Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Małgorzata Cichy

POLIMORFIZMY GENETYCZNE RECEPTORA β_2-ADRENERGICZNEGO A REGULACJA CZYNNOŚCI UKŁADU ODDECHOWEGO U CHORYCH NA ASTMĘ OSKRZELOWĄ I ALERGICZNY NIEŻYT NOSA

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor: Prof. dr hab. med. Teresa Adamek-Guzik
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi CMUJ

Kraków, 2005

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP 4
I.1. Epidemiologia astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa 7
I.2. Patomechanizm reakcji zapalnych w astmie oskrzelowej i alergicznym nieżycie nosa 8
I.3. Związek między występowaniem atopii, astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa 11
I.4. Podłoże genetyczne atopii i astmy oskrzelowej 12
I.5. Rola receptora β_2-adrenergicznego w astmie oskrzelowej i alergicznym nieżycie nosa 17
I.5.1. Mechanizm aktywacji i regulacja receptora β_2-adrenergicznego 19
I.5.2. Agoniści receptora β_2-adrenergicznego 21
I.6. Budowa genu dla receptora β_2-adrenergicznego i jego polimorfizmy 23
I.6.1. Związki polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego z astmą oskrzelową i alergicznym nieżytem nosa 24
I.7. Podsumowanie 27
II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY 28
III. MATERIAŁ I METODYKA 29
III.1. Grupa chorych i grupa kontrolna 29
III.2. Protokół badania 30
III.3. Testy skórne 31
III.4. Badanie czynności układu oddechowego 32
III.5. Pomiar całkowitego stężenia IgE w surowicy 33
III.6. Badanie polimorfizmów genetycznych receptora β_2-adrenergicznego 33
III.6.1 Izolacja DNA z krwi obwodowej badanych osób 33
III.6.2. Amplifikacja fragmentu DNA 33
III.6.3. Trawienie przy pomocy enzymów restrykcyjnych 34
III.6.4. Elektroforeza produktów trawienia 35
III.7. Opracowanie statystyczne wyników 38

IV. WYNIKI 39
IV.1. Charakterystyka badanych 39
IV.2. Rozkłady genotypowe i alleliczne polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego 43
IV.2.1. Analiza sprzężeń i interakcji polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu 46
IV.2.2. Analiza częstości występowania diplotypów w badanych grupach 47
IV.3. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego z czynnością układu oddechowego 49
IV.3.1. Porównanie wyników badań czynnościowych układu oddechowego w zależności od występowania allelu 51
IV.3.2. Porównanie wyników badań czynnościowych układu oddechowego w zależności od diplotypu 71
IV.3.3. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu z reakcją oskrzeli na krótkodziałający lek β_2-adrenergiczny 79
IV.4. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego z całkowitym stężeniem IgE 84
IV.4.1. Badanie związku allelu ze stężeniem IgE 85
IV.4.2. Badanie związku genotypów i diplotypów ze stężeniem IgE 86
IV.4.3 Badanie związku polimorfizmów z podwyższonym stężeniem IgE 88
IV.4.4. Badanie związku polimorfizmów z dodatnim wynikiem alergicznych testów skórnych 89
IV.5. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β2-adrenergicznego z wybranymi parametrami klinicznymi 90
IV.5.1. Badanie związku polimorfizmów ze stopniem ciężkości astmy 90
IV.5.2. Analiza związku polimorfizmów z objawami choroby 91
IV.6. Podsumowanie wyników 93
V. DYSKUSJA 95
V.1. Wpływ polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu na wystąpienie astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa 96
V.2. Wpływ polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego na funkcję układu oddechowego 98
V.3. Wpływ polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego na fenotyp astmy 101
VI. WNIOSKI 105
VII. STRESZCZENIE 106
VII. SUMMARY 108
VIII. PIŚMIENNICTWO 111
IX. INDEKS SKRÓTÓW 126

I. WSTĘP

Choroby alergiczne należą do najczęściej występujących schorzeń przewlekłych współczesnej cywilizacji, zarówno u dzieci jak u dorosłych [1], a wobec danych przedstawiających wzrost zachorowalności, szczególnie w krajach uprzemysłowionych, istotnym wydaje się określenie czynników wpływających na ich wystąpienie oraz mechanizmy tych schorzeń.

Badania na poziomie molekularnym pozwoliły na identyfikację szeregu genów biorących udział w regulacji swoistej odpowiedzi immunologicznej oraz kontroli reakcji zapalnych leżących u podłoża tych chorób [2, 3].

Do najczęściej występujących chorób alergicznych należą astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa. Podkreśla się obecnie wspólne mechanizmy patogenetyczne i być może również molekularne astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa, traktując te dwie jednostki chorobowe jako jedną całość w myśl zasady „jedne drogi oddechowe, jedna choroba" [4].

Astma oskrzelowa

Według definicji przedstawionej w raporcie GINA, astma jest przewleką chorobą zapalną dróg oddechowych, w której rolę odgrywa wiele komórek, głównie mastocyty, eozynofile i limfocyty T. U osób podatnych zapalenie to jest przyczyną nawracających epizodów świszczącego oddechu, duszności, ściskania w klatce piersiowej i kaszlu, występujących szczególnie w nocy i/lub nad ranem. Objawy te są zwykle związane z rozległą obturacją oskrzeli o zmiennym nasileniu, często ustępującą samoistnie lub pod wpływem leczenia. Proces zapalny toczący się w ścianie oskrzeli jest odpowiedzialny za nadreaktywność oskrzeli na różne czynniki [5].

Astmę oskrzelową możemy podzielić biorąc pod uwagę etiologię lub przebieg choroby. Pod względem etiologicznym astmę oskrzelową dzielimy na alergiczną (atopową, zewnątrzpochodną) - jest to astma wywołana przez mechanizmy immunologiczne oraz niealergiczną (nieatopową, wewnątrzpochodną), gdy nie udaje się wykryć udziału znanych alergenów i swoistych przeciwciał IgE w powstawaniu objawów choroby [6]. Podział astmy ze względu na przebieg choroby i nasilenie obturacji oskrzeli przedstawiono w tabeli 1 [5].

Tabela 1.Klasyfikacja astmy na podstawie obrazu klinicznego.

Stopień 1.- astma sporadyczna	- objawy rzadziej niż raz w tygodniu - zaostrzenia krótkotrwałe - objawy nocne nie częściej niż 2 razy w miesiącu - FEV1≥80% wartości należnej, lub PEF≥80% wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub FEV1<20%
Stopień 2.- astma przewlekła lekka	- objawy częściej niż 1 raz wtygodniu, rzadziej niż 1 raz dziennie - zaostrzenia mogą zaburzać sen i utrudniać codziennąaktywność - objawy nocne częściej niż 2 razy w miesiącu - FEV1≥80% wartości należnej, lub PEF≥80% wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub FEV1 20-30%
Stopień 3.- astma przewlekła umiarkowana	- objawy występują codziennie - zaostrzenia mogą zaburzać sen i utrudniać codzienną aktywność - objawy nocne częściej niż 1raz w tygodniu - konieczność inhalacji krótko działającego β_2-sympatykomimetyku codziennie - FEV1 60-80% wartości należnej, lub PEF60-80% wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub FEV1 >30%
Stopień 4.- astma przewlekła ciężka	- objawy występują codziennie - częste zaostrzenia - częste objawy nocne - ograniczenie aktywności fizycznej - FEV1 ≤60% wartości należnej, lub PEF≤60% wartości maksymalnej dla chorego - zmienność PEF lub FEV1 >30%

Do wystąpienia astmy oskrzelowej przyczyniają się czynniki osobnicze oraz środowiska, wywołujące zapalenie i skurcz oskrzeli, jak alergeny, czynniki zawodowe, infekcje bakteryjne i wirusowe, leki, palenie tytoniu. Natomiast czynniki wyzwalające skurcz oskrzeli i powodujące utrzymywanie się objawów alergicznego zapalenia to przede wszystkim: wysiłek fizyczny, zimne powietrze, zanieczyszczenie powietrza, dwutlenek siarki, stresy. Przedstawiono je w tabeli 2 [7, 8].

Tabela 2.Czynniki predysponujące do wystąpienia astmy oskrzelowej.

1. Czynniki osobnicze	- predyspozycja genetyczna - nadreaktywność oskrzeli - płeć i rasa
2. Czynniki środowiskowe	- alergeny - czynniki zawodowe działające uczulająco - dym tytoniowy, zanieczyszczenie powietrza - zakażenia układu oddechowego - dieta, status społeczny i ekonomiczny - wielkość rodziny
3. Czynniki wywołujące zaostrzenia i utrzymywanie się objawów choroby	- alergeny - zakażenia układu oddechowego

W diagnostyce astmy podstawowe znaczenie ma dokładnie zebrany wywiad chorobowy, uwzględniający występowanie w rodzinie chorób atopowych.

Najbardziej charakterystycznym objawem astmy są świsty i furczenia w badaniu osłuchowym płuc, ale ze względu na napadowy charakter tej choroby wynik badania fizykalnego może być w danej chwili prawidłowy. Z badań dodatkowych istotne dla rozpoznania astmy są badania czynnościowe płuc, a także testy skórne z alergenami i określenie stężenia całkowitych lub alergenowo swoistych przeciwciał IgE. Prowokacyjne próby dooskrzelowe, badanie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych, biopsja błony śluzowej oskrzeli potwierdzają rozpoznanie astmy i są wykonywane w specjalistycznych ośrodkach [5].

Alergiczny nieżyt nosa

Alergiczny nieżyt nosa jest to zespół objawów klinicznych wywołanych przez IgE-zależną reakcję zapalną błony śluzowej nosa po zadziałaniu alergenu. Objawami nieżytu nosa są: wyciek wodnistej wydzieliny z nosa, uczucie zatkania i świąd oraz kichanie, ustępujące samoistnie lub pod wpływem leczenia. Objawom tym może towarzyszyć świąd gardła, łzawienie oczu, podrażnienie spojówek, a także nadreaktywność oskrzeli czy astma. Choroba może mieć postać okresową (objawy występują przez mniej niż 4 dni w tygodniu lub krócej niż 4 tygodnie) lub przewlekłą (objawy występują przez więcej niż 4 dni w tygodniu i ponad 4 tygodnie). Stopień ciężkości alergicznego nieżytu nosa określa się jako łagodny, umiarkowany lub ciężki [9].

Alergiczny nieżyt nosa dzieli się na sezonowy, całoroczny i zawodowy, zależnie od czasu ekspozycji na czynnik wywołujący. Sezonowy alergiczny nieżyt nosa (synonimy tej choroby to: alergia pyłkowa, pyłkowica, gorączka sienna, katar sienny) wywoływany jest alergenami środowiska zewnętrznego takimi jak pyłki roślin czy pleśnie. Całoroczny nieżyt nosa najczęściej wywołują alergeny roztoczy kurzu domowego, niektóre gatunki pleśni, naskórek i sierść zwierząt. Przyczyną zawodowego nieżytu nosa jest narażenie na substancje obecne w powietrzu w miejscu pracy, np. alergeny zwierząt laboratoryjnych, zbóż, pył drzewny, substancje chemiczne.

Do czynników zwiększających ryzyko wystąpienia alergicznego nieżytu nosa zalicza się: czynniki genetyczne i rodzinne występowania chorób alergicznych, zwłaszcza alergicznego nieżytu nosa [10], narażenie na alergeny oraz zakażenia w dzieciństwie, miejsce zamieszkania i styl życia, zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego i wewnątrz pomieszczeń, a także palenie tytoniu [9].

W rozpoznaniu alergicznego nieżytu nosa podstawowe znaczenie ma dokładny wywiad, badanie fizykalne i laryngologiczne; z badań dodatkowych istotne znaczenie mają alergologiczne testy skórne, poziom IgE całkowitego w surowicy, poziom swoistych IgE w surowicy oraz cytologia nosa, badanie bakteriologiczne wydzieliny z nosa, ocena czynności aparatu śluzowo-rzęskowego, ocena przewodów nosowych, tomografia komputerowa i przeglądowe zdjęcie zatok obocznych nosa [11].

I.1. Epidemiologia astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa

Badania epidemiologiczne wskazują na gwałtowny wzrost chorób alergicznych na świecie w ostatnich trzech dekadach [12]. Obecnie choroby te dotyczą 10-30% ogólnej populacji [1]. W tabeli 3 przedstawiono wyniki badań dotyczących populacji polskiej z roku 2000 oraz 2003.

Tabela 3. Częstość występowania chorób alergicznych w populacji polskiej

	Populacja dorosłych	Populacja dzieci	Pozycja piśmiennictwa
Choroby alergiczne	18,7%	23,3%	[13]
Astma oskrzelowa	5,4%	8,6%, Kraków 5,8% Poznań 5,9%	[13, 14]
Alergiczny nieżyt nosa	8,5%	8,6%	[13]

Dane epidemiologiczne dotyczące występowania chorób alergicznych na świecie są niejednoznaczne ze względu na zastosowanie różnych kryteriów rozpoznawania choroby oraz badane subpopulacje. Częstość występowania objawów astmy oskrzelowej u dzieci, w różnych populacjach, waha się od 0-30%, a największy współczynnik chorobowości stwierdzono w Australii, Nowej Zelandii i Anglii. Dane dotyczące występowania astmy u osób dorosłych wynoszą od 3 do 16%w populacji światowej [5]. W populacji światowej częstość występowania alergicznego nieżytu nosa u dzieci waha się od 1 do 40% [9].

W badaniu wieloośrodkowym, międzynarodowym ISAAC, stwierdzono duże zróżnicowanie częstości występowania astmy i alergicznego nieżytu nosa u dzieci w różnych regionach świata. Zaobserwowano, że nieżyt nosa występuje rzadko w krajach, gdzie również astma występuje rzadko; w krajach, gdzie częstość alergicznego nieżytu nosa jest bardzo duża od 25 do 35%, częstość występowania astmy wynosiła od 10 do 25% [15]. W badaniu SAPALDIA częstość występowania alergicznego nieżytu nosa u dorosłych osób wynosiła 13,5% [16].

I.2. Patomechanizm reakcji zapalnych w astmie oskrzelowej i alergicznym nieżycie nosa

Do zapalenia dochodzi w wyniku swoistej odpowiedzi immunologicznej w drogach oddechowych. Proces immunologiczny zapoczątkowany jest aktywacją limfocytów T w odpowiedzi na antygen prezentowany przez komórki dendrytyczne przy udziale cząsteczek MHC-II (*Major Histocompatibility Complex*), a pod ich wpływem limfocyty typu Th_0 różnicują się w kierunku limfocytów typu Th_1 i Th_2 [17].

Obecnie uważa się, że zaburzenie równowagi pomiędzy limfocytami typu Th_1 i Th_2 odgrywa rolę w patogenezie chorób atopowych [18, 19]. Atopię charakteryzuje przewaga limfocytów typu Th_2, które poprzez uwalnianie cytokin IL-4, IL-13, IL-3, IL-5, IL-9, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) oraz czynnika aktywującego eozynofile (EAF), nasilają produkcję immunoglobulin IgE i podtrzymują proces zapalny. Jednocześnie dochodzi do obniżenia stężenia INFγ i IL-2, których źródłem są przede wszystkim limfocyty typu Th_1.

W zapaleniu alergicznym można wyróżnić trzy fazy [20, 21, 22]:

-wczesną, występującą prawie natychmiast po zadziałaniu bodźca, w której biorą udział komórki tuczne i bazofile, a istotną rolę odgrywa między innymi interleukina 4, nadzorująca zmianę izotypu limfocytów B w kierunku wytwarzania IgE, różnicowanie limfocytów T w kierunku limfocytów typu Th_2, zwiększająca ekspresję cząstek adhezyjnych np.VCAM-1 i kontrolująca poziom ekspresji receptora dla IgE (FcεRII) [23]. Za zwiększoną transkrypcję genu dla IL-4 odpowiedzialna jest aktywacja czynników transkrypcyjnych z rodziny STAT(STAT6).

IgE wiążą się z receptorem o wysokim powinowactwie dla IgE (FcεRI) na powierzchni komórek tucznych i bazofili oraz z receptorem o słabym powinowactwie (FcεRII) na powierzchni eozynofilów, monocytów, makrofagów, komórek dendrytycznych i płytek krwi. Po połączeniu z alergenem dochodzi do aktywacji tych komórek i uwalniania przez nie mediatorów, które inicjują fazę późną zapalenia [24]. Mediatory uwalniane z komórki tucznej to: histamina, bradykinina, czynnik chemotaktyczny dla eozynofilów (ECF-A), czynnik chemotaktyczny dla neutrofili (NCF-A). Mediatory uwalniane z fosfolipidów błony komórkowej w następstwie aktywacji komórki tucznej to: leukotrieny: LTB4, LTC4, LTD4, LTE4, tromboksan TXA_2, prostaglandyny-PGD_2, $PGF_{2\alpha}$ oraz czynnik aktywujący płytki (PAF),

-późną, występującą po 3-8 godzinach, w której uczestniczą głównie eozynofile, limfocyty i neutrofile.

Głównymi komórkami tej fazy są eozynofile, które poza produkcją metabolitów kwasu arachidonowego i PAF, uwalniają zmagazynowane w ziarnistościach białka takie, jak eozynofilowe białko kationowe (ECP), eozynofilowe białko X (EPX), białko zasadowe (MBP) eozynofilową peroksydazę (EPO) oraz wytwarzają nowe mediatory biorące udział w reakcji zapalnej: IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF. Również dużą rolę w tej fazie zapalenia przypisuje się limfocytom typu Th_2 i uwalnianym przez nie cytokinom, jak IL-4, IL-5, IL-13, czynnik aktywujący eozynofile (EAF), które odpowiedzialne są za przyciąganie, aktywację i przedłużone przeżycie eozynofilów w błonie śluzowej oskrzeli. TNFα i IL-4 odgrywają istotną rolę w zwiększeniu ekspresji cząstek adhezyjnych oraz umożliwiają tworzenie się nacieku zapalnego [11, 25, 26],

-naprawczą, za którą odpowiadają makrofagi i fibroblasty. W tej fazie pobudzone makrofagi i monocyty uwalniają leukotrieny LTB4, LTC4, tromboksan, prostaglandyny, PAF oraz elastazę, kolagen i kwas hialuronowy. Proliferujące fibroblasty wydzielają proteoglikan, kwas hialuronowy, kolagen, a także cytokiny prozapalne.

Komórki nabłonka oskrzeli stanowią fizjologiczną barierę, ponadto modulują zapalne reakcje alergiczne w drogach oddechowych syntetyzując przeciwzapalne mediatory eikozanoidowe oraz uczestnicząc w degradacji neuropeptydów (neuropeptydaza). Nabłonek oddechowy jest także źródłem prozapalnych chemokin (RANTES, TNFα, IL-1, IL-6, IL-8) oraz czynników regulujących napięcie mięśniówki gładkiej oskrzeli. Czynniki te mogą uczestniczyć w przebudowie ściany oskrzeli (remodelling). Proces charakteryzuje się złuszczeniem komórek nabłonka oddechowego, wzrostem liczby komórek kubkowych, pogrubieniem błony podstawnej w wyniku depozycji kolagenu i białek takich jak laminina i fibronektyna.

W wyniku długo trwającego procesu zapalnego dochodzi do hiperplazji i hipertrofii komórek mięśni gładkich i gruczołów śluzowych [26].

Nacieki zapalne w alergicznym nieżycie nosa mają podobny skład komórkowy do tego, który występuje w oskrzelach. W reakcji zapalnej biorą udział te same mediatory: histamina, leukotrieny, prostaglandyny, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF, chemokiny: RANTES i eotaksyna, cząsteczki adhezyjne. U chorych na alergiczny nieżyt nosa i astmę występują różnice między budową błony śluzowej w zakresie markerów zapalenia, udziału eozynofilów, stopnia złuszczania nabłonka oraz mikroskopowych cech przebudowy dróg oddechowych. Istotne są także różnice w roli układu autonomicznego w tych dwóch schorzeniach, z przewagą roli układu cholinergicznego w astmie i α-adrenergicznego oraz NANC w alergicznym nieżycie nosa [9].

Receptory β_2-adrenergiczne odgrywają rolę w kontroli zapalenia alergicznego. Znajdują się one na mastocytach, limfocytach, eozynofilach, a ich aktywacja hamuje uwalnianie mediatorów. Pobudzenie receptorów β_2-adrenergicznych prowadzi do zmniejszenia uwalniania neuropeptydów przez nerwy cholinergiczne, zmniejszenia przepuszczalności naczyń, zwiększenia ruchomości rzęsek i klirensu śluzówkowo-rzęskowego, co w efekcie prowadzi do ograniczenia procesu zapalnego (tabela 6) [27].

Rola nadreaktywności oskrzeli w astmie i alergicznym nieżycie nosa.

Nadreaktywność jako nadmierna odpowiedź skurczowa oskrzeli na bodźce jest uniwersalną cechą astmy niezależnie od jej etiologii. Mechanizmy nadreaktywności nie są znane, ale mogą wiązać się z uszkodzeniem nabłonka, zaburzeniem czynności mięśni gładkich oskrzeli, w następstwie zmian w ich kurczliwości oraz procesem zapalnym toczącym się w ścianie dróg oddechowych. Ponadto przyczyną wzmożonej odpowiedzi skurczowej oskrzeli mogą być zaburzenia regulacji napięcia mięśni gładkich oskrzeli związane z czynnościową przewagą nerwu błędnego, bądź też zaburzeniem funkcji receptorów β_2-adrenergicznych [28].

W astmie stwierdzono zmiany w nerwowej kontroli dróg oddechowych, co przejawia się zaburzeniem równowagi między czynnikami kurczącymi oskrzela-układ cholinergiczny, α-adrenergiczny, a czynnikami powodującymi rozkurcz - układ β-adrenergiczny. Toniczne napięcie mięśni gładkich utrzymywane jest przez acetylocholinę, uwalnianą przez zakończenia nerwu błędnego, która poprzez receptory M_2, obecne na powierzchni komórek mięśni gładkich powoduje ich skurcz. Hamująco na uwalnianie acetylocholiny działają katecholaminy, neuropeptydy (VIP) oraz sama acetylocholina. Natomiast uwalnianie acetylocholiny nasilają tromboksany i PGD_2. Potencjalną rolę w rozwoju nadreaktywności oskrzeli odgrywa również układ nieadrenergiczny i niecholinergiczny, który poprzez uwalniane mediatory: substancja P, neurokininy A i B, neuropeptydy (NKA, CGRP) regulują napięcie mięśni gładkich oskrzeli [29, 30].

U wielu chorych na alergiczny nieżyt nosa obserwuje się współwystępowanie nieswoistej nadreaktywności oskrzeli. Ustępowanie objawów nadreaktywności oskrzeli pod wpływem leczenia donosowo lekami przeciwzapalnymi, wskazuje na związek nadreaktywności z zapaleniem błony śluzowej nosa [31].

I.3. Związek między występowaniem atopii, astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa

Termin *atopia*, w języku greckim oznaczający „dziwny", został wprowadzony w 1923 roku przez Coca i Cooke'a i oznacza osobniczą lub rodzinną predyspozycję do produkowania przeciwciał klasy IgE w odpowiedzi na niskie dawki alergenów, zwykle białek oraz do rozwoju typowych objawów takich, jak astma, nieżyt nosa i spojówek lub wyprysk/zapalenie skóry. Choroby atopowe to między innymi atopowa astma oskrzelowa, alergiczny nieżyt nosa oraz atopowe zapalenie skóry [6].

Atopię definiowaną jako wytwarzanie nadmiernych ilości przeciwciał klasy IgE w odpowiedzi na ekspozycję na alergeny środowiskowe, rozpoznaje się na podstawie zwiększonego stężenia całkowitych lub swoistych IgE w surowicy i dodatniego wyniku punktowych testów skórnych z zestawem wystandaryzowanych wyciągów alergenowych. Zwiększona synteza przeciwciał IgE jest wynikiem złożonych mechanizmów, regulowanych przez szereg interakcji komórkowych, w których decydującą rolę odgrywają czynniki genetyczne [32].

Atopia jest ważnym czynnikiem osobniczym predysponującym do wystąpienia astmy [5], a dostępne dane epidemiologiczne wskazują, że stanowi ona podłoże astmy w ok. 50% przypadków [33]. Istotny wydaje się być również wzajemny wpływ poszczególnych chorób atopowych na siebie.

Alergiczny nieżyt nosa stanowi czynnik ryzyka rozwoju astmy [34, 35].

Istnieje koncepcja, według której górne i dolne drogi oddechowe należy traktować łącznie jako jednostkę objętą alergicznym procesem zapalnym; przy tym u pacjentów z łagodniejszą postacią choroby występuje tylko nieżyt nosa, podczas gdy cięższa postać choroby może manifestować się zarówno astmą oskrzelową jak i alergicznym nieżytem nosa [4, 36].

W wielu badaniach wykazano, że nacieki zapalne w błonie śluzowej nosa i oskrzeli mają podobny skład komórkowy (eozynofile, mastocyty, limfocyty T, komórki jednojądrzaste), a w patogenezie zmian zapalnych biorą udział te same mediatory [37].

Nie należy zapominać o różnicach pomiędzy błoną śluzową nosa i oskrzeli w zakresie markerów zapalenia, udziału eozynofilów, stopnia złuszczania nabłonka oraz cech przebudowy dróg oddechowych [38].

Nieżyt nosa stwierdza się u ponad 75% chorych na astmę atopową i u ponad 80% na astmę nieatopową [39]. Z badań przeprowadzonych w północnej Szwecji wynika, że ryzyko wystąpienia astmy u dorosłych jest 3-4 razy większe, zaś nieżytu nosa 2-6 razy większe u chorych z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku astmy i nieżytu nosa [40]. Czynnikiem wpływającym na rozwój astmy i nieżytu nosa lub izolowanego nieżytu nosa jest wiek, w którym pojawiły się objawy atopii. W badaniu przeprowadzonym w Australii stwierdzono, że wystąpienie objawów atopii u dzieci do 6 roku życia jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju astmy w późniejszym wieku, natomiast jej wystąpienie w starszym wieku wiązało się jedynie z ryzykiem sezonowego alergicznego nieżytu nosa [41]. Istnieją prace, z których wynika, że atopowe zapalenie skóry wpływa na rozwój astmy oskrzelowej [42, 43, 44]. Ocenia się, że u około 40% niemowląt chorujących na atopowe zapalenie skóry dojdzie do rozwoju astmy oskrzelowej w wieku 3-4 lat [42].

I.4. Podłoże genetyczne atopii i astmy oskrzelowej

Wiele danych wskazuje na dziedziczny charakter astmy i innych schorzeń alergicznych, jednak mechanizm dziedziczenia jest złożony. Zróżnicowanie obrazu klinicznego, różna ekspresja genów oraz oddziaływania gen-gen i gen-środowisko sprawia, że jednoznaczne określenie podłoża genetycznego astmy i innych schorzeń alergicznych jest trudne [32].

W badaniach prowadzonych u bliźniąt wykazano, że współczynniki współwystępowania chorób atopowych jak astma, alergiczny nieżyt nosa, czy atopowe zapalanie skóry są znamiennie większe dla bliźniąt jednojajowych niż dwujajowych [45, 46].

U bliźniąt jednojajowych występowanie atopii wynosi 50-60% [47], odpowiedni współczynnik dla astmy wynosi jednak zaledwie 26%. Co ciekawe, chociaż bliźnięta jednojajowe wychowywane w tych samych warunkach wykazują znaczne podobieństwo w poziomie IgE, wynikające z identycznego materiału genetycznego komórek zarodkowych i podobieństwa we wczesnym narażeniu na czynniki środowiskowe, często prezentują znaczne różnice w swoistej IgE-zależnej odpowiedzi przeciw różnym alergenom. Przypuszczalnie wynika to z różnic w segregacji genów, dotyczących zarówno genów dla immunoglobulin jak i receptorów na komórkach T [48].

Wysunięto hipotezę, że istnieją wspólne geny predysponujące do wystąpienia chorób alergicznych niezależnie od klinicznej manifestacji (geny te należą do układu genów związanych z chorobami immunologicznymi np. stwardnienie rozsiane, choroba Crohna,

cukrzyca typu pierwszego), a odrębne warunkują wystąpienie konkretnej jednostki chorobowej: astmy, alergicznego nieżytu nosa czy atopowego zapalenia skóry[36].

Należy podkreślić, że astma oskrzelowa ma podłoże wielogenowe, ponadto dochodzi do wzajemnych interakcji polimorfizmów poszczególnych genów i co jeszcze bardziej komplikuje genetyczne uwarunkowania tej choroby to zjawisko niecałkowitej penetracji genów oraz obecność fenokopii [49].

Dużą uwagę w badaniu podłoża genetycznego chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo, poświęca się badaniu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP). Jest to bardzo częste zjawisko: średnio na 350 nukleotydów w genomie człowieka występuje allel różniący się pojedynczym nukleotydem (mutacja), a polimorfizm pojedynczych nukleotydów, jest to występowanie więcej niż jednego wariantu (allelu) w danym locus z częstością większą niż 0,01 w populacji. Haplotyp jest układem polimorfizmów na małym fragmencie chromosomu, przekazywanym jako całość w rodzinach [50], a analiza haplotypów została zastosowana w badaniach dotyczących: ADRB2, TCR, IL-4Ra, IL-13, CD14 [49].

Metody poszukiwania genów biorących udział w patogenezie astmy dzielą się na dwie grupy: jedną z nich jest analiza sprzężeń, czyli przeszukiwanie genomu: *(genome wide screen, positional cloning)*, metoda polegająca na ustaleniu markerów genetycznych DNA, a następnie śledzenie ich dziedziczenia i zbieżności z fenotypem w badanych rodzinach. Jednym z ogólnie przyjętych markerów fenotypowych astmy jest nadreaktywność oskrzeli, z kolei inne badania sugerują, że takim markerem może być stężenie IgE [48]. Metoda ta pozwala to na określenie regionów genomu odpowiedzialnych za wystąpienie określonego fenotypu (tabela 4) [51].

Wyniki badań populacyjnych sugerują, że materiał genetyczny zawarty w regionach chromosomów: 2p,2q,5q,7q,11q,12q,13q może mieć znaczenie w rozwoju astmy. Najważniejsze znaczenie wydają się mieć regiony chromosomów 5q i 2p [32, 36].

Tabela 4. Podsumowanie wyników badań sprzężeń genetycznych w poszukiwaniu podłoża genetycznego astmy i atopii

Miejsce chromosomowe	Cecha	Gen kandydat	Pozycja piśmiennictwa
1 p31	Astma	HNMT	[52, 53]
2q33	Astma	CD28, IGBP5	[54]
3p24.2-p22	Astma	CCR4	[55]
5p15	Astma	Nieznany	[54]
5q23-33	Astma, atopia, całkowite IgE	IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, ADRB2, CD14, CSF2, (SPINK5), LTC (4), GRL1	[54, 55]
6p21.1-p23	Astma, całkowite IgE	HLA, TNFα, (PAFAH)	[51, 54]
7p-15.2	Astma, atopia, całkowite IgE	TCRG IL-6	[56]
7q31	Całkowite IgE	TCRB	[57]
11q13	Astma, całkowite IgE, atopia	FCER1B, CC16	[56]
12q14-q24.33	Astma, eozynofile, całkowite IgE	STAT6, IFNγG, SCF, IGF1, LTA4H, NOS1, NFYB,	[51, 58]
13q14.3-qter	Astma	TPT1	[54]
14q11.2-q13	Astma, atopowe zapalenie skóry, atopia	TCRA/D,	[54]
16q22.1-q24.2	Astma, atopia	Nieznany	[56]
17p11.1-q11.2	Astma	CC	[54]
19q13p	Astma	CD22	[54]
21q2120p	Astma	Nieznany	[54, 55]
Xq28/Yq28	Astma	IL9R	[59]

Na podstawie[49]

ADRB2 - receptor β_2-adrenergiczny; CC - chemokiny typu CC, CCR – receptor dla chemokin typu CC; CD - antygen różnicowania komórek, CC16 - białko swoiste dla komórek Clara; CSF - czynnik stymulujący kolonie; FCER1B - łańcuch β receptora IgE o wysokim powinowactwie; GRL - receptor dla glukokortykosteroidów; HLA - główny układ zgodności tkankowej; HNMT - *N*-metylotransferaza histaminy; IL-interleukina; ILR - receptor dla interleukiny; IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostu-1; LTA4H - hydrolaza leukotrienu A4; LTC (4) - syntaza leukotrienu C4; NOS1 - 1 syntaza NO; NFYB - jądrowy czynnik transkrypcyjny, podjednostka β; INFG - interferon γ; SCF - czynnik wzrostowy komórek macierzystych; SPINK5 - 5 inhibitor proteazy serynowej typu Kazal; STAT6 - czynnik transkrypcyjny STAT6; TCR - receptor limfocytów T

Drugą z metod jest analiza konkretnego genu (*candidate gene approach)* polegająca na badaniu asocjacji genetycznych. Celem tych badań jest wykazanie różnicy w częstości występowania zmienności genetycznej (polimorfizmu) u chorych, w porównaniu do grupy kontrolnej, a następnie określenie funkcjonalnego znaczenia polimorfizmu. W przypadku gdy polimorfizm znajduje się w regionie kodującym genu, białko kodowane przez wariant polimorficzny może wykazywać zmienioną funkcję.

Natomiast gdy polimorfizm dotyczy niekodujących części genu, wariant polimorficzny może wpływać na zmianę aktywności transkrypcji i ekspresji genetycznej. W dotychczasowych badaniach najwięcej uwagi poświęcono zmienności genów

znajdujących się w następujących regionach: 5q31-q33,6p21-3,11q13,12q14.3-q24.1,14q11.2-13 dla których wykazano związek z fenotypem astmy i atopii (tabela 5) [48].

Tabela 5. Znaczenie czynnościowe wybranych genów kandydatów w patogenezie astmy oskrzelowej i atopii.

Region chromosomu	Geny kandydaci	Funkcja	Fenotyp (y)	Pozycja piśmiennictwa
5q31.1-q33	IL3, IL4, IL5, IL9, IL13, CSF2	Izotyp limfocytów B produkujących IgE; cytokiny regulujące czynność eozynofilów, bazofili i mastocytów oraz IgE (np. odpowiedź Th2)	Astma, nadreaktywność oskrzeli, całkowite IgE	[60, 61, 62]
	ADRB2	Receptor β_2 adrenergiczny sprzężony z białkiem G	Astma, nadreaktywność oskrzeli, całkowite IgE	[63]
	GRL	Receptor istotny dla modulacji reakcji zapalnej	Nieznany	
6p21.3	HLAD	Prezentacja antygenu	Swoiste IgE i IgG	[64]
	TNFA	Uczestniczy w reakcji zapalnej	Astma	
11q13	FCER1B	Sygnał transdukcji dla bazofili, mastocytów i komórek dendrytycznych	Atopia (całkowite i swoiste IgE), astma, sugerowane dziedziczenie matczyne	[65]
	FGF3	Stymuluje proliferację komórek	Atopia (całkowite i swoiste IgE)	
12q14.3-q24.1	IFNG	Hamowanie aktywności IL-4	Cały region, astma, atopia, całkowite IgE	[66, 67]
	SCF	Wytwarzanie IL-4	(jak dla IFNG)	
	NFYB	Regulacja transkrypcji genów dla IL-4 i HLA-D	(jak dla FNG)	
	STAT6	Istotny czynnik transkrypcji regulowanej cytokinami	(jak dla IFNG)	
14q I 1.2-13	TCRA, TCRD	Reaguje z kompleksami peptyd-MHC	Swoiste IgE	[68]
	NFKB-1	Aktywuje geny immunoregulacyjne w odpowiedzi na bodźce zapalne	Nieznany	

Na podstawie[48]

ADRB2 - receptor β_2-adrenergiczny; CSF - czynnik stymulujący kolonie; FCER1B - łańcuch β receptora IgE o wysokim powinowactwie; FGF3 - czynnik wzrostu fibroblastów; GRL - receptor dla glukokortykosteroidów; HLAD - główny układ zgodności tkankowej - region D; IL - interleukina; INFG - interferon γ; NFYB - jądrowy czynnik transkrypcyjny-podjednostka β, NFKB-1 – inhibitor komórek cytotoksycznych; SCF - czynnik wzrostowy komórek macierzystych; STAT6 - czynnik transkrypcyjny STAT6; TCR - receptor limfocytów T - łańcuch α i δ, TNFA - czynnik martwicy nowotworów α

Chromosom 5q31-q33 zawiera wiele genów uczestniczących w rozwoju procesu zapalnego związanego z astmą i atopią. Znaleziono związki pomiędzy zmiennością genów kodujących IL-4 i znajdującymi się genami w regionie 5q31.1, a regulacją poziomu IgE [60, 69, 70].

W 1995 opisano polimorfizm promotora genu dla IL-4 i jego związek z podwyższonym całkowitym poziomem IgE w surowicy, jakkolwiek późniejsze prace tego nie potwierdziły [71]. Wykryto również polimorfizm genu kodującego IL-13 i jego związek z całkowitym stężeniem IgE w surowicy [72]. Region ten zawiera ponadto geny dla receptora β_2-adrenergicznego.

Na krótkim ramieniu chromosomu 6: 6p21.3 zlokalizowano geny kodujące białka układu zgodności tkankowej (HLA I, II, III) oraz inne geny, np. dla TNFα.- ważnego mediatora reakcji zapalnych. W przypadku dobrze scharakteryzowanych alergenów jak alergen ambrozji Amb-A5 i Amb-A6, udowodniono związek pomiędzy swoistą odpowiedzią a określonym fenotypem HLA klasy II (DR2.2 u osób rasy białej, lub DR2.12 u osób rasy azjatyckiej). W grupie chorych uczulonych na pyłek ambrozji, stwierdzono związek niektórych haplotypów z fenotypem klinicznym - np. haplotyp HLA-B7, SC31, DR2 występował prawie wyłącznie u osób chorujących na astmę, a haplotyp HLA-B8, SC01, DR3 występował u osób chorych na alergiczny nieżyt nosa [73].

