

Polimorfizm genów receptorów β_2 -adrenergicznego i muskarynowego typu 2 u dzieci chorych na astmę

Polymorphism of β_2 -adrenergic and muscarinic type 2 receptor genes in asthmatic children

ALEKSANDRA SZCZEPANKIEWICZ, BRĘBOROWICZ ANNA, PAULINA SOBKOVIK, ANNA POPIEL

Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej III Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wprowadzenie. Przebieg kliniczny astmy jak również odpowiedź na terapię przeciwastmatyczną wykazują duże zróżnicowanie w populacji pacjentów. Jednym z czynników odpowiedzialnych za tę różnorodność jest podłoże genetyczne. Zmienność genetyczna może również wpływać modyfikująco na odpowiedź rozkurczową na β_2 -agonistów, którą ponadto może upośledzać przewlekłe ich stosowanie w terapii astmy, co jest szczególnie niebezpieczne w zaostrzeniach astmy. Natomiast mało poznany jest wpływ przewlekłego leczenia β_2 -agonistami na odpowiedź na leki cholinolityczne.

Cel pracy. Analiza związku między polimorfizmem genów receptora adrenergicznego i muskarynowego typu 2 a ciężkością przebiegu astmy u dzieci oraz odpowiedzią bronchodilatacyjną na podanie wziewne β_2 -agonisty i leku cholinolitycznego.

Materiał i metody. Badanie przeprowadzono u 99 dzieci chorych na astmę oskrzelową w wieku od 6 do 18 roku życia, leczonych wziewnymi glikokortykosteroidami i LABA przez okres co najmniej 3 miesięcy. U wszystkich wykonano badanie spirometryczne oraz próbę rozkurczową z salbutamolem i bromkiem ipratropium po odstawieniu LABA. Polimorfizm genu ADRB2 i CHRM2 oznaczono za pomocą metody PCR-RFLP.

Wyniki. Wykazano związek astmy umiarkowanej z genotypem Gly/Gly polimorfizmu ADRB2 w kodonie 16. Nie zaobserwowano związku pozostałych polimorfizmów ze stopniem ciężkości astmy. Odpowiedź rozkurczowa na oba leki rozszerzające oskrzela była porównywalna (nieco lepsza dla salbutamolu), a zakres zmian wartości FEV1 nie różnił się istotnie u pacjentów z różnymi genotypami polimorfizmów genów ADRB2 ani CHRM2.

Wnioski. Niniejsze badanie potwierdziło istnienie zależności między stopniem ciężkości astmy a polimorfizmem w kodonie 16 genu ADRB2. Polimorfizm genów ADRB2 i CHRM2 nie pozwala na identyfikację chorych o określonej odpowiedzi na leki cholinolityczne.

Słowa kluczowe: *astma, polimorfizm, gen receptora β_2 -adrenergicznego, gen receptora muskarynowego typu 2, farmakogenetyka*

Summary

Introduction. The course of asthma and response to antiasthmatic treatment are very heterogenous in the population of patients. One of the factors underlying this heterogeneity is its genetic component. Genetic factors can also modify bronchodilator response to β_2 -agonists that may be subsequently impaired by chronic administration of those drugs, which is particularly dangerous in asthma exacerbations. On the other hand, the influence of chronic exposure to β_2 -agonists on bronchodilator response to anticholinergic agents is poorly described.

Aim of the study. The aim of the study was to analyse the relationship between ADRB2 and CHRM2 genes polymorphism and asthma severity in asthmatic children, as well as with bronchodilator response to an inhaled β_2 -agonist and an anticholinergic agent.

Material and methods. 99 asthmatic children in the age range of 6 to 18 years old treated with inhaled corticosteroids and LABAs for at least 3 months participated in the study. In all patients we performed spirometry and bronchodilator response to salbutamol and ipratropium bromide after LABA withdrawal. Polymorphism of ADRB2 and CHRM2 genes was analyzed with the PCR-RFLP.

Results. We observed an association of moderate asthma with the Gly/Gly genotype of Arg16Gly ADRB2 gene polymorphism. We did not find a relationship for the other polymorphisms. The bronchodilator response to both drugs was comparable (slightly better for salbutamol), and the range of FEV1 changes did not differ significantly in patients with particular genotypes of ADRB2 and CHRM2 genes.

Conclusions. The present study confirmed an association of Arg16Gly ADRB2 gene polymorphism and asthma severity. Polymorphism of ADRB2 and CHRM2 genes is not useful in the identification of patients with specific response to anticholinergic drugs

Key words: *asthma, polymorphism, β_2 -adrenergic receptor gene, muscarinic type receptor gene, pharmacogenetics*

© *Alergia Astma Immunologia* 2009, 14(1): ????

www.alergia-astma-immunologia.eu

Nadesłano: 10.02.2009

Zakwalifikowano do druku: 05.03.2009

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Aleksandra Szczepankiewicz
Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej
III Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań
tel. (61) 849 13 11, fax (61) 848 01 11
e-mail: alszczep@amp.edu.pl

Wykaz skrótów:

ADRB2 – receptor β 2-adrenergiczny
CHRM2 – receptor muskarynowy typu 2
PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy
RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
LABA – β 2-agonista długo działający

Abbreviations:

ADRB2 – β 2-adrenergic receptor
CHRM2 – muscarinic type 2 receptor
PCR – polymerase chain reaction
RFLP – restriction fragment length polymorphism
LABA – long-acting β 2-agonist

Astma jest chorobą o złożonej patogenezie i różnorodnym obrazie klinicznym [1]. Na wystąpienie choroby jak i jej naturalną historię mają wpływ zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Kontrolą genetyczną podlega kilka ogniw związanych z rozwojem i przebiegiem klinicznym choroby, a wśród nich odpowiedź na leki przeciwastmatyczne [2-4]. W oparciu o badania farmakogenetyczne rozpoczęte przed kilkoma laty pojawiła się nadzieja na możliwość indywidualnego, odpowiedniego dla określonego genotypu doboru leków. Warunkiem wdrożenia tak optymistycznych rozwiązań powinno być udokumentowanie związku między polimorfizmem genów dla określonych receptorów i odpowiedzią na ich stymulację. Jednak prowadzenie takich badań i jednoznaczne wnioskowanie na ich podstawie nie jest łatwe, bowiem może zależeć od aktualnego nasilenia objawów, stosowanego leczenia i czynników wyzwalających objawy.

