

**Aleksandra Szczepankiewicz<sup>1,2</sup>, Anna Bręborowicz<sup>1</sup>, Paulina Sobkowiak<sup>1</sup>, Lucyna Kramer<sup>3</sup>, Anna Popiel<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej III Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu  
Kierownik: prof. UM dr. hab. med. A. Bręborowicz

<sup>2</sup>Pracownia Diagnostyki Laboratoryjnej i Genetycznej Katedry Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu  
Kierownik: prof. dr hab. J. Twarowska-Hauser

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Informatyki i Statystyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu  
Kierownik: prof. dr hab. J. Moczko

## **Związek polimorfizmu A/T genu *CHRM2* z odpowiedzią rozkurczową na bromek ipratropium u dzieci chorujących na astmę oskrzelową**

Association of A/T polymorphism of the *CHRM2* gene with bronchodilator response to ipratropium bromide in asthmatic children

### **Abstract**

**Introduction:** The aim of this study was to analyze the possible association of A/T polymorphism of the *CHRM2* gene with asthma and pharmacogenetic analysis of the polymorphism with bronchodilator response to ipratropium bromide, an anticholinergic drug used in asthma.

**Material and methods:** Analysis was performed in a group of 113 children diagnosed with bronchial asthma and in a group of 123 healthy children from a control group. Moreover, in the group of 32 asthmatic children without concurrent treatment with long-acting  $\beta_2$ -agonists, bronchodilator response to ipratropium bromide was evaluated by the spirometric lung function test. Genetic analysis was performed for A/T polymorphism (rs6962027) of the *CHRM2* gene. Genotyping was done with the PCR-RFLP method. Statistical analysis was performed using Statistica 7.1 software.

**Results:** No association of A/T polymorphism was found with asthma ( $p = 0.865$  for genotypes and  $p = 0.782$  for alleles). In the pharmacogenetic analysis, it was observed that patients carrying TT genotype of *CHRM2* gene polymorphism demonstrated significantly poorer response to anticholinergic drug as compared to the patients with other genotypes for this polymorphism ( $p = 0.035$ ).

**Conclusions:** We found that TT genotype in the *CHRM2* gene was associated with poor bronchodilator response in asthmatic patients. The results should be analyzed carefully considering the small sample size and should be confirmed by other research groups.

**Key words:** ipratropium bromide, asthma, muscarinic type 2 receptor gene (*CHRM2*), polymorphism, bronchodilator response  
**Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 5–10**

### **Streszczenie**

**Wstęp:** Celem niniejszej pracy była analiza asocjacyjna polimorfizmu A/T genu receptora muskarynowego typu 2 (*CHRM2*) z występowaniem astmy oraz analiza farmakogenetyczna tego polimorfizmu z odpowiedzią rozkurczową na bromek ipratropium — lek antycholinergiczny stosowany w astmie.

**Materiał i metody:** Analizę przeprowadzono w grupie 113 dzieci z astmą oskrzelową oraz w grupie 123 dzieci zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Ponadto, w grupie 32 dzieci z astmą przeprowadzono ocenę odpowiedzi rozkurczowej na bromek ipratropium w badaniu spirometrycznym w okresie odstawienia  $\beta_2$ -agonisty długodziałającego (salmeterolu). Analizę genetyczną objęto polimorfizm A/T (rs6962027) genu *CHRM2*. Oznaczenie genotypów wykonano metodą PCR-RFLP. Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu Statistica 7.1.

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Aleksandra Szczepankiewicz, Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej III Katedry Pediatrii UM w Poznaniu, ul. Szpitalna 27/33, 60–572 Poznań, tel.: (061) 849 13 11, faks: (0 61) 848 01 11, e-mail: alszczep@amp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.03.2008 r.  
Copyright © 2009 Via Medica  
ISSN 0867–7077

**Wyniki:** W analizie asocjacyjnej nie wykazano związku polimorfizmu A/T genu *CHRM2* z występowaniem astmy ( $p = 0,865$  dla genotypów i  $p = 0,782$  dla alleli). W analizie farmakogenetycznej w badanej grupie pacjentów zaobserwowano istotny związek między występowaniem genotypu TT genu *CHRM2* a słabą odpowiedzią na lek antycholinergiczny ( $p = 0,035$ ).