Cookson i współpracownicy jako pierwsi zlokalizowali gen leżący w regionie 11q12- q13, kodujący łańcuch β receptora IgE o wysokim powinowactwie (FCR1B). Wykryli oni kilka polimorfizmów w obrębie tego genu (FceR1-b-Leu181 i FceR1-b-E237G), a wyniki wielu badań sugerują ich związek z regulacją poziomu IgE w surowicy i atopią [65, 74]. Późniejsze badania dały jednak rozbieżne wyniki [75].

Wiele uwagi poświęcono badaniom nad regionem 12q14.3-q24.1, zawierającym geny potencjalnie odgrywające rolę w patogenezie astmy i alergii między innymi gen kodujący syntazę tlenku azotu (NOS1) [76, 77], ponadto region ten zawiera gen kodujący interferon γ (INFγ) [58].

Gen kodujący łańcuch α receptora dla IL-4 i IL-13 znajdujący się w regionie 16p12 był także przedmiotem badań. Opisano czternaście polimorfizmów pojedynczego nukleotydu z których dziesięć skutkowało zamianą aminokwasu, natomiast trzy z powstałych wariantów powodują zaburzenia funkcji receptora. Zamiana Ile50Val skutkuje między innymi zwiększeniem aktywacji STAT6 i pobudzeniem procesów transkrypcyjnych. Wariant ten powiązano z występowaniem astmy w populacji japońskiej [78, 79]. Wysunięto hipotezę, że w różnych populacjach, różne polimorfizmy opisywanych genów mogą mieć związek z rozwojem astmy i alergii.

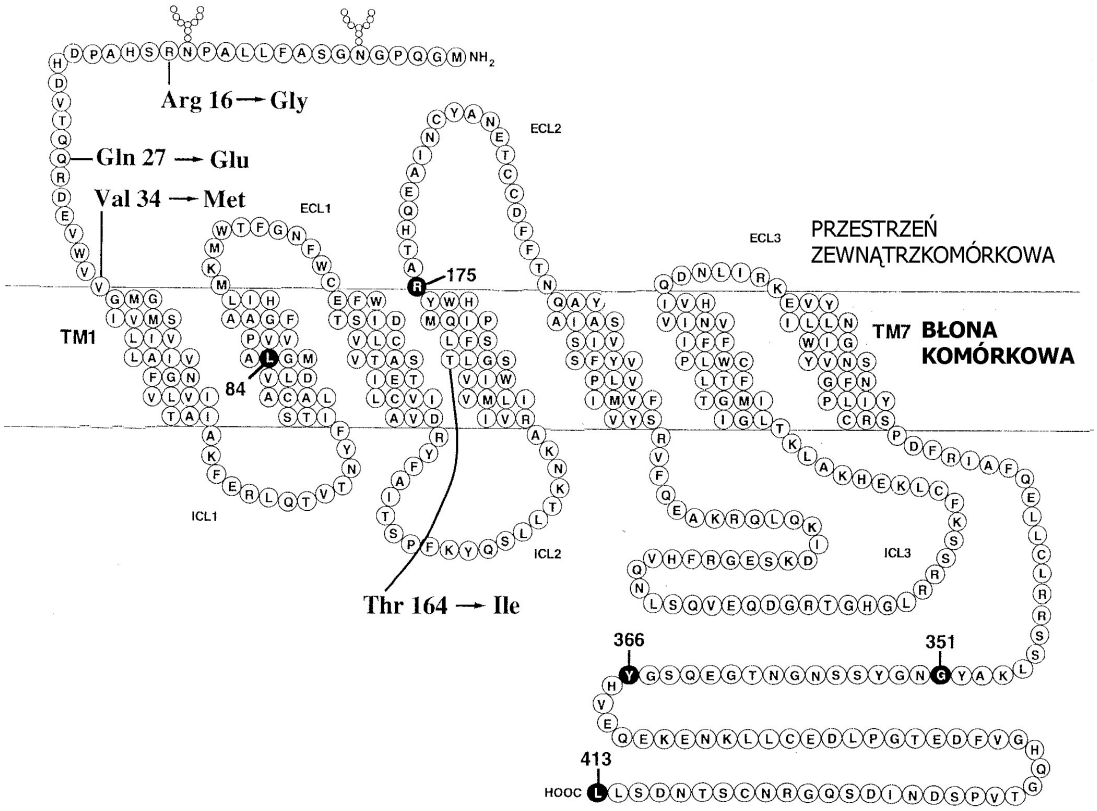
W populacji polskiej szczególne miejsce zajmują badania nad związkiem wybranych polimorfizmów genetycznych z astmą aspirynową. Na uwagę zasługuje odkrycie przez

zespół pod kierownictwem profesora Szczeklika polimorfizmu promotora genu kodującego syntazę leukotrienu (LTCS) [80]. Z kolei zespół profesora Kowalskiego zajmuje się zagadnieniem związku polimorfizmów genetycznych z astmą oskrzelową i alergicznym nieżytem nosa. Badania prowadzone przez ten zespół dotyczyły polimorfizmu genu HLA-DR [81], oraz polimorfizmów Arg16Gly, Gln27Glu w regionie kodującym genu receptora β_2-adrenergicznego i 5'LC Arg19/Cys regionu promotora tego genu [82].

I.5. Rola receptora β_2-adrenergicznego w astmie oskrzelowej i alergicznym nieżycie nosa

Receptor β_2-adrenergiczny należy do rodziny białek receptorowych o strukturze zbliżonej do rodopsyny. Składa się on z 413 aminokwasów o ciężarze 46500 Daltonów. Jest to pojedynczy polipeptyd, który hydrofobowymi odcinkami siedmiokrotnie przewija się przez błonę komórkową. Pomiędzy nimi są odcinki hydrofilne, skierowane naprzemiennie na zewnątrz i do wewnątrz komórki (ryc. 1) [83, 84].

Lands podzielił receptory β na następujące podtypy: β_1 - zlokalizowane głównie w mięśniu serca, aktywowane przez noradrenalinę, β_2 - znajdujące się głównie w mięśniach gładkich dróg oddechowych, stymulowane przez adrenalinę oraz β_3 - rozmieszczone w tkance tłuszczowej, biorące udział w lipolizie. Zidentyfikowana dla trzech receptorów struktura pierwszorzędowa jest znacznie zbliżona i wykazuje 65-70% homologię pomiędzy receptorami β_1 i β_3 a receptorem β_2 [85].



Ryc. 1. Schemat budowy receptora β_2-adrenergicznego.
Ciemne miejsca oznaczają polimorfizmy. TM1-TM7 - domeny przezbłonowe; ECL - domeny zewnątrzbłonowe; ICL - domeny wewnątrzbłonowe.
Zaznaczono miejsca polimorfizmów i zmianę aminokwasów.
Na podstawie [86].

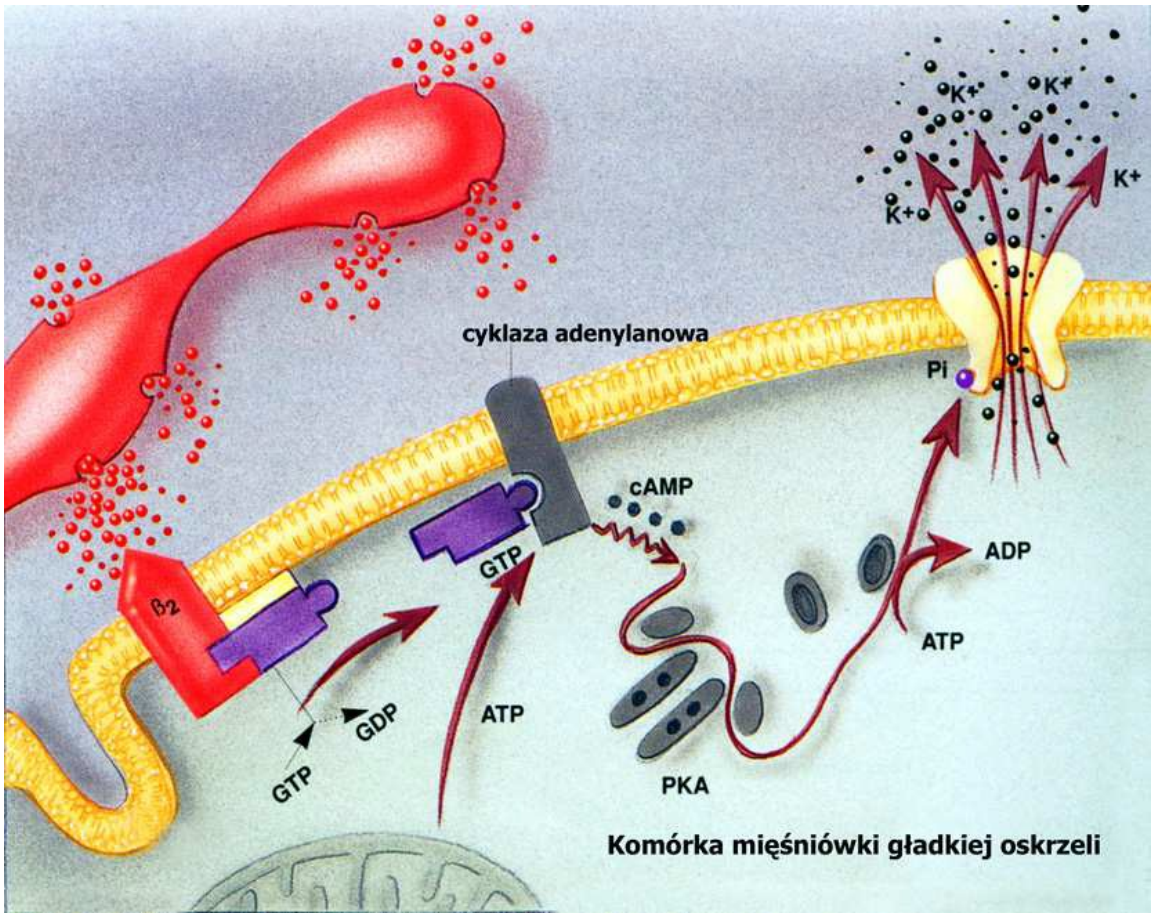
Receptor β_2-adrenergiczny występuje na komórkach mięśni gładkich oskrzeli, na powierzchni komórek nabłonka oddechowego, śródbłonka naczyń płucnych oraz pneumocytach typu II, limfocytach krwi obwodowej, mastocytach. Ponadto można znaleźć te receptory na komórkach mięśnia serca, mięśni gładkich macicy oraz adipocytach [87]. W zależności od lokalizacji funkcje receptora różnią się między sobą. Podstawowe efekty czynnościowe wywołane pobudzeniem receptora β_2-adrenergicznego przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Funkcje receptora β_2-adrenergicznego w zależności od umiejscowienia

Typ komórek	Funkcja
mięśnie gładkie	• rozkurcz • hamowanie proliferacji
nabłonki	• wzrost transportu jonowego • wzrost ruchu rzęsek i klirensu śluzówkowo-rzęskowego
gruczoły podśluzówkowe (β_1/β_2)	• zwiększone wydzielanie • redukcja uwalniania acetylocholiny
nerwy cholinergiczne	• redukcja uwalniania neuropeptydów
nerwy czuciowe (β_1/β_2)	• wazodylatacja
naczynia	• redukcja przenikania
mastocyty	• redukcja uwalniania mediatorów: PAF, PGD2, LTC4, LTD4
eozynofile	• redukcja uwalniania mediatorów: ECP
limfocyty	• hamowanie proliferacji • zmniejszenie wytwarzania przeciwciał • redukcja uwalniania cytokin:IL-12, INFγ, na korzyść IL-4, IL-10
pneumocyty typu I (β_1-/β_2-)	• wzrost resorpcji płynu
pneumocyty typu II	• wzrost wytwarzania surfaktantu

I.5.1. Mechanizm aktywacji i regulacja receptora β_2-adrenergicznego

Połączenie receptora z agonistą powoduje aktywację podjednostki α białka Gs związanego z receptorem. Prowadzi to do aktywacji cyklazy adenylanowej z konwersją ATP do cyklicznego AMP - wtórnego przekaźnika sygnału z receptora β_2, cAMP z kolei aktywuje kinazę białkową A (PKA), następstwem czego jest fosforylacja białek komórkowych i odpowiedź komórkowa, zależna od rodzaju tkanki oraz pobudzonego receptora. Pobudzenie receptora β_2 przez jego agonistę powoduje rozkurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli [88]. Odbywa się to przez spadek wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia i działanie na kanały potasowe. Stymulacja β_2-aderenoreceptora powoduje rozkurcz mięśniówki gładkiej oskrzeli w dwojaki sposób - za pośrednictwem cAMP i poprzez bezpośrednie działanie na zależne od wapnia kanały potasowe o dużym przewodnictwie – tzw. kanały maxi-K (ryc. 2) [89, 90].



Ryc. 2. Mechanizm aktywacji β2 -receptorów mięśnia gładkiego oskrzeli.
Na podstawie [91]

Receptor β_2-adrenergiczny może występować w postaci aktywnej i nieaktywnej.

W warunkach spoczynkowych obie formy są w równowadze z przewagą formy nieaktywnej. Receptor β_2-adrenergiczny znajduje się w postaci aktywnej, gdy związany jest z podjednostką α białka G. Zastąpienie GTP przez GDP katalizuje przemianę ATP do cAMP, zmniejsza powinowactwo podjednostki α do receptora, czego wynikiem jest dysocjacja i powrót receptora do niskoenergetycznego stanu nieaktywnego. Jest prawdopodobne, że β_2-agoniści działają nie na drodze wywoływania zmiany konformacji receptora, lecz raczej na drodze wiązania do receptora i czasowej stabilizacji receptora w formie aktywnej. Wynika z tego możliwość, że spontanicznie, chociaż z niewielką częstością zachodząca przemiana receptora β_2-adrenergicznego z postaci nieaktywnej do aktywnej, przy nieobecności β_2-agonistów, jest źródłem podstawowej aktywności. Działanie β_2-agonisty polega na wzmacnianiu tego niewielkiego wewnętrznego poziomu aktywności receptora [92, 93, 94].

Synteza receptorów β_2-adrenergicznych podlega w komórkach ścisłej kontroli, a właściwe tempo transkrypcji genów pozwala na stałe odnawianie ich liczby. Szacuje się, że komórka

mięśni gładkich oskrzeli posiada na swojej powierzchni 30-40 tysięcy takich cząsteczek, podczas gdy na przykład limfocyt zaledwie 700-750 [85]. Cechą charakterystyczną miocytów jest również wysoka aktywność materiału genetycznego, o której świadczy między innymi obecność w ich cytoplazmie znacznych ilości mRNA dla receptorów β_2-adrenergicznych. Gęstość receptora, czyli liczba cząstek rozmieszczonych na powierzchni komórek, wzrasta w kolejnych rozgałęzieniach drzewa oskrzelowego, osiągając największe stężenie w obrębie pęcherzyków płucnych. Nie ma istotnych różnic pomiędzy liczbą receptorów w płucach osób zdrowych i chorych na astmę [95].

Z aktywacją receptora β_2-adrenergicznego wiąże się proces desensytyzacji receptorów, czyli braku wrażliwości na kolejne pobudzenia [96], który stanowi zabezpieczenie przed nadmierną stymulacją receptorów w przypadku długotrwałego narażenia na działanie β_2-agonistów. Na mechanizmy desensytyzacji składają się trzy główne procesy:

1. Odłączenie receptora od cyklazy adenylanowej (*uncoupling*) na drodze fosforylacji - jest to proces przejściowy i ulega odwróceniu w ciągu kilku sekund do kilku minut od usunięcia agonisty.
2. Po dłuższej ekspozycji na działanie agonisty, zachodzi transport receptora do przedziału wewnątrzkomórkowego i utrata pewnej części receptorów z powierzchni komórki. Odwrócenie tego procesu trwa dłużej niż odłączenie, lecz zazwyczaj nie przekracza kilku godzin [85].
3. Po wielu godzinach narażenia na substancję agonistyczną, dochodzi do utraty netto receptora komórkowego (*down-regulation*) poprzez jego internalizację, trawienie białek, zmniejszenie się aktywności kinazy białka A (PKA) oraz aktywności czynników transkrypcyjnych. Po usunięciu agonisty powrót do pierwotnego stanu wymaga syntezy nowych białek, co wiąże się ze zmienioną ekspresją receptora [27]. Badanie zjawisk związanych z regulacją receptorów pod wpływem pobudzenia agonistą jest istotne dla oceny zjawiska tachyfilaksji, czyli osłabienia efektu działania leku po dłuższym czasie stosowania [97].

I.5.2. Agoniści receptora β_2-adrenergicznego

Profil farmakologiczny poszczególnych preparatów zaliczanych do grupy β_2-sympatykomimetyków i ich właściwości bronchodilacyjne wynikają z odmiennej budowy chemicznej cząsteczek jak i charakteru kompleksu tworzonego z receptorem; ma to ogromny wpływ na ostateczny efekt kliniczny. Rozpatrując właściwości poszczególnych

leków, należy zatem wziąć pod uwagę nie tylko mechanizm, czas oraz siłę ich działania, ale również selektywność i powinowactwo wobec β_2-receptora i innych receptorów β-adrenergicznych [98]. Ze względu na czas działania, można wyróżnić β_2-sympatykomimetyki krótko i długodziałające, ze względu na początek działania wyróżniamy β_2-sympatykomimetyki o szybkim i wolnym początku działania (tabela 7) [5].

Tabela 7. Początek i czas działania wziewnych β_2-sympatykomimetyków.

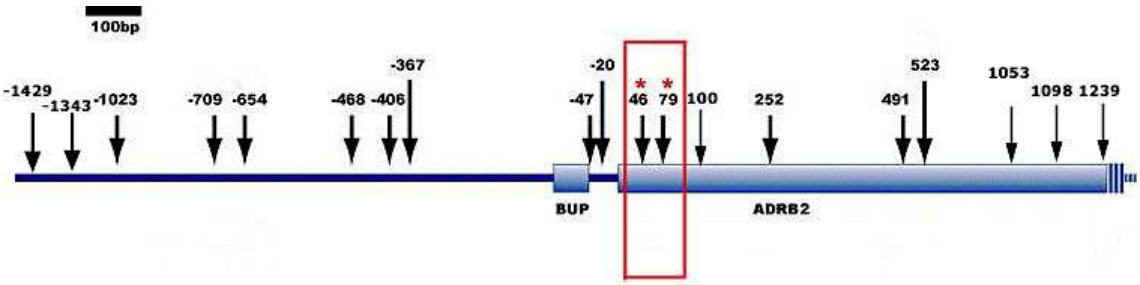
Początek działania	Czas działania	
	Krótki	Długi
Szybki	• fenoterol • terbutalina • salbutamol • pirbuterol • prokaterol	Formoterol
Wolny		Salmeterol

Preparaty należące do tzw. krótkodziałających β_2-sympatykomimetyków swój początek działania zawdzięczają znacznej hydrofilności cząsteczki, co umożliwia ich szybkie przemieszczenie z wodnej przestrzeni zewnątrzkomórkowej do receptora. Są również słabymi zasadami, więc w środowisku zewnątrzkomórkowym łatwo tworzą formę zjonizowaną i wchodzą w reakcję z aktywnym miejscem receptora. Powstające w ten sposób wiązanie jonowe jest jednak stosunkowo nietrwałe i szybko dochodzi do uwolnienia cząsteczki leku. W efekcie czas działania leku zależy od ilości cząsteczek zdolnych do pobudzenia receptora w jego otoczeniu, jest więc zależny od przyjętej dawki leku [27]. Formoterol różni się od leków krótkodziałających umiarkowaną lipofilnością. Dlatego ta część zainhalowanej dawki, która nie łączy się z receptorem jest gromadzona w obrębie błony komórkowej. Pozostałe cząsteczki leku, podobnie jak w przypadku salbutamolu, szybko aktywują receptor i po krótkim czasie są uwalniane poza aktywne miejsca receptora, jednak dzięki swoistemu „magazynowi" leku w błonie komórkowej kolejne jego cząstki dyfundują do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i tworzą kompleks z receptorem. W ten sposób zapewniony jest szybki początek i długi czas działania leku [99, 100]. Salmeterol, dzięki wysokiej lipofilności jest całkowicie pochłaniany przez błonę komórkową, jego cząsteczki dyfundują w niej, docierając do receptora, przez co wykazuje wolniejszy początek działania. Cząsteczka jego posiada grupę saligeninową, reagującą z miejscem aktywnym receptora oraz długi lipofilny

łańcuch boczny, przez który lek trwale łączy się z nieaktywnym fragmentem receptora (tzw. *exosite*). Taka budowa cząsteczki leku umożliwia pulsacyjny charakter kontaktu z miejscem aktywnym receptora, zapewnia jego trwałość, a więc długi czas działania, pozwala też na równoczesne, doraźne zastosowane preparatów krótkodziałających [101].

I.6. Budowa genu dla receptora β_2-adrenergicznego i jego polimorfizmy

Gen dla ludzkich receptorów β_2-został sklonowany w 1987 [102]. Gen ten przypisano regionowi chromosomu 5q 31-32, obejmuje 1.200 par zasad, nie zawiera intronów (GenBank: M15169), [103].



Ryc. 3. Budowa genu dla receptora β_2-adrenergicznego
Strzałki oznaczają znalezione polimorfizmy; BUP - *beta upstream peptide;*
Gwazdkami (*) oznaczono 2 polimorfizmy w miejscu 46 i 79 badane w niniejszej pracy.
Na podstawie[103]

W 1993 opisano 9 punktowych mutacji w obrębie regionu kodującego tego genu w pozycjach 46,79,100,252,491,523,1053,1098 i 1239 (Ryc. 1) [104], z których cztery, (w pozycji 46A➔G,79C➔G,100G➔A,491C➔T) wywołują zmianę w sekwencji aminokwasów. Trzy z tych punktowych mutacji mają znaczenie czynnościowe, zaś polimorfizmy w pozycji 46 i 79 występują relatywnie często w ogólnej populacji [105]. W tabeli 8 przedstawiono te polimorfizmy i ich proponowany efekt czynnościowy na podstawie badań w wybranych populacjach. Ostatnio odkryto kilka nowych polimorfizmów, przeszukując region zawierający 1470 par zasad w kierunku 5' od miejsca startowego sekwencji kodującej genu. Znaleziono polimorfizmy w następujących pozycjach: -20T➔C, -47T➔C, -367T➔C, -468C➔G, -654G➔A, -1023G➔A, -1343A➔G, -1429T➔A. Jeden z nich (-47 C➔T) indukuje niekonserwatywną zmianę aminokwasów Cys➔ Arg w BUP (*beta upstream peptide*). Badania McGraw i Scotta wykazały jego funkcjonalny wpływ na ekspresję genu [106, 107].

Tabela 8 Wybrane polimorfizmy genu dla receptora β_2-adrenergicznego i ich efekt czynnościowy

Polimorfizm	Pozycja genu	Zmiana aminokwasów	Allel	Efekt czynnościowy	Pozycja piśmiennictwa
A➔G	46	Arg➔Gly w pozycji 16	Arg16	• zwiększona podatność na reagowanie skurczem oskrzeli podczas infekcji	• [108] • [109]
			Gly16	• objawy astmy nocnej	• [86] • [110] • [63]
			Gly16	• ciężka postać astmy	• [86]
			Gly16Gly	• zwiększona wrażliwość na zjawisko desensytyzacji	• [111]
C➔G	79	Gln➔Glu w pozycji 27	Glu27	• zmniejszona reaktywność oskrzeli na prowokację metacholiną	• [112] • [109] • [108]
				• podwyższony poziom IgE	• [113]
G➔A	100	Val➔Met w pozycji 34			
C➔T	491	Thr➔Ile w pozycji 164	Ile164	• zmniejszona zdolność do wiązania ligandu	• [114]

I.6.1. Związki polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego z astmą oskrzelową i alergicznym nieżytem nosa

Znaczenie zmienności genetycznej receptora β_2-adrenergicznego wynika ze stwierdzonych związków między strukturą receptora β_2-adrenergicznego a jego funkcją w hodowlach tkankowych mięśni gładkich oskrzeli [114, 115] i fibroblastach [116]. Badając dwa najczęstsze polimorfizmy receptora β_2-adrenergicznego: Arg16Gly i Gln27Glu zaobserwowano, że in vitro wariant alleliczny Gly16 receptora jest bardziej podatny na desensytyzację niż Arg16. Wariant alleliczny Glu27 zdaje się być mniej wrażliwy na desensytyzację niż Gln27. Ze względu na wyniki uzyskane w badaniach *in vitro,* podjęto próby znalezienia zależności pomiędzy polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego a funkcją tego receptora w badaniach klinicznych.

Z wielu badań populacyjnych wynika, że rozkład polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego w populacji chorych na choroby alergiczne w tym astmę oskrzelową nie różni się od rozkładu w populacji osób zdrowych [63, 86, 108, 110, 117]. Jednak istnieją badania, których autorzy zaobserwowali związek między wystąpieniem astmy oskrzelowej a polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego. [118, 119, 120].

Rozbieżności dotyczą również związku występowania receptora β_2-adrenergicznego z reaktywnością oskrzeli, różnymi fenotypami astmy, czy stężeniem IgE. Hall i wsp. [112] wykazali związek pomiędzy wariantem allelicznym Glu27 receptora β_2-adrenergicznego a zmniejszoną reaktywnością dróg oddechowych, u chorych na astmę na prowokację metacholiną. Dalsze badania przeprowadzone przez D'Amato i wsp. [109] oraz Ramsay [108] potwierdziły związek między wystąpieniem Glu w pozycji 27 a zmniejszoną reaktywnością oskrzeli, a także wykazały istnienie zależności między wystąpieniem Arg w pozycji 16 a zwiększoną podatnością na skurcz oskrzeli, manifestujący się w postaci świstów podczas infekcji dróg oddechowych. Istotnym wnioskiem wynikającym z tych badań było stwierdzenie nierównowagi sprzężeń *(linkage disequilibrium)* pomiędzy polimorfizmem Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego [108].

Liggett w 1995 opublikował [86] wyniki badań dotyczące polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego, z których wynika, że allel Gly16 znacznie częściej występuje u chorych z objawami astmy nocnej (u których pogorszenie czynności płuc i objawy obturacji występują w nocy i godzinach wczesnorannych) w porównaniu do chorych, którzy nie mają nocnych objawów astmy. Kolejne badania przeprowadzone w 1997 roku potwierdziły tę zależność [110]. Podobne wyniki dotyczące występowania wariantu allelicznego Gly16 a objawami astmy nocnej uzyskali Turki i wsp. [63].

Badania Liggeta wykazały również zależność pomiędzy występowaniem wariantu Gly16 a ciężką postacią astmy (astma sterydozależna) [86], natomiast Turki i wsp. [63] oraz Weir i wsp. [121] nie wykazali zależności między wariantem Gly16 a ciężką postacią choroby, jaką jest astma sterydozależna.

Badania dotyczyły również związków polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu z całkowitym stężeniem IgE we krwi obwodowej jako wskaźnikiem alergicznego procesu zapalnego toczącego się w organizmie. Dewar i wsp. stwierdzili istnienie związku pomiędzy podwyższonym całkowitym stężeniem IgE, a występowaniem wariantu Glu w pozycji 27 u osób z „ rodzin astmatycznych" (multiplex families) [113]. Kowalski i wsp. potwierdzili związek polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego z występowaniem podwyższonego stężenia IgE całkowitego [122]. Z kolei badania Ramsay nie potwierdziły występowania związku pomiędzy polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego a stężeniem IgE [108], podobnie jak badania Dewara [117] i Deichmana [123].

W wielu pracach analizowano zagadnienie występowania związków pomiędzy polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego a odpowiedzią na leczenie krótko i długo-działającymi β_2-sympatykomimetykami [111, 124, 125, 126]. Pierwsze badania kliniczne przedstawiające zależność pomiędzy polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego, a odpowiedzią układu oddechowego na zastosowane leczenie β_2-sympatykomimetykiem (formoterol), zostały przeprowadzone przez Tan i wsp. i opublikowane w 1997 [111]. Wyniki tych badań sugerują, że polimorfizm receptora β_2-adrenergicznego może wiązać się ze zmienioną ekspresją tego receptora u chorych na astmę i objawia się obniżoną wrażliwością na działanie bronchodilatacyjne po poprzedniej ekspozycji na długo-działające β_2-sympatykomimetyki. Z kolei Martinez i wsp. zaobserwowali związek pomiędzy polimorfizmem Arg16Gly receptora β_2-adrenergicznego a odpowiedzią na krótkodziałający β_2-sympatykomimetyk (salbutamol) [124], a ich obserwacje potwierdziły badania Limy i wsp.[127]. Zjawiskiem zmniejszenia wrażliwości receptora na skutek przewlekłego stosowania długodziałających β_2-sympatykomimetyków zajęła się również grupa badaczy pod kierownictwem Hancoxa. U pacjentów wykazujących wariant Gly16Gly nie obserwowano zwiększonej odpowiedzi na metacholinę w teście prowokacyjnym, podczas długotrwałego stosowania β_2-sympatykomimetyków. Pacjenci z wariantem Glu27 reagowali zwiększeniem wieczornego PEF podczas terapii [125].

Z kolei Israel i wsp.w badaniach opublikowanych w roku 2000 stwierdzili, że pacjenci regularnie stosujący albuterol i posiadający wariant Arg16Arg receptora β_2-adrenergicznego, wykazują niższy poranny pomiar PEF niż stosujący albuterol „na żądanie" [128]. Aziz i wsp. [129] zaobserwowali, że polimorfizm Arg16Gly i Gln27Glu β_2- adrenoreceptora nie wpływa na FEV1 w trakcie stosowania formoterolu. Nie wpływał on także na rozmieszczenie β_2-adrenoreceptorów na limfocytach krwi obwodowej badanych pacjentów. Podobne wyniki uzyskali autorzy powyższej pracy w badaniach na większej populacji [126].

W populacji polskiej badania dotyczące związku polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego, z astmą oskrzelową i alergicznym nieżytem nosa prowadził zespół profesora Kowalskiego [82], natomiast badania związku między otyłością a polimorfizmem tego receptora były prowadzone przez zespół pod kierunkiem profesor Dembińskiej-Kieć [130, 131].

I.7. Podsumowanie

Wyniki badań, prowadzone na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat, dotyczące polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego są niejednoznaczne. Z jednych badań wynika, że polimorfizmy mogą mieć wpływ na rozwój astmy oskrzelowej [118, 119], występowanie różnych postaci astmy, [86, 110] oraz na przebieg i skuteczność leczenia choroby [111, 124, 125], inni badacze nie potwierdzają zależności pomiędzy wystąpieniem astmy a analizowanym polimorfizmem [63, 86, 108, 110, 117, 126, 129]. Rozbieżności te mogą wynikać z różnic genetycznnych między badanymi populacjami. Istnieją prace sugerujące występowanie związku pomiędzy polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego a poziomem IgE w surowicy i nadreaktywnością oskrzeli [113, 132]. Jak można wyjaśnić istnienie tego związku, zakładając, że jest on prawdziwy?

Po pierwsze: być może jest to przypadkowa zależność. Po drugie: polimorfizm receptora β_2-adrenergicznego może pozostawać w nierównowadze sprzężeń z innym miejscem na chromosomie 5 odpowiedzialnym za kontrolę poziomu IgE oraz nadreaktywność oskrzeli [133, 134]. To wyjaśnienie zdaje się być bardziej prawdopodobne. Drugi kierunek badań nad polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego poświęcony był zagadnieniom wpływu polimorfizmu receptora β_2-adrenergicznego na odpowiedź na stosowane leczenie. Założywszy, że krążące lub podane egzogennie katecholaminy lub β_2-agoniści wpływają na ekspresję receptora β_2-adrenergicznego w drogach oddechowych, można się spodziewać, że największy efekt kliniczny tych polimorfizmów zaobserwujemy po przewlekłym podawaniu β_2-sympatykomimetyków. Obserwacje prowadzone w grupie pacjentów przewlekle stosujących leki β_2-adrenergiczne [127] potwierdzają tę zależność. Zagadnienie zmienności genu dla receptora β_2-adrenergicznego, jego związku z rozwojem astmy oraz innych chorób alergicznych w tym alergicznego nieżytu nosa, kształtowanie poszczególnych fenotypów choroby i odpowiedzi na zastosowane leczenie wymaga dalszych badań.

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa należą do najczęściej wystepujących chorób przewlekłych współczesnej cywilizacji a prognozy przewidują ich dalszy wzrost.

Osiągnięcia współczesnej genetyki umożliwiają identyfikację genów predysponujących do rozwoju chorób alergicznych, ich wzajemnych interakcji, określenie występowania zmienności w obrębie genów oraz oddziaływania gen-środowisko. Jednym z kluczowych genów, który może być związany z regulacją funkcji płuc w astmie oskrzelowej i alergicznym nieżycie nosa wydaje się być gen kodujący receptor β_2-adrenergiczny. Zbadanie związku pomiędzy zmiennością genu receptora β_2-adrenergicznego a czynnością układu oddechowego i obrazem klinicznym astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa wydaje się uzasadnione.

Praca ma na celu:

1. Porównanie częstości występowania, a także określenie wzajemnych interakcji polimorfizmów genetycznych receptora β_2-adrenergicznego w grupach chorych na astmę oskrzelową i alergiczny nieżyt nosa oraz w grupie kontrolnej bez chorób alergicznych.
2. Ocenę związku polimorfizmów genetycznych receptora β_2-adrenergicznego z czynnością układu oddechowego w badaniach spirometrycznych.
3. Określenie związku pomiędzy całkowitym stężeniem IgE a zmiennością genetyczną receptora β_2-adrenergicznego.
4. Analizę związku polimorfizmów genetycznych receptora β_2-adrenergicznego z obrazem klinicznym astmy oskrzelowej.

Badanie dotyczyło wybranych polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego w pozycji 16 i 27, gdyż z dostępnej literatury wynika, że polimorfizmy te mają potencjalny wpływ na jego funkcję i występują relatywnie często w poszczególnych populacjach.

III. MATERIAŁ I METODYKA

III.1. Grupa chorych i grupa kontrolna

Badania przeprowadzono w grupie 142 chorych na astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa leczonych w Poradni Alergologicznej Szpitala Specjalistycznego im. Józefa Dietla w Krakowie oraz w Poradni Alergologicznej-Małopolski Zespół Przychodni Specjalistycznych oraz u osób zdrowych, bez chorób alergicznych, stanowiących grupę kontrolną.

Grupę chorych podzielono na następujące podgrupy:

Grupa I: pacjenci chorujący na astmę oskrzelową-46 osób
Grupa II: pacjenci chorujący na astmę oskrzelową i alergiczny nieżyt nosa-58 osób
Grupa III: pacjenci chorujący na alergiczny nieżyt nosa bez astmy oskrzelowej-38 osób

Grupa kontrolna została określona jako Grupa IV i stanowiły ją: 62 osoby - zdrowi ochotnicy, pracownicy Szpitala Specjalistycznego im. J. Dietla oraz studenci, u których wykluczono schorzenia alergiczne na podstawie wywiadu, badania fizykalnego, alergicznych testów skórnych oraz badania spirometrycznego.

III.2. Protokół badania

Do badania włączano osoby pomiędzy 18 a 70 rokiem życia. Chorzy włączeni do badań nie byli leczeni doustnymi lub parenteralnymi preparatami steroidowymi przez okres 3 miesięcy oraz nie stosowali wziewnych β_2-sympatykomimetyków krótkodziałających przez co najmniej 8 godzin przed wykonaniem spirometrii, β_2-sympatykomimetyków długodziałających przez co najmniej 24 godziny przed badaniem i wziewnych preparatów glikokortykosteroidowych przez co najmniej 24 godziny poprzedzające badanie.

Chorzy włączeni do badań nie byli poddawani immunoterapii.

Przed wykonaniem alergicznych testów skórnych odstawiono na okres co najmniej trzech tygodni leki antyhistaminowe.

W dniu badania u chorych został przeprowadzone następujące procedury:

- szczegółowy wywiad lekarski i środowiskowy według opracowanego kwestionariusza,
- badanie fizykalne i ocena stanu klinicznego,
- testy skórne,
- badanie czynności układu oddechowego,
- pobranie krwi do oznaczenia:
    - morfologii z rozmazem,
    - stężenia IgE całkowitego,
    - wykonania badań genetycznych.

Przed przystąpieniem do badań uczestnicy uzyskiwali szczegółową informację na temat ich celu i przebiegu oraz uzyskiwano pisemną zgodę na udział w badaniach, również zgodę na badanie genetyczne. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

III.3. Testy skórne

U chorych i w grupie kontrolnej wykonywano testy skórne punktowe przy użyciu standaryzowanych ekstraktów alergenowych (*Allergopharma)*.
Metoda wykonania testów była zgodna z zaleceniami Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej [135, 136].
Do badań użyto następujących ekstraktów alergenowych:

- kurz sienny
- roztocza kurzu domowego *D. pteronyssimus*
- roztocza kurzu domowego *D. farinae*
- pierze
- pleśnie I
- pleśnie II
- pyłki traw
- drzewa I
- drzewa II
- chwasty

Roztwory do testów punktowych były standaryzowane w jednostkach biologicznych (BU). Jako płyn kontrolny stosowano roztwór 0,9% NaCl z rozpuszczalnikiem, natomiast dodatnią kontrolę stanowił 0,1% roztwór *Histaminum dihydrochloricum* w soli fizjologicznej.
Testy skórne wykonywano na powierzchni dłoniowej przedramienia. Powierzchniową warstwę skóry nakłuwano przez nałożoną wcześniej kroplę roztworu alergenu za pomocą lancetu pod kątem 60 stopni. Odczytywano próbę dodatnią z histaminą (po 5 i 15 minutach), a po 15minutach pozostałe próby i określano w mm średnicę bąbla i rumienia.

III.4. Badanie czynności układu oddechowego

U wszystkich chorych i w grupie kontrolnej wykonano badanie czynności układu oddechowego za pomocą spirometru *abc PNEUMO* (*abcMED*), sterowanego komputerem zgodnym ze standardem IBM PC, poddawanym codziennej kalibracji.

Przed wykonaniem badania pacjenci stosujący leki wziewne byli proszeni o niestosowanie β_2-sympatykomimetyków długodziałających przez co najmniej 24 godziny poprzedzających badanie, β_2-sympatykomimetyków krótkodziałających przez co najmniej 8 godzin przed badaniem oraz wziewnych preparatów steroidowych przez co najmniej 24 godziny. Badanie wykonano zgodnie z obowiązującymi standardami [137, 138].