W obliczu zapalnej koncepcji astmy punkt ciężkości leczenia od wielu już lat został przesunięty w kierunku leczenia przeciwzapalnego [5]. Nadal jednak, uwzględniając komponentę skurczu mięśni gładkich w rozwoju obturacji, do leków niezbędnych zalicza się leki rozszerzające oskrzela. W zaostrzeniach choroby zaleca się te, które wykazują szybkie i silne działanie i które są łatwe w stosowaniu. Należą do nich przede wszystkim β 2-mimetyki o szybkim działaniu, a w drugiej kolejności leki cholinolityczne – obie grupy w postaci wziewnej [6]. W leczeniu przewlekłym zaleca się podawanie β 2-agonistów o długim działaniu, zawsze obok steroidów wziewnych [7]. Jak dotąd leki cholinolityczne o działaniu przedłużonym nie znalazły zastosowania w astmie.

Zostało udowodnione, że przewlekłe leczenie β 2-agonistami może upośledzać odpowiedź rozkurczową na podaną średnią dawkę salbutamolu (do 400mcg) prowadząc do rozwoju tolerancji na tę grupę leków. Może to być szczególnie niebezpieczne w przypadku zaostrzeń astmy. Jak dotąd mało zbadany jest wpływ przewlekłego podawania β 2-agonistów na odpowiedź na inne leki rozszerzające oskrzela takie jak leki cholinolityczne (np. bromek ipratropium). Problem ten wydaje się istotny klinicznie, bowiem, chociaż obie grupy leków działają za pośrednictwem różnych receptorów, mają wspólne szlaki przekazywania sygnału do komórek, co może prowadzić do interakcji między tymi lekami [8, 9]. Ponadto β 2-agoniści mogą wywierać nieswoisty wpływ na napięcie mięśni gładkich dróg oddechowych, co może zmieniać ich reakcję na inne leki rozszerzające oskrzela. W ostatnim badaniu

Asthma is a disease with a complex pathogenesis and heterogenous clinical picture [1]. Its development and natural history is influenced both by genetic and environmental factors. Genetic control covers elements related to the development and clinical course of the disease, including response to antiasthmatic agents [2-4]. Pharmacogenetic studies that have been conducted for a few years give hope for the choice of medicines on an individual basis with regard to a particular genotype. Implementation of this kind of solution is conditioned by the well-documented relationship between particular receptor genes polymorphism and their response to stimulation. However, it is not easy to conduct adequate studies and draw unequivocal conclusions, since a lot depends on current symptoms intensity, the method of treatment and the factors triggering symptoms.

Development of the concept of inflammatory asthma has caused a shift in treatment towards anti-inflammatory asthma therapy [5]. However, due to smooth muscle contraction occurring during the process of obturation, bronchodilating drugs are still considered essential. In asthma exacerbations, it is recommended to use those bronchodilating drugs that have fast and strong activity and are easy to use. These primarily include short-acting β 2-mimetics and secondly anticholinergic agents – both groups in the inhaled form. In treatment of chronic asthma, it is recommended to use long-acting β 2-agonists, always with inhaled steroids [7]. So far, long-acting anticholinergic agents have not been used in asthma management.

It has been proved that chronic administration of β 2-agonists may impair bronchodilator response to the mean salbutamol dose (up to 400 mcg), leading to a development of tolerance to this group of drugs. This may be particularly dangerous in asthma exacerbations. So far, the influence of chronic exposure to β 2-agonists on response to other bronchodilating drugs, such as anticholinergic agents (e.g. ipratropium bromide), has been poorly described. The problem seems to be clinically significant due to the fact that although both these groups of drugs act via different receptors, they use the same signalling pathway, which may lead to interactions between these drugs [8, 9]. Moreover, β 2-agonists may have a non-specific influence on the tone of airway smooth muscles, which may change their reaction to other bronchodilating drugs. In their most recent study, Haney and Hancox [10]

Haney i Hancox [10] wykazali, że przewlekła terapia β 2-agonistą (formoterol) indukuje tolerancję na leki z tej grupy i nie jest odwracalna nawet po podaniu dużej dawki salbutamolu, natomiast przewlekłe podawanie β 2-agonistów nie wpływa na odpowiedź rozkurczową po podaniu bromku ipratropium.

Zakładając, że zależna od predyspozycji genetycznej odpowiedź na leki przeciwastmatyczne może determinować przebieg astmy przeprowadzono badanie związku pomiędzy polimorfizmem genów receptora adrenergicznego i muskarynowego w populacji dzieci polskich chorych na astmę a ciężkością przebiegu choroby. Ponadto, oceniono odpowiedź bronchodilatacyjną na podanie wziewne leku β 2-agonisty i cholinolitycznego w różnych wariantach polimorficznych genów dla receptorów układu autonomicznego.

MATERIAŁ I METODY

Pacjenci

Do badań zakwalifikowano wstępnie 143 dzieci chore na astmę oskrzelową przewlekłą w wieku od 6 do 18 roku życia, średnia wieku wynosiła 11,8. W badanej grupie było 43 dziewczynki i 56 chłopców. Rozpoznanie astmy było ustalone w oparciu o wywiad, badanie przedmiotowe i wyniki badań dodatkowych zgodnie z kryteriami zawartymi w wytycznych GINA 2002 (ang. Global Initiative for Asthma) [11]. Wszyscy chorzy otrzymywali steroidy wziewne w związku z tym ich wpływ na wynik badania farmakogenetycznego przyjęto za jednakowy. Dawki stosowanych wziewnych steroidów były zróżnicowane w zależności od stopnia ciężkości astmy; w razie potrzeby stosowano krótkodziałające β 2-mimetyki doraźnie.