**Wnioski:** Wykazano, że genotyp homozygotyczny TT genu *CHRM2* w badanej grupie pacjentów chorujących na astmę był istotnie związany ze słabszą odpowiedzią na bromek ipratropium. Wyniki należy jednak interpretować ostrożnie, zważywszy na małą liczebność analizowanej grupy. Do sformułowania jednoznacznych wniosków istotną będzie weryfikacja uzyskanych wyników przez inne grupy badawcze.

**Słowa kluczowe:** bromek ipratropium, astma, gen receptora muskarynowego typu 2 (*CHRM2*), polimorfizm, odpowiedź rozkurczowa

Pneumonol. Alergol. Pol. 2009; 77: 5–10

## Wstęp

Grupą leków rozkurczowych pomocniczo stosowanych w terapii astmy są leki antycholinergiczne. Leki te są czwartorzędowymi pochodnymi atropiny i znajdują zastosowanie u tych chorych, którzy nie tolerują  $\beta_2$ -agonistów, nie wykazują zadowalającej reakcji rozkurczowej po ich zastosowaniu, mają nocne napady duszności, oraz w astmie ciężkiej. Działają poprzez blokowanie cholinergicznej składowej skurczu oskrzeli, hamując wszystkie typy receptorów muskarynowych.

Na podstawie właściwości farmakologicznych zidentyfikowano pięć podtypów receptorów muskarynowych, z których trzy ( $M_1$ ,  $M_2$  i  $M_3$ ) wywierają efekt fizjologiczny w drogach oddechowych. Ich dużą liczbę zaobserwowano w mięśniach gładkich dróg oddechowych [1, 2], jak również w nabłonku oddechowym i gruczołach podśluzowych, stymulujących, poprzez acetylocholinę, wydzielanie śluzu [1].

Receptory muskarynowe są sprzężone z białkami przekaźnikowymi  $G_i$  i w wyniku ich pobudzenia uruchamia się szereg reakcji biochemicznych prowadzących do skurczu. Receptory  $M_2$  (autoreceptory, receptory hamujące), choć stanowią większość receptorów muskarynowych w mięśniach gładkich dróg oddechowych, nie biorą bezpośredniego udziału w skurczu, ale ich pobudzenie hamuje działanie bronchodilatacyjne wywołane przez receptory  $\beta_2$ -adrenergiczne [3]. W drogach oddechowych chorych na astmę zaobserwowano zwiększone podstawowe napięcie dróg oddechowych [4, 5], co potwierdzono na modelu zwierzęcym, gdzie, po ekspozycji na alergen, następuje natychmiastowy skurcz oskrzeli, a następnie pojawia się nadreaktywność na bodźce, takie jak stymulacja nerwu błędnego pod wpływem impulsów elektrycznych lub histaminy [6]. Leki antycholinergiczne działają poprzez obniżenie tego napięcia i nadreaktywności dróg oddechowych [7].

Regulacja napięcia mięśni gładkich dróg oddechowych przez receptory muskarynowe jest zaburzona w astmie, a obserwowany wzmożony skurcz

oskrzeli i wydzielanie śluzu wynikają ze zwiększonej ekspresji i aktywności cząsteczek sygnałowych koniecznych do wywołania skurczu przez receptory muskarynowe, jak również ze zwiększonego wydzielania acetylocholino wskutek dysfunkcji mechanizmów nerwowych związanych ze stanem zapalnym [8]. W związku z tym leki antycholinergiczne stosowane jako rozkurczowe w astmie przywracają prawidłową reaktywność dróg oddechowych poprzez blokowanie cholinergicznego składnika skurczu oskrzeli [9]. Jednak również w przypadku tych leków może dochodzić, wskutek przedłużonego działania leku, do stopniowego zmniejszenia liczby receptorów na powierzchni komórek, co jest spowodowane przyspieszeniem ich internalizacji (wnikania do wnętrza komórki), a następnie rozpadu lub zmniejszeniem syntezy białka.