Analizowano następujące parametry czynności oddechowej:

- FEV1 - natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa,
- VC - pojemność życiowa płuc,
- FVCEx - forsowna wydechowa pojemność życiowa płuc,
- FEV1%VC - wskaźnik Tiffeneau - stosunek procentowy natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej do aktualnej spoczynkowej pojemności życiowej płuc,
- MEF25- maksymalny przepływ wydechowy na poziomie 25% natężonej pojemności życiowej (w momencie, gdy do końca forsownego wydechu pozostało jeszcze 25%FVC),
- MEF50- maksymalny przepływ wydechowy na poziomie 50% natężonej pojemności życiowej (w momencie, gdy do końca forsownego wydechu pozostało jeszcze 50%FVC),
- PEF- szczytowy przepływ wydechowy .

Zgodnie z zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Pulmonologicznego badanie wykonywano trzykrotnie i brano pod uwagę najwyższe wartości. Należne wartości parametrów czynnościowych układu oddechowego obliczano komputerowo uwzględniając płeć, wiek, wzrost oraz ciężar ciała na podstawie normogramów opracowanych przez European Community for Steel and Coal. W przypadku wartości parametrów oddechowych <80% wartości należnej, wykonywano próbę rozkurczową oskrzeli po podaniu wziewnym krótkodziałającego β_2-sympatykomimetyku.

Po wykonaniu podstawowego badania spirometrycznego, podawano krótkodziałający β_2-sympatykomimetyk (2 wziewy preparatu Ventolin a 0,01mg/dawkę), a po 15 minutach ponownie wykonano badanie spirometryczne.

Różnicę między wartościami spirometrycznymi przed i po podaniu leku obliczano według następującej proporcji:

FEV1 przed podaniem leku − 100%

FEV1 po podaniu leku − x%

Wartość odwracalności przedstawiono jako procent powyżej 100.

III.5. Pomiar całkowitego stężenia IgE w surowicy

Pomiaru dokonywano metodą nefelometryczną przy pomocy nefelometru *DADE BEHRING* BN II (*Behring*), z zastosowaniem standardowych odczynników.

Pomiary oznaczano w IU/ml. Dolna granica oznaczalności pomiarów wynosiła 18 IU/ml.

III.6. Badanie polimorfizmów genetycznych receptora β_2-adrenergicznego

Poddano analizie dwa polimorfizmy genetyczne receptora β_2-adrenergicznego występujące w pozycji 16 i 27. Zastosowano metodę analizy polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych-RFLP.

III.6.1 Izolacja DNA z krwi obwodowej badanych osób

Pobierano 2x9 ml krwi żylnej do probówek zawierających EDTA (końcowe stężenie 0,01M), następnie wirowano przez 10 min przy prędkości 4000 obrotów na minutę. Warstwę leukocytów pobierano do sterylnych probówek i zamrażano w temp. -80ºC do dalszej analizy. DNA izolowano przy użyciu zestawu kolumn do oczyszczania DNA: *QIAmp DNA Blood Mini kit* (*QIAGEN*, Niemcy), zgodnie z metodyką zalecaną przez producenta. Stężenie DNA (2,5 µl DNA w 500 µl wody destylowanej) oceniano metodą spektofotometryczną przy długości fali 260/280. Czystość próbki oceniano na podstawie stosunku A260/A280.

III.6.2. Amplifikacja fragmentu DNA

Celem amplifikacji (powielania) określonego fragmentu DNA, wykorzystano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Startery użyte do zapoczątkowania reakcji były następujące:

- dla kodonu 16 (B_2AR16) - starter z sekwencji kodującej (sensowny) 5'-CTT CTT GCT GGC ACG CAAT-3' i z sekwencji komplementarnej (antysensowny) 5'-CCA GTG AAG TGA TGA AGT AGT TGG-3',
- dla kodonu 27 (B_2AR27) starter z sekwencji kodującej 5'-GGC CCA TGA CCA GAT CAG CA-3' i z sekwencji komplementarnej 5'-GAA TGA GGC TTC CAG GCG TC-3'

Reakcja PCR była wykonana przy pomocy aparatu *T3 Thermocycler* (*Biometra*). Do obu reakcji użyto: 1µl DNA o stężeniu 50ng/µl,0,5 µl starteru sensownego i 0,5 µl antysensownego, 1 µl mieszaniny dezoksytrójfosforanów nukleozydów (dNTP), 0,5 µl odczynnika HOT START; 2,5 µl buforu oraz 19 µl wody destylowanej.

Warunki reakcji dla B_2AR16 były następujące: rozpoczynano od denaturacji (95ºC) -15 minut, przeprowadzano 35 cykli (denaturacja 95ºC - 30sekund; przyleganie 56ºC - 30 sekund; elongacja 72ºC - 40sekund) i końcową,10-minutową elongację w temperaturze 72ºC. Warunki reakcji dla B_2AR27: rozpoczynano od denaturacji (95ºC) - 15 minut, przeprowadzano 38 cykli (denaturacja 95ºC - 30 sekund; przyleganie 60ºC - 30 sekund; elongacja 72ºC - 40 sekund) i końcową 10-minutową elongację w temperaturze 72ºC. Następnie przeprowadzono elektroforezę otrzymanego produktu celem potwierdzenia prawidłowej amplifikacji, w żelu agarozowym 2% barwionym bromkiem etydyny (1 mg/ml) w buforze 1xTBE (54gTris BASE; 27,5 g kwasu borowego,20 ml 0,5M roztworu wersenianu disodowego o pH 8,0 - do elektroforezy rozcieńczany 5x) z buforem obciążającym (0,25% błękit bromofenolowy,40% roztwór wodnej sacharozy) w polu elektrycznym o napięciu 110V. Wielkość produktu amplifikacji dla B_2AR16 wynosiła 201 par zasad, dla B_2AR27 - 353 par zasad.

III.6.3. Trawienie przy pomocy enzymów restrykcyjnych.

B_2AR16: do trawienia został użyty enzym restrykcyjny: *Bse*MI (*Bsr*DI) (*MBI Fermentas*). Warunki reakcji były następujące: użyto 10 µl produktu PCR, 2 µl buforu (dostarczonego przez firmę), 0,5 µl enzymu,7,5 µl wody destylowanej, następnie inkubowano przez godzinę w temperaturze 60ºC.

B_2AR27: do trawienia został użyty enzym restrykcyjny: *Sat*I (*Fnu*4HI) (*MBI Fermentas*).

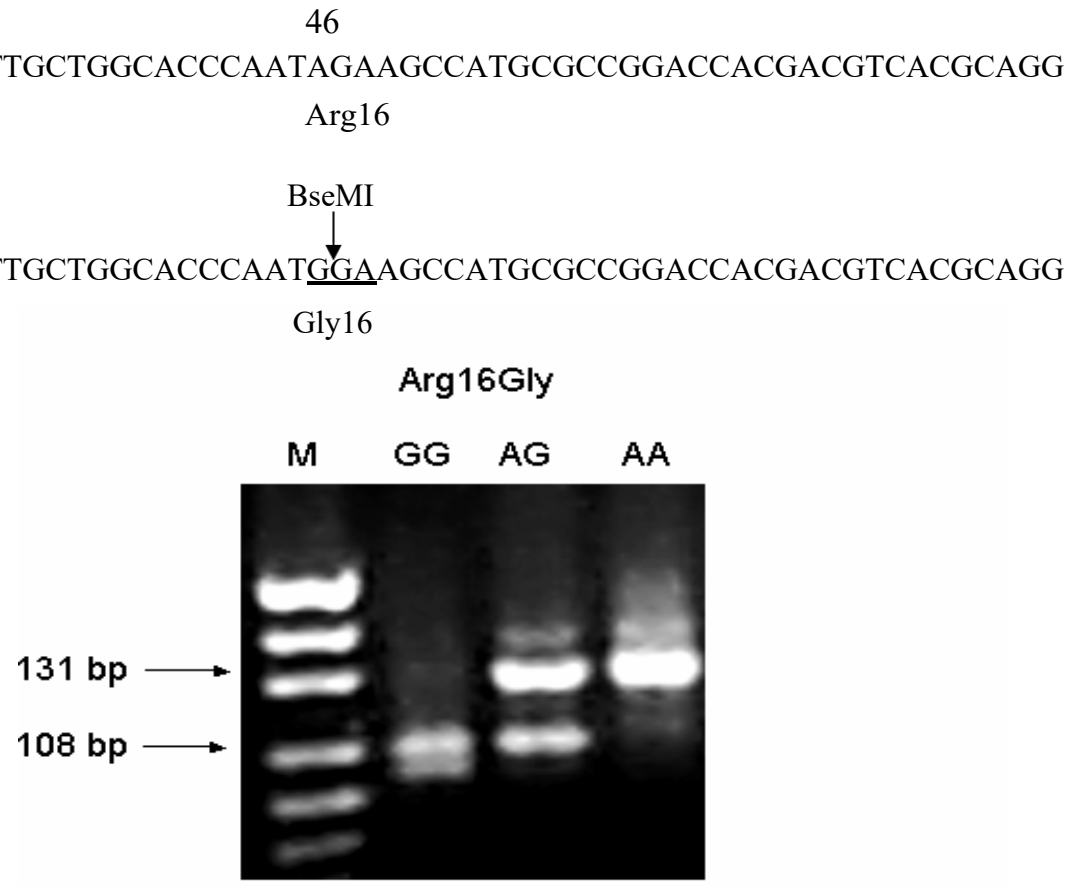
Warunki reakcji były następujące: użyto 10 µl produktu PCR, 2 µl buforu, 0,5 µl enzymu, 7,5 µl wody destylowanej, następnie inkubowano przez godzinę w temperaturze 37ºC.

III.6.4. Elektroforeza produktów trawienia

Elektroforezę wykonywano w 3% żelu agarozowym z bromkiem etydyny (1mg/ml), w polu elektrycznym o napięciu 110V, następnie fotografowano produkt w świetle UV.

Wielkość uzyskanych fragmentów była następująca:

B_2AR16: 14,56,131 par zasad dla Arg16Arg (AA), 14, 23, 56, 108, 131 par zasad dla Arg16Gly (AG), 14, 23, 56, 108 par zasad dla Gly16Gly (GG)



Ryc. 4. Identyfikacja polimorfizmu A46G
Produkt reakcji PCR składający się z 201pz trawiono enzymem BSeMI.
Obecność allelu G wytwarza sekwencję rozpoznawaną przez enzym prowadząc do cięcia produktu PCR na kilka fragmentów, które różnicowano w żelu agarozowym. Homozygota AA (obecność fragmentu 131pz), homozygota GG (obecność fragmentu 108pz) heterozygota AG (obecność 131pz i 108pz), M-wzorzec masy molekularnej.

B_2AR27: 27,55,97,174 par zasad dla Gln27Gln (CC), 27, 55, 97, 174, 229 par zasad dla Gln27Glu (CG), 27, 97, 229 par zasad dla Glu27Glu (GG).

79

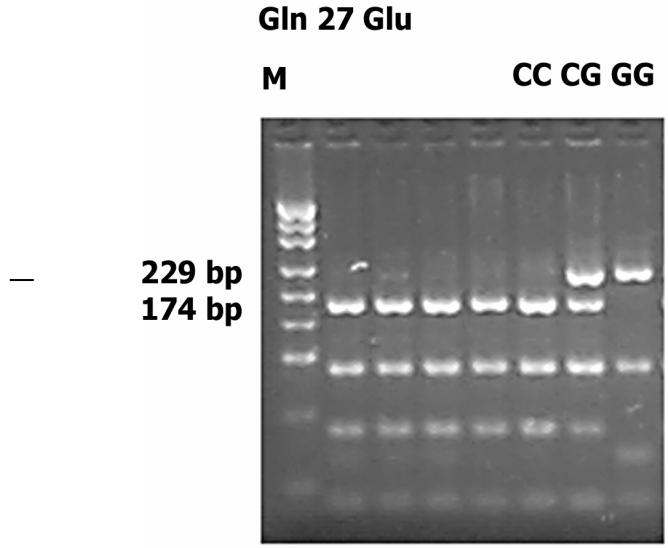
GGCTTCCAGGCGTCCGCTCGCGGCCCGCAGAGCCCCGCCGTGGGTCCGCCCGC

Gln27

SatI

GGCTTCCAGGCGTCCGCTCGCGGCCCGGAGAGCCCCGCCGTGGGTCCGCCCGC

Glu27



Ryc. 5. Identyfikacja polimorfizmu C79G

Produkt reakcji PCR składający się z 353pz trawiono enzymem SatI. Obecność allelu G wytwarza sekwencję rozpoznawaną przez enzym. Homozygota CC (identyfikacja przez fragment 174pz), homozygota GG (identyfikacja przez fragment 229pz), heterozygota CG (obecność 174pz i 229pz), M - wzorzec masy molekularnej.

Identyfikację poszczególnych genotypów przeprowadzało 2 niezależnych obserwatorów. Dla celów powyższej pracy przyjęto następujące nazewnictwo: polimorfizm A-G w pozycji 46 (A46G) kodonu oznacza zamianę adeniny na guaninę; wynika z tego zamiana aminokwasu argininy na glicynę w pozycji 16, został oznaczony jako Arg16Gly;

Allel A w pozycji 46 w pracy - oznaczono jako Arg16

Allel G w pozycji 46 w opracy - oznaczono jako Gly16

Arg16Arg - oznacza homozygotę Arg w pozycji 16, Arg16Gly - oznacza heterozygotę w pozycji 16, Gly16Gly - oznacza homozygotę Gly w pozycji 16.

Polimorfizm C-G w pozycji 79 kodonu (C79G) oznacza zamianę cytozyny na guaninę, determinuje zmianę aminokwasów: glutaminy na kwas glutaminowy w pozycji 27, został oznaczony jako Gln27Glu.

Allel C w pozycji 79 w pracy oznaczono jako Gln27

Allel G w pozycji 79 w pracy oznaczono jako Glu27

Gln27Gln - oznacza homozygotę Gln w pozycji 27, Gln27Glu - oznacza heterozygotę w pozycji 27, Glu27Glu - oznacza homozygotę Glu w pozycji 27.

III.7. Opracowanie statystyczne wyników

Analizę statystyczną zebranego materiału, ze względu na rodzaj zmiennych oraz rozkłady zmiennych jakościowych, oparto na tetstach nieparametrycznych.
Porównania częstości występowania danych skategoryzowanych w badanych grupach przeprowadzano:

- testem niezależności $\chi 2$ lub w przypadku małych wartości oczekiwanych $\chi 2$ z poprawką Yatesa,
- testem jednostronnym Fischera dokładnym,
- testem jednostronnym frakcji.

Występowanie różnic pomiędzy badanymi grupami i podgrupami w zakresie zmiennych ilościowych (np. parametry spirometryczne) testowano:

- testem Manna-Whitneya w przypadku porównywania 2 grup ze sobą
- testem Kruskal-Wallisa gdy porównywano więcej niż 2 grupy ze sobą.

W zakresie metod wielowymiarowych zastosowano analizę wariancji (ANOVA).
Przeprowadzono również meta analizę obliczając iloraz szans (OR) z 95% przedziałem ufności dla określenia ryzyka występowania astmy i powikłań związanych z konfiguracją poszczególnych alleli, genotypów i diplotypów.
Za statystycznie znamienne przyjmowano $p=0,05$.
Analizę statystyczną przeprowadzono wykorzystując pakiet Statistica 6.0.
Dla celów metaanalizy zastosowano pakiet StatsDirect 2.1.

IV. WYNIKI

IV.1. Charakterystyka badanych

Zbadano grupę 142 chorych na astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa, leczonych w Poradni Alergologicznej Szpitala Specjalistycznego im. Józefa Dietla w Krakowie oraz w Poradni Alergologicznej-Małopolski Zespół Przychodni Specjalistycznych przy ulicy Dunajewskiego 5.

Grupę kontrolną stanowiło 62 zdrowych ochotników, u których na podstawie wywiadu, badania fizykalnego, badań czynnościowych płuc oraz testów skórnych w przypadkach wątpliwych, wykluczono schorzenie alergiczne.

W grupie chorych było 77 kobiet (54,2%) oraz 65 mężczyzn (45,8%), w wieku od 17 do 70 lat (średnio 34,7± 13,9).

Wśród badanych u 104 osób stwierdzono astmę oskrzelową (73,2%) o różnym stopniu ciężkości: astma sporadyczna występowała u 7 osób (4,9%), astma lekka u 60 osób (42,3%), astma umiarkowana u 26 (18,3%), a astmę ciężką stwierdzono u 15 osób (10,6%).

U 96 osób występował alergiczny nieżyt nosa (67,6%).

Badanym wykonano punktowe testy skórne z wybranymi alergenami wziewnymi, stwierdzono dodatni wynik testów u 99 osób (71,7%), wśród nich uczulenie na na pyłki traw wykazano u 89 osób (62,7%), na pyłki drzew u 83 osób (58,5%), na pyłki chwastów u 75 osób (52,8%) oraz na kurz i roztocza kurzu domowego (*D. pteronyssimus i D. farinae)* u 87 osób (61,3%).

Dodatni wywiad rodzinny w kierunku astmy oskrzelowej podawało 44 pacjentów (31,2%), a w kierunku alergicznego nieżytu nosa 32 pacjentów (22,5%).

W grupie chorych palący stanowili 32,6% - 46 osób.

Test odwracalności oskrzeli po podaniu wziewnego β_2-sympatykomimetyku wykonano u 102 pacjentów, co stanowi 71,8% badanych. Wynik dodatni testu odwracalności (za kryterium odwracalności przyjęto zmianę o co najmniej 200ml i FEV1>12%), zaobserwowano u 81 pacjentów, co stanowi 79,4% z grupy, u której wykonano test.

Następnie przeprowadzono charakterystykę chorych w poszczególnych podgrupach.

Na astmę oskrzelową (z wyłączeniam ANN) chorowało 46 osób, w tym 33 (71,7%) kobiety i 13 (28,3%) mężczyzn, palący-13 osób stanowili 28,3%. Dodatni wywiad rodzinny w kierunku astmy podało 16 osób, a w kierunku ANN-7 osób. Dodatni wynik testów skórnych stwierdzono u 4 osób (9,5%).

Na astmę oskrzelową z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa chorowało 58 osób, 29 kobiet i 29 mężczyzn, palący-22 osoby stanowili 37,9%. Dodatni wywiad rodzinny w kierunku astmy podało 22 osoby, a w kierunku ANN 17 osób. Dodatni wynik testów skórnych stwierdzono u 58 osób.

Grupę chorych na alergiczny nieżyt nosa stanowiło 38 osób, w tym 15 kobiet (39,5%) oraz 23 (60,5%) mężczyzn. Palących było 11 osób (28,9%). Dodatni wywiad rodzinny w kierunku astmy podało 6 osób, a w kierunku ANN 8 osób. Dodatni wynik testów skórnych stwierdzono u wszystkich badanych.

Grupę kontrolną stanowiło 62 zdrowych ochotników, u których na podstawie wywiadu i badania fizykalnego wykluczono choroby alergiczne. U tych osób wykonano punktowe testy skórne oraz badanie spirometryczne.

W grupie kontrolnej było 28 kobiet (45,2%) i 34 mężczyzn (54,8%), w wieku od 16 do 58 lat średnio 32,3 ± 10,4 co było porównywalne z grupą badaną.

W grupie kontrolnej osób palących było 19, co stanowiło 30,6%, podobnie jak w badanej. W tabelach 9 i 10 przedstawiono charakterystykę grupy chorych i grupy kontrolnej.

Tabela 9. Charakterystyka badanych

Cecha	Grupa chorych	Grupa kontrolna	P
Liczba	142	62	
Wiek (lata) x± SD (min – max)	34,7 ± 13,9 (17 – 70)	32,3 ± 10,4 (16 – 58)	NS
Płeć: Kobiety n (%)	77 (54,2%)	28 (45,2%)	NS
Mężczyźni n (%)	65 (45,8%)	34 (54,8%)	
Palący n (%)	46 (32,6%)	19 (30,6%)	NS
Czas palenia (lata) x± SD (min–max)	11,5 ± 9,5 (1 – 30)	4,5 ± 2,5 (1 – 10)	p<0,001
Liczba papierosów/dz. x± SD (min – max)	13 ± 9 (1 – 40)	4 ± 4 (1 – 20)	p<0,001
Astma oskrzelowa n (%)	104 (73,2%)	0	p<0,001
Stopień ciężkości astmy		nie dotyczy	
0 n (%)	34 (23,9%)	--	
1 n (%)	7 (4,9%)	--	
2 n (%)	60 (42,3%)	--	
3 n (%)	26 (18,3%)	--	
4 n (%)	15 (10,6%)	--	
Alergiczny nieżyt nosa n (%)	96 (67,6%)	0	p<0,001
Wywiad rodzinny:			
Dodatni astma n (%)	44 (31,2%)	0	p<0,001
Dodatni ANN n (%)	32 (22,5%)	0	p<0,001
Objawy zgłaszane			
Napadowy suchy kaszel n (%)	98 (69,0%)	0	p<0,001
Świszczący oddech n (%)	92 (64,8%)	0	p<0,001
Duszność nocna n (%)	86 (60,6%)	0	p<0,001
Testy skórne dodatnie (%)	99 (71,7%)	0	p<0,001
Pyłki traw n (%)	89 (62,7%)	0	p<0,001
Pyłki drzew n (%)	83 (58,5%)	0	p<0,001
Pyłki chwastów n (%)	75 (52,8%)	0	p<0,001
Kurz domowy+roztocza n (%)	87 (61,3%)	0	p<0,001
Wykonany test odwracalności n (%)	102 (71,8%)	0	
Wynik dodatni n (%)	81 (79,4%)	0	

Tabela 10. Charakterystyka kliniczna poszczególnych podgrup badanych.

Cecha	I. Astma	II. Astma+ANN	III. ANN
Liczba	46	58	38
Wiek (lata) x± SD (min – max)	40,6 ± 17,0 (19 – 70)	33,9 ± 12,7 (17 – 70)	28,9 ± 7,6 (17 – 49)
Płeć: Kobiety n (%)	33 (71,7%)	29 (50%)	15 (39,5%)
Mężczyźni n (%)	13 (28,3%)	29 (50%)	23 (60,5%)
Palący n (%))	13 (28,9%)	22 (37,9%)	11 (28,9%)
Czas palenia (lata) x± SD (min – max)	15,0 ± 10,3 (1 – 30)	10,2 ± 9,5 (1 – 30)	10,2 ± 7,8 (2 – 25)
Liczba papierosów/dz.x± SD (min – max)	15 ± 9 (5 – 40)	13 ± 7 (1 – 20)	11 ± 11 (1 – 40)
Astma oskrzelowa n (%)	46 (100%)	58 (100%)	
Stopień ciężkości astmy			
0 n (%)	0	0	38 (100%)
1 n (%)	1 (2,2%)	3 (5,2%)	0
2 n (%)	22 (47,8%)	37 (63,8%)	0
3 n (%)	12 (26,1%)	14 (24,1%)	0
4 n (%)	11 (23,9%)	4 (6,9%)	0
Alergiczny nieżyt nosa n (%)	0	58 (100%)	38 (100%)
Wywiad rodzinny:			
Dodatni astma n (%)	16 (34,8%)	22 (37,9%)	6 (15,8%)
Dodatni ANN n (%)	7 (15,2%)	17 (29,3%)	8 (21,1%)
Objawy zgłaszane			
Napadowy suchy kaszel (%)	44 (95,7%)	48 (2,8%)	6 (15,8%)
Świszczący oddech n (%)	38 (82,6%)	49 (84,5%)	5 (13,2%)
Duszność nocna n (%)	33 (71,7%)	49 (84,5%)	4 (10,5%)
Testy skórne dodatnie (%) :	4 (9,5%)	58 (100%)	38 (100%)
Pyłki traw n (%)	8 (17,4%)	51 (87,9%)	29 (76,3%)
Pyłki drzew n (%)	6 (13,0%)	48 (82,7%)	29 (76,3%)
Pyłki chwastów n (%)	8 (17,4%)	48 (82,7%)	29 (76,3%)
Kurz dom. i roztocza n (%)	4 (8,7%)	44 (75,8%)	27 (71,0%)

IV.2. Rozkłady genotypowe i alleliczne polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego

Przeprowadzono analizę częstości występowania poszczególnych alleli polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu w grupie chorych i porównano wyniki z rozkładem częstości w grupie kontrolnej. Dla polimorfizmu Arg16Gly, w grupie chorych, allel Arg16 występował z częstością 0,331, a allel Gly16 odpowiednio 0,0669. Wśród 142 osób w badanej grupie, u 10 stwierdzono genotyp Arg16Arg, 74 osoby były heterozygotami Arg16Gly a u 58 stwierdzono genotyp Gly16Gly. Częstości genotypowe i alleliczne nie różniły się w sposób istotny statystycznie od grupy kontrolnej, w której allel Arg16 występował z częstością 0,0315, allel Gly16 z częstością 0,685. W grupie kontrolnej genotyp Arg16Arg stwierdzono u 1 osoby, 37osób było heterozygotami Arg16Gly, a 24 osoby homozygotami Gly16Gly.

Analizując rozkłady genotypowe i alleliczne dla polimorfizmu Gln27Glu stwierdzono występowanie allelu Gln27 w grupie chorych z częstością 0,518, a allelu Glu27 z częstością 0,482. Stwierdzono występowanie genotypu Gln27Gln u 44 osób, 59 osób było heterozygotami Gln27Glu, 39 osób było homozygotami Glu27Glu. Rozkłady częstości nie różniły się w sposób istotny statystycznie od grupy kontrolnej, w której allel Gln27 występował z częstością 0,567, a allel Glu27-0,433. Zaobserwowano genotyp Gln27Gln u 22 osób, genotyp Gln27Glu u 28 osób, a 12 osób było homozygotami Glu27Glu. Wyniki przedstawiono w tabeli 11 i 12.

Tabela 11. Częstość występowania poszczególnych alleli w grupie chorych i grupie kontrolnej.OR- iloraz szans, CI - przedział ufności, p - poziom istotności, NS-nieistotne statystycznie, wartości oznaczają liczbę alleli, w nawiasach podano częstość alleli.

Allel	Grupa chorych	Grupa kontrolna	p	OR (95%CI)
Arg16	94 (33,1%)	39 (31,5%)	NS	1,1 (0,7 – 1,7)
Gly16	190 (66,9%)	85 (68,5%)	NS	0,9 (0,6 – 1,5)
Gln27	147 (51,8%)	68 (56,7%)	NS	0,9 (0,6 – 1,4)
Glu27	137 (48,2%)	52 (43,3%)	NS	1,3 (0,8 – 2,1)

Tabela 12. Rozkład genotypów w grupie chorych i kontrolnej
n -liczba badanych, p - poziom istotności

Genotyp	Grupa chorych (n=142)	Grupa kontrolna (n=62)	P
Arg16Arg	10 (7,0%)	1 (1,6%)	0,102
Arg16Gly	74 (52,1%)	37 (59,7%)	0,176
Gly16Gly	58 (40,8%)	24 (38,7%)	0,479
Gln27Gln	44 (31,0%)	22 (35,5%	0,318
Gln27Glu	59 (41,5%)	28 (45,2%)	0,371
Glu27Glu	39 (27,5%)	12 (19,4%)	0,145

Uwzględniając podział na podgrupy, przeprowadzono analizę rozkładów genotypowych i allelicznych. Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi podgrupami chorych na astmę oskrzelową (Astma), z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa(Astma+ANN), lub u chorych na alergiczny nieżyt nosa bez astmy (ANN), a wyniki przedstawiono w tabelach 13 i 14

Tabela 13. Częstość występowania poszczególnych alleli w podgrupach badanych
p - poziom istotności, NS-nieistotne statystycznie,wartości oznaczają liczbę alleli, w nawiasach podano częstość alleli.

Allel	I. Astma	II. Astma+ANN	III. ANN	IV. Kontrola	P
Arg16	32 (42,7%)	31 (36,9%)	21 (36,8%)	38 (38,4%)	NS
Gly16	43 (57,3%)	53 (63,1%)	36 (64,2%)	61 (61,6%)	
Gln27	14 (58,3%)	17 (47,2%)	13 (56,5%)	22 (64,7%)	NS
Glu27	10 (41,7%)	19 (52,8%)	10 (43,5%)	12 (35,3%)	

Tabela14. Rozkład genotypów w podgrupach badanych.
n - liczba badanych, p - poziom istotności, NS - nieistotne statystycznie

Genotyp	I.Astma (n=46)	II.Astma+ANN (n=58)	III.ANN (n=38)	IV.Kontrola (n=62)	P
Arg16Arg	3 (6,5%)	5 (8,6%)	2 (5,3%)	1 (1,6%)	NS
Arg16Gly	29 (63,0%)	26 (44,8%)	37 (59,7%)	37 (59,7%)	NS
Gly16Gly	14 (30,4%)	27 (46,6%)	24 (38,7%)	24 (38,7%)	NS
Gln27Gln	14 (30,4%)	17 (29,3%)	13 (34,2%)	22 (35,5%	NS
Gln27Glu	22 (37,9%)	22 (37,9%)	15 (39,5%)	28 (45,2%)	NS
Glu27Glu	10 (21,7%)	19 (32,8%)	10 (26,3%)	12 (19,4%)	NS

Następnie zbadano, czy występowane alleli w badanej populacji jest zgodne z rozkładem Hardy-Weinberga. Stwierdzono różnice między obserwowanymi a oczekiwanymi częstościami genotypowymi w grupie badanej i w grupie kontrolnej.
Wartość p w teście zgodności z równowagą Hardy-Weinberga wynosiła w grupie badanej dla genotypu Arg16Gly p=0,056, dla grupy kontrolnej p=0,002 (test dokładny Fishera), a dla genotypów Gln27Glu w grupie badanej p=0,045, dla grupy kontrolnej p=0,604. Oba genotypy pozostawały w częściowej równowadze Hardy-Weinberga.

Zbadano rozkład częstości alleli dla polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu w grupie badanej i grupie kontrolnej uwzględniając podział na płeć.
Zaobserwowano, że w grupie mężczyzn obecność allelu Glu27 granicznie zwiększa ryzyko zachorowania (OR=2,16), podczas gdy w grupie kobiet efekt ten nie został zaobserwowany. Wyniki przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Rozkład częstości alleli w grupie chorych i w grupie kontrolnej z uwzględnieniem podziału na płeć.
(+) -oznacza występowanie allelu, (-) - oznacza brak allelu
OR - iloraz szans, CI - przedział ufności

Allel	Kobiety			Mężczyźni		
	Grupa chorych	Grupa kontrolna	OR (95%CI)	Grupa chorych	Grupa kontrolna	OR (95%CI)
Arg16 (-)	25 (32,5%)	10 (35,7%)	1,2 (0,4 – 3,1)	33 (50,8%)	14 (41,2%)	0,7 (0,3 – 1,7)
Arg16 (+)	52 (67,5%)	18 (64,3%)		32 (49,2%)	20 (58,8%)	
Gly16 (-)	6 (7,8%)	0	0 (0 – 2,3)	4 (6,2%)	1 (2,9%)	0,5 (0 – 4,9)
Gly16(+)	71 (92,2%)	28 (100%)		61 (93,8%)	33 (97,1%)	
Gln27 (-)	50 (64,9%)	19 (67,9%)	1,1 (0,4 – 3,3)	48 (73,8%)	21 (61,8%)	0,6 (0,2 – 1,5)
Gln27(+)	27 (35,1%)	9 (32,1%)		17 (26,2%)	13 (38,2%)	
Glu27 (-)	61 (79,2%)	23 (82,1%)	1,2 (0,4 – 4,7)	42 (64,6%)	27 (79,4%)	2,1 (0,7 – 6,6)
Glu27(+)	16 (20,8%)	5 (17,9%)		23 (35,4%)	7 (20,6%)	

IV.2.1. Analiza sprzężeń i interakcji polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu

W grupie badanych chorych stwierdzono związek pomiędzy występowaniem dwóch polimorfizmów w pozycji 27 i 16 (test $\chi 2=42,17$ $p<0,001$). Zaobserwowano jednoczesne występowanie układu Arg16Gly-Gln27Glu (częstość 28,2%) oraz Gly16Gly-Glu27Glu (21,8%), natomiast nie stwierdzono występowania układu Arg16Arg-Glu27Glu.

Stwierdzono występowanie sprzężenia genetycznego pomiędzy dwoma badanymi polimorfizmami (*linkage disequilibrium*). Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Analiza sprzężenia genetycznego pomiędzy polimorfizmami Arg16Gly i Gln27Glu w grupie chorych.

Genotyp	Gln27Gln	Gln27Glu	Glu27Glu	Ilość całkowita
Arg16Arg	8 (5,6%)	2 (1,4%)	0	10 (7,0%)
Arg16Gly	26 (18,3%)	40 (28,2%)	8 (5,6%)	74 (52,1%)
Gly16Gly	10 (7,0%)	17 (12,0%)	31 (21,8%)	58 (40,8%
Ilość całkowita	44 (31,0%)	59 (41,5%)	39 (27,5%)	142 (100%)

W grupie kontrolnej również stwierdzono występowanie sprzężenia genetycznego pomiędzy badanymi polimorfizmami (test $\chi 2=21,34$ $p<0,01$). Najczęściej występującym układem był: Arg16Gly-Gln27Glu (37,1%) oraz Arg16Gly-Gln27Gln (21%),

nie stwierdzono występowania układów Arg16Arg-Gln27Glu i Arg16Arg-Glu27Glu. Wyniki analizy przedstawia tabela 17.

Tabela 17. Analiza sprzężenia genetycznego pomiędzy polimorfizmami Arg16Gly i Gln27Glu w grupie kontrolnej.

Genotyp	Gln27Gln	Gln27Glu	Glu27Glu	Ilość całkowita
Arg16Arg	1 (1,6%)	0	0	1 (1,6%)
Arg16Gly	13 (21,0%)	23 (37,1%)	1 (1,6%)	37 (59,7%)
Gly16Gly	8 (12,9%)	5 (8,1%)	11 (17,7%)	24 (38,7%)
Ilość całkowita	22 (35,5%)	28 (45,2%)	12 (19,4%)	62 (100%)

Istnienie sprzężenia genetycznego pomiędzy polimorfizmami Arg16Gly i Gln27Glu sugeruje, że powinny być one rozpatrywane wspólnie, dlatego przeprowadzono analizę interakcji pomiędzy genotypami w grupie chorych i kontrolnej. Stwierdzono brak układu Arg16Arg-Glu27Glu w obu grupach oraz układu Arg16Arg-Gln27Glu w grupie kontrolnej. Zaobserwowano znamiennie częstsze ($p=0,019$) występowanie w grupie chorych układu Gly16Gly-Glu27Glu w porównaniu z grupą kontrolną. Otrzymane wyniki zebrano w tabeli 18 i 19.

Tabela 18. Układy genotypów w grupie chorych i grupie kontrolnej.
n - liczba badanych, p - poziom istotności

Układ genotypów	Grupa chorych (n=142)	Grupa Kontrolna (n=62)	p
Arg16Arg-Gln27Gln	8 (5,6%)	1 (1,6%)	0,104
Arg16Arg-Gln27Glu	2 (1,4%)	0	NS
Arg16Arg-Glu27Glu	0	0	NS
Arg16Gly-Gln27Gln	26 (18,3%)	13 (21,0%)	0,326
Arg16Gly-Gln27Glu	40 (28,2%)	23 (37,1%)	0,103
Arg16Gly-Glu27Glu	8 (5,6%)	1 (1,6%)	0,104
Gly16Gly-Gln27Gln	10 (7. 0%)	8 (12,9%)	0,086
Gly16Gly-Gln27Glu	17 (12,0%)	5 (8,1%)	0,205
Gly16Gly-Glu27Glu	31 (31,8%)	11 (17,7%)	0,019

Tabela 19. Układy genotypów w podgrupach n - liczba badanych, p - poziom istotności

Układ genotypów	I.Astma (n=46)	II.Astma+ANN (n=58)	III.ANN (n=38)	IV.Kotrola (n=62)	p
Arg16Arg-Gln27Gln	2 (4,3%)	5 (8,6%)	1 (2,6%)	1 (1,6%)	NS
Arg16Arg-Gln27Glu	1 (2,2%)	0	1 (2,6%)	0	NS
Arg16Arg-Glu27Glu	0	0	0	0	NS
Arg16Gly-Gln27Gln	9 (19,6%)	8 (13,8%)	9 (23,7%)	13 (21,0%)	NS
Arg16Gly-Gln27Glu	16 (25,4%)	15 (23,8%)	9 (23,7%)	23 (37,1%)	NS
Arg16Gly-Glu27Glu	4 (8,7%)	3 (5,2%)	1 (2,6%)	1 (1,6%)	NS
Gly16Gly-Gln27Gln	3 (6,5%)	4 (6,9%)	3 (7,9%)	8 (12,9%)	NS
Gly16Gly-Gln27Glu	5 (10,9%)	7 (12,1%)	5 (13,2%)	5 (8,1%)	NS
Gly16Gly-Glu27Glu	6 (13,0%)	16 (27,6%)	9 (23,7%)	11 (17,7%)	NS

IV.2.2. Analiza częstości występowania diplotypów w badanych grupach

Badając interakcje pomiędzy genotypami polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu przedstawiono model diplotypów, jako układu występowania po jednym allelu z każdego genotypu. Badano rozkład częstości występowania następujących diplotypów: Arg16/Gln27, Arg16/Glu27, Gly16/Gln27 oraz Gly16/Glu27 w grupie chorych na astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa i porównywano z grupą kontrolną.

Stwierdzono, że diplotyp Gly16/Gln27 występuje częściej (OR=1,98 p=0,049) w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Rozkłady pozostałych diplotypów nie różniły się w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną.

Po uwzględnieniu podziału na płeć zaobserwowano, że u mężczyzn obecność diplotypu Gly16/Gln27 zwiększała ryzyko zachorowania dwukrotnie (OR=2,3 p=0,049), natomiast dla kobiet wartość ta nie była istotna statystycznie (OR=1,84 p=NS). Rozkład diplotypów w obu grupach z uwzględnieniem podziału na płeć przedstawia tabela 20.