U dzieci, u których stosowano wcześniej długodziałające β 2-mimetyki leki te odstawiono na okres co najmniej 14 dni przed wykonaniem badań. U 99 chorych wykonano próbę rozkurczową z salbutamolem (200 mcg) i u 72 z bromkiem ipratropium (40 mcg). Badania czynnościowe układu oddechowego wykonywano w Pracowni Aerozoterapii i Badań Czynnościowych wykorzystując spirometr LUNG 1000. Badania przeprowadzono nie wcześniej niż 24 godziny po zastosowaniu ostatniej dawki leku doraźnego. W ciągu tygodnia poprzedzającego badanie zapotrzebowanie na lek doraźny wskazywało na dobrą kontrolę astmy (do 2 dawek salbutamolu na 7 dni). Każdy chory zgłaszał się na badanie dwukrotnie. W pierwszym badaniu oceniono odpowiedź na salbutamol (2 dawki a 100mcg) w drugim na bromek ipratropium (2 dawki a 25 mcg) podawanych z inhalatora ciśnieniowego przez komorę inhalacyjną Volumatic. Badanie spirometryczne wykonywano przed i po podaniu leku. Dla salbutamolu odstęp czasu między podaniem a drugim badaniem wynosił 15 minut, dla bromku ipratropium – 30 min. Ocenianym parametrem referencyjnym była wartość FEV1 wyrażana w procentach wartości należącej. Zmianę wartości po podaniu leku wyrażano w procentach w stosunku do wartości początkowej.

have shown that chronic treatment with β 2-agonist (formoterol) induces tolerance to drugs of this group, which is not restored by a high dose of salbutamol. However, bronchodilator response to ipratropium bromide is unaffected.

Following the assumption that response to antiasthmatic agents depending on the genetic predisposition may determine the course of asthma, it was justified to conduct an analysis concerning the relationship between ADRB2 and CHRM2 genes polymorphism and asthma severity in asthmatic children in Poland. Bronchodilator response to an inhaled β 2-agonist and anticholinergic agent in various gene polymorphic variants for the autonomous system receptors was also analyzed.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

143 children with chronic bronchial asthma in the age range of 6 to 18 years old (mean 11.8) were initially included in the study. The group consisted of 43 girls and 56 boys. The diagnosis was based on medical history, physical examination and results of additional tests according to the Global Initiative for Asthma (GINA) 2002 guidelines. [11]. All the subjects were receiving inhaled steroids; therefore, their influence on the pharmacogenetic study result was assumed to be equal. Inhaled steroids were administered in various doses, depending on asthma severity. If needed, short-acting β 2-mimetics were used.

In children earlier receiving long-acting β 2-mimetics, they were withdrawn at least 14 days prior to the study. 99 patients were subjected to bronchodilator response to salbutamol (200 mcg) and 72 to ipratropium bromide (40 mcg). Pulmonary function tests were performed at the Laboratory of Aerosol Therapy and Function Tests with the use of a LUNG 1000 spirometer. They were performed at least 24 hours after the administration of the last dose of the medicine received according as needed. During the week prior to the test, the need to use the medicine indicated good asthma control (up to 2 salbutamol doses in a period of 7 days). Each patient underwent the test twice. The first test assessed the response to salbutamol (2 doses vs. 100 mcg) and the second test response to ipratropium bromide (2 doses vs. 25 mcg) that were administered from a pressurized inhaler with a Volumatic inhalation chamber. Spirometry was performed before and after the drug administration. The interval between the drug administration and the second test was 15 minutes for salbutamol and 30 minutes for ipratropium bromide. The reference parameter to be assessed was FEV1 expressed as a percentage of the predicted value. The change in value following the drug administration was expressed as a percentage of the initial value.

Badanie genetyczne

DNA pacjentów uzyskano z krwi i wyizolowano metodą wysalania wg Millera i wsp. [12]. Polimorfizmy genów ADRB2 i CHRM2 analizowano przy użyciu metody PCR-RFLP. Reakcję PCR przeprowadzono w objętości 15 μ l. Dla polimorfizmów w kodonie 16 i 27 genu ADRB2 wykorzystano warunki reakcji PCR oraz sekwencje starterów wcześniej opisane w piśmiennictwie [13]. Objętość 5 μ l produktu PCR (168 pz) trawiono z użyciem 0.5 U odpowiedniego enzymu restrykcyjnego (NcoI dla Arg16Gly; BseXI dla Glu27Gln). Po analizie RFLP, po elektroforezie w żelu agarozowym zaobserwowano następujące allele: dla Arg16Gly – allel A (Arg) (146 i 22 pz) i allel G (Gly) (122, 28 i 18 pz); dla Glu27Gln – allel G (Gln) (168 pz) i allel C (Glu) (105 i 63 pz).

Dla polimorfizmu rs6962027 genu CHRM2 wykorzystany projekt własny starterów (przy użyciu programu internetowego „Primer3” dostępnego pod adresem: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) o następującej sekwencji: starter forward: 5'-TTTCTTCTTGTTATGCCACT-3' i starter reverse: 5'-CTTTAATAAACTTGGTCC-3'. Wszystkie składniki konieczne do przeprowadzenia PCR mieszano w jednej probówce przygotowując mieszaninę reakcyjną, a następnie przenoszono odpowiednio po 10 μ l mieszaniny reakcyjnej do probówek zawierających po 5 μ l roboczego roztworu DNA (50 ng/ μ l) pacjentów. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze PTC-200 MJ Research. Produkt PCR wielkości 356 pz został poddany trawieniu przez enzym restrykcyjny HpyCH4IV (New England Biolabs), a produkty trawienia rozdzielono w 2% 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.

W przypadku nie trawionego produktu PCR dla allelu G polimorfizmu Glu27Gln trawienie zostało przeprowadzone dwukrotnie by potwierdzić otrzymane genotypy. Przeprowadzono również kontrolę reakcji RFLP dla każdego polimorfizmu (25% przypadkowo wybranych próbek DNA). Genotypowanie przeprowadzono bez znajomości danych klinicznych pacjenta i wyniku terapii.