Gen receptora muskarynowego typu 2 zlokalizowany jest w ramieniu długim chromosomu 7 (7q31–q35), w przybliżeniu 20 cm od miejsca związanego z wielkością wskaźnika szczytowego przepływu wydechowego (PEFR, *peak expiratory flow rate*) w badaniu Wjst i wsp. [10] i nadreaktywnością oddechową w badaniu Daniels i wsp. [11]. Gen o wielkości około 1,4 kb zawiera jedną, pozbawioną intronów, otwartą ramkę odczytu (pojedynczy ekson) kodującą 466-aminokwasowe białko receptora oraz duży region 5'UTR ulegający alternatywnemu splicingowi. W badaniu przeprowadzonym przez Fenech i wsp. [12] na komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych wykazano, że region ten zawiera liczne miejsca startu transkrypcji z sekwencjami rozpoznawanymi przez czynniki transkrypcyjne Sp1 i AP-2. W regionie tym znajduje się między innymi polimorfizm powtórzenia motywu  $(CA)_n$  zlokalizowany 96 pb za miejscem startu transkrypcji, który może wpływać na transkrypcję genu w mięśniach gładkich dróg oddechowych oraz częsty polimorfizm C/A położony przed tym miejscem. Sekwencja kodująca genu jest wysoce konserwatywna i nie znaleziono doniesień naukowych analizujących polimorfizmy z tej jego części.

W badaniu opisanym przez Minette i wsp. [13] wykazano, że u osób z astmą obserwuje się różny stopień dysfunkcji receptora  $M_2$ , co może prowadzić do nadmiernego wydzielania acetylocholiny i, w efekcie, zwiększonej aktywacji receptorów  $M_3$  odpowiedzialnych za skurcz. W związku z tym polimorfizmy genu receptora mogą potencjalnie wpływać na jego dysfunkcję. Jednak do chwili obecnej przeprowadzono niewiele badań nad związkiem polimorfizmów genu receptora *CHRM2* z występowaniem astmy.

W analizie polimorfizmu powtórzenia motywu (CA)<sub>n</sub> wykazano, że wariant zawierający 14 kopii (typ dziki) powtórzenia jest związany z wyższym poziomem ekspresji niż wariant z 6 powtórzeniami w transfekowanych komórkach mięśni gładkich dróg oddechowych [12], co mogłoby sugerować wpływ tego polimorfizmu na aktywność genu receptora i obserwowane różnice w nadreaktywności dróg oddechowych u pacjentów z astmą. Jednakże z powodu lokalizacji tego polimorfizmu w regionie o niskiej aktywności promotorowej istotny wpływ na całkowitą liczbę cząsteczek receptora  $M_2$  jest mało prawdopodobny. Analizowany w niniejszym badaniu polimorfizm (rs6962027) jest polimorfizmem typu SNP (zmiany pojedynczego nukleotydu), polega na zastąpieniu tyminy (T) adeniną (A) i jest zlokalizowany w obrębie ostatniego eksonu, w regionie 3' nieulegającym translacji. Jego ewentualny wpływ na działanie receptora nie został do tej pory określony.

Celem niniejszego badania była analiza asocjacyjna związku polimorfizmu A/T genu *CHRM2* z występowaniem astmy oraz ocena odpowiedzi rozkurczowej na bromek ipratropium w zależności od genotypu pacjenta.