Tabela 20. Rozkład diplotypów polimorfizmów Arg16Gly, Gln27Glu z uwzględnieniem podziału na płeć.
(+) występuje diplotyp, (-) brak diplotypu, OR: iloraz szans, 95%CI - przedział ufności

Diplotyp				Kobiety			Mężczyźni		
	Grupa chorych	Grupa kontrolna	OR (95%CI)	Grupa chorych	Grupa kontrolna	OR (95%CI)	Grupa chorych	Grupa kontrolna	OR (95%CI)
Arg16Gln27 (-)	66 (46,5%)	25 (40,3%)	1,285 (0,8 – 3,8)	31 (40,3%)	11 (39,3%)	1,042 (0,7 – 2,5)	35 (53,8%)	14 (41,2%)	1,667 (0,4 – 3,1)
Arg16Gln27 (+)	76 (53,5%)	37 (59,7%)		46 (59,7%)	17 (60,7%)		30 (46,2%)	20 (59,7%)	
Arg16Glu27 (-)	92 (64,8%)	38 (29,2%)	1,162 (0,9 – 3,4)	45 (58,4%)	16 (57,1%)	1,055 (0,8 – 2,5)	47 (72,3%)	22 (64,7%)	1,424 (0,5 – 3,8)
Arg16Glu27 (+)	50 (35,2%)	24 (32,4%)		32 (41,6%)	12 (42,9%)		18 (27,7%)	12 (35,3%)	
Gly16Gln27 (-)	49 (34,5%)	13 (21,0%)	1,986 (1,1 – 5,1)	22 (28,6%)	5 (17,9%)	1,840 (0,5 – 4,2)	27 (41,5%)	8 (23,5%)	2,309 (1,2 – 8,2
Gly16Gln27 (+)	93 (65,5%)	49 (79,0%)		55 (71,4%)	23 (82,1%)		38 (58,5%)	26 (76,5%)	
Gly16Glu27 (-)	46 (32,4%)	22 (35,5%)	0,871 (1,2 – 4,5)	29 (37,7%)	9 (32,1%)	1,275 (0,6 – 3,8)	17 (26,2%)	13 (38,2%)	0,572 (0,3 – 2,3)
Gly16Glu27 (+)	96 (67,6%)	40 (64,5%)		48 (62,3%)	19 (67,9%)		48 (73,8%)	21 (61,8%)	

IV.3. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego z czynnością układu oddechowego

Receptory β_2-adrenergiczne występują na wielu komórkach układu oddechowego, między innymi mięśni gładkich oskrzeli, nabłonka oddechowego, śródbłonka naczyń płucnych oraz pneumocytach typu II. Efekt czynnościowy receptora zależy od rodzaju pobudzanej komórki i ujawnia się poprzez rozkurcz mięśni gładkich oskrzeli, zmniejszenie produkcji śluzu, zmniejszenie przepuszczalności naczyń. Jakościową i ilościową ocenę pobudzenia receptorów β_2-adrenergicznych możemy przeprowadzić przy pomocy badań czynnościowych układu oddechowego. Porównując wyniki badań czynnościowych płuc, w zależności od występującego polimorfizmu, można przeprowadzić analizę wpływu tego polimorfizmu na funkcję receptora β_2-adrenergicznego.

Wykazano różnice w wartościach wybranych parametrów oddechowych pomiędzy grupą chorych a grupą kontrolną. Średnie wartości FEV1, FEV1/VC, MEF25, MEF50 oraz PEF były znamiennie wyższe w grupie kontrolnej. Nie zaobserwowano różnic w średnich wartościach VC i FVCEx pomiędzy grupą chorych a grupą kontrolną. Wyniki zestawiono w tabeli 21.

Tabela 21. Średnie wartości parametrów spirometrycznych w grupie chorych i w grupie kontrolnej. x-wartości średnich arytmetycznych, SD - odchylenie standardowe, n - liczba badanych, * - różnica znamienna statystycznie ($p<0,01$) względem grupy kontrolnej

Parametr spirometryczny	Grupa chorych (n=142; średnia ± SD)	Grupa kontrolna (n=62; średnia ± SD)
FEV1%	88,00±19,96*	100,75±10,76
VC	97,28±14,62	102,29±11,96
FEV1/VC	91,16±13,98*	99,72±7,47
MEF25	68,22±29,44*	92,91±18,90
MEF50	71,79±28,40*	99,84±20,12
FVCEx	96,99±15,41	101,92±10,83
PEF	95,69±12,18*	118,59±17,44

Analizując średnie wartości parametrów oddechowych w podgrupach zaobserwowano, że średnie wartości FEV1, VC, FEV1/VC, MEF25, MEF50, FVCEx i PEF w podgrupie chorych na astmę oskrzelową i astmę oskrzelową z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa różniły się w sposób wysoce znamienny statystycznie ($p<0,001$) w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości wszystkich badanych parametrów oddechowych w podgrupie chorych na alergiczny nieżyt nosa nie różniły się statystycznie od wartości obserwowanych w grupie kontrolnej.

Porównanie średnich wartości parametrów spirometrycznych w badanych podgrupach przedstawia tabela 22.

Tabela 22. Średnie wartości parametrów spirometrycznych w podgrupach:

x- średnie arytmetyczne, SD - odchylenie standardowe, n - liczba badanych,
* - różnica znamienna statystycznie ($p<0,01$) względem grupy kontrolnej

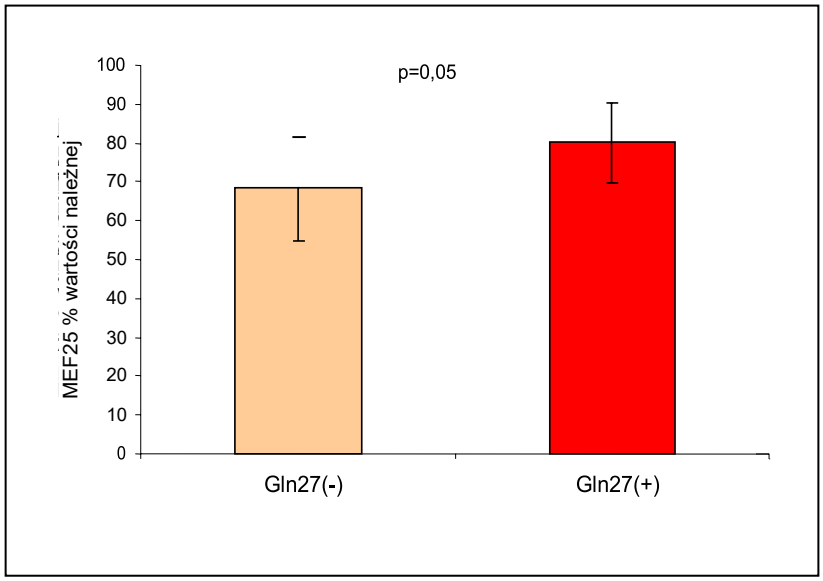
Wartość spirometryczna	I Astma (n=46) x ± SD	II Astma+ANN (n=58) x ± SD	III ANN (n=38) x± SD	IV Kontrola (n=62) x ± SD
FEV1%	79,51±21,25*	86,29±19,69*	100,92±10,28	100,75±10,76
VC	96,16±15,74*	97,64±14,91*	101,72±11,38	102,29±11,96
FEV1/VC	86,86±15,08*	88,57±13,24*	100,33±8,87	99,72±7,47
MEF25	53,95±22,48*	61,75±25,21*	95,36±25,19	92,91±18,90
MEF50	57,94±26,56*	66,50±23,45*	96,63±21,26	99,84±20,12
FVCEx	92,61±16,03*	96,77±16,66*	102,61±10,41	101,92±10,83
PEF	85,58±21,75*	91,99±22,67*	113,60±14,24	118,59±17,44

IV.3.1. Porównanie wyników badań czynnościowych układu oddechowego w zależności od występowania allelu

Porównano wyniki badań czynnościowych płuc w zależności od występowania allelu celem oceny związku pomiędzy występowaniem allelu Arg16, Gly16, Gln27 i Glu27, a funkcją układu oddechowego. Analizę przeprowadzono u wszystkich badanych, a następnie w grupie chorych (I+II+III), uwzględniając podział na płeć.

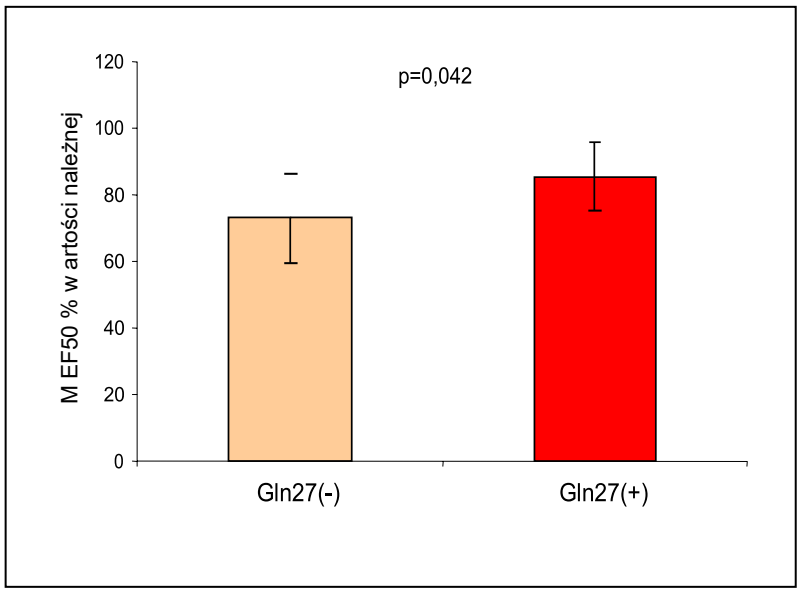
W kolejnym etapie zanalizowano wyniki badań czynnościowych układu oddechowego w poszczególnych podgrupach badanych.

Wartości parametrów spirometrycznych w całej badanej grupie bez podziału względem płci nie różniły się znamiennie statystycznie. Po uwzględnieniu podziału na płeć również nie zaobserwowano znamiennych różnic pomiędzy średnimi wartościami FEV1, VC, FEV1/VC, stwierdzono natomiast, że średnie wartości MEF25 u kobiet posiadających allel Gln27 wynoszące 80,13%±31 były znamiennie wyższe ($p<0,05$) w porównaniu do wartości MEF25: 68,26%±28,99 u kobiet bez tego allelu. Wyniki zilustrowano na rycinie 6.



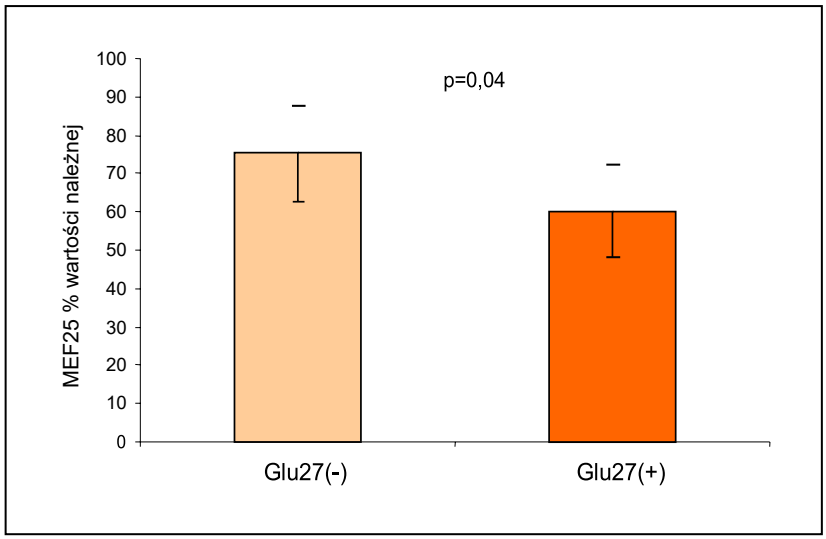
Ryc. 6. Porównanie średnich wartości MEF25 u kobiet w zależności od allelu Gln27. (+) występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna

Wyższe wartości MEF50 zaobserwowano u kobiet posiadających allel Gln27 - średnie wartości wynosiły 85,33%±29,82 w porównaniu do średnich wartości MEF50 dla kobiet bez allelu Gln27, wynoszących 72,92%±29,07 ($p<0,05$).
Wyniki przedstawiono na rycinie 7.

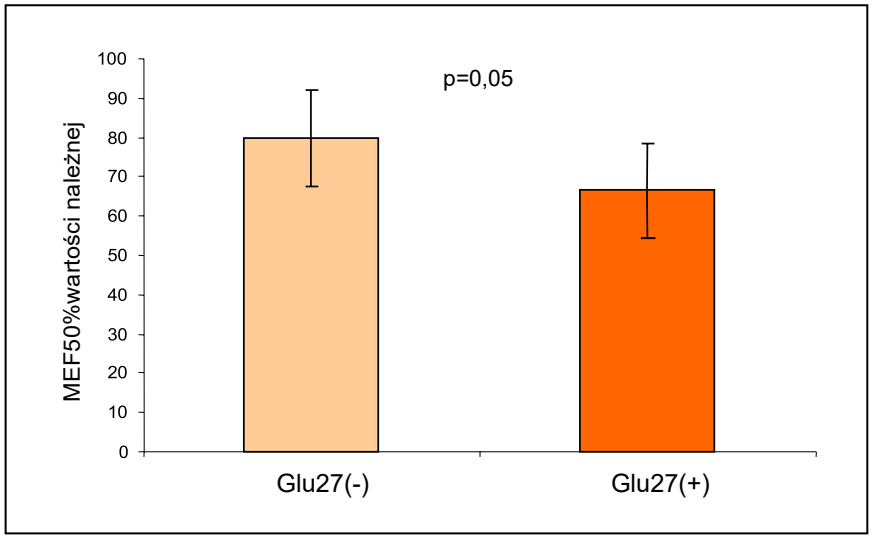


Ryc. 7. Porównanie średnich wartości MEF25 u kobiet w zależności od allelu Gln27. (+) oznacza występowanie allelu, (-) oznacza brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna

Analizując średnie wartości FVCEx oraz PEF nie zaobserwowano znamiennych statystycznie różnic między nimi, w zależności od allelu, u badanych kobiet.
Odwrotny związek zaobserwowano między obecnością allelu Glu27 a średnimi wartościami spirometrycznymi MEF25 i MEF50. Średnie wartości MEF25 dla kobiet posiadających allel Glu27 wynosiły 60,27%±26,78, a dla kobiet nie posiadających allelu Glu27 wynosiły 75,34%±30,21 ($p=0,04$). Średnie wartości MEF50 wynosiły 66,53%±26 i 79,84%±30,21 odpowiednio dla kobiet posiadających allel Glu27 i nie posiadających allelu Glu27 ($p=0,05$). Wyniki te przedstawiono na rycinach 8 i 9.



Ryc. 8. Porównanie średnich wartości MEF25 u kobiet w zależności od allelu Glu27. (+) oznacza występowanie allelu, (-) oznacza brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna



Ryc. 9. Porównanie średnich wartości MEF50 u kobiet w zależności od allelu Glu27. (+) oznacza występowanie allelu, (-) oznacza brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna

W grupie badanych mężczyzn nie zaobserwowano występowania różnic w średnich wartościach parametrów oddechowych w zależności od występującego allelu. Wyniki analizy zebrano w tabelach 23-26.

Tabela 23. Analiza związku pomiędzy wartościami parametrów spirometrycznych a występowaniem allelu Arg16.
Arg16 (-) brak allelu, Arg16 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD-odchylenie standardowe, p - poziom istotności

Arg16

Parametr spirometryczny	Allel	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x± SD	p	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1%	Arg16 (-)	82	92,12±19,11	NS	35	90,74±19,94	NS	47	93,17±18,62	NS
	Arg16 (+)	122	91,71±18,33		70	91,37±18,60		52	92,17±18,13	
VC	Arg16 (-)	82	99,25±14,50	NS	35	97,25±15,36	NS	47	100,74±13,80	NS
	Arg16 (+)	122	98,51±13,75		70	99,70±14,94		52	96,90±11,93	
FEV1%/VC	Arg16 (-)	82	92,81±13,04	NS	35	94,94±12,78	NS	47	91,22±13,14	NS
	Arg16 (+)	122	94,71±12,93		70	95,18±12,40		52	93,35±13,67	
MEF25	Arg16 (-)	82	78,71±30,86	NS	35	76,55±32,83	NS	47	80,33±29,57	NS
	Arg16 (+)	122	73,71±27,57		70	70,22±28,77		52	78,42±25,37	
MEF50	Arg16 (-)	82	80,75±30,48	NS	35	78,59±32,22	NS	47	82,36±29,37	NS
	Arg16 (+)	122	80,02±28,33		70	76,47±28,70		52	84,81±27,37	
FVCEx	Arg16 (-)	82	98,95±14,42	NS	35	97,21±14,83	NS	47	100,26±14,13	NS
	Arg16 (+)	122	98,17±14,32		70	98,83±15,08		52	97,3±13,32	
PEF	Arg16 (-)	82	103,66±24,30	NS	35	101,52±25,93	NS	47	105,56±23,18	NS
	Arg16 (+)	122	101,97±23,87		70	97,45±21,99		52	108,07±25,13	

Tabela 24. Analiza związku pomiędzy wartościami parametrów spirometrycznych a występowaniem allelu Gly16.
Gly16 (-) brak allelu, Gly16 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gly16

Parametr spirometryczny	Allel	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x± SD	P	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1%	Gly16 (-)	11	86,89 ±26,75	NS	6	90,82 ±30,33	NS	5	82,18 ±24,25	NS
	Gly16 (+)	193	92,16±10,08		99	91,18 ±19,29		94	93,20 ±19,90	
VC	Gly16 (-)	11	96,44±21,47	NS	6	96,34 ±27,46	NS	5	96,56 ±17,48	NS
	Gly16 (+)	193	98,94±13,55		99	99,04 ±14,20		94	98,84 ±12,92	
FEV1%/VC	Gly16 (-)	11	90,05±13,25	NS	6	96,03 ±8,38	NS	5	82,86 ±15,26	NS
	Gly16 (+)	193	93,97±12,96		99	95,05 ±12,70		94	92,84 ±13,19	
MEF25	Gly16 (-)	11	66,33±23,47	NS	6	63,72 ±25,32	NS	5	69,45 ±23,52	NS
	Gly16 (+)	193	76,26±29,21		99	72,85 ±30,48		94	79,85 ±27,52	
MEF50	Gly16 (-)	11	73,98±27,24	NS	6	72,84 ±33,10	NS	5	75,35 ±21,92	NS
	Gly16 (+)	193	80,67±29,27		99	77,44 ±29,73		94	84,08 ±28,53	
FVCEx	Gly16 (-)	11	96,00 ±21,28	NS	6	96,97 ±28,0	NS	5	94,84 ±12,22	NS
	Gly16 (+)	193	98,63 ±13,90		99	98,37 ±14,03		94	98,89 ±13,82	
PEF	Gly16 (-)	11	97,57 ±28,35	NS	6	95,45 ±33,61	NS	5	100,11 ±24,13	NS
	Gly16 (+)	193	102,94±23,78		99	99,01 ±22,79		94	107,09 ±24,22	

Tabela 25. Analiza związku pomiędzy wartościami parametrów spirometrycznych a występowaniem allelu Gln27.
Gln27 (-) brak allelu, Gln27 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gln27

Parametr spirometryczny	Allel	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
		N	x±SD	p	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1%	Gln27 (-)	138	91,58 ±18,53	NS	69	89,03 ±19,63	NS	69	94,13 ±17,12	NS
	Gln27 (+)	66	92,50 ±18,87		36	95,23 ±17,14		30	89,23 ±20,59	
VC	Gln27 (-)	138	98,42 ±13,55	NS	69	97,63 ±14,74	NS	69	99,21 ±12,30	NS
	Gln27 (+)	66	99,62 ±15,06		36	101,28 ±15,56		30	97,62 ±14,43	
FEV1%/VC	Gln27 (-)	138	93,47 ±12,39	NS	69	93,63 ±13,31	NS	69	93,30 ±11,49	NS
	Gln27 (+)	66	94,39 ±14,18		36	97,93 ±10,26		30	90,12 ±17,00	
MEF25	Gln27 (-)	138	74,87 ±28,51	NS	69	68,26 ±28,99	0,05	69	81,48 ±26,60	NS
	Gln27 (+)	66	77,51 ±30,06		36	80,13 ±31,26		30	74,35 ±28,76	
MEF50	Gln27 (-)	138	78,96 ±28,71	NS	69	72,92 ±29,07	0,042	69	84,99 ±27,23	NS
	Gln27 (+)	66	83,1 ±30,5		36	85,33 ±29,82		30	80,55 ±30,62	
FVCEx	Gln27 (-)	138	98,34 ±13,73	NS	69	97,23 ±14,39	NS	69	99,45 ±13,05	NS
	Gln27 (+)	66	98,78 ±15,61		36	100,32 ±15,96		30	96,95 ±15,25	
PEF	Gln27 (-)	138	100,85 ±24,16	NS	69	96,35 ±24,68	NS	69	105,36 ±22,92	NS
	Gln27 (+)	66	106,41 ±23,40		36	103,52 ±10,0		30	109,89 ±26,87	

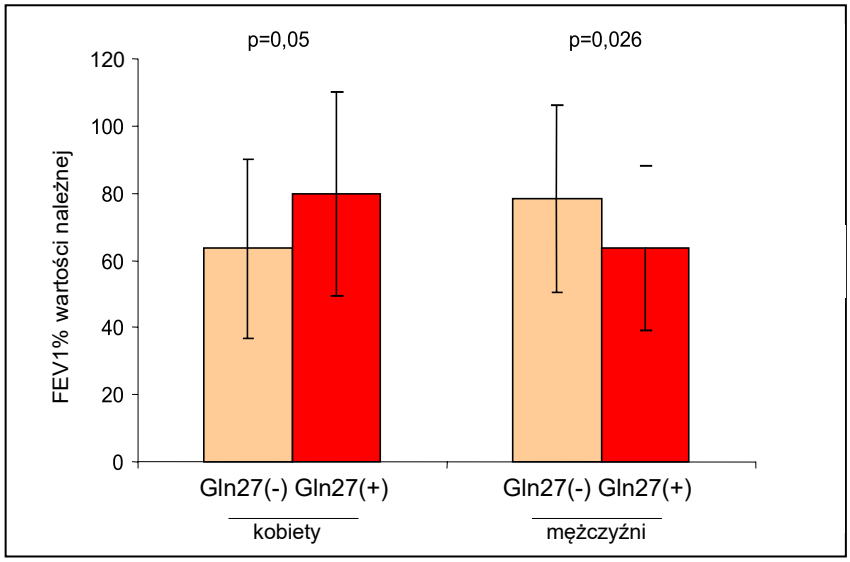
Tabela 26. Analiza związku pomiędzy wartościami parametrów spirometrycznych a występowaniem allelu Glu27.
Glu27 (-) brak allelu, Glu27 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, p - poziom istotności *Glu27*

Parametr spirometryczny	Allel	Wszyscy badani			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	P	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1%	Glu27 (-)	153	92,95 ±18,59	NS	84	92,66 ±19,25	NS	69	93,29 ±19,90	NS
	Glu27 (+)	51	88,68 ±18,43		21	85,15 ±16,88		30	91,14 ±19,34	
VC	Glu27 (-)	153	99,25 ±13,99	NS	84	99,55 ±15,19	NS	69	98,90 ±12,48	NS
	Glu27 (+)	51	97,46 ±14,19		21	96,23 ±14,55		30	98,33 ±14,11	
FEV1%/VC	Glu27 (-)	153	94,65 ±13,32	NS	84	96,18 ±12,41	NS	69	92,77 ±14,23	NS
	Glu27 (+)	51	91,11 ±11,59		21	90,79 ±12,02		30	91,34 ±11,47	
MEF25	Glu27 (-)	153	77,68 ±28,87	NS	84	75,34 ±30,37	0,04	69	80,53 ±26,89	NS
	Glu27 (+)	51	69,84 ±28,74		21	60,27 ±26,78		30	76,55 ±29,57	
MEF50	Glu27 (-)	153	82,14 ±29,24	NS	84	79,84 ±30,21	0,05	69	84,95 ±27,97	NS
	Glu27 (+)	51	74,83 ±28,42		21	66,53 ±26,00		30	80,63 ±19,01	
FVCEx	Glu27 (-)	153	98,75 ±14,36	NS	84	98,81 ±15,44	NS	69	98,66 ±13,04	NS
	Glu27 (+)	51	97,70 ±14,35		21	96,20 ±12,90		30	98,76 ±15,41	
PEF	Glu27 (-)	153	103,80 ±24,55	NS	84	99,69 ±24,09	NS	69	108,80 ±24,33	NS
	Glu27 (+)	51	99,22 ±22,16		21	95,28 ±20,18		30	101,98 ±23,38	

Następnie porównano wyniki badań czynnościowych układu oddechowego w grupie chorych w zależności od allelu. Wyniki średnich wartości parametrów spirometrycznych w całej grupie chorych nie różniły się istotnie statystycznie w zależności od występującego allelu. Po podziale grupy chorych względem płci zaobserwowano istotne statystycznie różnice zarówno w grupie kobiet jak i mężczyzn. Stwierdzono wyższe wartości średnie FEV1%, FEV1/VC, MEF25, MEF50 w grupie kobiet, u których występował allel Gln27. Natomiast wyższe wartości FEV1, MEF25 i MEF50 zaobserwowano u mężczyzn nie posiadających allelu Gln27.

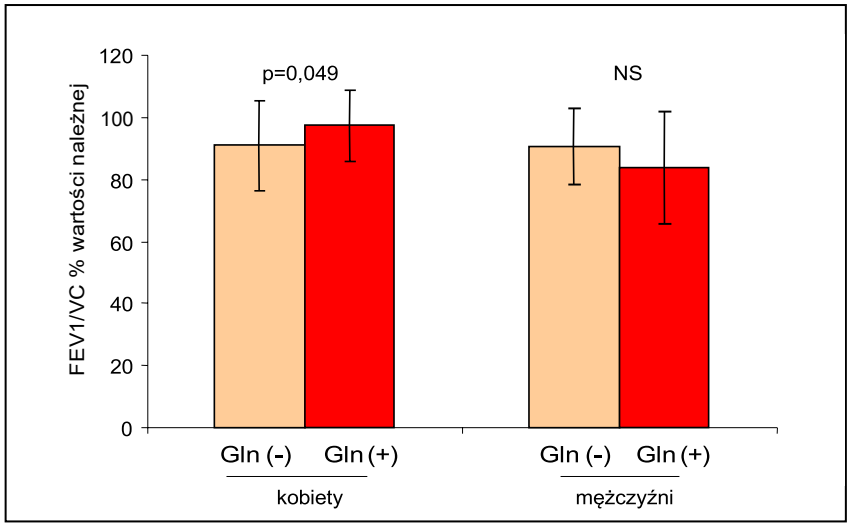
Średnie wartości FEV1 dla kobiet posiadających allel Gln27 wynosiły 93,13%±17,97 i były wyższe (p=0,05) od średnich wartości FEV1 dla kobiet nie posiadających tego allelu, które wynosiły 84,14%±20.

Średnie wartości FEV1 dla mężczyzn posiadających allel Gln27 wynosiły 79,44%±20,82 i były statystycznie niższe (p=0,026) od średnich wartości dla mężczyzn bez allelu Gln27 wynoszących 92,19%±19,40. Wyniki przedstawiono na rycinie 10.



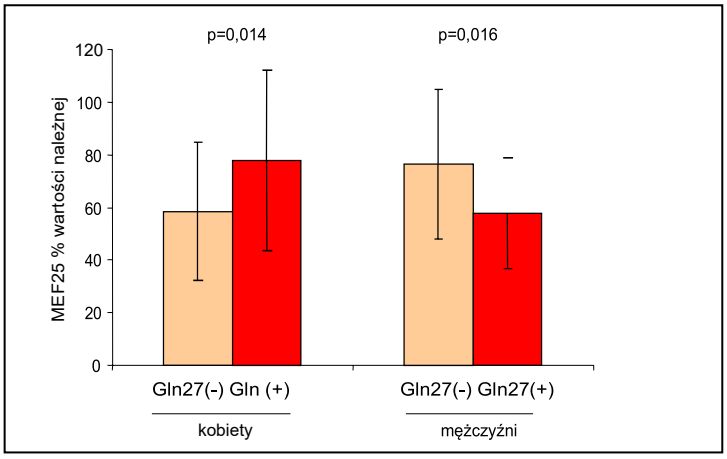
Ryc. 10. Porównanie średnich wartości FEV1 u kobiet i u mężczyzn w zależności od allelu Gln27. (+) występowanie allelu,(-) brak allelu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna

Średnie wartości FEV1/VC dla kobiet posiadających allel Gln27 były wyższe niż dla kobiet bez allelu Gln27 (p=0,049) i wynosiły odpowiednio 97,24%±11,44 i 90,87%±14,25, natomiast średnie wartości FEV1/VC dla mężczyzn nie wykazywały różnic istotnych statystycznie. Wyniki przedstawiono na rycinie 11.



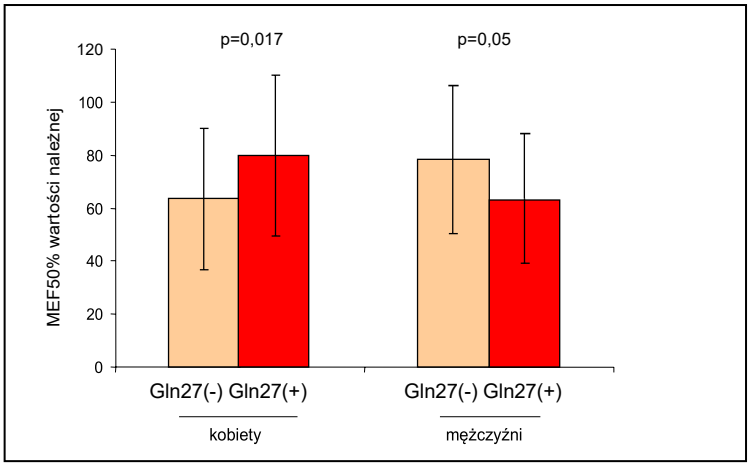
Ryc. 11. Porównanie średnich wartości FEV1/VC u kobiet i u mężczyzn w zależności od allelu Gln27. (+) występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna

Analizując średnie wartości MEF25 stwierdzono, że są one wyższe (p=0,014) u kobiet posiadających allel Gln27. Średnie wartości wynosiły 77,89%±34,49 w porównaniu do średnich wartości MEF25 wynoszących 58,48%±26,32 dla kobiet nie posiadających allelu Gln27. U mężczyzn stwierdzono, że obecność Gln27 związana jest z niższą (p=0,016) wartością tego parametru wynoszącą 57,96%±21,01, w porównaniu do 76,56%±28,40 dla mężczyzn bez allelu Gln27. Wyniki przedstawia ryc. 12.



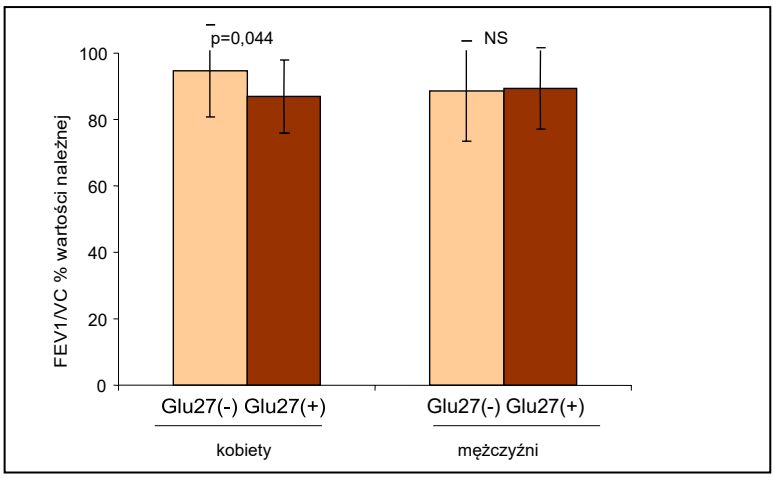
Ryc. 12. Porównanie średnich wartości MEF25 u kobiet i u mężczyzn w zależności od allelu Gln27.(+) występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna.

Analizując kolejny parametr spirometryczny - MEF50 zaobserwowano, że średnie wartości dla kobiet posiadających allel Gln27 wynosiły 79,95%±30,46, a dla kobiet bez allelu Gln27-63,61%±26,74 (p=0,017). Wartości średnie tego parametru wynosiły dla mężczyzn posiadających allel Gln27 i bez allelu Gln27 odpowiednio 63,87%±24,51 i 78,51%±27,88 (p=0,05). Wyniki przedstawiono na rycinie 13.



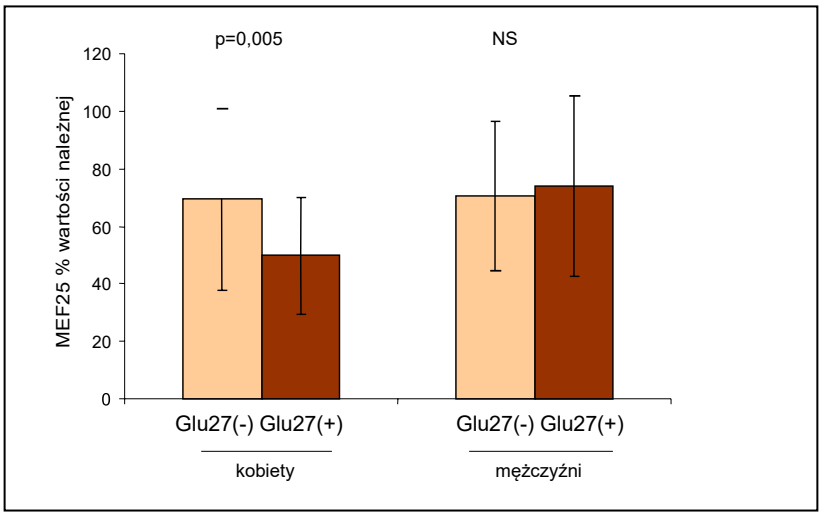
Ryc. 13. Porównanie średnich wartości MEF50 u kobiet i u mężczyzn w zależności od allelu Gln27. (+) występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±SD, p - istotność statystyczna.

Stwierdzono ponadto, że obecność allelu Glu27 u kobiet związana była z niższymi wartościami wybranych parametrów spirometrycznych: FEV1/VC, MEF25, MEF50. Średnie wartości FEV1, VC, FVCEx oraz PEF nie różniły się u pod względem allelu Glu27. Średnie wartości FEV1/VC wynosiły 87,02%±11,02 dla kobiet posiadających allel Glu27 i były niższe (p=0,044) od średnich wartości wynoszących 94,70%±13,85 dla kobiet bez allelu Glu27 (p=0,044). Wyniki przedstawiono na rycinie 14.



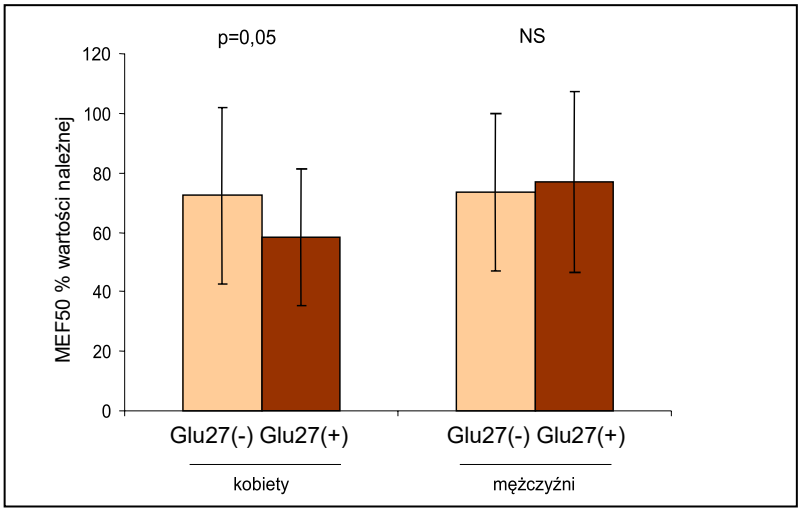
Ryc. 14. Porównanie średnich wartości FEV1/VC u kobiet i u mężczyzn w zależności od allelu Glu27.(+) występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczną, NS - brak istotności statystycznej

Średnie wartości MEF25 wynosiły odpowiednio 49,77%±20,41 dla kobiet z allelem Glu27 i 69,36%±31,72 dla kobiet bez allelu Glu27 (p=0,005), przedstawiono je na ryc.15.



Ryc. 15. Porównanie średnich wartości MEF25 u kobiet i u mężczyzn w zależności od allelu Glu27.(+) występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczną, NS - brak istotności statystycznej

Podobnie, średnie wartości MEF50 wynosiły odpowiednio 58,24%±23,13 dla kobiet z allelem Glu27 i 72,25%±29,82 dla kobiet bez allelu Glu27 (p=0,05). Porównanie średnich przedstawia rycina 16.



Ryc. 16. Porównanie średnich wartości MEF50 u kobiet i u mężczyzn w zależności od allelu Glu27.(+) występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczną, NS - brak istotności statystycznej

W grupie mężczyzn nie zaobserwowano różnic w średnich wartościach parametrów spirometrycznych w zależności od występowania allelu Glu27. Nie stwierdzono także różnic w wartościach parametrów funkcji płuc dla alleli Arg16 i Gly16 u kobiet i mężczyzn. Pozostałe wyniki przedstawiono w tabelach 27-30.

Uwzględniając podział na podgrupy badanych nie zaobserwowano istotnych statystycznie związków pomiędzy wystapieniem pojedynczego allelu a jakąkolwiek z analizowanych wartości spirometrycznych. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabelach 31-34.

Nie zabserwowano również związków pojedynczego allelu z badanymi parametrami funkcji płuc w podgrupie chorych na astmę oskrzelową (grupa I+II).