Analiza statystyczna

Analizę porównawczą średnich wartości wyników uzyskanych w badaniu spirometrycznym (FEV1% wyjściowy oraz % wartości należnej) przeprowadzono za pomocą testu T-studenta, gdy rozkład spełniał kryteria normalności lub testem nieparametrycznym Wilcoxon, gdy dane nie spełniały wymogów rozkładu normalnego. Odpowiedź rozkurczową na leki z grupy β 2-agonistów w zależności od genotypu pacjenta określono 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.

Genetic study

Patient DNA was extracted from blood using the salting-out procedure described by Miller et al. [12]. Polymorphism of ADRB2 and CHRM2 genes was analyzed with the PCR-RFLP. The PCR was performed in a 15 μ l reaction volume. The analysis of polymorphisms in codon 16 and codon 27 of ADRB2 genes was performed in PCR conditions and with primer sequences described previously in literature [13]. 5 μ l of PCR product (168 bp) was digested with 0.5 U of a suitable restriction enzyme (NcoI for Arg16Gly; BseXI for Glu27Gln). The RFLP analysis and agarose gel electrophoresis revealed the following alleles: for Arg16Gly – allele A (Arg) (146 and 22 bp) and allele G (Gly) (122, 28 and 18 bp); for Glu27Gln – allele G (Gln) (168 bp) and allele C (Glu) (105 and 63 bp).

For rs6962027 polymorphism of the CHRM2 gene we used primers of our own design (with the “Primer 3” online program, available at http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) in the following sequence: the forward starter: 5'-TTTCTTCTTGTTATGCCACT-3' and the reverse starter: 5'-CTTTAATAAACTTGGTCC-3'. All the components necessary to conduct the PCR were mixed in one test tube and then each 10 μ l reaction mixture was transferred to test tubes containing a 5 μ l working DNA solution (50 ng/ μ l). The reactions were conducted in a PTC-200 MJ Research thermal cycler. The PCR product (356 bp) was digested with the HpyCH4IV (New England Biolabs) restriction enzyme and digestion products were separated by 2% agarose gel. T allele was identified for 250 and 106 bp DNA fragments, and A allele for 178, 106 and 72 bp fragments.

In case of the indigested PCR product for G allele of Glu27Gln polymorphism, digestion was performed twice in order to confirm the obtained genotypes. Also, the RFLP reaction was checked for each polymorphism (25% of randomly selected DNA samples). Genotyping was performed without knowledge of the patient's clinical data and therapy results.

Statistical analysis

A comparative analysis of mean values obtained in spirometry (FEV1 initial % and % of the predicted value) was conducted with a Student's t-test in case of normal distribution or with the non-parametric Wilcoxon test, if the data did not fulfil the requirements of normal distribution. Bronchodilator response to β 2-agonists, depending on the patient's genotype, was determined with one-way analysis of variance (ANOVA) if the data were normally distributed (Shapiro-Wilk test) and after checking the homogeneity of variance with the Levene's test. Means were compared with the post-hoc Newman-Keuls test. If the data distribution did not meet the above-mentioned criteria, the non-parametric Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple comparison test were performed.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statistica v.7.1. Dla analiz przyjęto jako istotny statystycznie poziom istotności (p) poniżej wartości 0,05.

Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 227/05 i 149/06), a warunkiem ich wykonania było uzyskanie pisemnej zgody rodziców/opiekunów i dziecka powyżej 12 roku życia. W czasie badań były przestrzegane prawa pacjentów zgodnie z Konwencją Helsińską.

WYNIKI

Analiza wariantów genu ADRB2 ze stopniem ciężkości astmy wykazała istotność statystyczną polimorfizmu w kodonie 16, wskazując na związek astmy umiarkowanej z genotypem Gly/Gly ($p=0,041$). Dla polimorfizmu w kodonie 27 nie zaobserwowano istotnych różnic w rozkładzie genotypów u pacjentów z różnym stopniem ciężkości astmy ($p=0,253$). Również dla polimorfizmu rs6962027 A/T genu CHRM2 nie zaobserwowano istotnych różnic ($p=0,541$) (tab. I).

Statistical analysis was performed with the Statistica v.7.1 statistical package. For all the analyses, the statistical significance level (p) was set at <0.05 .

The studies were conducted with the consent of the Bioethical Commission of the Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in Poznań (Resolution No. 227/05 and 149/06), after was obtained written consent of the parents/guardians and children over the age of 12. The studies were conducted according to the Helsinki Declaration protocol.

RESULTS

The analysis of ADRB2 gene variants with asthma severity showed statistical significance for Arg16Gly polymorphism indicating an association of moderate asthma with the Gly/Gly genotype ($p=0.041$). For Gln27Glu polymorphism, no significant differences in the genotype distribution in patients with different levels of asthma severity were observed ($p=0.253$). Similarly, no significant differences were observed for A/T rs6962027 polymorphism of the CHRM2 gene ($p=0.541$) (tab. I).

Tabela I. Analiza rozkładu genotypów ADRB2 i CHRM2 w zależności od stopnia ciężkości astmy
Table I. Distribution of ADRB2 and CHRM2 genotypes depending on asthma severity

