tabela 17.	Ogólny wzór profilu termicznego reakcji PCR dla badanych genów, różnice dotyczyły temperatur oraz czasu przyłączania starterów; x <sup>o</sup> C - temperatura przyłączania startera, y sek - czas przyłączania startera.....	58
Tabela 18.	Skład mieszaniny nakładanej na żel agarozowy dla markera wielkości oraz próby badanej.....	58
Tabela 19.	Stężenia poszczególnych fragmentów genów zastosowane w reakcji sekwencjonowania dla genów <i>NR3C1</i> i <i>ABCB1</i> .....	Tom II, 16
Tabela 20.	Stężenia poszczególnych fragmentów genów zastosowane w reakcji sekwencjonowania dla genów <i>HSP90AA1</i> i <i>MIF</i> .....	Tom II, 16
Tabela 21.	Sekwencje starterów zastosowane do reakcji sekwencjonowania dla genów <i>NR3C1</i> , <i>ABCB1</i> , <i>HSP90AA1</i> oraz <i>MIF</i> .....	Tom II, 17
Tabela 22.	Skład mieszaniny do reakcji sekwencjonowania.....	60
Tabela 23.	Ogólny wzór profilu termicznego reakcji sekwencjonowania.....	61
Tabela 24.	Sekwencje starterów zastosowane do identyfikacji polimorfizmu STR genu <i>MIF</i> oraz długość amplifikowanego fragmentu.....	66
Tabela 25.	Profil termiczny reakcji PCR.....	66
Tabela 26.	Mutacje zidentyfikowane w genach <i>HSP90AA1</i> oraz <i>MIF</i> .....	70

- Tabela 27. Charakterystyka polimorfizmów zidentyfikowanych w genie *NR3C1*. ..... Tom II, 19
- Tabela 28. Charakterystyka polimorfizmów zidentyfikowanych w genie *ABCBI*. ..... Tom II, 20
- Tabela 29. Charakterystyka polimorfizmów zidentyfikowanych w genie *HSP90AA1*. ..... Tom II, 21
- Tabela 30. Charakterystyka polimorfizmów zidentyfikowanych w genie *MIF*. ..... Tom II, 22
- Tabela 31. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs72555801, rs6189/rs6190, rs72542742 genu *NR3C1* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 23
- Tabela 32. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs6195, rs6196, rs6191 genu *NR3C1* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 24
- Tabela 33. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs10482714 i rs6198 genu *NR3C1* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 25
- Tabela 34. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs2214102, rs9282564, rs2235074 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 26
- Tabela 35. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs2235015, rs2235023, rs1922240 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 27
- Tabela 36. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs10276036, rs2229109, rs1128503 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 28
- Tabela 37. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs2032588, rs2235033, rs2235035 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 29
- Tabela 38. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs2235013, rs28381916, rs191864178 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 30
- Tabela 39. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs2235046, rs1922242, rs2235040 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 31
- Tabela 40. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs9282563, rs2032582, rs2032583 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 32
- Tabela 41. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs61040122, rs1045642, rs2235047 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 33
- Tabela 42. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs2235048 i rs17064 genu *ABCBI* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 34
- Tabela 43. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs4586364, rs4947 oraz rs3742429 genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 35
- Tabela 44. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs7155973, rs34644998 oraz rs6575895 genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. . Tom II, 36
- Tabela 45. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu rs2298877 genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną. .... Tom II, 37