Tabela 27. Porównanie średnich wartości parametrów spirometrycznych w zależności od obecności allelu Arg16 w podgrupach chorych na astmę oskrzelową, astmę z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa i alergiczny nieżyt nosa z uwzględnieniem podziału na płeć. (+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności

Arg16

Parametr spirometryczny	Allel	Grupa chorych(I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1%	Arg16 (-)	58	89,45 ±21,35	NS	25	86,78 ±22,01	NS	33	91,47 ±20,95	NS
	Arg16 (+)	84	87,01 ±19,00		52	87,54 ±18,67		32	86,16 ±19,81	
VC	Arg16 (-)	58	98,54 ±15,70	NS	25	94,54 ±16,55	NS	33	101,57 ±14,55	NS
	Arg16 (+)	84	96,41 ±13,85		52	97,59 ±14,72		32	94,50 ±12,29	
FEV1%/VC	Arg16 (-)	58	90,32 ±13,70	NS	25	92,68 ±14,19	NS	33	88,54 ±13,26	NS
	Arg16 (+)	84	91,74 ±14,23		52	93,31 ±13,45		32	89,19 ±15,28	
MEF25	Arg16 (-)	58	73,56 ±33,25	0,08	25	71,12 ±36,36	NS	33	75,41 ±31,15	NS
	Arg16 (+)	84	64,53 ±26,07		52	62,48 ±27,47		32	67,86 ±23,66	
MEF50	Arg16 (-)	58	75,19 ±32,21	NS	25	73,17 ±35,36	NS	33	76,72 ±30,08	NS
	Arg16 (+)	84	69,44 ±25,37		52	67,50 ±25,55		32	72,59 ±25,15	
FVCEx	Arg16 (-)	58	96,22 ±15,27	NS	25	94,57 ±16,13	NS	33	100,76 ±15,01	NS
	Arg16 (+)	84	98,09 ±15,67		52	97,19 ±15,50		32	94,66 ±14,99	
PEF	Arg16 (-)	58	94,05 ±21,56	NS	25	95,55 ±27,40	NS	33	99,99 ±23,92	NS
	Arg16 (+)	84	98,07 ±25,34		52	90,82 ±19,10		32	99,30 ±24,47	

Tabela 28. Porównanie średnich wartości wybranych parametrów spirometrycznych w zależności od obecności allelu Gly16 w grupie chorych na astmę oskrzelową, astmę z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa i alergiczny nieżyt nosa z uwzględnieniem podziału na płeć.
(+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności

Gly16

Parametr spirometryczny	Allel	Grupa chorych (I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		N	x±SD	p	n	x±SD	P	n	x±SD	p
FEV1%	Gly16 (-)	10	84,98 ±27,39	NS	6	90,82 ±30,33	NS	4	76,22 ±23,40	NS
	Gly16 (+)	132	88,23 ±19,40		71	86,99 ±18,80		61	89,68 ±20,14	
VC	Gly16 (-)	10	94,78 ±21,87	NS	6	96,34 ±27,46	NS	4	92,45 ±12,92	NS
	Gly16 (+)	132	97,47 ±14,02		71	96,62 ±14,15		61	98,46 ±13,93	
FEV1%/VC	Gly16 (-)	10	89,61 ±13,88	NS	6	96,03 ±8,38	NS	4	79,97 ±15,97	NS
	Gly16 (+)	132	91,28 ±14,04		71	92,86 ±13,97		61	89,44 ±14,00	
MEF25	Gly16 (-)	10	62,99 ±21,81	NS	6	63,72 ±25,32	NS	4	61,89 ±18,86	NS
	Gly16 (+)	132	68,62 ±29,97		71	65,42 ±21,23		61	72,33 ±28,24	
MEF50	Gly16 (-)	10	70,50 ±26,00	NS	6	72,84 ±33,10	NS	4	66,99 ±13,23	NS
	Gly16 (+)	132	71,89 ±28,66		71	69,05 ±28,86		61	75,19 ±28,30	
FVCEx	Gly16 (-)	10	97,13 ±14,88	NS	6	96,97 ±28,00	NS	4	92,15 ±12,28	NS
	Gly16 (+)	132	95,04 ±22,18		71	96,28 ±14,49		61	98,12 ±15,38	
PEF	Gly16 (-)	10	95,84 ±22,90	NS	6	95,45 ±33,62	NS	4	91,23 ±15,80	NS
	Gly16 (+)	132	93,76 ±26,75		71	92,09 ±21,15		61	100,20 ±24,44	

Tabela 29. Porównanie średnich wartości wybranych parametrów spirometrycznych w zależności od obecności allelu Gln27 w grupie chorych na astmę oskrzelową, astmę z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa i alergiczny nieżyt nosa z uwzględnieniem podziału na płeć.
(+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności

Gln27

Parametr spirometryczny	Allel	Grupa chorych (I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	P	n	x±SD	p
FEV1%	Gln27 (-)	98	88,08 ±20,02	NS	50	84,14 ±20,00	0,05	48	92,19 ±19,40	0,026
	Gln27 (+)	44	87,84 ±20,05		27	93,13 ±17,97		17	79,44 ±20,82	
VC	Gln27 (-)	98	97,25 ±14,31	NS	50	94,80 ±14,66	NS	48	99,80 ±13,62	NS
	Gln27 (+)	44	97,35 ±15,47		27	99,93 ±16,17		17	93,25 ±13,74	
FEV1%/VC	Gln27 (-)	98	90,77 ±13,20	NS	50	90,87 ±14,25	0,049	48	90,67 ±12,15	NS
	Gln27 (+)	44	92,02 ±15,73		27	97,24 ±11,44		17	83,74 ±18,25	
MEF25	Gln27 (-)	98	67,34 ±28,69	NS	50	58,48 ±26,32	0,014	48	76,56 ±28,40	0,016
	Gln27 (+)	44	70,19 ±31,31		27	77,89 ±34,49		17	57,96 ±21,01	
MEF50	Gln27 (-)	98	70,91 ±28,18	NS	50	63,61 ±26,74	0,017	48	78,51 ±27,88	0,05
	Gln27 (+)	44	73,74 ±29,11		27	79,95 ±30,46		17	63,87 ±24,51	
FVCEx	Gln27 (-)	98	97,24 ±14,75	NS	50	94,72 ±14,84	NS	48	99,85 ±14,34	NS
	Gln27 (+)	44	96,43 ±16,95		27	99,33 ±16,94		17	91,83 ±16,42	
PEF	Gln27 (-)	98	94,51 ±22,98	NS	50	89,30 ±22,79	NS	48	99,93 ±22,12	NS
	Gln27 (+)	44	98,34±23,67		27	98,02 ±19,82		17	98,86±29,43	

Tabela 30. Porównanie średnich wartości wybranych parametrów spirometrycznych w zależności od obecności allelu Glu27 w grupie chorych na astmę oskrzelową, astmę z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa i alergiczny nieżyt nosa z uwzględnieniem podziału na płeć.
(+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności

Glu27

Parametr spirometryczny	Allel	Grupa chorych (I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		N	x±SD	p	N	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1%	Glu27 (-)	103	88,61 ±20,05	NS	61	89,11 ±20,30	NS	42	87,88 ±19,89	NS
	Glu27 (+)	39	86,40 ±19,90		16	80,33 ±15,73		23	90,62 ±21,67	
VC	Glu27 (-)	103	97,14 ±14,48	NS	61	97,15 ±15,47	NS	42	97,12 ±13,10	NS
	Glu27 (+)	39	97,66 ±15,17		16	94,50 ±14,93		23	99,85 ±15,26	
FEV1%/VC	Glu27 (-)	103	92,20 ±14,68	NS	61	94,70 ±13,85	0,044	42	88,58 ±15,25	NS
	Glu27 (+)	39	88,41 ±11,69		16	87,02 ±11,02		23	89,37 ±12,29	
MEF25	Glu27 (-)	103	69,81 ±29,35	NS	61	69,36 ±31,72	0,005	42	70,47 ±25,88	NS
	Glu27 (+)	39	64,01 ±29,66		16	49,77 ±20,41		23	73,92 ±31,39	
MEF50	Glu27 (-)	103	72,77 ±28,32	NS	61	72,25 ±29,82	0,05	42	73,53 ±26,32	NS
	Glu27 (+)	39	69,18 ±28,82		16	58,24 ±23,13		23	76,79 ±30,36	
FVCEx	Glu27 (-)	103	96,67 ±15,49	NS	61	96,83 ±16,28	NS	42	96,51 ±14,45	NS
	Glu27 (+)	39	97,75 ±15,36		16	94,47 ±13,26		23	100,4 ±16,57	
PEF	Glu27 (-)	103	96,00 ±23,60	NS	61	92,81 ±22,81	NS	42	100,64 ±24,23	NS
	Glu27 (+)	39	94,88 ±22,31		16	90,64 ±19,55		23	97,84 ±24,01	

Tabela 31. Parametry spirometryczne w badanych podgrupach w zależności od występowania allelu Arg16.
(+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Arg16

Parametr spirometryczny	Allel	Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV	
		n	x±SD	n	X±SD	n	x±SD	n	x±SD
FEV1%	Arg16 (-)	14	76,52 ±29,21	27	88,05 ±17,15	17	102,31 ±11,30	24	98,61 ±9,70
	Arg16 (+)	32	80,82 ±17,09	31	84,75 ±21,83	21	99,79 ±9,52	38	102,10 ±11,29
VC	Arg16 (-)	14	90,35 ±20,76	27	99,91 ±13,50	17	103,12 ±12,16	24	100,96 ±11,18
	Arg16 (+)	32	94,39 ±13,18	31	92,62 ±22,01	21	100,59 ±10,87	38	103,14 ±12,49
FEV1/VC	Arg16 (-)	14	83,71 ±15,22	27	87,69 ±12,02	17	99,95 ±9,89	24	98,81 ±8,97
	Arg16 (+)	32	88,24 ±15,06	31	89,33 ±14,37	21	100,63 ±8,19	38	100,30 ±6,41
MEF25	Arg16 (-)	14	56,39 ±29,03	27	65,42 ±27,13	17	100,63 ±30,16	24	91,16 ±19,64
	Arg16 (+)	32	52,89 ±19,39	31	58,55 ±23,40	21	91,10 ±20,08	38	94,01 ±18,60
MEF50	Arg16 (-)	14	54,97 ±33,94	27	68,28 ±22,06	17	102,81 ±26,84	24	94,19 ±20,84
	Arg16 (+)	32	59,23 ±23,14	31	64,95 ±24,85	21	129,71 ±174,62	38	103,41 ±19,08
FVCEx	Arg16 (-)	14	90,21 ±21,59	27	99,09 ±13,68	17	102,98 ±10,53	24	101,05 ±10,81
	Arg16 (+)	32	93,66 ±13,18	31	94,75 ±18,87	21	102,32 ±10,56	38	102,47 ±10,95
PEF	Arg16 (-)	14	82,67 ±28,44	27	96,51 ±24,49	17	113,25 ±14,16	24	117,17 ±14,82
	Arg16 (+)	32	86,85 ±18,49	31	88,06 ±20,55	21	113,88 ±14,65	38	119,48 ±19,05

Tabela 32. Parametry spirometryczne w badanych podgrupach w zależności od występowania allelu Gly16.
(+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gly16

Parametr spirometryczny	Allel	Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV	
		n	x±SD	n	x±SD	n	x±SD	n	x±SD
FEV1%	Gly16 (-)	3	85,70 ±36,32	5	75,83 ±25,08	2	106,76	1	106,02
	Gly16 (+)	43	79,08 ±20,45	53	87,27 ±19,11	36	100,59 ±10,16	61	100,66 ±10,83
VC	Gly16 (-)	3	100,69 ±21,24	5	84,80 ±23,15	2	110,89	1	113,01
	Gly16 (+)	43	92,63 ±17,48	53	97,07 ±18,19	36	10,21 ±11,31	61	102,12 ±11,98
FEV1/VC	Gly16 (-)	3	84,15 ±24,07	5	90,14 ±9,11	2	96,48	1	94,41
	Gly16 (+)	43	87,05 ±14,68	53	88,42 ±13,62	36	100,54 ±8,98	61	99,81 ±7,50
MEF25	Gly16 (-)	3	73,89 ±8,75	5	46,87 ±18,07	2	86,92	1	99,72
	Gly16 (+)	43	52,56 ±22,52	53	63,15 ±25,47	36	95,83 ±25,81	61	92,80 ±19,04
MEF50	Gly16 (-)	3	84,62 ±20,43	5	53,21 ±22,19	2	92,54	1	108,79
	Gly16 (+)	43	56,08 ±26,11	53	67,75 ±23,37	36	119,07 ±133,80	61	999,70 ±20,26
FVCEx	Gly16 (-)	3	99,58 ±20,79	5	86,76 ±25,55	2	108,94	1	105,62
	Gly16 (+)	43	92,12 ±15,84	53	97,71 ±15,60	36	102,26 ±10,37	61	101,86 ±10,91
PEV	Gly16 (-)	3	93,22 ±20,37	5	83,67 ±30,21	2	119,79	1	135,66
	Gly16 (+)	43	85,04 ±21,97	53	92,77 ±22,04	36	113,26 ±14,47	61	118,31 ±17,45

Tabela 33. Parametry spirometryczne w badanych podgrupach w zależności od występowania allelu Gln27.
(+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gln27

Parametr spirometryczny	Allel	Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV	
		n	x±SD	n	x±SD	n	x±SD	n	x±SD
FEV1%	Gln27 (-)	32	77,07 ±21,42	41	88,41 ±18,60	25	101,64 ±9,88	40	100,15 ±10,15
	Gln27 (+)	14	85,09 ±20,53	17	81,17 ±21,84	13	99,52 ±11,31	22	101,83 ±11,96
VC	Gln27 (-)	32	90,98 ±15,96	41	96,26 ±19,21	25	103,13 ±10,21	40	101,27 ±11,13
	Gln27 (+)	14	98,14 ±14,55	17	95,42 ±18,16	13	99,03 ±13,38	22	104,16 ±13,41
FEV1/VC	Gln27 (-)	32	86,15 ±15,12	41	89,66 ±12,20	25	98,49 ±8,24	40	100,06 ±6,59
	Gln27 (+)	14	88,45 ±15,44	17	85,91 ±15,54	13	103,87 ±9,29	22	99,11 ±8,99
MEF25	Gln27 (-)	32	50,99 ±24,34	41	64,61 ±25,89	25	92,72 ±20,11	40	93,33 ±17,74
	Gln27 (+)	14	60,72 ±15,29	17	54,85 ±22,75	13	100,45 ±33,24	22	92,15 ±21,28
MEF50	Gln27 (-)	32	53,43 ±25,81	41	68,65 ±23,12	25	96,99 ±18,54	40	98,67 ±18,95
	Gln27 (+)	14	68,23 ±26,26	17	64,32 ±24,11	13	157,47 ±221,53	22	101,98 ±22,42
FVCEx	Gln27 (-)	32	90,61 ±15,32	41	98,09 ±14,20	25	104,32 ±9,32	40	101,05 ±10,52
	Gln27 (+)	14	97,18 ±14,91	17	93,59 ±21,66	13	99,34 ±11,95	22	103,49 ±11,45
PEV	Gln27 (-)	32	81,35 ±19,96	41	93,40 ±22,41	25	113,17 ±13,70	40	116,41 ±19,68
	Gln27 (+)	14	95,24 ±23,30	17	88,59 ±23,61	13	114,44 ±15,77	22	122,56 ±11,88

Tabela 34. Parametry spirometryczne w badanych podgrupach w zależności od występowania allelu Glu27.
(+) oznacza obecność allelu, (-)-oznacza brak allelu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Glu27

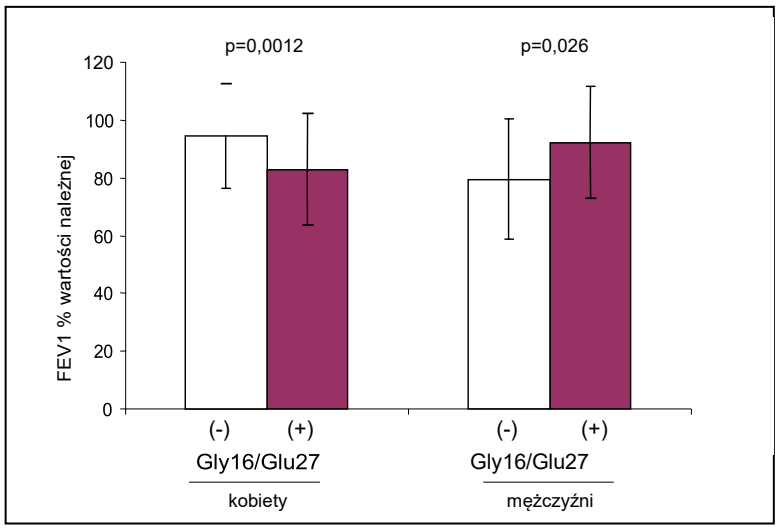
Parametr spirometryczny	Allel	Grupa I		Grupa II		Grupa III		Grupa IV	
		n	x±SD	n	x±SD	n	x±SD	N	x±SD
FEV1%	Glu27 (-)	36	80,44 ±20,67	39	86,62 ±20,48	28	101,90 ±9,80	50	101,87 ±10,74
	Glu27 (+)	10	76,15 ±24,13	19	85,61 ±18,48	10	98,16 ±11,63	12	96,07 ±9,93
VC	Glu27 (-)	36	93,03 ±14,54	39	95,48 ±21,25	28	101,35 ±10,65	50	103,61 ±11,92
	Glu27 (+)	10	93,63 ±20,39	19	97,09 ±12,59	10	102,76 ±13,81	12	96,83 ±10,94
FEV1/VC	Glu27 (-)	36	88,37 ±15,72	39	88,58 ±14,22	28	102,18 ±8,17	50	99,68 ±7,96
	Glu27 (+)	10	81,43 ±11,59	19	88,54 ±11,32	10	95,13 ±9,08	12	99,92 ±5,20
MEF25	Glu27 (-)	36	54,24 ±20,95	39	63,74 ±24,43	28	98,29 ±25,05	50	93,90 ±19,96
	Glu27 (+)	10	52,91 ±28,59	19	57,68 ±26,97	10	87,16 ±25,01	12	88,79 ±14,21
MEF50	Glu27 (-)	36	59,31 ±26,51	39	67,54 ±23,14	28	125,94 ±151,12	50	101,44 ±20,45
	Glu27 (+)	10	52,98 ±27,59	19	64,35 ±24,56	10	95,55 ±21,95	12	93,17 ±17,97
FVCEx	Glu27 (-)	36	92,70 ±15,21	39	96,19 ±17,86	28	102,54 ±10,02	50	102,96 ±10,64
	Glu27 (+)	10	92,30 ±19,63	19	97,95 ±14,24	10	102,82 ±12,00	12	97,56 ±10,96
PEV	Glu27 (-)	36	87,02 ±23,77	39	90,68 ±21,26	28	114,98 ±14,63	50	119,85 ±17,85
	Glu27 (+)	10	80,37 ±11,35	19	94,69 ±25,72	10	109,76 ±13,02	12	113,33 ±15,16

IV.3.2. Porównanie wyników badań czynnościowych układu oddechowego w zależności od diplotypu

Porównując wartości parametrów spirometrycznych w zależności od występującego diplotypu: Arg16/Gln27, Arg16/Glu27, Gly16/Gln27, Gly16/Glu27 nie stwierdzono różnic pomiędzy średnimi wartościami FEV1, VC, FEV1/VC, MEF25, MEF50, FVCEx, PEF w całej grupie chorych (I+II+III).

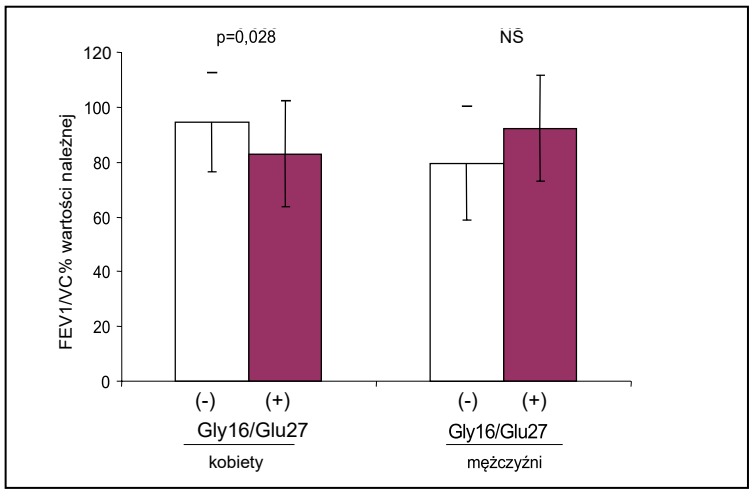
Dopiero po podziale względem płci stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy średnimi wartościami FEV1, MEF25 i MEF50 a występowaniem diplotypu Gly16/Glu27 zarówno u mężczyzn jak i u kobiet. Ponadto u kobiet zaobserwowano różnice w średnich wartościach FEV1/VC, PEF ale nie VC i FVCEx.

Średnie wartości FEV1 u kobiet posiadających diplotyp Gly16/Glu27 wynosiły 82,97%±19,52 i były niższe (p=0,012) od średnich wartości FEV1 u kobiet bez diplotypu Gly16/Glu27, które wynosiły 94,44%±18,05. Dla mężczyzn posiadających diplotyp Gly16/Glu27 średnie wartości FEV1 wynosiły 92,19%±19,40 i były wyższe (p=0,026) od średnich wartości FEV1 u mężczyzn bez diplotypu Gly16/Glu27, które wynosiły 79,44%±20,82. Wyniki przedstawiono na rycinie 17.



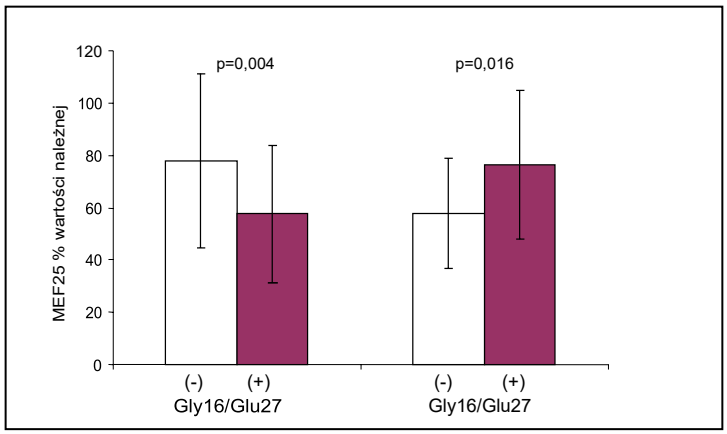
Ryc. 17. Porównanie średnich wartości FEV1 u kobiet i u mężczyzn w zależności od diplotypu Gly16/Glu27.(+) występuje diplotyp, (-) brak diplotypu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna.

Średnie wartości FEV1/VC przedstawiały się następująco: u kobiet z diplotypem Gly16/Glu27 były niższe (p=0,028) i wynosiły 90,47%±14,41, a u kobiet bez tego diplotypu- 97,46%±11,06, natomiast u mężczyzn nie zaobserwowano różnic między średnimi wartościami FEV1/VC. Wyniki przedstawiono na rycinie 18.



Ryc. 18. Porównanie średnich wartości FEV1/VC u kobiet i u mężczyzn w zależności od diplotypu Gly16/Glu27. (+) występowanie diplotypu, (-) brak diplotypu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna.

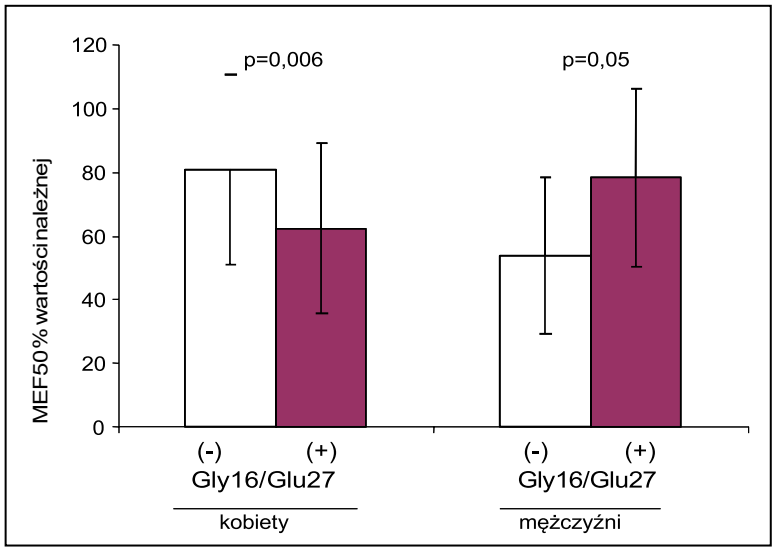
Podobnie średnie wartości MEF25 u kobiet posiadających diplotyp Gly16/Glu27 wynosiły 57,56%±26,39 były więc znacząco niższe (p=0,004) w porównaniu do średnich wartości MEF25 u kobiet bez tego diplotypu wynoszących 78,08%±33,34. Zaobserwowano również różnice w średnich wartościach MEF25, u mężczyzn posiadających diplotyp Gly16/Glu27 były one wyższe (p=0,016) i wynosiły 76,56%±28,40, w porównaniu do wartości MEF25 u mężczyzn bez diplotypu Gly16/Glu27, wynoszących 57,95%±21,01. Wyniki przedstawiono na rycinie 19.



Ryc. 19. Porównanie średnich wartości MEF25 u kobiet i u mężczyzn w zależności od diplotypu Gly16/Glu27. (+) występowanie diplotypu, (-) brak diplotypu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna.

Stwierdzono także znaczne różnice w średnich wartościach MEF50 (p=0,006), które dla kobiet z diplotypem Gly16/Glu27 wynosiły 62,40%±26,53 w porównaniu do średnich wartości u kobiet bez tego diplotypu, wynoszących 80,83%±29,66.

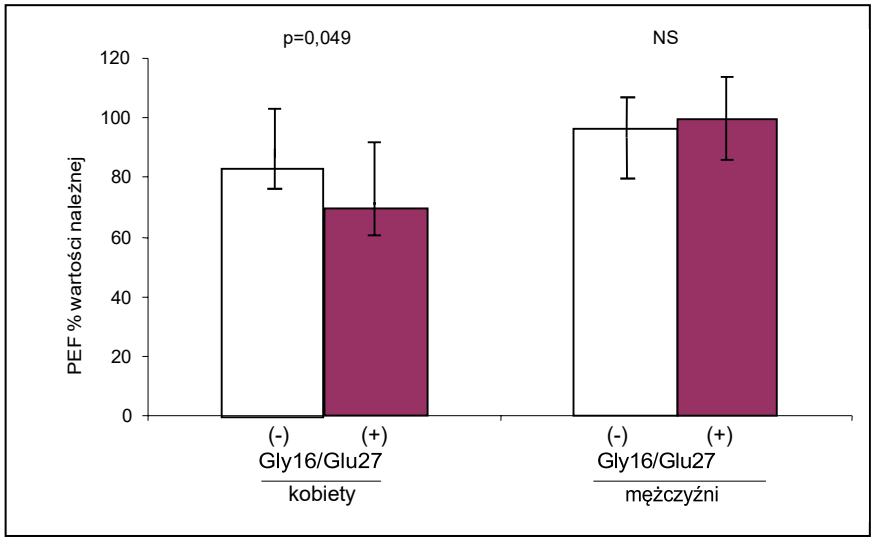
Średnie wartości MEF50 dla mężczyzn posiadających diplotyp Gly16/Glu27 wynosiły 78,51%±27,88 i były statystycznie wyższe (p=0,05) w porównaniu do średnich wartości u mężczyzn bez tego diplotypu, wynoszących 53,87%±24,51 (rycina 20).



Ryc. 20. Porównanie średnich wartości MEF50 u kobiet i u mężczyzn w zależności od obecności diplotypu Gly16/Glu27.(+) występouje diplotyp, (-) brak diplotypu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna.

Zaobserwowano ponadto, że średnie wartości PEF dla kobiet posiadających diplotyp Gly16/Glu27 wynosiły 62,40%±88,53 i były znacząco niższe (p=0,049) od średnich wartości PEF u kobiet bez tego diplotypu, wynoszących 80,83%±98,70.

Nie zaobserwowano podobnych różnic u mężczyzn. Powyższe wyniki przedstawia rycina21. Pozostałe wyniki zebrano w tabelach 35-38.



Ryc. 21. Porównanie średnich wartości PEF u kobiet i u mężczyzn w zależności od obecności diplotypu Gly16/Glu27. (+) występuje diplotyp, (-) brak diplotypu, przedstawiono średnie wartości ±odchylenie standardowe, p - istotność statystyczna.

Tabela 35. Parametry spirometryczne w grupie badanej w zależności od występowania diplotypu Arg16/Gln27
(+) oznacza obecność diplotypu, (-) brak diplotypu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Arg16/Gln27

Parametr spirometryczny	Diplotyp	Grupa chorych (I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1%	Arg16/Gln27 (-)	66	88,29 ±20,67	NS	31	84,96 ±20,37	NS	35	91,23 ±20,77	NS
	Arg16/Gln27 (+)	76	87,76 ±19,46		46	88,86 ±19,26		30	86,08 ±19,97	
VC	Arg16/Gln27 (-)	66	98,55 ±14,85	NS	31	95,41 ±15,08	NS	35	101,33 ±14,29	0,041
	Arg16/Gln27 (+)	76	96,18 ±14,42		46	97,41 ±15,55		30	94,31 ±12,51	
FEV1%/VC	Arg16/Gln27 (-)	66	89,48 ±13,43	NS	31	90,51 ±13,93	NS	35	88,57 ±13,11	NS
	Arg16/Gln27 (+)	76	92,62 ±14,37		46	94,85 ±13,25		30	89,20 ±15,56	
MEF25	Arg16/Gln27 (-)	66	70,20 ±33,50	NS	31	65,28 ±35,42	NS	35	74,56 ±31,57	NS
	Arg16/Gln27 (+)	76	66,50 ±25,51		46	65,29 ±27,42		30	68,35 ±22,59	
MEF50	Arg16/Gln27 (-)	66	72,71 ±32,22	NS	31	68,79 ±34,50	NS	35	76,18 ±30,12	NS
	Arg16/Gln27 (+)	76	70,98 ±24,80		46	69,72 ±25,00		30	72,93 ±24,79	
FVCEx	Arg16/Gln27 (-)	66	98,08 ±14,79	NS	31	94,94 ±14,51	NS	35	100,87 ±14,67	0,074
	Arg16/Gln27 (+)	76	69,03 ±15,96		46	97,28 ±16,47		30	94,12 ±15,23	
PEF	Arg16/Gln27 (-)	66	96,17 ±24,42	NS	31	92,46 ±25,47	NS	35	99,45 ±23,32	NS
	Arg16/Gln27 (+)	76	95,29± 22,21		46	92,29±19,75		30	99,88 ±25,18	

Tabela 36. Parametry spirometryczne w grupie badanej w zależności od występowania diplotypu Arg16/Glu27.
(+) oznacza obecność diplotypu, (-) brak diplotypu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Arg16/Glu27

Parametr spirometryczny	Diplotyp	Grupa chorych (I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	p	N	x±SD	p
FEV1%	Arg16/Glu27 (-)	92	87,67 ±21,08	NS	45	88,24 ±20,31	NS	47	87,12 ±22,00	NS
	Arg16/Glu27 (+)	50	88,62 ±17,90		32	85,95 ±18,98		18	93,37 ±15,14	
VC%	Arg16/Glu27 (-)	92	97,26 ±15,76	NS	45	96,40 ±16,75	NS	47	98,09 ±14,89	NS
	Arg16/Glu27 (+)	50	97,32 ±12,39		32	96,89 ±13,24		18	98,09 ±11,0	
FEV1%/VC	Arg16/Glu27 (-)	92	90,45 ±14,52	NS	45	93,86 ±12,95	NS	47	87,18 ±15,31	0,064
	Arg16/Glu27 (+)	50	92,47 ±12,98		32	92,03 ±14,63		18	93,25 ±9,71	
MEF25	Arg16/Glu27 (-)	92	70,54 ±31,18	NS	45	71,02 ±32,89	0,05	47	70,07 ±29,80	NS
	Arg16/Glu27 (+)	50	63,95 ±25,70		32	57,23 ±25,61		18	75,92 ±21,72	
MEF50	Arg16/Glu27 (-)	92	72,82 ±29,65	NS	45	73,06 ±30,56	NS	47	72,60 ±29,08	NS
	Arg16/Glu27 (+)	50	69,88 ±26,11		32	64,12 ±26,19		18	80,13 ±23,27	
FVCEx	Arg16/Glu27 (-)	92	96,56 ±16,45	NS	45	95,95 ±16,82	NS	47	97,15 ±16,24	NS
	Arg16/Glu27 (+)	50	97,76 ±13,41		32	96,88 ±14,09		18	99,33 ±12,33	
PEF	Arg16/Glu27 (-)	92	96,88 ±24,68	NS	45	95,45± 24,06	NS	47	98,26± 25,46	NS
	Arg16/Glu27 (+)	50	93,51 ±20,17		32	88,01± 18,41		18	103,28± 19,92	

Tabela 37.Parametry spirometryczne w grupie badanej w zależności od występowania diplotypu Gly16/Gln27.
(+) oznacza obecność diplotypu, (-) brak diplotypu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gly16/Gln27

Parametr spirometryczny	Diplotyp	Grupa chorych (I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	P	n	x±SD	p
FEV1%	Gly16/Gln27 (-)	49	86,11 ±21,32	NS	22	83,19 ±20,46	NS	27	88,49 ±22,09	NS
	Gly16/Gln27 (+)	93	89,00 ±19,25		55	88,93 ±19,30		38	89,11 ±19,44	
VC	Gly16/Gln27 (-)	49	97,07 ±16,53	NS	22	95,00 ±18,42	NS	27	98,76 ±14,95	NS
	Gly16/Gln27 (+)	93	97,39 ±13,60		55	97,24 ±14,00		38	97,62 ±13,19	
FEV1%/VC	Gly16/Gln27 (-)	49	88,65 ±12,03	NS	22	89,48 ±10,97	NS	27	87,98 ±12,99	NS
	Gly16/Gln27 (+)	93	92,48 ±14,80		55	94,55 ±14,36		38	89,48 ±15,11	
MEF25	Gly16/Gln27 (-)	49	63,81 ±28,03	NS	22	53,58 ±22,15	0,014	27	72,14 ±29,90	NS
	Gly16/Gln27 (+)	93	70,54 ±30,05		55	69,97 ±32,48		38	71,37 ±26,54	
MEF50	Gly16/Gln27 (-)	49	69,45 ±28,01	NS	22	62,22 ±26,22	NS	27	75,34 ±28,51	NS
	Gly16/Gln27 (+)	93	73,02 ±28,67		55	72,19 ±29,77		38	74,22 ±27,35	
FVCEx	Gly16/Gln27 (-)	49	97,20 ±16,74	NS	22	95,15 ±17,71	NS	27	98,87 ±16,06	NS
	Gly16/Gln27 (+)	93	96,87 ±14,75		55	96,81 ±14,90		38	96,97 ±14,73	
PEF	Gly16/Gln27 (-)	49	94,65 ±22,98	NS	22	31,95 ±23,39	NS	27	96,86 ±22,86	NS
	Gly16/Gln27 (+)	93	96,24 ±23,39		55	92,52 ±21,74		38	101,63 ±24,90	

Tabela 38. Parametry spirometryczne w grupie badanej w zależności od występowania diplotypu Gly16/Glu27.
(+) oznacza obecność diplotypu, (-) brak diplotypu, n - liczba badanych, x-wartość średnia ± odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gly16/Glu27

Parametr spirometryczny	Diplotyp	Grupa chorych (I+II+III)			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	P	n	x±SD	p
FEV1%	Gly16/Glu27 (-)	46	88,90 ±20,26	NS	29	94,44 ±18,05	0,012	17	79,44 ±20,82	0,026
	Gly16/Glu27 (+)	96	87,58 ±19,91		48	82,97 ±19,52		48	92,19 ±19,40	
VC	Gly16/Glu27 (-)	46	98,14 ±15,60	NS	29	101,01 ±16,13	0,06	17	93,25 ±13,74	NS
	Gly16/Glu27 (+)	96	96,87 ±14,19		48	93,94 ±14,29		48	99,80 ±13,62	
FEV1%/VC	Gly16/Glu27 (-)	46	92,39 ±15,47	NS	29	97,46 ±11,06	0,028	17	83,74 ±18,25	NS
	Gly16/Glu27 (+)	96	90,57 ±13,26		48	90,47 ±14,41		48	90,67 ±12,15	
MEF25	Gly16/Glu27 (-)	46	70,64 ±30,74	NS	29	78,08 ±33,34	0,004	17	57,95 ±21,01	0,016
	Gly16/Glu27 (+)	96	67,06 ±28,89		48	57,56 ±26,39		48	76,56 ±28,40	
MEF50	Gly16/Glu27 (-)	46	74,56 ±28,80	NS	29	80,83 ±29,66	0,006	17	53,87 ±24,51	0,05
	Gly16/Glu27 (+)	96	70,46 ±28,25		48	62,40 ±26,53		48	78,51 ±27,88	
FVCEx	Gly16/Glu27 (-)	46	97,19 ±16,98	NS	29	80,83 ±100,33	NS	17	91,83 ±16,42	0,061
	Gly16/Glu27 (+)	96	96,89 ±14,69		48	62,40 ±93,92		48	99,85 ±14,34	
PEF	Gly16/Glu27 (-)	46	98,76 ±23,55	NS	29	80,83 ±98,70	0,049	17	98,86 ±29,43	NS
	Gly16/Glu27 (+)	96	94,23 ±22,98		48	62,40 ±88,53		48	99,93 ±22,12	

IV.3.3. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu z reakcją oskrzeli na krótkodziałający lek β_2-adrenergiczny

Analiza obejmowała 102 chorych, u których wyjściowe wartości parametrów spirometrycznych wynosiły poniżej 80% wartości należnej. Badaną grupę podzielono ze względu na występowanie pojedynczego allelu i diplotypów polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu i uwzględniono podział na płeć.

Wartości odwracalności dla FEV1, FEV1/VC, FVCEx oraz PEF nie różniły się w sposób istotny statystycznie w zależności od allelu w całej grupie oraz uwzględniając podział na płeć badanych.