## Materiał i metody

### Osoby badane

W badaniu uczestniczyło 113 niespokrewnionych dzieci chorych na astmę oskrzelową w wieku 6–18 lat ze średnią wieku 12 lat, odchyleniem standardowym (SD, *standard deviation*) = 3,8; w tym 45 dziewczynek (średnia wieku 12,4 roku, SD = 3,8) i 68 chłopców (średnia wieku 11,8 roku, SD = 2,9). Pacjenci byli rekrutowani w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej UM w Poznaniu oraz przyszpitalnej Poradni Alergologicznej. Rozpoznanie astmy ustalano co najmniej 6 miesięcy przed badaniem na podstawie wywiadu lekarskiego, przebiegu choroby i wyników badań dodatkowych zgodnie z wytycznymi GINA 2002 (<http://www.ginasthma.com>). Atopowe podłoże choroby potwierdzone następu-

jącymi badaniami: alergiczne punktowe testy skórne z powszechnie występującymi alergenami, podwyższone całkowite stężenie IgE lub obecność alergenowo swoistych IgE. Wynik testu interpretowano jako dodatni, jeśli bąbel pokrzywkowy w miejscu podania alergenu był co najmniej o 3 mm większy niż kontrola negatywna. Oceniano wyniki testów z następującymi alergenami: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Cladosporium*, *Alternaria*, sierść psa, sierść kota, pyłki traw, pyłki żyta, pyłki brzozy, leszczyny, olchy, babki, bylicy, pokrzywy. Wartości stężeń IgE odnoszono do wartości należnych dla wieku podanych przez producenta.

Osobno analizowano podgrupę chorych na astmę ciężką (n = 54), którzy dla utrzymania kontroli astmy wymagali stałego podawania dużych dawek wziewnych glikokortykosteroidów (> 800 µg budesonidu lub > 500 µg propionianu flutikazonu) oprócz leczenia długodziałającym  $\beta_2$ -agonistą i/lub lekiem antyleukotrienowym i/lub teofiliną o wolnym uwalnianiu.

Grupę kontrolną stanowiło 123 niespokrewnionych dzieci w wieku 6–18 lat ze średnią wieku 9,8 roku, SD = 2; w tym 64 dziewczynki (średnia wieku 9,6 roku, SD = 1,8) i 59 chłopców (średnia wieku 10 lat, SD = 2,2). U dzieci z grupy kontrolnej wykluczono obecność astmy oraz chorób atopowych na podstawie wywiadu lekarskiego, badania spirometrycznego oraz pomiaru stężenia tlenu azotu w powietrzu wydychanym (wykładnik stanu zapalnego dróg oddechowych).

Wszystkie osoby biorące udział w badaniu były rasy kaukaskiej, pochodziły z populacji polskiej (wszyscy z terenu Wielkopolski). Osoby badane, opiekunowie prawni pacjentów oraz dzieci z grupy kontrolnej wyrazili pisemną zgodę na ich udział w badaniu genetycznym. Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

### Analiza genetyczna

DNA wyizolowano z 10 ml krwi obwodowej pobranej na EDTA metodą wysalania [14] w grupie pacjentów oraz ze śliny osób z grupy kontrolnej za pomocą zestawu OraGene według załączonego protokołu. Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) przeprowadzono w objętości 15 µl. Wszystkie składniki konieczne do przeprowadzenia PCR mieszano w jednej probówce, przygotowując mieszaninę reakcyjną, a następnie przenoszono odpowiednio po 10 µl mieszaniny reakcyjnej do probówek zawierających po 5 µl roboczego roztworu DNA (50 ng/µl)