Gen/ Gene	Genotyp/ Genotype	n	Astma/ Asthma			p
			lekka/ mild	umiarkowana/ moderate	ciężka/ severe	
kodon 16/ codon 16 (Arg16Gly)						
ADRB2	Arg/Arg	28	0 (0,00%)	17 (60,71%)	11 (39,29%)	0,041
	Arg/Gly	58	0 (0,00%)	27 (46,55%)	31 (53,45%)	
	Gly/Gly	57	1 (1,75%)	41 (71,93%)	15 (26,32%)	
kodon 27/ codon 27 (Gln27Glu)						
ADRB2	Gln/Gln	30	1 (3,33%)	20 (66,67%)	9 (30,00%)	0,253
	Gln/Glu	62	0 (0,00%)	40 (55,56%)	32 (44,44%)	
	Glu/Glu	41	0 (0,00%)	25 (60,98%)	16 (39,02%)	
rs6962027						
CHRM2	T/T	34	0 (0,00%)	22 (64,71%)	12 (35,29%)	0,541
	A/T	69	0 (0,00%)	40 (57,97%)	29 (42,03%)	
	A/A	39	1 (2,56%)	23 (58,97%)	15 (38,46%)	

n – liczba pacjentów/number of patients

p – poziom istotności statystycznej/level of statistical significance

Średnia wartość FEV1 przed oceną efektu rozkurczowego salbutamolu w całej badanej grupie (n=99) wynosiła 92,5% wartości należnej (SD=15,1). Po podaniu salbutamolu wartość ta wzrosła średnio o 7% w stosunku do wartości wyjściowej. Zakres zmian wartości wynosił od -9 do + 25%, przy czym u 64% zmiana wartości wynosiła $\pm 5\%$, u 20% $\pm 6-10\%$, u 16% $> 10\%$. Średnia zmiana wartości FEV1 była porównywalna we wszystkich genotypach obu polimorfizmów genu ADRB2, jak również odsetek dzieci, u których wystąpiła zmiana w określonych przedziałach wartości dla wszystkich genotypów był porównywalny (tab. II i III).

The mean value of FEV1 prior to the evaluation of bronchodilator effect of salbutamol in the whole group (n=99) was 92.5% of the predicted value (SD=15.1). After salbutamol administration, the value increased by 7% on average, compared to the initial value. The range of changes was from -9 to + 25%, where the change in values was $\pm 5\%$ in 64%, $\pm 6-10\%$ in 20% and $> 10\%$ in 16%. The mean FEV1 change, as well as the percentage of children with changes in a particular range, was comparable for all genotypes of both ADRB2 gene polymorphisms (tab. II and III).

Tabela II. Średnia zmiana wartości FEV1 w zależności od genotypu w kodonie 16 genu ADRB2
Table II. Mean FEV1 change, depending on the ADRB2 Arg16Gly genotype

kodon 16/ codon 16 (Arg16Gly)	średnia zmiana FEV1 po salbutamolu (%)/ mean FEV1 change after salbutamol (%)	n	SD	p
Arg/Arg	4,55	20	6,82	
Arg/Gly	4,26	46	6,15	0,973
Gly/Gly	4,19	36	3,95	

n – liczba pacjentów/number of patients

SD – odchylenie standardowe/standard deviation

p – poziom istotności statystycznej/level of statistical significance

Tabela III. Średnia zmiana wartości FEV1 w zależności od genotypu w kodonie 27 genu ADRB2
Table III. Mean FEV1 change, depending on the ADRB2 Gln27Glu genotype

kodon 27/ codon 27 (Gln27Glu)	średnia zmiana FEV1 po salbutamolu (%)/ mean FEV1 change after salbutamol (%)	n	SD	p
Gln/Gln	4,81	21	4,29	
Gln/Glu	4,37	54	5,84	0,799
Glu/Glu	3,74	27	6,02	

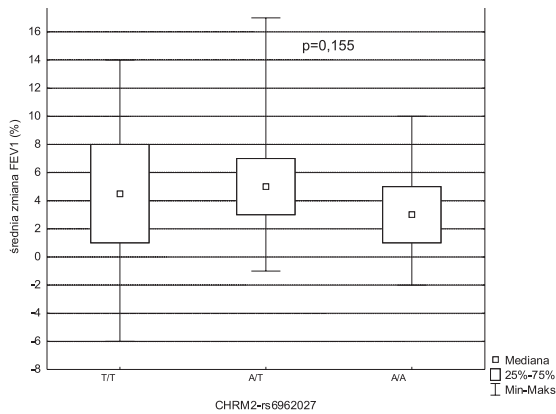
n – liczba pacjentów/number of patients

SD – odchylenie standardowe/standard deviation

p – poziom istotności statystycznej/level of statistical significance

Średnia wartość FEV1 przed oceną efektu rozkurczowego bromku ipratropium w całej badanej grupie wynosiła 92,5% wartości należnej (SD=15,1). Po podaniu bromku ipratropium (n=74) wartość ta wzrosła średnio o 5,8% w stosunku do wartości wyjściowej. Zakres zmian wartości wynosił od -5 do + 21%, przy czym u 48% zmiana wartości wynosiła $\pm 5\%$, u 37,5% $\pm 6-10\%$, u 14,5% $> 10\%$. Średnia zmiana wartości FEV1 była porównywalna we wszystkich genotypach genu CHRM2, jak również odsetek dzieci, u których wystąpiła zmiana w określonych przedziałach wartości (ryc. 1).

The mean value of FEV1 prior to the evaluation of bronchodilator effect of ipratropium bromide in the whole group was 92.5% of the predicted value (SD=15.1). After the administration of ipratropium bromide (n=74), the value increased by 5.8% on average, compared to the initial value. The range of changes was from -5 to +21%, where the change in values was $\pm 5\%$ in 48%, $\pm 6-10\%$ in 37.5% and $> 10\%$ in 14.5%. The mean FEV1 change, as well as the percentage of children with changes in a particular range were comparable for all genotypes of the CHRM2 gene polymorphism (fig. 1).



Ryc. 1. Średnia zmiana wartości FEV1 w zależności od genotypu genu CHRM2

W całej grupie wzrost wartości FEV1 wyrażony w procentach był większy po podaniu salbutamolu niż po podaniu bromku ipratropium, a różnica pomiędzy tymi wartościami (odpowiednio 7% i 5,8%) nie była istotna statystycznie ($p=0,133$).

Analiza zmian wartości FEV1 po podaniu bromku ipratropium u chorych z różnymi genotypami genu ADRB2 nie wykazała istotnych różnic (ryc. 2 i 3).