Zaobserwowano różnice w średnich wartościach MEF25 u badanych kobiet w zależności od allelu Arg16. U kobiet, u których występował allel Arg16 zaobserwowano wyższy stopień odwracalności oskrzeli dla MEF25 (p=0,017) wynoszący 129,23±24,3 w porównaniu do wartości obserwowanych u kobiet bez tego allelu, które wynosiły 112,9 ±25,2.

U mężczyzn, u których występował allel Gly16 zaobserwowano wyższy stopień odwracalności oskrzeli dla MEF50 (p=0,001), w porównaniu do wartości obserwowanych u mężczyzn bez tego allelu, a średnie wartości odwracalności wynosiły odpowiednio: 135,59 ±29,3 oraz 115,03 ±20,7. Również u mężczyzn obecność allelu Glu27 związana była z niższymi wartościami odwracalności (p=0,04) dla FEV1/VC, natomiast wyższe wartości MEF50 zaobserwowano u mężczyzn posiadających allel Glu27.

Średnie wartości FEV1/VC po podaniu leku wynosiły 105,72±7,6 dla mężczyzn z allelem Glu27, a 112,56±13,4 bez allelu Glu27. Wartości MEF50 po podaniu leku u mężczyzn z allelem Glu27 wynosiły odpowiednio 147,29±41,9 a bez tego allelu 127,5±18,9.

Wyniki przedstawiono w tabelach 39-42.

Analizując wartości parametrów oddechowych po podaniu β_2-sympatykomimetyku w zależności od diplotypu zaobserwowano następujące różnice (p=0,05): dla kobiet nie posiadających diplotypu Arg16/Gln27 wartości MEF25 były niższe i wynosiły 116,23±27, a dla kobiet posiadających diplotyp Arg16/Gln27 wynosiły129,09±23,5. Odwrotnie, dla mężczyzn posiadających diplotyp Arg16/Gln27 wartości MEF25 były niższe i wynosiły 117,8±21,1, a dla tych bez diplotypu Arg16/Gln27, wartości wynosiły 132,22±36,9 (dane nie prezentowane).

Tabela 39. Porównanie zmian parametrów spirometrycznych po podaniu krótko działającego β_2-sympatykomimetyku w zależności od allelu Arg16.
Arg16 (-) brak allelu, Arg16 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, p - poziom istotności

Arg16

Zmiana parametru spirometrycznego (%)	Allel	Grupa chorych			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	p	N	x±SD	p
FEV1	Arg16 (-)	39	113,06 ±16,3	NS	21	111,13 ±17,6	NS	18	115,29 ±14,9	NS
	Arg16 (+)	63	114,33 ±18,6		39	113,51 ±20,2		24	115,66 ±15,9	
VC	Arg16 (-)	39	107,39 ±10,9	NS	21	108,13 ±12,5	NS	18	106,51 ±8,9	NS
	Arg16 (+)	63	105,95 ±9,8		39	107,46 ±11,3		24	103,5 ±6,2	
FEV1%/VC	Arg16 (-)	39	105,73 ±8,8	NS	21	103,71 ±8,6	NS	18	108,09 ±8,7	NS
	Arg16 (+)	63	108,1 ±12,7		39	105,58 ±11,1		24	112,20 ±14,28	
MEF25	Arg16 (-)	39	120,36 ±28,7	NS	21	112,9 ±25,2	0,017	18	129,07 ±30,8	NS
	Arg16 (+)	63	126,23 ±26,7		39	129,23 ±24,36		24	121,36 ±30,01	
MEF50	Arg16 (-)	39	129,64 ±32,9	NS	21	118,65 ±27,9	NS	18	142,46 ±34,4	NS
	Arg16 (+)	63	129,01 ±28		39	130,25 ±31		24	127 ±22,8	
FVCEx	Arg16 (-)	39	106,57 ±8,8	NS	21	106,84 ±10,5	NS	18	106,25 ±6,6	NS
	Arg16 (+)	63	106,5 ±12,6		39	105,99 ±14,2		24	107,33 ±9,8	
PEF	Arg16 (-)	39	114,12 ±28,7	NS	21	113,56 ±25,1	NS	18	114,76 ±33,2	NS
	Arg16 (+)	63	111,56 ±22,3		39	111,37 ±18,1		24	111,86 ±28,3	

Tabela 40. Porównanie zmian parametrów spirometrycznych po podaniu krótko działającego β_2-sympatykomimetyku w zależności od allelu Gly16
Gly16 (-) brak allelu, Gly16 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gly16

Zmiana parametru spirometrycznego (%)	Allel	Grupa chorych			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1	Gly16 (-)	8	117,82 ±22,3	NS	4	115,38 ±20,02	NS	4	120,26 ±27,3	NS
	Gly16 (+)	94	113,50 ±17,3		56	112,49 ±19,3		38	115 ±14	
VC	Gly16 (-)	8	109,34 ±14,9	NS	4	115,39±20,4	NS	4	103,29 ±2,1	NS
	Gly16 (+)	94	106,26 ±9,7		56	107,15 ±10,8		38	104,95 ±7,9	
FEV1%/VC	Gly16 (-)	8	109,3 ±18,6	NS	4	100,1 ±4,2	NS	4	118,49 ±23,8	NS
	Gly16 (+)	94	107,02 ±10,7		56	105,27 ±10,5		38	109,59 ±10,6	
MEF25	Gly16 (-)	8	115,18 ±27,5	NS	4	125,72 ±28,5	NS	4	104,64 ±25,7	NS
	Gly16 (+)	94	124,74 ±27,5		56	123,36 ±25,7		38	126,77 ±30,2	
MEF50	Gly16 (-)	8	126,74 ±22,8	NS	4	138,44 ±20,4	NS	4	115,03 ±20,7	0,001
	Gly16 (+)	94	129,47 ±30,4		56	125,31 ±30,7		38	135,59 ±29,3	
FVCEx	Gly16 (-)	8	108,27±12,02	NS	4	110,39 ±17,5	NS	4	106,14 ±4,5	NS
	Gly16 (+)	94	106,38 ±11,2		56	105,99 ±12,7		38	106,94 ±8,9	
PEF	Gly16 (-)	8	110,16 ±14,5	NS	4	111,67 ±17,9	NS	4	108,65 ±12,9	NS
	Gly16 (+)	94	112,73±25,6		56	112,17±20,9		38	113,57 ±31,5	

Tabela 41.Porównanie zmian parametrów spirometrycznych po podaniu krótko działającego β_2-sympatykomimetyku w zależności od allelu Gln27
Gln27 (-) brak allelu, Gln27 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, p - poziom istotności.

Gln27

Zmiana parametru spirometrycznego (%)	Allel	Grupa chorych			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	P	n	x±SD	p
FEV1	Gln27 (-)	68	114,18 ±18,8	NS	41	114,46 ±21,6	NS	27	113,75±13,8	NS
	Gln27 (+)	34	113,16 ±15,5		19	108,84 ±12,1		15	118,64±17,9	
VC	Gln27 (-)	68	107,32 ±11,1	NS	41	108,50 ±12,1	NS	27	105,52±9,1	NS
	Gln27 (+)	34	104,87 ±8,1		19	105,96 ±10,5		15	103,48±2,9	
FEV1%/VC	Gln27 (-)	68	106,6±10,4	NS	41	105,83 ±11,8	NS	27	107,77 ±8,01	NS
	Gln27 (+)	34	108,39±13,2		19	102,97 ±5,6		15	115,25 ±16,7	
MEF25	Gln27 (-)	68	125,11 ±30,1	NS	41	123,67 ±28,7	NS	27	127,28±32,6	NS
	Gln27 (+)	34	121,75 ±21,6		19	123,18 ±18,4		15	119,95±25,8	
MEF50	Gln27 (-)	68	130,84±33,4	NS	41	127,23 ±34,4	NS	27	136,31 ±31,7	NS
	Gln27 (+)	34	126,08±21,1		19	123,94 ±19,03		15	128,79 ±23,7	
FVCEx	Gln27 (-)	68	106,86 ±12	NS	41	107,50 ±14,1	NS	27	105,89±8,2	NS
	Gln27 (+)	34	105,86 ±9,7		19	103,68 ±9,8		15	108,63±9,1	
PEF	Gln27 (-)	68	113,82 ±27,9	NS	41	114,59 ±23,4	NS	27	112,66±34,2	NS
	Gln27 (+)	34	109,95 ±17,1		19	106,83 ±11,7		15	113,91±21,9	

Tabela 42. Porównanie zmian parametrów spirometrycznych po podaniu krótko działającego β_2-sympatykomimetyku w zależności od allelu Glu27
Glu27 (-) brak allelu, Glu27 (+) obecność allelu, n - liczba badanych, x - wartość średnia, SD - odchylenie standardowe, p - poziom istotności

Glu27

Zmiana parametru spirometrycznego (%)	Allel	Grupa chorych			Kobiety			Mężczyźni		
		n	x±SD	p	n	x±SD	p	n	x±SD	p
FEV1	Glu27 (-)	74	114,63±19,3	NS	4	113,75±21,6	NS	29	115,98±15,1	NS
	Glu27 (+)	28	111,77±12,7		15	109,45±8,1		13	114,45±16,4	
VC	Glu27 (-)	74	106,25±10,3	NS	45	108,09±11,9	NS	29	103,4±6,3	NS
	Glu27 (+)	28	107,16±10,1		15	106,53±11,1		13	107,9±9,2	
FEV1%/VC	Glu27 (-)	74	107,86±12,6	NS	45	104,84±11,1	NS	29	112,56±13,4	0,04
	Glu27 (+)	28	105,43±7,3		15	105,19±7,4		13	105,72±7,6	
MEF25	Glu27 (-)	74	123,18±22,6	NS	45	125,28±24,1	NS	29	119,93±20,2	NS
	Glu27 (+)	28	126,13±37,9		15	118,23±30,3		13	135,24±44,6	
MEF50	Glu27 (-)	74	128,58±27,8	NS	45	129,27±32,4	NS	29	127,5±18,9	0,04
	Glu27 (+)	28	131,03±35,2		15	116,94±20,6		13	147,29±41,9	
FVCEx	Glu27 (-)	74	107,06±12,7	NS	45	106,48±14,7	NS	29	107,96±9,04	NS
	Glu27 (+)	28	105,12±5,6		15	105,71±4,5		13	104,43±6,9	
PEF	Glu27 (-)	74	112,64±24,6	NS	45	113,50±23,1	NS	29	111,3±27,1	NS
	Glu27 (+)	28	112,27±26,1		15	108,04±10,02		13	117,14±36,9	

IV.4. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego z całkowitym stężeniem IgE

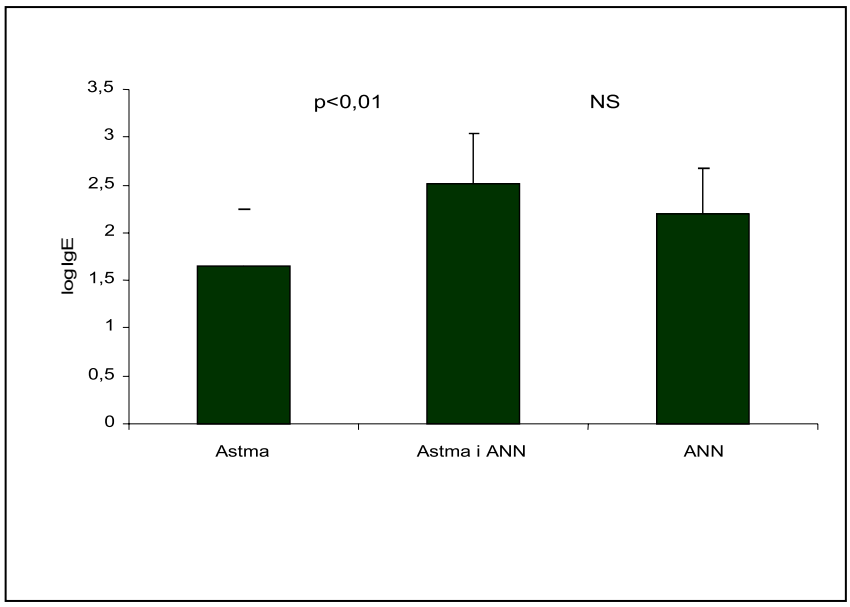
Całkowite stężenie IgE oraz wynik punktowych testów skórnych świadczą o predyspozycji do wystąpienia chorób alergicznych. Dlatego poniższa analiza miała na celu zbadanie występowania związku pomiędzy polimorfizmem Arg16Gly i Gln27Glu a skłonnością do wystąpienia alergii. Badaniem objęto 136 chorych u których wykonano pomiar całkowitego stężenia IgE. Stwierdzono, najwyższe wartości stężenia IgE w grupie chorych na astmę oskrzelową z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa: 671,3±99,2 U/ml, w grupie chorych na astmę oskrzelową te wartości były najniższe: 115±177,5 U/ml, natomiast w grupie chorych na alergiczny nieżyt nosa średnie wartości IgE całkowitego wynosiły 268,6±268,6. Wartości całkowitego IgE w poszczególnych podgrupach i liczebność grup przedstawiono w tabeli 43.

Tabela 43. Porównanie średnich wartości całkowitego IgE w podgrupach chorych.
n - liczba badanych, x-wartości średnie, SD - odchylenie standardowe

Grupa	N	IgE (U/ml)	
	136	X	SD
I. Chorzy na astmę oskrzelową	42	115,2	177,5
II. Chorzy na astmę oskrzelową i alergiczny nieżyt nosa	57	671,3	99,2
III. Chorzy na alergiczny nieżyt nosa	37	268,6	292,6

W analizie stosowano logarytm dziesiętny IgE.

Średnie wartości logIgE całkowitego były najwyższe u chorych na astmę z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa i wynosiły: 2,51± 0,53, natomiast średnie wartości logIgE w grupie chorych na astmę oskrzelową wynosiły 1,66± 0,59. Różnica ta była istotna statystycznie ($p<0,01$). W grupie chorych na alergiczny nieżyt nosa średnie wartości nie różniły się od wartości obserwowanych u chorych na astmę z alergicznym nieżytem nosa i wynosiły 2,19± 0,48. Porównanie przedstawiono na rycinie 22.

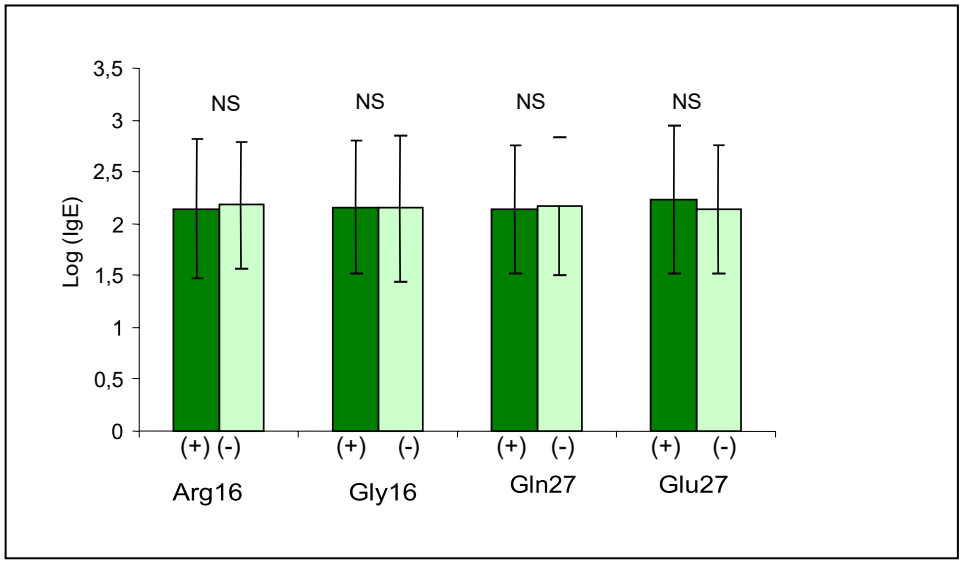


Ryc. 22. Porównanie wartości średnich logIgE całkowitego w podgrupach chorych przedstawiono wartości średnie±SD,p - istotność statystyczna, NS-nieistotne statystycznie.

IV.4.1. Badanie związku allelu ze stężeniem IgE

Nie zaobserwowano różnic pomiędzy średnimi wartościami logIgE całkowitego w zależności od występowania allelu Arg16, Gly16, Gln27 i Glu27.

Średnie wartości log IgE dla chorych z allelem Arg16 wynosiły 2,14±0,67, a dla chorych bez tego allelu 2,18±0,67, średnie wartości dla chorych z allelem Gly16 wynosiły 2,16±0,64 a dla chorych bez tego allelu wynosiły 2,14±0,69, dla pacjentów posiadających allel Gln27 wynosiły 2,14±0,61 natomiast dla chorych bez tego allelu 2,17±0,67. Z kolei dla chorych z allelem Glu27 średnie wartości logIgE wynosiły 2,24±0,71, a dla chorych bez tego allelu 2,13±0,62. Wyniki przedstawiono na rycinie 23.



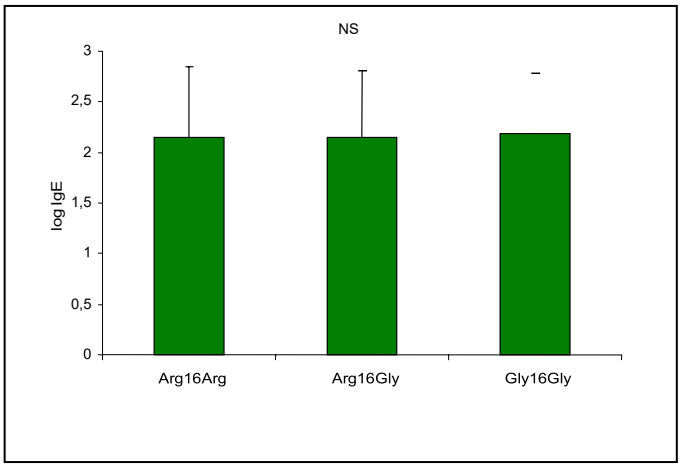
Ryc. 23. Porównanie średnich wartości logIgE całkowitego w zależności od allelu. (+) oznacza występowanie allelu, (-) brak allelu, przedstawiono wartości średnie ±SD, p - istotność statystyczna.

IV.4.2. Badanie związku genotypów i diplotypów ze stężeniem IgE.

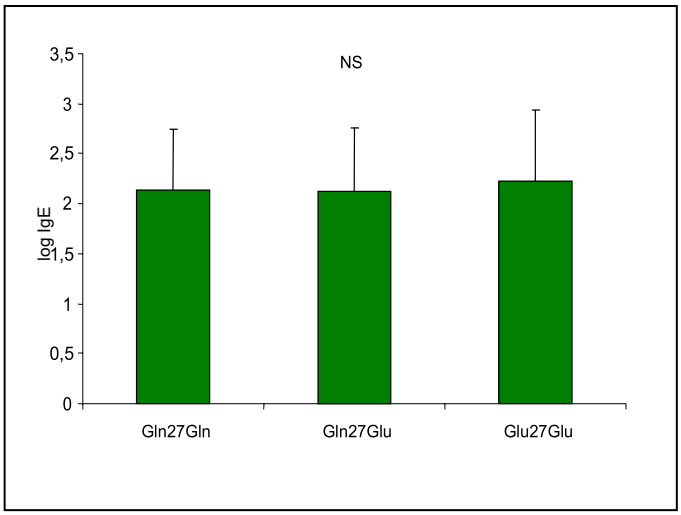
W badanej grupie nie zaobserwowano różnic w wartościach całkowitego stężenia IgE w zależności od występującego genotypu polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Gly.

Wartości średnie logIgE w badanych grupach były następujące: dla homozygot Arg16Arg: 2,15± 0,67, dla heterozygot Arg16Gly 2,24± 0,67, dla homozygot Gly16Gly 2,12± 0,60. Z kolei średnie wartości dla homozygot Gln27Gln wynosiły 2,149± 0,61, dla heterozygot Gln27Glu 2,13± 0,63, dla homozygot Glu27Glu 2,23 ± 0,71. Wyniki przedstawiono na rycinie 24.

A



B



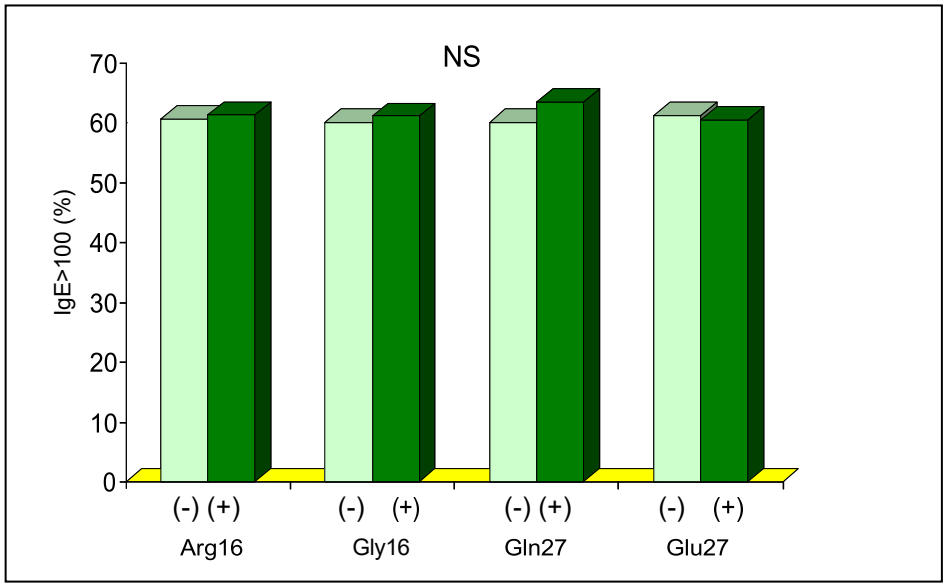
Ryc. 24. Porównanie średnich wartości logIgE w zależności od występującego polimorfizmu Arg16Gly (A), Gln27Glu (B).
przedstawiono wartości średnie logIgE±odchylenie standardowe, na osi odciętych występujący polimorfizm, NS - brak istotności statystycznej.

Analizując diplotypy, również nie zaobserwowano różnic znamiennych statystycznie pomiędzy średnimi wartościami logIgE całkowitego, a występowaniem diplotypu.

IV.4.3 Badanie związku polimorfizmów z podwyższonym stężeniem IgE

Analizę przeprowadzono w grupie chorych z podwyższonym całkowitym stężeniem IgE >100U/ml, porównywano ich do chorych ze stężeniem IgE <100U/ml oraz u pacjentów z całkowitym stężeniem IgE>200U/ml w porównaniu do chorych u których pomiary IgE całkowitego nie przekraczały 200.

Obserwując rozkład wartości podwyższonego IgE u chorych podzielonych na grupy pod względem występowania allelu nie stwierdzono istotnych statystycznie związków pomiędzy podwyższonym poziomem IgE>100U/ml a wystąpieniem allelu Arg16, Gly16, Gln27 i Glu27, również nie stwierdzono istotnych związków pomiędzy podwyższonym poziomem IgE>200U/ml a obecnością allelu. Wyniki przedstawiono na rycinie 25.



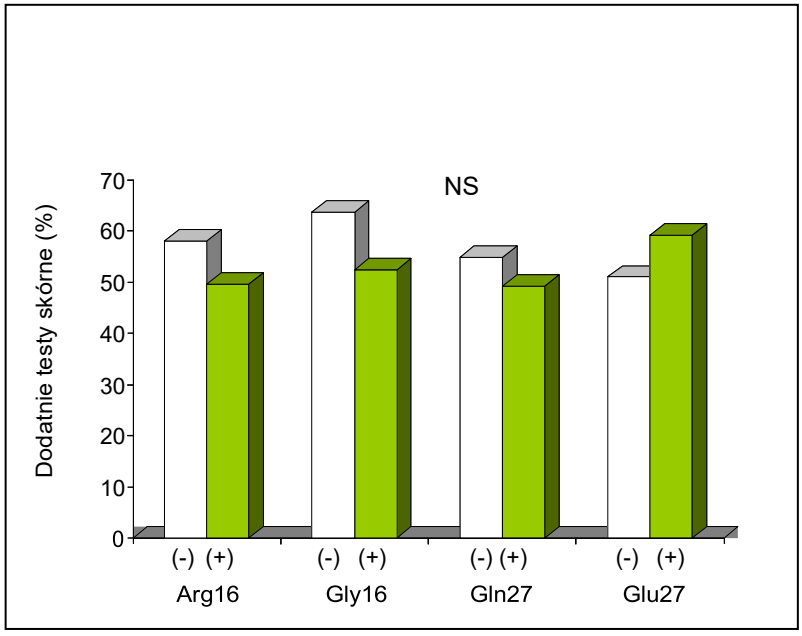
Ryc. 25. Porównanie średnich wartości całkowitego IgE>100U/ml w zależności od występowania allelu. (+) występowanie allelu, (-) brak allelu, na wykresach przedstawiono odsetek osób z wartością IgE powyżej 100 IU/ml, NS- nieistotne statystycznie.

IV.4.4. Badanie związku polimorfizmów z dodatnim wynikiem alergicznych testów skórnych

Badanie wykonano u 106 osób z grupy chorych, u których stwierdzono dodatni wynik punktowych testów skórnych i porównano do osób z testami ujemnymi.

Nie zaobserwowano różnic w procentowych rozkładach dodatnich testów skórnych w zależności od występującego allelu. Wyniki przedstawiono na rycinie 26.

Przeprowadzono również analizę wieloczynnikową ANOVA dotyczącą wpływu polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Glu na dodatni wynik testów skórnych i podwyższony poziom IgE jako wykładników alergii. W analizie wariancji ANOVA nie stwierdzono zależności pomiędzy genotypem a dodatnim wynikiem testów skórnych, genotypem a IgE i interakcji pomiędzy nimi.



Ryc. 26. Porównanie występowania dodatnich testów skórnych w zależności od allelu. (+) występowanie allelu, (-) brak allelu; przedstawiono odsetek osób z dodatnimi testami skórnymi, NS-brak istotności statystycznej.

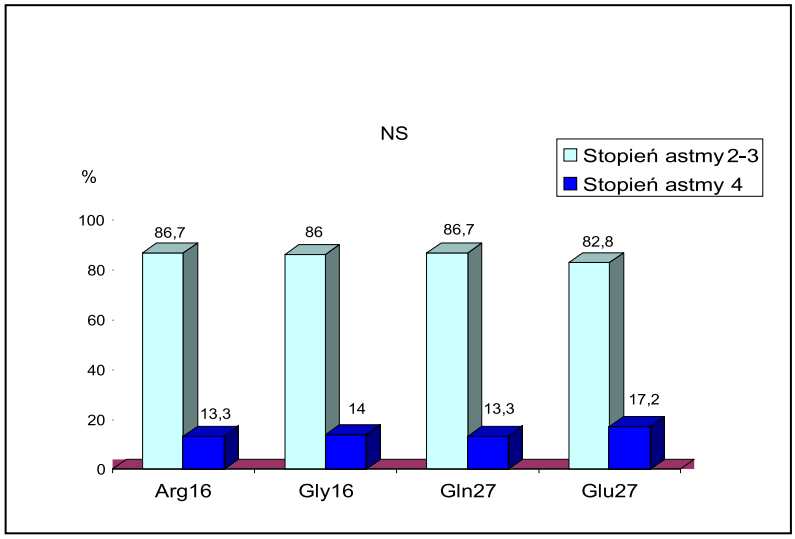
IV.5. Badanie związku występowania polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β2-adrenergicznego z wybranymi parametrami klinicznymi

Przeprowadzono analizę związku pomiędzy występowaniem polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Glu a następującymi parametrami klinicznymi: stopień ciężkości astmy, zgłaszane przez pacjenta objawy jak napadowy, suchy kaszel, duszność nocna, świszczący oddech, dodatni wywiad rodzinny w kierunku astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa.

IV.5.1. Badanie związku polimorfizmów ze stopniem ciężkości astmy

Do badania zakwalifikowano chorych na astmę oskrzelową stopnia lekkiego i umiarkowanego i porównano do chorych na ciężką astmę. Badaną grupę podzielono pod względem występującego allelu.

U 60 chorych stwierdzono astmę oskrzelową umiarkowaną (42,3%), u 26 średniego stopnia (18,3%), natomiast na astmę ciężką chorowało 15osób (10,6%). Porównując procentowy rozkład chorych w stopniu umiarkowanym i średnim do chorych na astmę w stopniu ciężkim, w zależności od występującego allelu, nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie, tym samym nie stwierdzono aby stopień ciężkości astmy okrzelowej był związany z występowaniem polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Glu w badanej grupie chorych. Wyniki przedstawiono na rycinie 27.



Ryc. 27 Porównanie stopnia ciężkości astmy oskrzelowej (2-3 oraz 4) w zależności od występującego allelu.
Na osi rzędnych przedstawiono występowanie allelu Arg16, Gly16, Gln27, Glu27.
Na osi odciętych zaznaczono procentowy rozkład chorych o różnym stopniu ciężkości astmy, NS-brak istotności statystycznej.

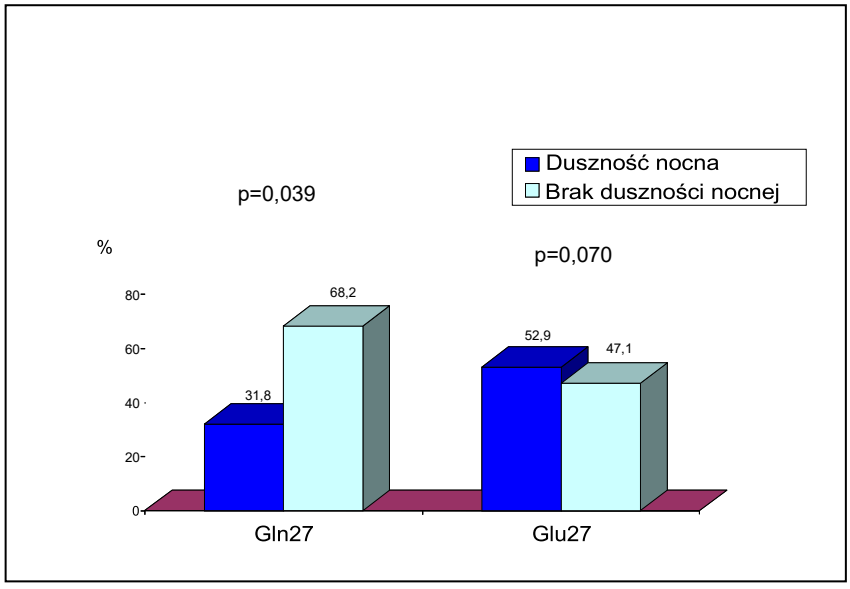
IV.5.2. Analiza związku polimorfizmów z objawami choroby

Pod uwagę brano następujące objawy zgłaszane przez chorych: napadowy suchy kaszel, świszczący oddech oraz duszność występującą w godzinach nocnych.

Istotny statystycznie związek między polimorfizmem a występowaniem objawów choroby zaobserwowano dla polimorfizmu Gln27Glu i objawów duszności w nocy.

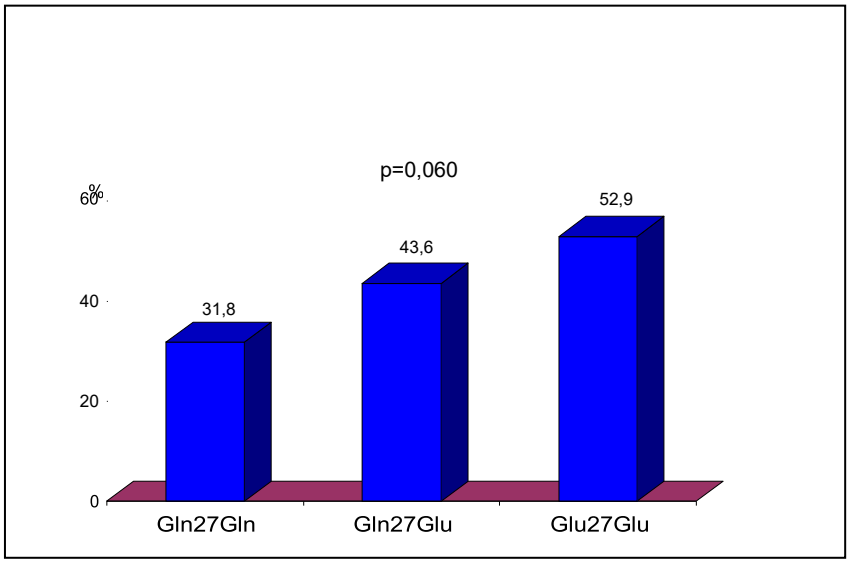
W grupie badanej 86 osób zgłaszało duszność w nocy (60,6%). Porównując średnie w grupie z dusznością i bez duszności w zależności od występowania allelu, stwierdzono znamiennie rzadsze występowanie duszności u chorych posiadających allel Gln27 (p=0,039), natomiast u osób posiadających allelu Glu27 nieznamiennie częściej obserwowano duszność w nocy (p=0,07). Nie zaobserwowano znamiennych związków pomiędzy występowaniem polimorfizmu Arg16Gly a objawami duszności w nocy.

Powyższą zależność zilustrowano na rycinie 28.



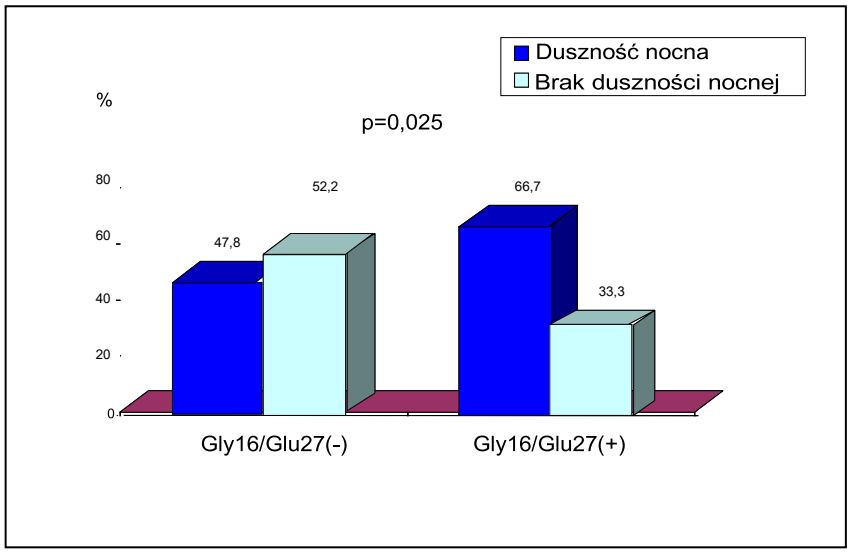
Ryc. 28. Związek między występowaniem allelu Gln27 i Glu 27 a dusznością w nocy.
Na osi rzędnych przedstawiono występowanie allelu Gln27 i Glu27.
Na osi odciętych zaznaczono procentowy rozkład chorych zgłaszających duszność lub jej brak, p - poziom istotności.

Następnie zbadano czy występuje związek pomiędzy zgłaszaną przez pacjentów dusznością w nocy a genotypem polimorfizmu Gln27Glu. Zaobserwowano, że najrzadziej te objawy zgłaszały osoby z genotypem Gln27Gln-średnio 31,3%, częściej osoby z genotypem Gln27Glu-średnio 43,6%, a najczęściej objawy duszności w nocy zgłaszały osoby z genotypem Glu27Glu-52,9% różnice te nie były znamienne statystycznie (p=0,06). Wyniki przedstawiono na rycinie 29.



Ryc. 29 Występowanie objawów duszności w nocy w zależności od genotypu polimorfizmu Gln27Glu. Na osi rzędnych przedstawiono występowanie homozygot Gln27Gln, heterozygot Gln27Glu i homozygot Glu27Glu. Na osi odciętych zaznaczono odsetek chorych zgłaszających duszność, p - poziom istotności.

Zbadano również występowanie objawów duszności w nocy, w zależności od występowania diplotypów. Zaobserwowano u osób z diplotypem Gly16/Glu27 znamiennie częstsze (p=0,025) występowanie duszności w nocy w porównaniu do osób nie posiadających tego diplotypu. Dla pozostałych diplotypów nie zaobserwowano podobnych związków. Wynik analizy przedstawiono na rycinie 30.



Ryc. 30. Występowanie objawów duszności w nocy w zależności od diplotypu Gly16/Glu27. Na osi rzędnych przedstawiono występowanie diplotypu Gly16/Glu27(+) lub jego brak(-). Na osi odciętych zaznaczono odsetek chorych zgłaszających duszność, p - poziom istotności.

IV.6. Podsumowanie wyników

Przeprowadzone badania przedstawiają związki zmienności genetycznej receptora β_2-adrenergicznego z parametrami czynności układu oddechowego oraz objawami klinicznymi i całkowitym stężeniem IgE w surowicy, w grupie chorych na astmę oskrzelową i alergiczny nieżyt nosa.

Na podstawie przeprowadzonych badań i analiz statystycznych otrzymano następujące wyniki:

1. Częstości genotypowe i alleliczne badanych polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego nie różnią się pomiędzy grupą chorych a kontrolną, podobnie w podgrupach chorych na astmę oskrzelową, astmę z towarzyszącym alergicznym nieżytem nosa i chorych na alergiczny nieżyt nosa w porównaniu do grupy kontrolnej.
2. Pomiędzy dwoma badanymi polimorfizmami stwierdzono występowanie sprzężenia (*linkage disequilibrium*). Obraz kliniczny choroby ma związek nie tyle z pojedynczym polimorfizmem co ich układem. Analiza haplotypów przyczynia się do dokładniejszego poznania wzajemnego oddziaływania badanych polimorfizmów.
3. W grupie chorych znamiennie częściej występował układ Gly16Gly-Glu27Glu oraz diplotyp Gly16/Gln27, zależność tę zaobserwowano również w grupie badanych mężczyzn, ale nie u kobiet. W grupie chorych i w grupie kontrolnej nie stwierdzono występowania układów Arg16Arg-Glu27Glu.
4. Obecność allelu Gln27 w grupie kobiet związana była z wyższymi wartościami parametrów oddechowych: FEV1, FEV1/VC, MEF25, MEF50.
5. W grupie mężczyzn zaobserwano natomiast, że obecność allelu Gln27 wiązała się z niższymi wartościami spirometrycznymi: FEV1, MEF25 i MEF50.
6. W grupie badanych kobiet obecność allelu Glu27 związana była z niższymi wartościami parametrów oddechowych: FEV1/VC, MEF25 i MEF 50.
7. Obecność diplotypu Gly16/Glu27 związana była z niższymi wartościami spirometrycznymi: FEV1, FEV1/VC, MEF25, MEF50, PEF u kobiet, natomiast u mężczyzn obecność tego diplotypu związana była z wyższymi wartościami FEV1, MEF25, MEF50.