Tabela 46.	Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs755622, rs112568463, rs2096525 genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.....	Tom II, 38
Tabela 47.	Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmów: rs2070766, rs2070767, rs2000466 genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.....	Tom II, 39
Tabela 48.	Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu: rs34383331 genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.....	Tom II, 40
Tabela 49.	Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli polimorfizmu rs5844572 (CATT <sub>5-8</sub> ) genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.....	84
Tabela 50.	Porównanie rozkładu liczebności i częstości tzw. „genotypów wysokiej i niskiej ekspresji” polimorfizmu rs5844572 (CATT <sub>5-8</sub> ) genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów ze SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.....	85
Tabela 51.	Porównanie korelacji rozkładu liczebności i częstości genotypów polimorfizmów: rs5844572 (CATT <sub>5-8</sub> ) i rs755622G>C genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN z grupą pacjentów z SWZN oraz w całej grupie pacjentów z IZN z grupą kontrolną.....	86
Tabela 52.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>NR3C1</i> w grupach pacjentów z SOZN i SWZN.....	87
Tabela 53.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>NR3C1</i> w grupach SOZN i SWZN.....	88
Tabela 54.	Polimorfizmy SNP genu <i>NR3C1</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN.....	88
Tabela 55.	Test permutacji dla polimorfizmów rs6190, rs6189 oraz rs10482714 genu <i>NR3C1</i> badanych w grupach SOZN i SWZN.....	89
Tabela 56.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>NR3C1</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.....	89
Tabela 57.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>NR3C1</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.....	90
Tabela 58.	Polimorfizmy SNP genu <i>NR3C1</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.....	90
Tabela 59.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> w grupach pacjentów z SOZN i SWZN.....	91
Tabela 60.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> w grupach SOZN i SWZN.....	92
Tabela 61.	Polimorfizmy SNP genu <i>ABCB1</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN.....	93
Tabela 62.	Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu <i>ABCB1</i> w grupie pacjentów ze SOZN i SWZN.....	95
Tabela 63.	Test permutacji dla polimorfizmu: rs2235033 oraz haplotypów bloku 3: AGATCCAG i AGATTCAG genu <i>ABCB1</i> badanych w grupie pacjentów z SOZN i SWZN.....	95
Tabela 64.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> w grupach pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej.....	96
Tabela 65.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>ABCB1</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.....	96
Tabela 66.	Polimorfizmy SNP genu <i>ABCB1</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej.....	96



Tabela 67.	Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu <i>ABCB1</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	99
Tabela 68.	Rozkład liczby i częstości wygenerowanych haplotypów polimorfizmów: rs2032582, rs2235033, rs1045642 genu <i>ABCB1</i> w grupie pacjentów z SOZN oraz SWZN. ....	100
Tabela 69.	Rozkład liczby i częstości wygenerowanych haplotypów polimorfizmów: rs2032582, rs2235033, rs1045642 genu <i>ABCB1</i> w grupie pacjentów z IZN oraz grupie kontrolnej. ....	100
Tabela 70.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>HSP90AA1</i> w grupach pacjentów z SOZN i SWZN. ....	101
Tabela 71.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>HSP90AA1</i> w grupach SOZN i SWZN. ....	101
Tabela 72.	Polimorfizmy SNP genu <i>HSP90AA1</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN. ....	101
Tabela 73.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>HSP90AA1</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	102
Tabela 74.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>HSP90AA1</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	103
Tabela 75.	Polimorfizmy SNP genu <i>HSP90AA1</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	103
Tabela 76.	Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu <i>HSP90AA1</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	104
Tabela 77.	Test permutacji dla polimorfizmów: rs2298877, rs3742429, rs4947 oraz haplotypu bloku 2: CC genu <i>HSP90AA1</i> badanych w grupie z IZN i grupie kontrolnej. ....	104
Tabela 78.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>MIF</i> w grupach pacjentów z SOZN i SWZN. ....	105
Tabela 79.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>MIF</i> w grupach SOZN i SWZN. ....	105
Tabela 80.	Polimorfizmy SNP genu <i>MIF</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z SOZN i SWZN. ....	106
Tabela 81.	Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN i SWZN. ....	106
Tabela 82.	Test permutacji dla polimorfizmów: rs112568463, rs2000466 oraz rs34383331 oraz haplotypów bloku 2: GA i TT genu <i>MIF</i> badanych w grupie pacjentów z SOZN oraz SWZN. ....	107
Tabela 83.	Charakterystyka analizowanych polimorfizmów genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	107
Tabela 84.	Analiza asocjacji badanych polimorfizmów genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	107
Tabela 85.	Polimorfizmy SNP genu <i>MIF</i> wykazujące najsilniejsze sprzężenie w badanej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	108
Tabela 86.	Charakterystyka wygenerowanych haplotypów genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	109
Tabela 87.	Rozkład liczby i częstości wygenerowanych haplotypów polimorfizmów: rs755622 (-173G/C) i rs5844572 (-794CATT) genu <i>MIF</i> w grupie pacjentów z SOZN i SWZN oraz całej grupie pacjentów z IZN i grupie kontrolnej. ....	109