pacjentów i grupy kontrolnej. Skład mieszaniny reakcyjnej stanowiły: 250 ng genomowego DNA, 0,26  $\mu$ M każdego startera (o następującej sekwencji: starter *forward*: 5'-TTTCTTCTTGTTATGC-CACT-3' i starter *reverse*: 5'-CTTTAATAAACTTG-GTCC-3'), 2,6 mM dNTP, 22,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween, 0,5 U polimerazy Taq rekombinowanej (Fermentas). Reakcje przeprowadzono w termocyklerze PTC-200 MJ Research. Zastosowano następujący profil termiczny reakcji: denaturację wstępną 95°C przez 2 min; 30 cykli następujących kolejno: denaturacji 94°C przez 30 s; przyłączania starterów przez 30 s (50°C); wydłużania 72°C przez 40 s oraz końcową elongację przez 10 min w 72°C. Sekwencje starterów zostały zaprojektowane (opracowane) przez autorów niniejszej pracy przy użyciu programu internetowego „Primer3” dostępnego pod adresem: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Produkt PCR wielkości 356 pz został poddany trawieniu przez enzym restrykcyjny HpyCH4IV (*New England Biolabs*), a produkty trawienia rozdzielono w 2-procentowym żelu agarozowym. Allel T identyfikowano dla fragmentów DNA o wielkości 250 i 106 pz, a allel A dla fragmentów o wielkości 178 i 106 i 72 pz.

### Analiza farmakogenetyczna

Do badania farmakogenetycznego włączono 32 chorych w okresie stabilnym choroby. Oceniono prospektywnie odpowiedź na leczenie lekiem antycholinergicznym (bromek ipratropium). Odpowiedź na bromek ipratropium badano po okresie co najmniej dwóch tygodni od zakończenia leczenia długodziałającym  $\beta_2$ -agonistą (salmeterol). Wszyscy chorzy włączeni do badania kontynuowali dotychczasowe leczenie wziewnym glikokortykosteroidem, w związku z tym jego wpływ na wynik badania farmakogenetycznego przyjęto za jednakowy, a wykryte zależności pomiędzy wariantem polimorficznym a odpowiedzią na leczenie odniesiono wyłącznie do leku antycholinergicznego.

W ocenie odpowiedzi na leki o działaniu bronchodilatacyjnym (bromek ipratropium) posłużono się badaniem spirometrycznym (krzywa przepływu-objętość) wykonanym aparatem LungTest 1000 zgodnie z wytycznymi ATS (*American Thoracic Society*) [15, 16]. Badanie przeprowadzono w Pracowni Aerozoloterapii i Diagnostyki Czynnościowej Płuc Kliniki Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej. Analizie poddano wartości FEV<sub>1</sub> (*forced one-second expiration volume*) uzyskane przed podaniem leku i 30 min po jego podaniu. Zmianę wartości FEV<sub>1</sub> po podaniu leku obliczano według wzoru:

$$\text{odsetek odwracalności} = \frac{\text{maks. FEV}_1 \text{ po leku} - \text{maks. FEV}_1 \text{ przed lekiem}}{\text{maks. FEV}_1 \text{ przed lekiem}} \times 100$$

Wartość FEV<sub>1</sub> uzyskaną po podaniu leku wyrażano w procentach wartości należnej.

Odpowiedź na lek antycholinergiczny mierzono w próbie rozkurczowej (odwracalności obturacji) z użyciem bromku ipratropium (40 mcg) podanego przez komorę inhalacyjną Volumatic. Badanie spirometryczne wykonano przed podaniem leku i po 30 minutach po jego podaniu.

### Analiza statystyczna

Analizę rozkładu częstości genotypów przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statistica 7.1., stosując test  $\chi^2$  Pearsona, a analizę rozkładu częstości alleli — z wykorzystaniem testu dokładnego prawdopodobieństwa Fishera. Dla analiz przyjęto jako istotny statystycznie poziom istotności  $p > 0,05$ . W przypadku grup o liczebności mniejszej niż 5, zastosowano test dokładnego prawdopodobieństwa Fishera-Frimana-Haltona.