8. Zaobserwowano wyższe wartości MEF25 po podaniu krótkodziałającego leku β_2-adrenergicznego u kobiet posiadających allel Arg16 w porównaniu do kobiet bez tego allelu. Jednocześnie u kobiet wykazujących diplotyp Arg16/Gln27 wartości MEF25 po podaniu leku były wyższe niż u kobiet bez tego diplotypu. Natomiast u mężczyzn z diplotypem Arg16/Gln27 wartości MEF25 były niższe niż u mężczyzn bez tego diplotypu.
9. Nie stwierdzono powiązania pomiędzy polimorfizmem Arg16Gly i Gln27Glu a całkowitym stężeniem IgE w surowicy, w badanej grupie chorych.
10. W badanej grupie polimorfizm Arg16Gly i Gln27Glu nie był związany z dodatnim wynikiem alergicznych punktowych testów skórnych.
11. Obecność diplotypu Gly16/Glu27 związana była z częstszym występowaniem objawów duszności w nocy, natomiast obecność allelu Gln27 związana była z rzadszym występowaniem tych objawów.

V. DYSKUSJA

Choroby alergiczne, w tym astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa, stanowią istotny problem epidemiologiczny w populacji światowej [12, 98], dlatego wciąż poszukuje się metod ich skuteczniejszego diagnozowania i leczenia.

Astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą o charakterze zapalnym, której złożony obraz kliniczny wynika z uwarunkowań genetycznych oraz czynników środowiskowych wzajemnie na siebie oddziałujących [48]. Do tego dołącza się także zmienna odpowiedź na stosowane leczenie u poszczególnych pacjentów, co jeszcze bardziej utrudnia poznanie patomechanizmów tej choroby [139].

Różnice w indywidualnej odpowiedzi na zastosowane leczenie w astmie mogą wynikać ze stopnia ciężkości choroby, wieku pacjenta, współistniejących schorzeń, stosowania innych leków, a także niekorzystnych czynników środowiska [139]. Uważa się że czynniki genetyczne w około 80% przyczyniają się do zmiennej odpowiedzi na leczenie u osób rasy białej [140], dlatego analiza związków pomiędzy występowaniem polimorfizmu genetycznego a fenotypem choroby ma szczególne znaczenie w diagnostyce i leczeniu astmy jak również innych chorób alergicznych. Postęp technologiczny w dziedzinie biologii molekularnej umożliwił rozpowszechnienie badań dotyczących genetycznego podłoża częstych chorób i diagnostyki chorób dziedzicznych wywołanych pojedynczą mutacją. Przełomowym momentem w badaniach genetycznych było odkrycie w 1983 przez Kary Mullisa metody PCR, dzięki której w krótkim czasie, nawet z małej ilości materiału genetycznego można przy pomocy technik takich jak RFLP czy *Southern blot* zlokalizować występujący polimorfizm. Obecnie genetyka zajmuje się nie tylko lokalizacją zmian w genotypie, ale przede wszystkim badaniem wpływu zmienności genetycznej na fenotyp. Praca miała na celu zbadanie wpływu zmienności genetycznej receptora β_2-adrenergicznego na czynność układu oddechowego i wybrane parametry kliniczne u chorych na astmę oskrzelową i alergiczny nieżyt nosa.

Metodą RFLP, po uprzedniej amplifikacji fragmentu DNA, analizowano dwa polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) występujące w obrębie sekwencji kodującej genu dla receptora β_2-adrenergicznego: polimorfizm A➔G w kodonie 46, z którego wynika zamiana aminokwasów Arg➔Gly w pozycji 16 łańcucha polipeptydowego oraz C➔G w kodonie 79 i wynikająca z tego zamiana Gln➔Glu w pozycji 27.

Polimorfizmy te występują z dość dużą częstością w populacji (częstość występownia alleli polimorficznych >0.15) [141].

Obecnie naukowcy skłaniają się do stwierdzenia, że astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa stanowią tę samą jednostkę chorobową o różnej lokalizacji, traktując je jako „continuum zmian zapalnych toczących się w jednych drogach oddechowych" [4, 9, 36], dlatego w pracy analizowano uzyskane wyniki wspólnie z zaznaczeniem występujących różnic pomiędzy badanymi.

V.1. Wpływ polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu na wystąpienie astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa

Częstość występowania poszczególnych alleli była podobna do częstości alleli opisywanych dla innych badanych populacji [104, 108, 113, 128, 142, 143], w tym populacji polskiej [82, 131].

W przeprowadzonej analizie zwraca uwagę mniejsza niż opisywano częstość allelu Arg16, szczególnie formy homozygotycznej Arg16Arg, natomiast wyniki otrzymane przez Hall i wsp. są podobne do otrzymanych w naszym badaniu [112]. Zbyt mała w stosunku do oczekiwanej liczba homozygot Arg16Arg daje w efekcie częściową zgodność z równowagą Hardy-Weinberga. Wyjaśnieniem dla ograniczonej liczby homozygot pod względem allelu Arg16 mogą być różnice w rozkładach genotypów w różnych populacjach, tak jak to podaje Santillan w przypadku populacji meksykańskiej, gdzie częstość allelu Glu27 (formy homozygotycznej Glu27Glu) była znacznie niższa niż w opisywanych populacjach [118]. Można przyjąć także hipotezę o bardzo jednorodnej grupie chorych zakwalifikowanych do badania.

W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano związków między żadnym z badanych polimorfizmów a wystąpieniem astmy oskrzelowej lub alergicznego nieżytu nosa co pozwala wnioskować, że badane polimorfizmy Arg16Gly i Gln27Glu nie są pierwotną przyczyną astmy lub alergicznego nieżytu nosa. Wyniki te potwierdza większość autorów [63, 86, 104, 108, 111, 112, 117, 144, 145], natomiast w kilku pracach stwierdzono występowanie zależności pomiędzy polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego a rozpoznaniem astmy oskrzelowej [118, 119, 120].

Jak wynika z wcześniejszych obserwacji polimorfizmy Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego pozostają w nierównowadze sprzężeń [108, 111, 117, 118, 124], otrzymane wyniki potwierdzają ten związek: homozygoty Gly16Gly częściej były homozygotami w pozycji Glu27Glu, heterozygoty Arg16Gly częściej były również

heterozygotami w pozycji Gln27Glu, w obu grupie chorych i grupie kontrolnej nie stwierdzono występowania homozygot w pozycji Arg16Arg i Glu27Glu, podobnie jak podają inni autorzy [118, 124, 146].

Na podstawie istniejących pomiędzy tymi dwoma polimorfizmami powiązań genetycznych można przypuszczać, że na obraz kliniczny choroby wpływa nie pojedynczy allel, ale raczej układ alleli na jednym chromosomie tworzący haplotyp.

Badanie dotyczące haplotypów opierają się przede wszystkim na badaniu rodzin [109, 121, 145, 147]. Istnieją również modele pośredniego oznaczania haplotypów przy wykorzystaniu technik cyfrowych [143, 148].

W pracy analizowano dipotypy opierając się na prawdopodobieństwie wystąpienia układu alleli z dwóch badanych polimorfizmów. Model ten nie był dotychczas opisywany w literaturze, chociaż podobne próby wspólnego analizowania dwóch polimorfizmów przedstawiają w swoich pracach Barr [149], Santillan [118] i Lee [146].

Podkreślić należy również, że w prezentowanej pracy zastosowano podział badanych pod względem płci, otrzymując ciekawe i dotychczas nie opisywane wyniki. Obserwacje wynikające z uwzględnienia czynnika jakim jest płeć badanych, podają w swoich pracach Ulbrecht [143] i Santillan [118], natomiast D'Amato analizował tylko populację mężczyzn [109], a w badaniu Barr i wsp. uczestniczyły wyłącznie kobiety [149].

W niniejszym badaniu zaobserwowano, częstsze występowanie astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa w grupie osób noszących diplotyp Gly16/Gln27 (OR=1,986; p=0,05) w porównaniu do grupy kontrolnej, podobne związki zaobserwowano w grupie mężczyzn (OR=2,309; p=0,05), natomiast u kobiet zależność ta nie była istotna statystycznie.

Interesujące związki pomiędzy występowaniem „allelu Gly16 bez allelu Glu27" a występowaniem astmy u mężczyzn (p=0,003), ale nie u kobiet, zaobserwował w swoich badaniach Santillan, natomiast odwrotną zależność między astmą a „allelem Gly16-Glu27" zaobserwował u kobiet ale nie u mężczyzn.

Jednocześnie allele Gly16-Glu27 wydawały się układem chroniącym przed wystąpieniem astmy zarówno dla mężczyzn jak i dla kobiet [118]. Podobne związki podaje w swojej pracy Barr: u kobiet noszących allele Gly16-Glu27, które prowadziły siedzący styl życia, zaobserwował zwiększone ryzyko wystąpienia astmy w porównaniu do kobiet prowadzących aktywny styl życia [149].

V.2. Wpływ polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego na funkcję układu oddechowego.

W przedstawionej pracy porównywano średnie wartości parametrów oddechowych w zależności od występowania alleli Arg16, Gly16, Gln27, Glu27; genotypów Arg16Arg, Arg16Gly, Gly16Gly, Gln27Gln, Gln27Glu, Glu27Glu oraz diplotypów Arg16/Gln27, Arg16/Glu27, Gly16/Gln27, Gly16/Glu27 receptora β_2-adrenergicznego.

Analizując wszystkich badanych zaobserwowano znamienną różnicę pomiędzy średnimi wartościami wybranych parametrów spirometrycznych w grupie kobiet w zależności od obecności allelu Gln27 i Glu27. Obecność allelu Gln27 związana była z wyższymi średnimi wartościami MEF25 i MEF50, natomiast obecność allelu Glu27 wiązała się z niższymi wartościami tych parametrów.

Przeprowadzając analizę w grupie chorych, zaobserwowano u kobiet z allelem Gln27 wyższe wartości FEV1, FEV1/VC, MEF25, MEF50 niż u kobiet bez tego allelu. Zaobserwowano natomiast, że u mężczyzn obecność allelu Gln27 wiązała się z niższymi średnimi wartościami spirometrycznymi FEV1, MEF25, MEF50.

Obecność allelu Glu27 u kobiet wiązała się z niższymi wartościami parametrów FEV1/VC, MEF25 oraz MEF50 w porównaniu do kobiet nieposiadających tego allelu.

Analizując związek czynności układu oddechowego z diplotypem, potwierdzono zróżnicowanie wyników wartości spirometrycznych względem płci. Kobiety posiadające diplotyp Gly16/Glu27 wykazywały niższe średnie wartości FEV1, FEV1/VC, MEF25, MEF50, PEF w porównaniu do kobiet nieposiadających tego diplotypu, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje dotyczące różnic w zależności od występowania allelu Glu27 w niektórych parametrach oddechowych u badanych kobiet.

U mężczyzn posiadających diplotyp Gly16/Glu27 zaobserwowano wyższe wartości FEV1, MEF25, MEF50, w porównaniu do mężczyzn bez tego diplotypu.

Wyniki różnią się od opisywanych w literaturze, np. Summerhil [145] zaobserwował wyższe wartości parametrów spirometrycznych FEV1 i FVC u osób dorosłych posiadających allel Gly16 (najwyższe wartości spirometryczne zaobserwowano u homozygot Gly16Gly), natomiast jego wyniki różnią się od opisywanych przez Silvermana i wsp., którzy w populacji dziecięcej opisują wyższe wartości FEV1 i FVC dla homozygot Arg16Arg [147].

W swoich badaniach, zarówno Martinez [124] jak i Ramsay [108] nie stwierdzili związku pomiędzy występowaniem allelu polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Glu a podstawową czynnością układu oddechowego w badaniu spirometrycznym.

Na uwagę zasługuje fakt, niewielkiej liczby prac, w których zwracano uwagę na związek między polimorfizmem Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego, a podstawową czynnością płuc w badaniu spirometrycznym, jak również nie opisywano różnic, które wynikają z podziału badanej grupy na kobiety i mężczyzn.

Należy zadać pytanie, jakie związki zaobserwowano pomiędzy polimorfizmem Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego, a reakcją oskrzeli na krótkodziałające β_2-sympatykomimetyki?

W przedstawionej pracy zaobserwowano różnice w niektórych parametrach oddechowych po podaniu krótkodziałającego β_2-sympatykomimetyku: u kobiet, u których występował allel Arg16 obserwowano wyższy stopień odwracalności oskrzeli w MEF25, w porównaniu do kobiet bez tego allelu, natomiast u mężczyzn, u których występował allel Gly16, zaobserwowano wyższy stopień odwracalności oskrzeli w MEF50 w porównaniu do mężczyzn u których nie stwierdzono allelu Gly16. Analizując diplotypy stwierdzono różnice wśród kobiet i mężczyzn w średnich wartościach MEF25 po podaniu leku, w zależności od występowania diplotypu Arg16/Gln27.

Wcześniejsze prace dotyczące wpływu polimorfizmu na reakcję oskrzeli po podaniu β_2-sympatykomimetyków dały rozbieżne wyniki. W swoich badaniach Hancox i wsp. nie opisują związku pomiędzy polimorfizmem Arg16Gly i Gln27Glu, a odpowiedzią oskrzeli na długodziałające β_2-sympatykomimetyki [125]. Israel w badaniu 190 chorych na astmę zaobserwował następujące związki między polimorfizmem a odpowiedzią oskrzeli na stosowany albuterol: pacjenci będący homozygotami Arg16Arg, przewlekle stosujący albuterol wykazywali niższe wartości porannego PEF w porównaniu z pacjentami z wariantem Arg16Arg stosującymi albuterol tylko „na żądanie", dla polimorfizmu Gln27Glu nie stwierdzili podobnych związków [128]. W 2004 roku ta grupa badaczy opublikowała wyniki badań klinicznych u chorych na astmę oskrzelową z grupą kontrolną, w którym podzielili badanych względem genotypu na osoby będące homozygotami Arg16Arg i homozygotami Gly16Gly. Pacjenci w kilkutygodniowym badaniu stosowali albuterol lub placebo. Badacze zaobserwowali występowanie niższych wartości PEFR u osób będących homozygotami Arg16Arg w czasie stosowania albuterolu w porównaniu do okresu stosowania placebo. Z kolei osoby, będące homozygotami Gly16Gly, wykazywały wyższe wartości PEFR stosując regularnie albuterol w porównaniu do czasu stosowania placebo [122, 150]. W przeciwieństwie do tych danych pozostaje badanie Martineza w populacji dziecięcej [124], w którym stwierdzono następujący związek między występowaniem allelu Arg16 a odpowiedzią na albuterol: u osób będących

homozygotami Arg16Arg wywołana albuterolem wartość FEV1 była wyższa w porównaniu do heterozygot Arg16Gly i homozygot Gly16Gly. Badania Limy potwierdziły te obserwacje w grupie 16 dorosłych chorych na umiarkowaną astmę oskrzelową [127]. W badaniach czynnościowych płuc po podaniu salbutamolu Lima i wsp. zaobserwowali, że zmiana FEV1 była wyższa i szybsza u chorych będących homozygotami Arg16Arg w porównaniu do chorych będących homozygotami Gly16Gly. Również Kowalski i wsp. zaobserwowali wyższą odpowiedź rozkurczową oskrzeli w badaniu FEV1 na podaną dawkę salbutamolu u pacjentów będących homozygotami Arg16Arg w porównaniu do heterozygot i homozygot Gly16Gly [122].

Tan i wsp. opisują w swojej pracy związek między polimorfizmem Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego, a zjawiskiem uniewrażliwienia (desensytyzacji) po przewlekłym stosowaniu formoterolu u chorych na astmę umiarkowaną i ciężką.

Nie zaobserwowali oni różnic w podstawowej czynności oskrzeli biorąc pod uwagę FEV1 i FEF25-75 u chorych, w zależności od występującego polimorfizmu. Stopień desensytyzacji po regularnym stosowaniu formoterolu był określony przy pomocy krzywej dawka-odpowiedź (DRC). Tan i wsp. stwierdzili, że dla polimorfizmu Arg16Gly pacjenci będący homozygotami Gly16Gly, byli bardziej wrażliwi na zjawisko desensytyzacji niż pacjenci z genotypem Arg16Arg [111]. Te obserwacje są zgodne z wynikami uzyskanymi in vitro [116] i autorzy sugerują, że forma Gly16 receptora może predysponować do zmniejszonej reakcji na długotrwale stosowane β_2-sympatykomimetyki.

Badania Drysdale [148] oraz Silvermana [147] potwierdzają związek między występowaniem halpotypów czyli układu różnych polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego a odpowiedzią rozkurczową oskrzeli po zastosowaniu leków β_2-sympatykomimetycznych.

Drysdale i wsp. opisują zmniejszoną odpowiedź rozkurczową oskrzeli po zastosowanym albuterolu u chorych, u których występuje haplotyp Arg16/Gln27 w przeciwieństwie do chorych z haplotypem Gly16/Glu27, u których zaobserwowano wyższe wartości spirometryczne po podaniu albuterolu. Jednocześnie autorzy nie stwierdzili występowania związku pomiędzy pojedynczym polimorfizmem, a odpowiedzią oskrzeli na krótkodziałający β_2-sympatykomimetyk [148].

W przedstawionej pracy, stwierdzono występowanie różnic w średnich wartościach odwracalności MEF25 u kobiet i mężczyzn, w zależności od obecności diplotypu Arg16/Gln27. Kobiety posiadające ten diplotyp, wykazywały wyższy stopień odwracalności oskrzeli po β_2-sympatykomimetyku, natomiast mężczyźni niższy.

V.3. Wpływ polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego na fenotyp astmy

Polimorfizm receptora β_2-adrenergicznego był również badany pod kątem jego związku z fenotypem astmy np. astmą nocną, nadreaktywnością oskrzeli, podwyższonym stężeniem IgE czy wynikiem punktowych testów skórnych.

W prezentowanej pracy nie zaobserwowano związku pomiędzy poziomem całkowitego IgE w surowicy a występowaniem polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Glu β_2-adrenoreceptora, podobnie jak wynika z obserwacji Ramsay [108], D'Amato [109] i Deichmana [123]. Natomiast Dewar i wsp. w badaniach populacji dziecięcej zaobserwowali występowanie związku pomiędzy allelem Gln27 a podwyższonym poziomem IgE w surowicy[113]. W późniejszych badaniach populacji 630 osób dorosłych nie zaobserwowali oni występowania związku pomiędzy badanym polimorfizmem a stężeniem całkowitych i swoistych IgE [117]. Związek pomiędzy występowaniem alleli Arg16 i Gln27 a podwyższonym całkowitym stężeniem IgE u dorosłych chorych z pyłkowicą opisuje w swoich badaniach Woszczek [151]. Drugim, obok poziomu IgE, badaniem wykazującym obecność alergii jest dodatni wynik alergicznych testów skórnych. W przeprowadzonym badaniu nie zaobserwowano związków pomiędzy polimorfizmem, a dodatnim wynikiem testów skórnych podobnie jak Dewar [117] i Ramsay [108].

W kilku pracach opisywano związek polimorfizmów genetycznych receptora β_2-adrenergicznego ze stopniem ciężkości astmy i występowaniem klinicznych fenotypów astmy np. z „astmą nocną". Liggett w 1995 opublikował [86] wyniki badań dotyczących polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego, w których zaobserwował, że wariant alleliczny Gly16 znacznie częściej występuje u chorych z objawami astmy nocnej (u których pogorszenie czynności płuc i objawy obturacji występują w nocy i godzinach wczesno-rannych) w porównaniu do chorych, którzy nie mają tych objawów. Kolejne badania przeprowadzone w 1997 roku potwierdziły tę zależność [110]. Podobne związki dotyczące występowania wariantu allelicznego Gly16 z objawami astmy nocnej zaobserwowali Turki i wsp. [63]. W badaniach prowadzonych przez Santillana również stwierdzono związek między obecnością allelu Gly16, a występowaniem objawów astmy nocnej [118].

W prezentowanej pracy stwierdzono znamiennie rzadsze występowanie objawów duszności w nocy u chorych, u których występuje allel Gln27 w porównaniu do chorych z allelem Glu27, natomiast u chorych z diplotypem Gly16/Glu27 znamiennie częściej

występowały objawy duszności w nocy. Sugeruje to addycyjny efekt działania polimorfizmów Gly16 i Glu27 w kształtowaniu obrazu klinicznego choroby.

Badania Liggeta wykazały zależność pomiędzy występowaniem wariantu Gly16, a ciężką postacią astmy (astma sterydozależna) [86], natomiast Turki [63] oraz Weir [121] nie wykazali zależności między polimorfizmem receptora β_2-adrenergicznego, a ciężką postacią astmy. Weir i wsp. opisują w swojej pracy częstsze występowanie haplotypu Gly16/Gln27 u chorych na umiarkowaną astmę w porównaniu do chorych na astmę lekką [121]. W badanej przez nas grupie nie zaobserwowano związków pomiędzy występowaniem polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego, a stopniem ciężkości astmy. Być może przyczyną tego jest zbyt jednorodny charakter badanej grupy, do której kwalifikowano chorych na astmę sporadyczną, lekką i umiarkowaną, a obserwowane przez innych autorów zależności dotyczyły w większości chorych na astmę ciężką. Inną przyczyną może być również zbyt mała ilość homozygot Arg16Arg wśród badanych osób w stosunku do ilości oczekiwanej.

Z obserwacji wynika, że wpływ polimorfizmów 16 i 27 receptora β_2-adrenergicznego na czynność układu oddechowego należy rozpatrywać po uwzględnieniu podziału badanej grupy na kobiety i mężczyzn. Jak podaje Europejskie Towarzystwo Pulmonologiczne[137] pomiary spirometryczne należy odnosić do wartości należnych, obliczanych w oparciu o parametry antropometryczne, jak wiek, wzrost i płeć, co tłumaczy istniejące różnice w wynikach badań czynności układu oddechowego pomiędzy kobietami i mężczyznami [152]. Być może należy więc potencjalny wpływ polimorfizmów genetycznych na czynność układu oddechowego rozpatrywać oddzielnie w tych dwóch grupach. Innym wyjaśnieniem powyższych obserwacji może być wpływ hormonów płciowych na czynność układu oddechowego. Zaobserwowano, że płuca płodów płci męskiej i żeńskiej różnią się między sobą. Płuca płodów płci żeńskiej są większe i bardziej dojrzałe w tym samym tygodniu ciąży w porównaniu do płuc płodów płci męskiej [153]. Istnieją hipotezy, że hormony płciowe mogą wpływać również na odpowiedź immunologiczną. Jednym ze sposobów wyjaśnienia większej zachorowalności na choroby autoimmunologiczne u kobiet może być wpływ hormonów płciowych [154]. Ta hipoteza może również dotyczyć alergicznego procesu zapalnego w astmie, a w modelu zwierzęcym potwierdzono przeciwzapalne działanie estrogenów [155]. W innym badaniu zaobserwowano, że podanie estrogenów wpływa na zwiększenie gęstości receptora β_2-adrenergicznego w tkance płucnej królika, efekt ten był odwracany podaniem progesteronu [156]. Badania wpływu hormonów płciowych na astmę dotyczyły procesów

związanych z cyklem menstruacyjnym, dojrzewaniem płciowym czy suplementacją hormonalną w okresie menopauzy [157, 158]. Interesujące wyniki badań przedstawił Villa w badaniu kobiet z zespołem Turnera i nadreaktywnością oskrzeli, która ustępowała po leczeniu estrogenami [159]. Z kolei Tan i wsp. w swoich badaniach sugerują, że hormony płciowe mogą wpływać na regulację receptorów β_2-adrenergicznych u chorych na astmę [160]. Z licznych badań wynika, że hormony płciowe mogą mieć wpływ na występowanie różnych fenotypów astmy, czy też zmiany w poziomie hormonów mogą zaostrzać objawy choroby [161]. Czy jednak różnice w czynności układu oddechowego u chorych na astmę w zależności od płci można tłumaczyć wpływem hormonów płciowych na funkcję β_2-adrenoreceptora? To pytanie pozostaje otwarte.

Polimorfizmy Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego nie są bezpośrednią przyczyną astmy i alergicznego nieżytu nosa, mogą jednak wpływać na czynność układu oddechowego. Pozostając w nierównowadze sprzężeń, te dwa polimorfizmy współdziałają ze sobą w kształtowaniu genetycznego podłoża choroby dlatego należy efekty ich działania rozważać wspólnie.

Obszar 5’ poprzedzający sekwencję kodującą genu zawiera szereg elmentów wpływających na ekspresję genu poza strukturą klasycznego promotora. Jednym z nich jest 5’-*leader* cistron, który uczestniczy w regulacji ekspresji receptora. W ramach sekwencji 5’-*leader* cistron zlokalizowany jest tak zwany peptyd peptyd BUP (*beta upstream peptide*). Drysdale i wsp. wykazali, że polimorfizm -47 C➔T indukuje niekonserwatywną zmianę aminokwasów Cys➔ Arg w pozycji 19 BUP i co ważniejsze dwa ostatnie badania wykazały jego funkcjonalny wpływ na ekspresję genu [106, 107].

Polimorfizm ten znajduje się bardzo blisko regionu kodującego genu. Zachodzi między nimi nierównowaga sprzężeń. Może więc okazać się, że efekty działania uprzednio przypisywane polimorfizmom Arg16Gly i Gln27Glu β_2- adrenoreceptora mogą być w rzeczywistości zależne od polimorfizmu występującego w tym regionie. Wykryto również nowe polimorfizmy w regionie 5’genu dla receptora β_2-adrenergicznego w pozycjach -20,-47, -367, -468, -654, -1023, -1343, -1429 [107, 162, 163]. Pomiędzy nimi, a badanymi w pracy polimorfizmami zachodzi nierównowaga sprzężeń, dlatego efekty czynnościowe przypisywane poprzednio polimorfizmom Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego mogą w rzeczywistości zależeć od wzajemnego układu i powiązań różnych polimorfizmów tego genu. Ponadto D’Amato w swoich badaniach sugeruje związek nie tyle pojedynczego polimorfizmu receptora β_2-adrenergicznego, jak układu

polimorfizmów-czyli haplotypu [109] z obrazem astmy oskrzelowej, co potwierdzają w badaniach klinicznych Drysdale i wsp. [148].

Jak wynika z wielu badań dotyczących polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego ma on istotne znaczenie w kształtowaniu fenotypu astmy i innych chorób alergicznych, jednak wciąż wiele pytań dotyczących klinicznych i farmakologicznych aspektów tego zagadnienia pozostaje niewyjaśnionych. Rosnące zainteresowanie badaniami genetycznymi w chorobach wieloczynnikowych wymaga precyzyjnych obliczeń statystycznych. Z prowadzonych analiz wynika, że istotne statystycznie zależności dotyczące polimorfizmu pojedynczego nukleotydu wymagają badania dużych populacji (900 osób dla $p<0,05$). W badaniach asocjacji zbyt mała liczebność grupy może uniemożliwić wykrycie nawet dużej zależności związanej z pojedynczym polimorfizmem. Sugeruje to potrzebę wykonywania badań w populacjach znacznie większych niż dotychczas [141].

Rozwój biologii molekularnej stworzył nowe możliwości dostosowania leczenia do indywidualnego pacjenta. Dobór leku będzie mógł odbywać się na podstawie genotypu, względem którego dokona się podziału na osoby wykazujące różnego rodzaju reakcję na dany lek. Perspektywy takiego leczenia astmy oskrzelowej przedstawili w swoich badaniach Israel i wsp. [150] i -być może- w niedalekiej przyszłości będziemy mogli takie badania wykonywać rutynowo, aby skutecznie leczyć przewlekłe choroby współczesnej cywilizacji.

VI. WNIOSKI

1. Częstości genotypowe i alleliczne polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego nie różnią się pomiędzy grupą chorych, a grupą kontrolną, co pozwala wyciągnąć wniosek, że badane polimorfizmy nie są najprawdopodobniej bezpośrednio związane patogenetycznie z występowaniem astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa.
2. Badane polimorfizmy receptora β_2-adrenergicznego pozostają w nierównowadze sprzężeń, dlatego efekt czynnościowy zależy od ich interakcji. Obraz kliniczny astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa jest związany nie z pojedynczym allelem, lecz układem alleli na chromosomie tworzącym haplotyp.
3. Polimorfizmy Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego mają wpływ na czynność układu oddechowego. Wpływ ten jest znamiennie różny dla kobiet i mężczyzn, co może wskazywać na znaczenie hormonów płciowych w genetycznej regulacji funkcji płuc i obrazu klinicznego astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa. Obecność diplotypu Gly16/Glu27 u mężczyzn jest związana z wyższymi wartościami parametrów oddechowych, natomiast obecność tego diplotypu u kobiet, jak również obecność allelu Glu27 jest związana z niższymi wartościami badanych parametrów.
4. Obecność diplotypu Gly16/Glu27 ma związek z częstszym występowaniem u chorych objawów duszności w nocy, natomiast chorzy z allelem Gln27 rzadziej zgłaszają te objawy.
5. Polimorfizmy Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego nie mają związku z całkowitym stężeniem IgE w surowicy ani z dodatnim wynikiem punktowych testów skórnych.

VII. STRESZCZENIE

Astma oskrzelowa i alergiczny nieżyt nosa należą do jednych z najczęściej wystepujących chorób przewlekłych współczesnej cywilizacji. Wyniki prac badawczych z dziedziny genetyki umożliwiają identyfikację genów predysponujących do rozwoju chorób alergicznych, ich wzajemnego wpływu, określenie występowania zmienności w obrębie genów oraz oddziaływania gen-środowisko. W badaniach nad podłożem genetycznym astmy oskrzelowej wiele uwagi poświęcono polimorfizmom receptora β_2-adrenergicznego i jego związkom z występowaniem astmy oskrzelowej i atopii, reakcją układu oddechowego na zastosowane β_2-sympatykomimetyki, czy obrazem klinicznym choroby. Wyniki tych badań są jednak niejednoznaczne, co może wynikać z różnic między badanymi populacjami lub zastosowaniu różnych kryteriów diagnostycznych w rozpoznawaniu choroby. Niewiele prac dotyczy związku polimorfizmów receptora β_2-adrenergicznego z występowaniem alergicznego nieżytu nosa.

Celem prezentowanej pracy było zbadanie zależności pomiędzy wystąpieniem polimorfizmu Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego a rozpoznaniem astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa oraz określenie związku między tymi polimorfizmami a czynnością układu oddechowego u chorych, całkowitym stężeniem IgE oraz obrazem klinicznym choroby.

Badanie przeprowadzono u 142 chorych na astmę oskrzelową i/lub alergiczny nieżyt nosa i u 62 osób zdrowych. Identyfikację badanych polimorfizmów wykonano metodą RFLP. Badania czynnościowe układu oddechowego prowadzono stosując badanie spirometryczne. Nie zaobserwowano różnic w rozkładzie polimorfizmów pomiędzy grupą chorych a grupą kontrolną. Stwierdzono nierównowagę sprzężeń pomiędzy badanymi polimorfizmami Arg16Gly i Gln27Glu dlatego efekty ich działania należy rozpatrywać wspólnie, nie stwierdzono również występowania układu Arg16Arg-Glu27Glu w badanej grupie.

W badaniach czynnościowych układu oddechowego zaobserwowano różnice między występowaniem badanych polimorfizmów a wartościami parametrów oddechowych dla kobiet i mężczyzn. Obecność diplotypu Gly16/Glu27 u mężczyzn jest związana z wyższymi wartościami parametrów oddechowych, natomiast obecność tego diplotypu u kobiet, jak również obecność allelu Glu27 jest związana z niższymi wartościami badanych parametrów.

Obecność wariantu polimorficznego Gln27 ma związek z rzadszym wystąpieniem u chorych objawów duszności w nocy, natomiast u chorych z diplotypem Gly16/Glu27 częściej występują te objawy. Nie zaobserwowano zależności pomiędzy występowaniem polimorfizmów Arg16Gly i Gln27Glu a stężeniem IgE całkowitym u badanych chorych oraz dodatnim wynikiem testów skórnych.

Wnioski: Badane polimorfizmy nie są bezpośrednią przyczyną astmy oskrzelowej i alergicznego nieżytu nosa. Pomiędzy polimorfizmami Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego występuje nierównowaga sprzężeń i efekty czynnościowe zależą od ich interakcji. Polimorfizmy Arg16Gly i Gln27Glu receptora β_2-adrenergicznego mają wpływ na czynność układu oddechowego, wpływ ten jest znacząco różny u kobiet i u mężczyzn co może wskazywać na znaczenie hormonów płciowych w kształtowaniu genetycznego podłoża i regulacji funkcji płuc w astmie oskrzelowej i alergicznym nieżycie nosa.

VII. SUMMARY

Bronchial asthma and allergic rhinitis belong to the most frequent chronic diseases of modern civilisation. The genetic predisposition to the development of asthma and allergic rhinitis has been confirmed by numerous studies. They belong to the "complex diseases" in which multiplie genes and gene-gene interaction as well as enviromental exposure play important role. Much attention in the studies concerning the genetic background of bronchial asthma has been given to the β_2-adrenergic receptor polymorphisms and their relationship with asthma and alergic rhinitis diagnosis, the response of the respiratory system response to the β_2-sympathomimetics, or the clinical phenotype of the disease. However, the results of these studies are inconsistents, which may be attributed to the differences between the study populations or the use of difference diagnostic criteria of the diseases. Only few studies pertain to the relationship of β_2- adrenoreceptor polymorphisms and allergic rhinitis. The objective of this study was to investigate the relationship of β_2-adrenoreceptor polymorphisms Arg16Gly and Gln27Glu and the diagnosis of asthma and allergic rhinitis, as well as determination of the relationship between these polymorphisms and respiratory system function, total IgE level and the clinical presentation of the disease.

The study group included 142 patients with asthma and/or allergic rhinitis and in 62 healthy subjects. The identification of the evaluated polymorphisms was carried out with the RFLP method. Functional studies of the respiratory system were carried out with the use of spirometry. No differences in the distribution of polymorphisms were observed between the study group and the control group. The studied polymorphisms Arg16Gly and Gln27Glu were found to be in linkage disequilibrium, therefore their effects should be evaluated collectively; the Arg16Arg-Glu27Glu combination was not observed in the study group. In functional tests of the respiratory system, differences between genders were observed for the Gln27Glu polymorphism and spirometry values.

Similarly, the diplotype analysis showed differences in the observed spirometry values depending on diplotype and between males and females. The presence of Gly16/Glu27 diplotype was associated with higher spirometry values in men and lower spiromety values in women, as the Glu27 allel presence.

No relationship was observed between the occurrence of Arg16Gly and Gln27Glu polymorphisms and total IgE level in the study group. Nocturnal dyspnoea was less

frequent in patients with the Gln27 allele and more frequent in patients with Gly16/Glu27 diplotype.

Conclusions: The two analysed polimorphisms are not considered as a major cause of bronchial asthma and allergic rhinitis. The Arg16Gly and Gln27Glu β_2-adrenoreceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium and their functional effects depend on their interaction.

These polymorphisms can influence the function of pulmonary system. This effect significantly differs between men and women possibly indicating the effect of sexual hormones on genetic expresion and regulation of pulmonary function.

PIŚMIENNICTWO

VIII. PIŚMIENNICTWO

1. Van Moerbeke D,[red.] European Allergy White Paper: Allergic diseases as a public health problem. Brussels: UCB Institute of Allergy; 1997.
2. Adamek-Guzik T., Czerniawska-Mysik G., Guzik T.: *Astma oskrzelowa:przewlekła choroba zapalna.* Przegl. Lek. 1996; 53(1): 12-19.
3. Rosenwasser L.J.: *Genetics of asthma and atopy.* Toxicol. Lett. 1996; 86(2-3): 73-77.
4. Grossman J.: *One airway, one disease.* Chest 1997; 111, Supl.2: 11S-16S.
5. *National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma Update on Selected Topics--2002.* J. Allergy Clin. Immunol. 2002; 110, Supl.5: 141-219.
6. Johansson S.G., Hourihane J.O., Bousquet J., Bruijnzeel-Koomen C., Dreborg S., Haahtela T., Kowalski M.L., Mygind N., Ring J., van Cauwenberge P., van Hage-Hamsten M., Wuthrich B.: *A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force.* Allergy 2001; 56(9): 813-824.
7. Holt P.G.: *Potential role of environmental factors in the etiology and pathogenesis of atopy: a working model.* Environ. Health Perspect. 1999; 107, Supl. 3: 485-487.
8. Asher I., Boner A., Chuchalin A., Custovic A., Dagli E., Haus M., Hemmo-Lotem M., Holgate S.T., Holt P.G., Host A., Iikura I., Johansson S.G., Kowalski M.L., Naspitz C.K., Odhiambo J., Vichyanond P., Volovitz B., Wahn U., Warner J.O., Weiss K., Zhong N.S.: *Prevention of allergy and asthma: interim report.* Allergy 2000; 55(11): 1069-1088.
9. Alergiczny nieżyt nosa i jego wpływ na astmę : raport ARIA - Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma / [Bousquet J.] ; tł. Agnieszka Gawlewicz-Mroczka, Filip Mejza, Monika Świerczyńska. Kraków : Medycyna Praktyczna, 2002. Seria Medycyna Praktyczna ; 2002, wyd. spec. 7.
10. Bahna S.L.: *Factors determining development of allergy in infants.* Allergy Proc. 1992; 13(1): 21-25.
11. Adamek-Guzik T., Czerniawska-Mysik A.: *Prewencja i rehabilitacja wybranych chorób układu oddechowego*. Klin. Chorób Wewn. i Med. Wsi Collegium Medicum U.J., Kraków 1995:7-22
12. Sly R.M.: *Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma.* Ann. Allergy Asthma Immunol. 1999; 82(3): 233-248.