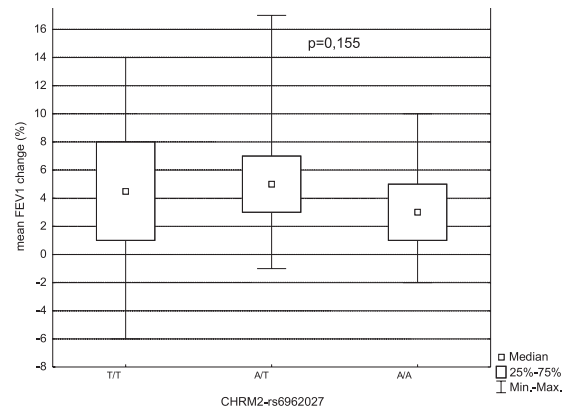
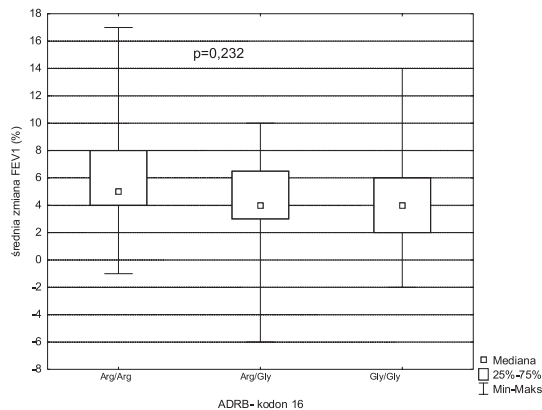


Fig. 1. Mean FEV1 change depending on the CHRM2 genotype

In the whole group, an increase in FEV1 (expressed as percentage) following salbutamol administration was higher compared to the administration of ipratropium bromide, and the difference between these values (7% and 5.8%, respectively) was not statistically significant ($p=0.133$).

The range of FEV1 changes following the administration of ipratropium bromide did not differ significantly in patients with particular genotypes of the ADRB2 gene (fig. 2 and fig. 3).



Ryc. 2. Zmiany wartości FEV1 po podaniu bromku ipratropium u chorych z różnymi genotypami polimorfizmu w kodonie 16 genu ADRB2

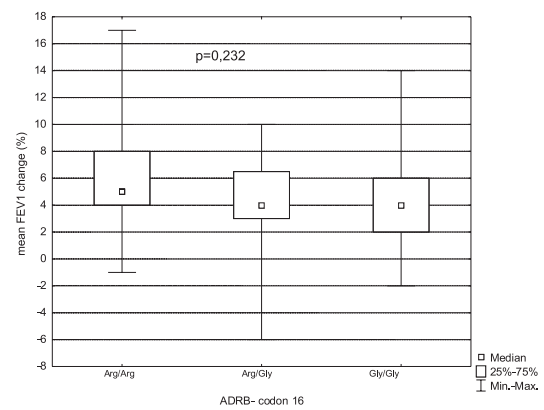
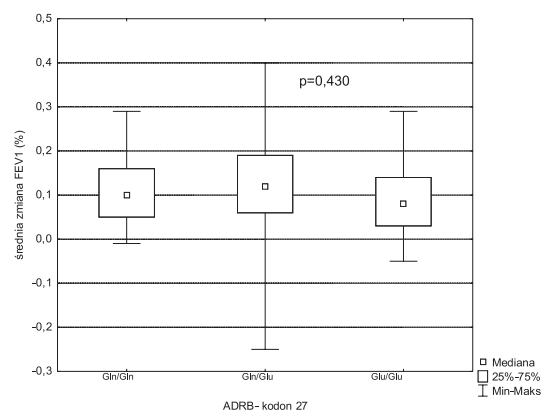


Fig. 2. FEV1 changes following the administration of ipratropium bromide in patients with different genotypes of the ADRB2 Arg16Gly polymorphism



Ryc. 3. Zmiany wartości FEV1 po podaniu bromku ipratropium u chorych z różnymi genotypami polimorfizmu w kodonie 27 genu ADRB2

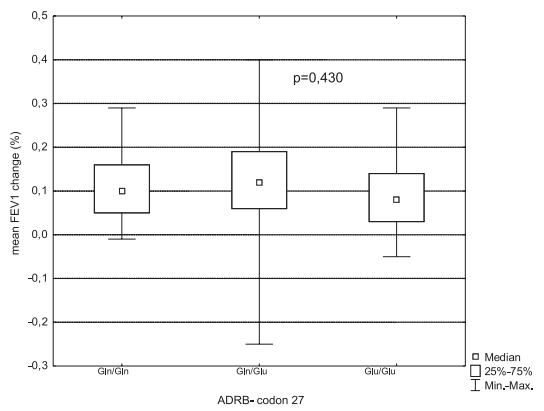


Fig. 3. FEV1 changes following the administration of ipratropium bromide in patients with different genotypes of the ADRB2 Gln27Glu polymorphism

DYSKUSJA

Kliniczny przebieg astmy wykazuje duże zróżnicowanie w całej populacji chorych jak również u tego samego chorego. Wśród czynników determinujących ciężkość przebiegu choroby sugerowano między innymi znaczenie wieku wystąpienia i nasilenia pierwszych objawów, stopnia alergizacji, współistnienia innych chorób alergicznych, wybranych zakażeń, refluksu żołądkowo-przełykowego. Wraz z postępowaniem badań genetycznych w astmie zwrócono dodatkowo uwagę na zależność pomiędzy polimorfizmem genów dla receptorów odpowiedzi na leki a przebiegiem astmy [10, 14-16]. Wobec nielicznych jak dotąd doniesień na ten temat w odniesieniu do dzieci uzasadnione było przeprowadzenie badań w populacji dzieci polskich.

Teoretyczne uzasadnienie badania związku pomiędzy polimorfizmem receptora a ciężkością przebiegu choroby wynika z potencjalnie zróżnicowanej odpowiedzi na stymulację i tym samym zróżnicowanej możliwości likwidacji objawów. Jak wynika z metaanalizy przeprowadzonej przez Contopoulos-Ioannidis i wsp. pacjenci z polimorfizmem Gly16Gly receptora β_2 -adrenergicznego mają częściej objawy astmy nocnej i astmy o cięższym przebiegu oraz wymagają bardziej intensywnego leczenia [17]. W metaanalizie tej tylko 8 na 28 badań dotyczyło oceny ciężkości astmy i były one prowadzone w grupach reprezentujących różne rasy. Nasze badania zrealizowane u dzieci rasy kaukaskiej chorych na astmę potwierdziły istnienie zależności między stopniem ciężkości astmy a polimorfizmem w kodonie 16 genu ADRB2. Nie stwierdziliśmy natomiast związku pomiędzy polimorfizmem receptora muskarynowego 2 a ciężkością przebiegu choroby.