## SPIS ZAŁĄCZNIKÓW – opracowanie stanowi TOM II.

- Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej na prowadzenie badań.
- Załącznik 2. Informacja dla rodziców/opiekunów pacjenta dotycząca badań genetycznych.
- Załącznik 3. Ankieta dla pacjentów z Idiopatycznym Zespołem Nerczycowym.
- Załącznik 4. Ankieta dla grupy kontrolnej.
- Załącznik 5. Wykaz starterów oraz długości amplifikowanych fragmentów badanych genów.
- Załącznik 6. Temperatury  $T_m$  i czasy przyłączania starterów oraz liczba cykli reakcji PCR dla badanych genów.
- Załącznik 7. Stężenia poszczególnych fragmentów genów zastosowane w reakcji sekwencjonowania dla badanych genów.
- Załącznik 8. Sekwencje starterów zastosowane do reakcji sekwencjonowania dla badanych genów.
- Załącznik 9. Ocena ilości i jakości materiału DNA pozyskanego w badanych grupach pacjentów i grupie kontrolnej.
- Załącznik 10. Charakterystyka polimorfizmów zidentyfikowanych w badanych genach.
- Załącznik 11. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *NR3C1* w grupie pacjentów z SOZN.
- Załącznik 12. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *NR3C1* w grupie pacjentów z SWZN.
- Załącznik 13. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *NR3C1* w grupie kontrolnej.
- Załącznik 14. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *ABCB1* w grupie pacjentów z SOZN.
- Załącznik 15. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *ABCB1* w grupie pacjentów z SWZN.
- Załącznik 16. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *ABCB1* w grupie kontrolnej.
- Załącznik 17. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z SOZN.
- Załącznik 18. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *HSP90AA1* w grupie pacjentów z SWZN.
- Załącznik 19. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *HSP90AA1* w grupie kontrolnej.
- Załącznik 20. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *MIF* w grupie pacjentów z SOZN.
- Załącznik 21. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *MIF* w grupie pacjentów z SWZN.
- Załącznik 22. Wykaz genotypów dla zróżnicowanych polimorfizmów genu *MIF* w grupie kontrolnej.

- Załącznik 23. Weryfikacja zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu  $\chi^2$  w badanych populacjach dla polimorfizmów biallelicznych SNP genu *NR3C1*.
- Załącznik 24. Weryfikacja zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu  $\chi^2$  w badanych populacjach dla polimorfizmów biallelicznych SNP genu *ABCBI*.
- Załącznik 25. Weryfikacja zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu  $\chi^2$  w badanych populacjach dla polimorfizmów biallelicznych SNP genu *HSP90AA1*.
- Załącznik 26. Weryfikacja zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu  $\chi^2$  w badanych populacjach dla polimorfizmów biallelicznych SNP genu *MIF*.
- Załącznik 27. Weryfikacja zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu  $\chi^2$  w badanych populacjach dla polimorfizmu STR (rs5844572) genu *MIF*.
- Załącznik 28. Weryfikacja zgodności z prawem Hardy'ego-Weinberga za pomocą testu  $\chi^2$  w badanych populacjach dla polimorfizmu triallelicznego SNP (rs2032582) genu *ABCBI*.
- Załącznik 29. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *NR3C1*.
- Załącznik 30. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *ABCBI*.
- Załącznik 31. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *HSP90AA1*.
- Załącznik 32. Porównanie rozkładu liczebności i częstości genotypów oraz alleli zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *MIF*.
- Załącznik 33. Haplotypy oraz ich częstości oczekiwane i oszacowane dla polimorfizmów: rs2235033, rs1045642, rs2032582 wygenerowane przez program EH w badanych grupach pacjentów i grupie kontrolnej.