13. Małolepszy J.: *Występowanie chorób alergicznych w Polsce.* Alergia Astma Immunol. 2000; 5 (1 Supl. 2): 163-169.
14. Bręborowicz A., Lis G., Cichocka-Jarosz E., Sobkowiak P., Głodzik I., Gazurek D., Światły A., Alkiewicz J.: *Astma oskrzelowa w populacji dzieci szkolnych-narastający problem zdrowotny w świetle badań ISAAC.* Int. Rev. Allergol. Clin. Immunol. 2003; 9: 39.
15. ISAAC, *Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee.* Lancet 1998; 351(9111): 1225-1232.
16. Wuthrich B., Schindler C., Leuenberger P., Ackermann-Liebrich U.: *Prevalence of atopy and pollinosis in the adult population of Switzerland (SAPALDIA study). Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults.* Int. Arch. Allergy Immunol. 1995; 106(2): 149-156.
17. Simon M.R., Cooper K.D., Norris R.B., Blok B., King C.L.: *Antigen presenting cell-independent cytokine and spontaneous in vitro IgE production in patients with atopic dermatitis: increased interferon-gamma production and lack of effects of in vivo low-dose interferon-gamma treatment.* J. Allergy Clin. Immunol. 1995; 96(1): 84-91.
18. Wiernega E.A., Snoek M., Jansen H.M., et al.: *Human atopen specific Th1 and Th2 cell clones.* J. Immunol. 1991; 147: 2942-2949.
19. Kapsenberg M., Hilkens C., Jansen H., et al.: *Production and Modulation of T cell Cytokines in Atopic Allergy.* Int. Arch. Allergy Immunol. 1996; 110: 107-113.
20. Hamid Q., Tulic M.K., Liu M.C., Moqbel R.: *Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy.* J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 111, Supl.1: 5-17.
21. Roitt I.M., Brostoff J., Male D.[red.]: *Immunology.* Wyd.3. Mosby, Londyn 1993.
22. Del Prete G.: *Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy.* Allergy 1992; 47(5): 450-455.
23. Borish L.C., Nelson H.S., Lanz M.J., Claussen L., Whitmore J.B., Agosti J.M., Garrison L.: *Interleukin-4 receptor in moderate atopic asthma. A phase I/II randomized, placebo-controlled trial.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999; 160(6): 1816-1823.
24. Arock M., Le Goff L., Becherel P.A., Dugas B., Debre P., Mossalayi M.D.: *Involvement of Fc epsilon RII/CD23 and L-arginine dependent pathway in IgE-*

mediated activation of human eosinophils. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994; 203(1): 265-271.

25. Bousquet J., Corrigan C.J., Venge P.: *Peripheral blood markers: evaluation of inflammation in asthma.* Eur. Respir. J. 1998; 26, Supl.: 42-48.
26. Holgate S.T.: *Biomarkers of asthma.* Lancet 1998; 351(9112): 1300-1301.
27. Chazan R.[red.]: *Pneumonologia i alergologia praktyczna*. a-medica press, Bielsko-Biała 2001.
28. Chung K.F.: *Airway smooth muscle cells: contributing to and regulating airway mucosal inflammation?* Eur. Respir. J. 2000; 15(5): 961-968.
29. Barnes P.J., Baraniuk J.N., Belvisi M.G.: *Neuropeptides in the respiratory tract. Part II.* Am. Rev. Respir. Dis. 1991; 144(6): 1391-1399.
30. Baraniuk J.N.: *Neural receptors and asthma.* Allergy Proc. 1995; 16(5): 227-233.
31. Dahl R., Mygind N.: *Mechanisms of airflow limitation in the nose and lungs.* Clin. Exp. Allergy 1998; 28, Supl. 2: 17-25.
32. Holloway J.W., Beghe B., Holgate S.T.: *The genetic basis of atopic asthma.* Clin. Exp. Allergy 1999; 29(8): 1023-1032.
33. Pearce N., Pekkanen J., Beasley R.: *How much asthma is really attributable to atopy?* Thorax 1999; 54(3): 268-272.
34. Vignola A.M., Chanez P., Godard P., Bousquet J.: *Relationships between rhinitis and asthma.* Allergy 1998; 53(9): 833-839.
35. Greisner W.A., Settipane R.J., Settipane G.A.: *Co-existence of asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students.* Allergy Asthma Proc. 1998; 19(4): 185-188.
36. Barnes K.C.: *Evidence for common genetic elements in allergic disease.* J. Allergy Clinical Immunol. 2000; 106: 192-200.
37. Varney V.A., Jacobson M.R., Sudderick R.M., Robinson D.S., Irani A.M., Schwartz L.B., Mackay I.S., Kay A.B., Durham S.R.: *Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils, and neutrophils.* Am. Rev. Respir. Dis. 1992; 146(1): 170-176.
38. Chanez P., Vignola A.M., Vic P., Guddo F., Bonsignore G., Godard P., Bousquet J.: *Comparison between nasal and bronchial inflammation in asthmatic and control subjects.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999; 159(2): 588-595.
39. Leynaert B., Bousquet J., Neukirch C., Liard R., Neukirch F.: *Perennial rhinitis: An independent risk factor for asthma in nonatopic subjects: results from the European*

Community Respiratory Health Survey. J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 104(2 Cz.1): 301-304.

40. Lundback B.: *Epidemiology of rhinitis and asthma.* Clin. Exp. Allergy 1998; 28, Supl. 2: 3-10.
41. Peat J.K., Salome C.M., Woolcock A.J.: *Longitudinal changes in atopy during a 4-year period: relation to bronchial hyperresponsiveness and respiratory symptoms in a population sample of Australian schoolchildren.* J. Allergy Clin. Immunol. 1990; 85(1 Cz. 1): 65-74.
42. Bergmann R.L., Edenharter G., Bergmann K.E., Forster J., Bauer C.P., Wahn V., Zepp F., Wahn U.: *Atopic dermatitis in early infancy predicts allergic airway disease at 5 years.* Clin. Exp. Allergy 1998; 28(8): 965-970.
43. Kawada T.: *Risk factors and prevalence of asthma or atopic dermatitis in young children by a questionnaire survey.* J. Nippon Med. Sch. 2004; 71(3): 167-171.
44. Illi S., von Mutius E., Lau S., Nickel R., Gruber C., Niggemann B., Wahn U.: *The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma.* J. Allergy Clin. Immunol. 2004; 113(5): 925-931.
45. Schultz Larsen F.: *Atopic dermatitis: a genetic-epidemiologic study in a population-based twin sample.* J. Am. Acad. Dermatol. 1993; 28(5 Cz. 1): 719-723.
46. Hopp R.J., Bewtra A.K., Watt G.D., Nair N.M., Townley R.G.: *Genetic analysis of allergic disease in twins.* J. Allergy Clin. Immunol. 1984; 73(2): 265-270.
47. Blumenthal M.N., Bonini S.: *Genetic and Enviromental Factors in Clinical Allergy.* 1990: 132-142.
48. Barnes K.C., Marsh D.G.:*The genetics and complexity of allergy and asthma.* Immunol. Today 1998; 19(7): 325-332.
49. Heinzmann A., Deichmann K.A.: *Genes for atopy and asthma.* Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2001; 1(5): 387-392.
50. Strachan T., Read A.P.: *Human Molecular Genetics*. 1996; Oxford UK: Bios. Scientific Publishers Ltd.
51. Wjst M., Fischer G., Immervoll T., Jung M., Saar K., Rueschendorf F., Reis A., Ulbrecht M., Gomolka M., Weiss E.H., Jaeger L., Nickel R., Richter K., Kjellman N.I., Griese M., von Berg A., Gappa M., Riedel F., Boehle M., van Koningsbruggen S., Schoberth P., Szczepański R., Dorsch W., Silbermann M., Wichmann H.E., et al.: *A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Grou* Genomics 1999; 58(1): 1-8.

52. Dizier M.H., Besse-Schmittler C., Guilloud-Bataille M., Annesi-Maesano I., Boussaha M., Bousquet J., Charpin D., Degioanni A., Gormand F., Grimfeld A., Hochez J., Hyne G., Lockhart A., Luillier-Lacombe M., Matran R., Meunier F., Neukirch F., Pacheco Y., Parent V., Paty E., Pin I., Pison C., Scheinmann P., Thobie N., Vervloet D., Kauffmann F., Feingold J., Lathrop M., Demenais F.: *Genome screen for asthma and related phenotypes in the French EGEA study.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 162(5): 1812-1818.

53. Ober C., Tsalenko A., Willadsen S., Newman D., Daniel R., Wu X., Andal J., Hoki D., Schneider D., True K., Schou C., Parry R., Cox N.: *Genome-wide screen for atopy susceptibility alleles in the Hutterites.* Clin. Exp. Allergy 1999; 29, Supl. 4: 11- 15.

54. CSGA, *A genome-wide search for asthma suceptibility loci in ethnical diverse population:the Collaborative Study on the Genetics of Asthma(CSGA).* Nat Genet, 1997; 15: 389-392.

55. Ober C., Cox N.J., Abney M., Di Rienzo A., Lander E.S., Changyaleket B., Gidley H., Kurtz B., Lee J., Nance M., Pettersson A., Prescott J., Richardson A., Schlenker E., Summerhill E., Willadsen S., Parry R.: *Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. The Collaborative Study on the Genetics of Asthma.* Hum. Mol. Genet. 1998; 7(9): 1393-1398.

56. Daniels S.E., Bhattacharrya S., James A., Leaves N.I., Young A., Hill M.R., Faux J.A., Ryan G.F., le Souef P.N., Lathrop G.M., Musk A.W., Cookson W.O.: *A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma.* Nature 1996; 383(6597): 247-250.

57. Noguchi E., Shibasaki M., Arinami T., Takeda K., Kobayashi K., Matsui A., Hamaguchi H.: *Evidence for linkage between the development of asthma in childhood and the T-cell receptor beta chain gene in Japanese.* Genomics 1998; 47(1): 121-124.

58. Barnes K.C., Freidhoff L.R., Nickel R., Chiu Y.F., Juo S.H., Hizawa N., Naidu R.P., Ehrlich E., Duffy D.L., Schou C., Levett P.N., Marsh D.G., Beaty T.H.: *Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy.* J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 104 (2 Cz.1): 485-491.

59. Holroyd K.J., Martinati L.C., Trabetti E., Scherpbier T., Eleff S.M., Boner A.L., Pignatti P.F., Kiser M.B., Dragwa C.R., Hubbard F., Sullivan C.D., Grasso L., Messler C.J., Huang M., Hu Y., Nicolaides N.C., Buetow K.H., Levitt R.C.: *Asthma*

and bronchial hyperresponsiveness linked to the XY long arm pseudoautosomal region. Genomics 1998; 52(2): 233-235.

60. Marsh D., Neely J., Breazeale D.,et al.: *Linkage analysis of IL-4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations.* Science 1994; 264: 1152-1156.
61. Meyers D.A., Postma D.S., Panhuysen C.I., Xu J., Amelung P.J., Levitt R.C., Bleecker E.R.: *Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5.* Genomics 1994; 23(2): 464-470.
62. Walley A.J., Wiltshire S., Ellis C.M., Cookson W.O.: *Linkage and allelic association of chromosome 5 cytokine cluster genetic markers with atopy and asthma associated traits.* Genomics 2001; 72(1): 15-20.
63. Turki J., Pak J., Green S.A., Martin R.J., Liggett S.B.: *Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype.* J. Clin. Invest. 1995; 95(4): 1635-1641.
64. Blumenthal M., Marcus-Bagley D., Awdeh Z., Johnson B., Yunis E.J., Alper C.A.: *HLA-DR2, [HLA-B7, SC31, DR2], and [HLA-B8, SC01, DR3] haplotypes distinguish subjects with asthma from those with rhinitis only in ragweed pollen allergy.* J. Immunol. 1992; 148(2): 411-416.
65. Cookson W.O., Sharp P.A., Faux J.A., Hopkin J.M.: *Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q.* Lancet 1989; 1(8650): 1292-1295.
66. Barnes K.C., Neely J.D., Duffy D.L., Freidhoff L.R., Breazeale D.R., Schou C., Naidu R.P., Levett P.N., Renault B., Kucherlapati R., Iozzino S., Ehrlich E., Beaty T.H., Marsh D.G.: *Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosome 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasian populations.* Genomics 1996; 37(1): 41-50.
67. Thomas N.S., Wilkinson J., Holgate S.T.: *The candidate region approach to the genetics of asthma and allergy.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 156(4 Cz. 2): 144-151.
68. Moffatt M.F., Hill M.R., Cornelis F., Schou C., Faux J.A., Young R.P., James A.L., Ryan G., le Souef P., Musk A.W., i wsp.: *Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses.* Lancet 1994; 343(8913): 1597-1600.

69. Doull I.J., Lawrence S., Watson M., Begishvili T., Beasley R.W., Lampe F., Holgate T., Morton N.E.: *Allelic association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1996; 153(4 Cz. 1): 1280-1284.
70. Deichmann K., Bardutzky J., Forster J., Heinzmann A., Kuehr J.: *Common polymorphisms in the coding part of the IL4-receptor gene.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; 231(3): 696-697.
71. Rosenwasser L.J., Klemm D.J., Dresback J.K., Inamura H., Mascali J.J., Klinnert M., Borish L.: *Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy.* Clin. Exp. Allergy 1995; 25,Supl. 2: 74-78; dyskusja 95-96.
72. Graves P.E., Kabesch M., Halonen M., Holberg C.J., Baldini M., Fritzsch C., Weiland S.K., Erickson R.P., von Mutius E., Martinez F.D.: *A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children.* J. Allergy Clin. Immunol. 2000; 105(3): 506- 513.
73. Zwollo P., Ehrlich-Kautzky E., Scharf S.J., Ansari A.A., Erlich H.A., Marsh D.G.: *Sequencing of HLA-D in responders and nonresponders to short ragweed allergen, Amb a V.* Immunogenetics 1991; 33(2): 141-151.
74. Sandford A.J., Shirakawa T., Moffatt M.F., Daniels S.E., Ra C., Faux J.A., Young R.P., Nakamura Y., Lathrop G.M., Cookson W.O. i wsp.: *Localisation of atopy and beta subunit of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on chromosome 11q.* Lancet 1993; 341(8841): 332-334.
75. Amelung P.J., Postma D.S., Xu J., Meyers D.A., Bleecker E.R.: *Exclusion of chromosome 11q and the FcepsilonRI-beta gene as aetiological factors in allergy and asthma in a population of Dutch asthmatic families [see comments].* Clin. Exp. Allergy 1998; 28(4): 397-403.
76. Vercelli D., Baldini M., Martinez F.: *The monocyte/IgE connection: may polymorphisms in the CD14 gene teach us about IgE regulation?* Int. Arch. Allergy Immunol. 2001; 124(1-3): 20-24.
77. Grasemann H., Yandava C.N., Storm van's Gravesande K., Deykin A., Pillari A., Ma J., Sonna L.A., Lilly C., Stampfer M.J., Israel E., Silverman E.K., Drazen J.M., *A neuronal NO synthase (NOS1) gene polymorphism is associated with asthma.:* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 272(2): 391-394.

78. Mitsuyasu H., Yanagihara Y., Mao X.Q., Gao P.S., Arinobu Y., Ihara K., Takabayashi A., Hara T., Enomoto T., Sasaki S., Kawai M., Hamasaki N., Shirakawa T., Hopkin J.M., Izuhara K.: *Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis.* J. Immunol. 1999; 162(3): 1227- 1231.
79. Izuhara K., Yanagihara Y., Hamasaki N., Shirakawa T., Hopkin J.M.: *Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain.* J. Allergy Clin. Immunol. 2000; 106(1 Cz. 2): 65-71.
80. Sanak M., Pierzchalska M., Bazan-Socha S., Szczeklik A.: *Enhanced expression of the leukotriene C(4) synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2000; 23(3): 290-296.
81. Woszczek G., Kowalski M.L., Borowiec M.: *Association of asthma and total IgE levels with human leucocyte antigen-DR in patients with grass allergy.* Eur. Respir. J. 2002; 20(1): 79-85.
82. Woszczek G., Kowalski M.L.: *Polimorfizm genetyczny receptora beta 2-adrenergicznego i jego rola w stanach patologicznych.* Postepy Hig. Med. Dosw. 2001; 55(1): 37-51.
83. Dixon R.A., Kobilka B.K., Strader D.J., Benovic J.L., Dohlman H.G., Frielle T., Bolanowski M.A., Bennett C.D., Rands E., Diehl R.E. i wsp.: *Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin.* Nature 1986; 321(6065): 75-79.
84. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.H.: *Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy.* J. Mol. Biol. 1990; 213(4): 899-929.
85. Johnson M.:*The beta-adrenoceptor.* Am.J.Respir.Crit.Care Med. 1998; 158(5 Cz.3): 146-153.
86. Liggett S.B.: *Genetics of beta 2-adrenergic receptor variants in asthma.* Clin. Exp. Allergy 1995; 25, Supl. 2: 89-94; dyskusja 95-96.
87. Barnes P.J.: *Beta-adrenergic receptors and their regulation.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995; 152(3): 838-860.
88. Collins S., Lohse M.J., O'Dowd B., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: *Structure and regulation of G protein-coupled receptors: the beta 2-adrenergic receptor as a model.* Vitam. Horm. 1991; 46: 1-39.

89. Small R.C., Chiu P., Cook S.J., Foster R.W., Isaac L.: *Beta-adrenoceptor agonists in bronchial asthma: role of k+-channel opening in mediating their bronchodilator effects.* Clin. Exp. Allergy 1993; 23(10): 802-811.
90. Chiu P., Cook S.J., Small R.C., Berry J.L., Carpenter J.R., Downing S.J., Foster R.W., Miller A.J., Small A.M.: *Beta-adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal K(+)-channels in bovine trachealis muscle: studies of mechanical activity and ion fluxes.* Br. J. Pharmacol. 1993; 109(4): 1149-1156.
91. Wilson-Pauwels L., Stewart P., Akesson E.: *Autonomic nerves.* Inc. B.C.D. Londyn, 1997.
92. Onaran H.O., Costa T., Rodbard D.: *Beta gamma subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits.* Mol. Pharmacol. 1993; 43(2): 245-256.
93. Naline E., Zhang Y., Qian Y., Mairon N., Anderson G.P., Grandordy B., Advenier C.: *Relaxant effects and durations of action of formoterol and salmeterol on the isolated human bronchus.* Eur. Respir. J. 1994; 7(5): 914-920.
94. Nials A.T., Coleman R.A., Johnson M., Magnussen H., Rabe K.F., Vardey C.J.: *Effects of beta-adrenoceptor agonists in human bronchial smooth muscle.* Br. J. Pharmacol. 1993; 110(3): 1112-1116.
95. Bai T.R., Zhou D., Aubert J.D., Lizee G., Hayashi S., Bondy G.P.: *Expression of beta 2-adrenergic receptor mRNA in peripheral lung in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1993; 8(3): 325-333.
96. Freedman N.J., Lefkowitz R.J.: *Desensitization of G protein-coupled receptors.* Recent Prog. Horm. Res. 1996; 51: 319-51; dyskusja: 352-353.
97. Collins S., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: *Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression.* Annu. Rev. Physiol. 1991; 53: 497-508.
98. Bousquet J.:*Global initiative for asthma (GINA) and its objectives.* Clin. Exp. Allergy 2000;30, Supl. 1:2-5.
99. Nyberg L.: *Pharmacokinetics of ß2-adrenoreceptor-stimulating drugs.* ß2-agonists in asthma treatment. Pauwels R.A: Marcel Dekker, Inc. New York 1997:87-130.
100. Nelson H.S.: *Beta-adrenergic bronchodilators.* N. Engl. J. Med. 1995; 333(8): 499-506.

101. Brittain R.T.: *Approaches to a long-acting, selective beta 2-adrenoceptor stimulant.* Lung 1990; 168, Supl.: 111-114.

102. Kobilka B.K., Dixon R.A., Frielle T., Dohlman H.G., Bolanowski M.A., Sigal I.S., Yang-Feng T.L., Francke U., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: *cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1987; 84(1): 46-50.

103. Kobilka B.K., Frielle T., Dohlman H.G., Bolanowski M.A., Dixon R.A., Keller P., Caron M.G., Lefkowitz R.J.: *Delineation of the intronless nature of the genes for the human and hamster beta 2-adrenergic receptor and their putative promoter regions.* J. Biol. Chem. 1987; 262(15): 7321-7327.

104. Reihsaus E., Innis M., MacIntyre N., Liggett S.B.: *Mutations in the gene encoding for the beta 2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1993; 8(3): 334-339.

105. Hall I.P.: *Beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma.* Clin. Exp. Allergy 1999; 29(9): 1151-1154.

106. McGraw D.W., Liggett S.B.: *Coding block and 5 leader cistron polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor.* Clin. Exp. Allergy 1999; 29, Supl. 4: 43-45.

107. Scott M.G., Swan C., Wheatley A.P., Hall I.P.: *Identification of novel polymorphisms within the promoter region of the human beta2 adrenergic receptor gene.* Br. J. Pharmacol. 1999; 126(4): 841-844.

108. Ramsay C.E., Hayden C.M., Tiller K.J., Burton P.R., Goldblatt J., Lesouef P.N.: *Polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene are associated with decreased airway responsiveness.* Clin. Exp. Allergy 1999; 29(9): 1195-1203.

109. D'Amato M., Vitiani L.R., Petrelli G., Ferrigno L., di Pietro A., Trezza R., Matricardi P.M.: *Association of persistent bronchial hyperresponsiveness with beta2-adrenoceptor (ADRB2) haplotypes. A population study.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 158(6): 1968-1973.

110. Liggett S.B.: *Polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor and asthma.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997; 156(4 Cz. 2): 156-162.

111. Tan S., Hall I.P., Dewar J., Dow E., Lipworth B.: *Association between beta 2-adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics.* Lancet 1997; 350(9083): 995-999.

112. Hall I.P., Wheatley A., Wilding P., Liggett S.B.: *Association of Glu 27 beta 2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects.* Lancet 1995; 345(8959): 1213-1214.
113. Dewar J.C., Wilkinson J., Wheatley A., Thomas N.S., Doull I., Morton N., Lio P., Harvey J.F., Liggett S.B., Holgate S.T., Hall I.P.: *The glutamine 27 beta2-adrenoceptor polymorphism is associated with elevated IgE levels in asthmatic families.* J. Allergy Clin. Immunol. 1997; 100(2): 261-265.
114. Green S.A., Cole G., Jacinto M., Innis M., Liggett S.B.: *A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor.* J. Biol. Chem. 1993; 268(31): 23116-23121.
115. Green S.A., Turki J., Bejarano P., Hall I.P., Liggett S.B.: *Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995; 13(1): 25-33.
116. Green S.A., Turki J., Innis M., Liggett S.B.: *Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties.* Biochemistry 1994; 33(32): 9414-9419.
117. Dewar J.C., Wheatley A.P., Venn A., Morrison J.F., Britton J., Hall I.P.: *Beta2-adrenoceptor polymorphisms are in linkage disequilibrium, but are not associated with asthma in an adult population.* Clin. Exp. Allergy 1998; 28(4): 442-448.
118. Santillan A.A., Camargo C.A., Jr., Ramirez-Rivera A., Delgado-Enciso I., Rojas-Martinez A., Cantu-Diaz F., Barrera-Saldana H.A.: *Association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults.* J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 112(6): 1095-1100.
119. Hopes E., McDougall C., Christie G., Dewar J., Wheatley A., Hall I.P., Helms P.J.: *Association of glutamine 27 polymorphism of beta 2 adrenoceptor with reported childhood asthma: population based study.* Br. Med. J. 1998;. 316(7132): 664.
120. Ohe M., Munakata M., Hizawa N., Itoh A., Doi I., Yamaguchi E., Homma Y., Kawakami Y.: *Beta 2 adrenergic receptor gene restriction fragment length polymorphism and bronchial asthma.* Thorax 1995; 50(4): 353-359.
121. Weir T.D., Mallek N., Sandford A.J., Bai T.R., Awadh N., Fitzgerald J.M., Cockcroft D., James A., Liggett S.B., Pare P.D.: *beta2-Adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998; 158(3): 787-791.

122. Kowalski M.L., Woszczek G., Borowiec M.: *Polymorphisms of Beta-2-Adrenoceptor Are Associated With Bronchodilator Respones to Salbutamol and High IgE Levels in Patients With Pollen Allergy.* J. Allergy Clin. Immunol. 2000; 104, Supl :371.
123. Deichmann K.A., Schmidt A., Heinzmann A., Kruse S., Forster J., Kuehr J.: *Association studies on beta2-adrenoceptor polymorphisms and enhanced IgE responsiveness in an atopic population.* Clin. Exp. Allergy 1999; 29(6): 794-799.
124. Martinez F.D., Graves P.E., Baldini M., Solomon S., Erickson R.: *Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing.* J. Clin. Invest. 1997; 100(12): 3184-3188.
125. Hancox R.J., Sears M.R., Taylor D.R.: *Polymorphism of the beta2-adrenoceptor and the response to long-term beta2-agonist therapy in asthma.* Eur. Respir. J. 1998; 11(3): 589-593.
126. Lipworth B.J., Hall I.P., Tan S., Aziz I., Coutie W.: *Effects of genetic polymorphism on ex vivo and in vivo function of beta2-adrenoceptors in asthmatic patients.* Chest 1999; 115(2): 324-328.
127. Lima J.J., Thomason D.B., Mohamed M.H., Eberle L.V., Self T.H., Johnson J.A.: *Impact of genetic polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on albuterol bronchodilator pharmacodynamics.* Clin. Pharmacol. Ther. 1999; 65(5): 519-525.
128. Israel E., Drazen J.M., Liggett S.B., Boushey H.A., Cherniack R.M., Chinchilli V.M., Cooper D.M., Fahy J.V., Fish J.E., Ford J.G., Kraft M., Kunselman S., Lazarus S.C., Lemanske R.F., Martin R.J., McLean D.E., Peters S.P., Silverman E.K., Sorkness C.A., Szefler S.J., Weiss S.T., Yandava C.N.: *The effect of polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 162(1): 75-80.
129. Aziz I., Hall I.P., McFarlane L.C., Lipworth B.J.: *Beta2-adrenoceptor regulation and bronchodilator sensitivity after regular treatment with formoterol in subjects with stable asthma.* J. Allergy Clin. Immunol. 1998; 101(3): 337-341.
130. Malczewska-Malec M., Wybrańska I., Leszczyńska-Gołabek I., Partyka L., Hartwich J., Jabrocka A., Kieć-Wilk B., Kwaśniak M., Motyka M., Dembinska-Kieć A.: *Analysis of candidate genes in Polish families with obesity.* Clin. Chem. Lab. Med. 2004; 42(5): 487-493.
131. Malczewska-Malec M., Wybrańska I., Leszczyńska-Gołabek I., Niedbał S., Kwaśniak M., Hartwich J., Kieć-Wilk B., Motyka M., Szopa M., Dembińska-Kieć

A.: *An analysis of the link between polymorphisms of the beta2 and beta3 adrenergic receptor gene and metabolic parameters among Polish Caucasians with familial obesity.* Med. Sci. Monit. 2003; 9(6): 225-234.

132. Kowalski M.L., *Polymorphisms of beta-2-adrenoceptor are associated with bronchodilator response to salbutamol and high IgE levels in patients with pollen allergy.* J Allergy Clin Immunol, 2000; 105,Supl.:371.
133. Heinzmann A., Mao X.Q., Akaiwa M., Kreomer R.T., Gao P.S., Ohshima K., Umeshita R., Abe Y., Braun S., Yamashita T., Roberts M.H., Sugimoto R., Arima K., Arinobu Y., Yu B., Kruse S., Enomoto T., Dake Y., Kawai M., Shimazu S., Sasaki S., Adra C.N., Kitaichi M., Inoue H., Yamauchi K., Tomichi N., Kurimoto F., Hamasaki N., Hopkin J.M., Izuhara K., Shirakawa T., Deichmann K.A.: *Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy.* Hum.Mol.Genet. 2000; 9(4): 549-559.
134. Howard T.D., Whittaker P.A., Zaiman A.L., Koppelman G.H., Xu J., Hanley M.T., Meyers D.A., Postma D.S., Bleecker E.R.: *Identification and association of polymorphisms in the interleukin-13 gene with asthma and atopy in a Dutch population.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2001; 25(3): 377-384.
135. *Position paper. Allergen standardization and skin tests. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology.* Allergy, 1993; 48,Supl.14: 48-82.
136. Pepys J.: *Skin testing.* Br.J.Hosp.Med. 1975; 14: 412.
137. *Standardized lung function testing. Official statement of the European Respiratory Society.* Eur. Respir. J. 1993;16, Supl.: 1-100.
138. *Standardization of Spirometry, 1994 Update. American Thoracic Society.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995; 152(3): 1107-1136.
139. Hall I.P.: *Pharmacogenetics of asthma.* Eur. Respir. J. 2000; 15(3): 449-451.
140. Drazen J.M., Silverman E.K., Lee T.H.: *Heterogeneity of therapeutic responses in asthma.* Br. Med. Bull. 2000; 56(4): 1054-1070.
141. Palmer L.J., Silverman E.S., Weiss S.T., Drazen J.M.: *Pharmacogenetics of asthma.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2002; 165(7): 861-866.
142. Liggett S.B.: *The pharmacogenetics of beta2-adrenergic receptors: relevance to asthma.* J. Allergy Clin. Immunol. 2000; 105(2 Cz.2): 487-492.
143. Ulbrecht M., Hergeth M.T., Wjst M., Heinrich J., Bickeboller H., Wichmann H.E., Weiss E.H.: *Association of beta(2)-adrenoreceptor variants with bronchial hyperresponsiveness.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 161(2 Cz. 1): 469-474.

144. Borowiec M., Woszczek G., Kowalski M.: *Distribution of New Polymorphic Loci beta-2 Adrenoceptor Gene in Atopic and Non-atopic Subjects.* Eur. Respir. J. 1999; 14,Supl. 30: 117.
145. Summerhill E., Leavitt S.A., Gidley H., Parry R., Solway J., Ober C.: *beta(2)-adrenergic receptor Arg16/Arg16 genotype is associated with reduced lung function, but not with asthma, in the Hutterites.* Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000; 162(2 Cz. 1): 599-602.
146. Lee D.K.: *Beta2-adrenoceptor genotypes and diplotypes at positions 16 and 27 in allergic rhinitis and asthma.* Ann. Allergy Asthma Immunol. 2004; 92(5): 580.
147. Silverman E.K., Kwiatkowski D.J., Sylvia J.S., Lazarus R., Drazen J.M., Lange C., Laird N.M., Weiss S.T.: *Family-based association analysis of beta2-adrenergic receptor polymorphisms in the childhood asthma management program.* J. Allergy Clin. Immunol. 2003; 112(5): 870-876.
148. Drysdale C.M., McGraw D.W., Stack C.B., Stephens J.C., Judson R.S., Nandabalan K., Arnold K., Ruano G., Liggett S.B.: *Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97(19): 10483-10488.
149. Barr R.G., Cooper D.M., Speizer F.E., Drazen J.M., Camargo C.A., Jr.: *Beta(2)-adrenoceptor polymorphism and body mass index are associated with adult-onset asthma in sedentary but not active women.* Chest 2001; 120(5): 1474-1479.
150. Israel E., Chinchilli V.M., Ford J.G., Boushey H.A., Cherniack R., Craig T.J., Deykin A., Fagan J.K., Fahy J.V., Fish J., Kraft M., Kunselman S.J., Lazarus S.C., Lemanske R.F., Jr., Liggett S.B., Martin R.J., Mitra N., Peters S.P., Silverman E., Sorkness C.A., Szefler S.J., Wechsler M.E., Weiss S.T., Drazen J.M.: *Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial.* Lancet 2004; 364(9444): 1505-1512.
151. Woszczek G., Borowiec M., Kowalski J.: *Association of Beta-2 Adrenoceptor Gene Polymorphisms With High Total IgE Levels in Patients With Pollen Allergy.* Eur. Respir. J. 1999; 14,Supl.30: 117.
152. Boros P., Kowalski J.: *Jak prawidłowo oceniać wyniki badań czynnościowych układu oddechowego?* Pneumonol. Alergol. Pol. 2000; 68(7-8): 299-302.
153. Torday J.S., Nielsen H.C., Fencl Mde M., Avery M.E.: *Sex differences in fetal lung maturation.* Am. Rev. Respir. Dis. 1981; 123(2): 205-208.

154. Holdstock G., Chastenay B.F., Krawitt E.L.: *Effects of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation.* Clin. Exp. Immunol. 1982; 47(2): 449-456.
155. Josefsson E., Tarkowski A., Carlsten H.: *Anti-inflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils.* Cell Immunol. 1992; 142(1): 67-78.
156. Moawad A.H., River L.P., Kilpatrick S.J.: *The effect of estrogen and progesterone on beta-adrenergic receptor activity in rabbit lung tissue.* Am. J Obstet. Gynecol. 1982; 144(5): 608-613.
157. Pata O., Atis S., Utku Oz A., Yazici G., Tok E., Pata C., Kilic F., Camdeviren H., Aban M.: *The effects of hormone replacement therapy type on pulmonary functions in postmenopausal women.* Maturitas 2003; 46(3): 213-218.
158. Mueller J.E., Frye C., Brasche S., Heinrich J.: *Association of hormone replacement therapy with bronchial hyper-responsiveness.* Respir. Med. 2003; 97(8): 990-992.
159. Villa M.P., Bernardi F., Burnaccini M., Tura A., Martelli M., Mazzanti L., Bergamaschi R., Cacciari E.: *Bronchial reactivity and sex hormone: study in a Turner's population.* Pediatr. Pulmonol. 1990; 9(4): 199-205.
160. Tan K.S., McFarlane L.C., Lipworth B.J.: *Paradoxical down-regulation and desensitization of beta2-adrenoceptors by exogenous progesterone in female asthmatics.* Chest 1997; 111(4): 847-851.
161. Balzano G., Fuschillo S., Melillo G., Bonini S.: *Asthma and sex hormones.* Allergy 2001; 56(1): 13-20.
162. Timmermann B., Li G.H., Luft F.C., Lund-Johansen P., Skrabal F., Hoehe M.R.: *Novel DNA sequence differences in the beta2-adrenergic receptor gene promoter region.* Hum. Mutat. 1998; 11(4): 343-344.
163. McGraw D.W., Forbes S.L., Kramer L.A., Liggett S.B.: *Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2-adrenergic receptor regulate receptor expression.* J. Clin. Invest. 1998; 102(11): 1927-1932.

IX. INDEKS SKRÓTÓW

A46 - adenina w pozycji 46

ADRB2 - receptor β_2-adrenergiczny

AmbA5 - alergen ambrozji

AmbA6 - alergen ambrozji

AMP - monofosforan adenozyny

ANN - alergiczny nieżyt nosa

ANOVA - analiza wariancji

Arg16 - arginina w pozycji 16(allel kodujący)

ATP - trójfosforan adenozyny

BUP - *beta upstream peptide*

G46 - guanina w pozycji 46

G79 - guanina w pozycji 79

C79 - cytozyna w pozycji 79

cAMP - cykliczny monofosforan adenozyny

CC - chemokiny typu CC,

CC16 - białko swoiste dla komórek Clara

CCR – receptor dla chemokin typu CC;

CD - antygen różnicowania komórek,

CGRP - neuropeptyd zależny od genu kalcytoniny

CSF - czynnik stymulujący kolonie

DNA - kwas dezoksyrybonukleinowy

dNTP - mieszanina syntetycznych trifosforanów dezoksynukleotydów

EAF - czynnik aktywujący eozynofile

ECF-A - czynnik chemotaktyczny dla eozynofilów

ECP - eozynofilowe białko kationowe

EPO - prekursor peroksydazy eozynofilowej

EPX - białko eozynofilowe X

FcεRI - receptor dla IgE o dużym powinowactwie

FcεRII - receptor dla IgE o dużym powinowactwie

FCER1B - łańcuchβreceptoraIgE o wysokim powinowactwie

FGF3 - czynnik wzrostu fibroblastów

G46 - guanina w pozycji 46

G79 - guanina w pozycji 79

GDP - difosforan guanozyny

Gln27 - glutamina w pozycji 27(allel kodujący)

Glu27 - kwas glutaminowy w pozycji 27(allel kodujący)

Gly16 - glicyna w pozycji 16 (allel kodujący)

GMCSF - czynnik pobudzający tworzenie koloni granulocytów i makrofagów

GTP - trójfosforan guanozyny

GRL - receptor dla glukokortykosteroidów

HLA - główny układ zgodności tkankowej

HNMT - *N*-metylotransferaza histaminy;

IgE - immunoglobulina E

IL - interleukina

ILR - receptor dla interleukiny

IGF-1 - insulinopodobny czynnik wzrostu-1

INFG (γ) - interferon γ

IU - jednostka międzynarodowa

LTA4H - hydrolaza leukotrienu A4;

LTB4 - leukotrien B4

LTC4 - leukotrien C4

LTCS - syntaza leukotrienu C4

MBP - główne białko zasadowe eozynofilów

MHC - główny kompleks zgodności tkankowej

NANC - układ nieadrenergiczny, niecholinergiczny

NKA - neurokinina A

NCF - czynnik chemotaktyczny dla neutrofilów

NFYB - jądrowy czynnik transkrypcyjny, podjednostka β

NFKB - 1 – inhibitor naturalnych komórek cytotoksycznych

NOS1 - 1 syntaza tlenku azotu

OR - iloraz szans

PAF - czynnik aktywujący płytki

PCR - polimerazowa reakcja łańcuchowa

PGD2 - prostaglandyna D2

PGF - prostaglandyna F

PKA - kinaza białkowa A

pz- par zasad

RANTES - chemokina produkowana przez limfocyty T

RFLP - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

SCF - czynnik wzrostowy komórek macierzystych

SD - odchylenie standardowe

SNP - polimorfizm pojedynczych nukleotydów

SPINK5 - 5 inhibitor proteazy serynowej typu Kazal

STAT6 - czynnik transkrypcyjny

TCR - receptor limfocytów T

Th - subpopulacja limfocytów pomocniczych

TNFA - czynnik martwicy nowotworów α

TRIS - (tris)hydroksymetyloaminometan

TXA – tromboksan A

UV- ultrafiolet

VIP - naczynioaktywny peptyd jelitowy