Analiza zależności pomiędzy wielkością odpowiedzi rozkurczowej po zastosowaniu leków najczęściej doraźnie podawanych w zaostrzeniach astmy a polimorfizmem genów receptorów dla tych leków nie wykazała istotnych różnic. Nie można wykluczyć, iż na uzyskane wyniki ma wpływ wyjściowo zadowolający stan kliniczny i stan czynności układu oddechowego jako wynik skutecznej terapii przeciwzapalnej. Terapia ta stosowana przez długi okres czasu prowadzi do zmniejszenia nadreaktywności oskrzeli i poprawy ich drożności [18]. Nie potwierdziliśmy więc zwiększonej odpowiedzi na β_2 -mimetyk stwierdzonej w badaniach innych autorów dla homozygot Arg16Arg [19]. Z kolei wykonywanie badań w innym modelu czyli po odstawieniu leków przeciwzapalnych byłoby nieetyczne. U pewnej grupy chorych w ramach strategii stopniowanego leczenia według reguły „step down” przeprowadzenie takiej oceny zaplanowano. Tym niemniej w świetle wykonanych badań nie udało się ustalić genotypów lepszej odpowiedzi na określoną grupę leków.

Dane z piśmiennictwa sugerują, że na efekt down-regulation wpływ ma stosowanie długodziałających β_2 -mimetyków i że efekt ten jest bardziej widoczny po stosowaniu salmeterolu [20] niż formoterolu [21]. W przedstawionym badaniu oceny dokonywano po dłuższej, co najmniej 14-dniowej przerwie w stosowaniu LABA, mimo iż w innych badaniach sugeruje się, że dla powrotu funkcji receptora wystarczy 36 godzin.

DISCUSSION

The clinical course of asthma is very heterogenous in the whole population of patients as well as in one individual patient. It has been suggested that factors determining asthma severity may include the age of onset and intensification of first symptoms, allergization level, other concurrent allergic diseases, certain infections or gastroesophageal reflux. Progress in genetic studies has drawn attention to the association between genetic polymorphism of receptors and the course of asthma [10, 14-16]. Scarce data concerning children have made it necessary to conduct appropriate studies in the population of Polish children.

Theoretical justification for investigating the association between receptor polymorphism and disease severity results from potentially heterogenous response to stimulation and as a consequence from various possibilities of symptoms elimination. Meta-analysis conducted by Contopoulos-Ioannidis et al. shows that patients with the Gly16Gly β_2 -adrenergic receptor polymorphism more often suffer from nocturnal asthma symptoms and severe asthma and as a consequence require more intense treatment [17]. Only 8 out of 28 studies conducted within this meta-analysis focused on the asthma severity evaluation and they were carried out in subjects of different races. The present study conducted on asthmatic Caucasian children confirmed an association of Arg16Gly ADRB2 gene polymorphism and asthma severity. However, we did not find an association between muscarinic type 2 receptor polymorphism and asthma severity.

The analysis of correlation between bronchodilator response to drugs administered on demand in asthma exacerbation and receptor polymorphism for these drugs has not revealed significant differences. It must be taken into account that the obtained results may have been influenced by an initially satisfactory general clinical condition and the condition of the respiratory system resulting from successful anti-inflammatory therapy. The therapy used on a long-term basis leads to a decrease in bronchial hyperresponsiveness and improves bronchial patency [18]. Thus, we have not confirmed higher response rates with β_2 -mimetics observed in studies of other authors for Arg16Arg homozygotes [19]. On the other hand, it would be unethical to conduct studies in another model, i.e. after anti-inflammatory drugs withdrawal. Such evaluation was intended in a certain group of patients according to principles of the “step down” treatment. Nevertheless, the studies have not allowed determination of genotypes associated with a better response to a particular group of medicines.

Literature suggests that the down-regulation effect is influenced by the use of long-acting β_2 -mimetics and that it is more visible after salmeterol [20] than formoterol [21]. In the present study, the evaluation was performed after a long, at least 14-day, interval in the use of LABA, although other studies suggest that 36 hours is enough to restore receptor function.

Wobec sugerowanego w piśmiennictwie ewentualnego wpływu polimorfizmu receptora β 2-adrenergicznego na odpowiedź na stymulację cholinergiczną, przeprowadzono analizę zależności odpowiedzi na bromek ipratropium u chorych z różnymi wariantami receptora β 2-adrenergicznego [22]. Nie stwierdzono różnic w zmianie wartości FEV1 po podaniu bromku ipratropium u chorych z różnymi wariantami polimorfizmu ADRB2. W badaniu Israela i wsp. koncepcję tę oparto na spostrzeżeniu, że u chorych z genotypem Arg/Arg 16 w okresie zaprzestania leczenia β 2--agonistami i stosowania bromku ipratropium wartość PEF uległa istotnemu zwiększeniu [23]. W innym badaniu wykazano, że u chorych z polimorfizmem Gly/Gly 16 doraźnie dodawany salbutamol zmniejsza protekcyjne działanie formoterolu na indukowaną AMP nadreaktywność oskrzeli [24]. Praktycznym wnioskiem autorów tej pracy było zalecenie, aby w tej grupie chorych, czyli u chorych leczonych długo działającymi β 2-mimetykami zastąpić salbutamol innym lekiem interwencyjnym np. bromkiem ipratropium. Zalecenie to zastosowano w przypadku pacjentki opisanej przez Metzger i wsp. [25], którzy po zbadaniu genotypu ADRB2 (Arg/Arg) zastąpili leczenie β 2-agonistą podawaniem leków antycholinergicznymi, uzyskując kontrolę astmy, której nie udało się uzyskać stosując β 2-agonistów. Jednakże, sformułowanie takiego zalecenia musi być poparte większą liczbą dowodów. W naszym badaniu, u chorych nieotrzymujących aktualnie LABA odpowiedź na salbutamol była lepsza niż na bromek ipratropium.