Ilorazy szans (OR, *odds ratio*) oraz ich przedziały ufności (CI, *confidential interval*) dla tabel 2  $\times$  2 przy obliczaniu alleli wyznaczono przy użyciu programu GraphPad InStat3 dostępnego pod adresem: <http://www.graphpad.com>.

Zgodność rozkładu genotypów z prawem Hardy’ego-Weinberga analizowano za pomocą programu *Utility Programs For Analysis Of Genetic Linkage* (Copyright © 1988 J. Ott). Za rozkład genotypów zgodny z prawem równowagi Hardy’ego-Weinberga przyjęto wartość  $p > 0,05$ .

W badaniu farmakogenetycznym dla genu receptora muskarynowego 2 przeprowadzono analizę porównawczą średnich wartości wyników uzyskanych w badaniu spirometrycznym (FEV<sub>1</sub>%, FVC% [*forced vital capacity*], PEF [*peak expiratory flow*]) oraz odpowiedzi rozkurczowej na bromek ipratropium w zależności od genotypu pacjenta, stosując jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, gdy dane były zgodne z rozkładem normalnym (test Shapiro-Wilka) i po sprawdzeniu jednorodności wariancji testem Levene’a. Średnie porównano testem *post-hoc* Newman-Keulsa. W przypadku, gdy rozkład danych nie spełniał wyżej wymienionych kryteriów, wykonano test nieparametryczny Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna.

### Wyniki

Rozkład genotypów dla badanego polimorfizmu był zgodny z prawem równowagi Hardy’ego-

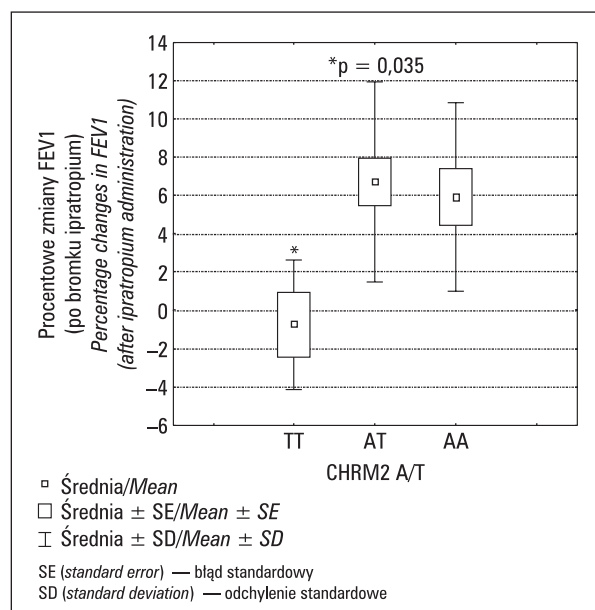
-Weinberga zarówno w grupie pacjentów ( $p = 0,780$ ), jak i w grupie kontrolnej ( $p = 0,784$ ). Liczebności dla poszczególnych genotypów (TT, AT, AA) wynosiły odpowiednio: w grupie pacjentów — 28, 55, 30 osób; w grupie kontrolnej — 31, 63, 29 osób. W analizie asocjacyjnej rozkład genotypów i alleli polimorfizmu A/T genu *CHRM2* nie różnił się istotnie statystycznie po porównaniu grupy pacjentów z grupą kontrolną ( $p = 0,865$  dla genotypów i  $p = 0,782$  dla alleli). W podgrupie pacjentów z astmą ciężką nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w porównaniu z grupą kontrolną ( $p = 0,726$  dla genotypów i  $p = 0,488$  dla alleli).

W analizie farmakogenetycznej polimorfizmu A/T genu *CHRM2* w grupie pacjentów zaobserwowano następujące liczebności dla poszczególnych genotypów: TT = 4 osoby; AT = 17 osób; AA = 11 osób. Wykazano istotne różnice między średnimi wartościami FEV1 ( $p = 0,021$ ), FVC ( $p = 0,022$ ) i PEF (0,01) w zależności od genotypu pacjenta. W analizie zależności między średnią wartością procentowej odpowiedzi na lek rozkurczowy a genotypami zaobserwowano istotnie statystycznie gorszą odpowiedź u pacjentów z genotypem TT (analiza wariancji ANOVA:  $df = 2$ ,  $F = 3,737$ ,  $p = 0,035$ ) (ryc. 1).

## Omówienie

Zaobserwowano, że receptory  $M_2$  wykazują zaburzone funkcjonowanie i, co za tym idzie, zmniejszoną zdolność hamowania mechanizmów rozkurczowych [13]. W związku z funkcją genu oraz jego lokalizacją w regionie chromosomowym sprzężonym między innymi z nadreaktywnością dróg oddechowych [11], w niniejszej pracy przeprowadzono analizę asocjacyjną jednego z polimorfizmów zlokalizowanego w obrębie tego genu.

Częstości alleli genu *CHRM2* określone dla populacji kaukaskiej wynosiły: 44% dla allelu T i 56% dla allelu A. Częstości obu alleli uzyskane w tej pracy obserwowano z równą częstością (po 50% każdy) zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. Konsekwencją identycznej częstości obu alleli w obu grupach jest brak asocjacji analizowanego polimorfizmu z występowaniem astmy. Polimorfizm A/T genu *CHRM2* nie był wcześniej analizowany, podjęto natomiast badania nad związkiem innych polimorfizmów tego genu z astmą. W badaniu przeprowadzonym przez Yamamoto i wsp. [17] w grupie 102 pacjentów z astmą, w tym 58 osób bez objawów choroby, ale z astmą występującą w dzieciństwie i 70 osób zdrowych znaleziono „niemą” (cichą) zmianę w pozycji A1050G, której oba warianty kodują serynę. W badaniu populacji maltańskiej opisano dwa polimorfizmy [18]



**Rycina 1.** Porównanie zależności genotypu A/T genu *CHRM2* z odpowiedzią rozkurczową na bromek ipratropium

**Figure 1.** Comparison of relationship between A/T *CHRM2* genotypes and bronchodilator response to ipratropium bromide

znajdujące się w regionie kodującym genu w pozycji A976C (oba warianty kodują argininę) i T1197C (oba warianty kodują treoninę), jednakże żaden z nich nie był związany z astmą w grupie 46 pacjentów z astmą i 46 osób z grupy kontrolnej. W badaniu tym zaobserwowano również istnienie częstego polimorfizmu w regionie 3' UTR genu, analizowanego w niniejszym badaniu, nie przeprowadzono jednak analizy asocjacyjnej z występowaniem astmy dla tego polimorfizmu. Wykazano, że polimorfizm ten nie powoduje zmiany sekwencji w miejscu rozpoznawanym przez czynniki transkrypcyjne i w związku z tym prawdopodobnie nie wpływa na ekspresję genu. W tym samym badaniu u wszystkich analizowanych osób wykazano istnienie insercji adeniny w odległości 100 pz od wspomnianego polimorfizmu, która wprowadza sekwencję konsensusu dla czynników transkrypcyjnych C-Rel/NF- $\kappa$ B w regionie 3'UTR. Ze względu na niewielką odległość między tymi wariantami nie można wykluczyć sprzężenia między nimi i, w efekcie, potencjalnego wpływu na ekspresję genu. Przyniesione przykłady wskazują na brak związku genu *CHRM2* z astmą, zgodnie z wynikami niniejszej analizy, jednak nie bez znaczenia pozostaje fakt, że większość tych badań (łącznie z niniejszym) przeprowadzono z udziałem stosunkowo małych grup badanych ( $n \sim 100$ ), w związku z tym w celu weryfikacji uzyskanych dotąd wyników analiza tego genu wymaga powtórzenia w większej grupie.