Podsumowując, polimorfizm genu receptora β 2-adrenergicznego i muskarynowego 2 nie pozwala na identyfikację chorych o określonej odpowiedzi na stymulację.

PODZIĘKOWANIA

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 Medycyny Polpharma oraz stypendium naukowego L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki.

Piśmiennictwo

1. Borish L and Culp JA. Asthma: a syndrome composed of heterogeneous diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 1-8; quiz 8-11, 50.
2. Cookson WO. Asthma genetics. *Chest* 2002; 121: 75-135.
3. Palmer LJ and Cookson WO. Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res* 2000; 10: 1280-7.
4. Pignatti PF. Trends in pharmacogenomics of drugs used in the treatment of asthma. *Pharmacol Res* 2004; 49: 343-9.
5. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Diagnosis and Management of Asthma NHLBI/WHO Workshop Report. NHI. NHLBI Publication No 02-3569 1995;
6. Plotnick LH and Ducharme FM. Combined inhaled anticholinergics and beta2-agonists for initial treatment of acute asthma in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; CD000060.
7. Papi A. Investigating the steroids and long-acting beta 2-agonists combination: why do we need more? *Eur Respir J* 2004; 23: 501-2.
8. Giembycz MA and Newton R. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways. *Eur Respir J* 2006; 27: 1286-306.
9. Sarria B, Naline E, Zhang Y i wsp. Muscarinic M2 receptors in acetylcholine-isoproterenol functional antagonism in human isolated bronchus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L1125-32.
10. Haney S and Hancox RJ. Overcoming beta-agonist tolerance: high dose salbutamol and ipratropium bromide. Two randomised controlled trials. *Respir Res* 2007; 8: 19.
11. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Ma-

Since some authors have suggested the possible influence of β 2-adrenergic receptor polymorphism on response to cholinergic stimulation, response to ipratropium bromide was analysed in patients with different β 2-adrenergic receptor variants [22]. No differences were observed in FEV1 changes after the administration of ipratropium bromide in patients with different variants of ADRB2 polymorphism. In the study of Israel et al., the concept was based on the observation that the PEF value was remarkably increased in patients with the Arg/Arg 16 genotype in the period of β 2-agonist withdrawal and the use of ipratropium bromide [23]. Another study revealed that in patients with Gly/Gly 16 polymorphism, occasional administration of salbutamol decreased the protective effect of formoterol on the AMP-induced bronchial hyperresponsiveness [24]. The authors of this study recommended replacement of salbutamol with another rescue medicine, e.g. ipratropium bromide in patients treated with long-acting β 2-mimetics. This recommendation was followed in a female patient described by Metzger et al. [25], in whom β 2-agonist was replaced with anticholinergic agents following the determination of ADRB2 genotype (Arg/Arg). This resulted in asthma control that had not been achieved using β 2-agonists. However, such a recommendation must be supported with strong evidence. In the present study, patients who were not receiving LABA revealed a better response to salbutamol than to ipratropium bromide.

In conclusion, polymorphism of β 2-adrenergic and muscarinic type 2 receptor genes is not useful in the identification of patients with specific response to stimulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was developed thanks to the Ministry of Science and Higher Education fund No. 2P05B 143 29 and the financial support of the Foundation for Polish Science.

Aleksandra Szczepankiewicz has received a scientific scholarship from the POLPHARMA Foundation for the Development of Polish Pharmacy and Medicine and a scholarship from L'Oréal Poland for Women in Science.

- agement and Prevention. NHLBI/WHO Workshop Report. NHI. NHLBI Publication No 02-3569 2002;
12. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
 13. Martinez FD, Graves PE, Baldini M i wsp. 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: 3184-8.
 14. Green SA, Turki J, Innis M i wsp. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 1994; 33: 9414-9.
 15. Israel E, Drazen JM, Liggett SB i wsp. 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: 75-80.
 16. Liggett SB. The pharmacogenetics of beta2-adrenergic receptors: relevance to asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: S487-92.
 17. Contopoulos-Ioannidis DG, Manoli EN and Ioannidis JP. Meta-analysis of the association of beta2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 963-72.
 18. Taylor DR, Epton MJ, Kennedy MA i wsp. Bronchodilator response in relation to beta2-adrenoceptor haplotype in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 700-3.
 19. Woszczek G, Borowiec M, Ptasińska A i wsp. Beta2-ADR haplotypes/polymorphisms associate with bronchodilator response and total IgE in grass allergy. *Allergy* 2005; 60: 1412-7.
 20. Grove A and Lipworth BJ. Bronchodilator subsensitivity to salbutamol after twice daily salmeterol in asthmatic patients. *Lancet* 1995; 346: 201-6.
 21. Aziz I, Hall IP, McFarlane LC i wsp. Beta2-adrenoceptor regulation and bronchodilator sensitivity after regular treatment with formoterol in subjects with stable asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 337-41.
 22. Tattersfield AE and Hall IP. Are beta2-adrenoceptor polymorphisms important in asthma--an unravelling story. *Lancet* 2004; 364: 1464-6.
 23. Israel E, Chinchilli VM, Ford JG i wsp. Use of regularly scheduled albuterol treatment in asthma: genotype-stratified, randomised, placebo-controlled cross-over trial. *Lancet* 2004; 364: 1505-12.
 24. Sims EJ and Lipworth BJ. Concomitant occasional use of salbutamol influences bronchoprotective responsiveness afforded by formoterol in patients with the glycine-16 genotype. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 59: 791-5.
 25. Metzger NL, Kockler DR and Gravatt LA. Confirmed beta16 Arg/Arg polymorphism in a patient with uncontrolled asthma. *Ann Pharmacother* 2008; 42: 874-81.