W niniejszym badaniu oceniono związek genotypów polimorfizmu A/T genu *CHRM2* z odpowiedzią na bromek ipratropium w próbie rozkurczowej przeprowadzonej w czasie odstawienia  $\beta_2$ -mimetyku długodziałającego (*wash-out*). Wykazano, że osoby homozygotyczne pod względem allelu T wykazują istotnie statystycznie gorszą odpowiedź rozkurczową (mniejszy wzrost wartości wskaźnika FEV1) po podaniu bromku ipratropium w porównaniu z pacjentami o pozostałych genotypach ( $p = 0,035$ ). Nie przeprowadzono jak dotąd badań analizujących wpływ tego i innych polimorfizmów genu *CHRM2* na odpowiedź na leki antycholinergiczne, nie można w związku z tym porównać uzyskanych wyników. Jednak z powodu niewielkiej liczebności pacjentów w analizie tego polimorfizmu ( $n = 32$ ) należy ostrożnie interpretować wyniki.

Praca powstała dzięki grantowi MNiSW nr 2P05B 143 29 oraz przy wsparciu finansowym Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Aleksandra Szczepankiewicz jest laureatką stypendium naukowego Fundacji na Rzecz Wspierania Polskiej Farmacji i Medycyny oraz stypendium naukowego L'Oreal Polska dla Kobiet i Nauki.

### Piśmiennictwo

- Mak J.C., Barnes P.J. Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 141: 1559–1568.
- Makker H.K., Holgate S.T. The contribution of neurogenic reflexes to hypertonic saline-induced bronchoconstriction in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993; 92: 82–88.
- Schramm C.M., Arjona N.C., Grunstein M.M. Role of muscarinic M2 receptors in regulating beta-adrenergic responsiveness in maturing rabbit airway smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: L783–L790.
- Molfini N.A., Slutsky A.S., Julia-Serda G. i wsp. Assessment of airway tone in asthma. Comparison between double lung transplant patients and healthy subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 148: 1238–1243.
- Morrison J.F., Pearson S.B., Dean H.G. Parasympathetic nervous system in nocturnal asthma. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 1988; 296: 1427–1429.
- Fryer A.D., Wills-Karp M. Dysfunction of M2-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after antigen challenge. *J. Appl. Physiol.* 1991; 71: 2255–2261.
- O'Connor B.J., Towse L.J., Barnes P.J. Prolonged effect of tiotropium bromide on methacholine-induced bronchoconstriction in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154: 876–880.
- Gosens R., Zaagsma J., Meurs H., Halayko A.J. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir. Res.* 2006; 7: 73.
- Barnes P.J. Corticosteroid resistance in airway disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2004; 1: 264–268.
- Wjst M., Fischer G., Immervoll T. i wsp. A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. *Genomics* 1999; 58: 1–8.
- Daniels S.E., Bhattacharya S., James A. i wsp. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 1996; 383: 247–250.
- Fenech A.G., Billington C.K., Swan C. i wsp. Novel polymorphisms influencing transcription of the human *CHRM2* gene in airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; 30: 678–686.
- Minette P.A., Lammers J.W., Dixon C.M., McCusker M.T., Barnes P.J. A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. *J. Appl. Physiol.* 1989; 67: 2461–2465.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.
- American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987.
- Society A.T. Standardization of spirometry. Update. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994; 150: 1107–1136.
- Yamamoto T., Yamashita N., Kuwabara M. i wsp. Mutation screening of the muscarinic m2 and m3 receptor genes in asthmatics, outgrow subjects, and normal controls. *Ann. Genet.* 2002; 45: 109–113.
- Fenech A.G., Ebejer M.J., Felice A.E., Ellul-Micallef R., Hall I.P. Mutation screening of the muscarinic M(2) and M(3) receptor genes in normal and asthmatic subjects. *Br. J. Pharmacol.* 2001; 133: 43–48.