

**Analiza związku polimorfizmów genów wybranych  
cytokin i ich receptorów z przebiegiem astmy  
u dzieci**

Rozprawa doktorska

**Natalia Schöneich**

Klinika Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej  
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

**Promotor: Prof. dr hab. Anna Bręborowicz**

Poznań 2013

Pani Profesor Annie Bręborowicz i  
Pani Doktor Aleksandrze Szczepankiewicz  
dziękuję za wszelką pomoc, okazaną mi  
podczas powstawania niniejszej pracy.

Rodzicom i Siostrze dziękuję  
za nieustanne wsparcie.

Niniejsza rozprawa doktorska powstała dzięki grantowi naukowemu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr **N40706132/2710**:  
„Mechanizmy molekularne chorób atopowych u dzieci na przykładzie astmy oskrzelowej i alergii krzyżowej”

**SPIS TREŚCI**

SPIS TREŚCI .....	4
1. WYKAZ SKRÓTÓW .....	7
2. WSTĘP .....	9
2.1. Definicja astmy .....	10
2.2. Czynniki ryzyka wystąpienia astmy .....	10
2.3. Charakterystyka zapalenia i znaczenie wybranych cytokin w astmie .....	11
2.4. Charakterystyka kliniczna, rozpoznawanie i leczenie astmy .....	14
2.5. Podziały astmy .....	17
3. CELE I HIPOTEZY .....	20
4. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ .....	21
5. MATERIAŁY I METODY .....	24
5.1. Metody kliniczne .....	24
5.2. Metody laboratoryjne .....	26
5.3. Metody molekularne .....	27
5.4. Metody statystyczne .....	30
6. WYNIKI .....	34
6.1. Analizowane polimorfizmy genów .....	34
6.1.1. Gen IL1 B .....	34
6.1.2. Gen IL4 .....	35
6.1.3. Gen IL4-R A .....	36
6.1.4. Gen IL5 .....	37
6.1.5. Gen IL12 .....	38
6.1.6. Gen IL13 .....	40
6.1.7. Gen IL15 .....	43
6.1.8. Gen IL18 .....	47
6.1.9. Gen IL18-R .....	48
6.2. Analiza związku badanych polimorfizmów ze stopniem ciężkości astmy oskrzelowej ..	49

## SPIS TREŚCI

6.3.	Analiza związku badanych polimorfizmów z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby.....	52
6.4.	Analiza związku badanych polimorfizmów z koniecznością stosowania steroidoterapii systemowej.....	54
6.5.	Analiza badanych polimorfizmów u chorych na astmę atopową i nieatopową.....	57
6.6.	Analiza związku badanych polimorfizmów z występowaniem atopowego zapalenia skóry (AZS) u chorych na astmę atopową.....	60
6.7.	Analiza związku badanych polimorfizmów z występowaniem alergicznego nieżytu nosa (ANN) u chorych na astmę atopową.....	63
6.8.	Analiza związku badanych polimorfizmów z nadwrażliwością na pyłki traw.....	66
6.9.	Analiza związku badanych polimorfizmów z nadwrażliwością na roztocza kurzu.....	69
6.10.	Analiza związku badanych polimorfizmów u chorych na astmę atopową z nadwrażliwością na pyłki traw (AT) i na roztocza kurzu (AR).....	72
6.11.	Analiza związku badanych polimorfizmów z całkowitym stężeniem IgE.....	75
6.12.	Analiza związku badanych polimorfizmów z wartością FEV1 w okresie bezobjawowym.....	77
6.13.	Analiza związku badanych polimorfizmów z wartością FEV1 w okresie zaostrzenia.....	79
6.14.	Analiza związku badanych polimorfizmów ze średnią wartością zmienności FEV1 w czasie próby wysiłkowej.....	81
6.15.	Analiza związku polimorfizmów wybranych genów cytokin i ich receptorów z wartością FENO.....	83
7.	DYSKUSJA.....	85
7.1.	Polimorfizm genu dla IL1.....	88
7.2.	Polimorfizm genu dla IL 4.....	89
7.3.	Polimorfizm genu receptora dla IL4.....	91
7.4.	Polimorfizm genu dla IL 5.....	93
7.5.	Polimorfizmy genu dla IL12.....	94
7.6.	Polimorfizmy genu dla IL13.....	94
7.7.	Polimorfizmy genu dla IL 15.....	97
7.8.	Polimorfizm genu dla IL18.....	98
7.9.	Polimorfizm genu receptora dla IL18.....	99
8.	WNIOSKI.....	101
9.	PIŚMIENNICTWO.....	102
10.	STRESZCZENIE.....	116

## SPIS TREŚCI

11.	SUMMARY .....	118
12.	SPIS TABEL.....	120
13.	SPIS RYCIN.....	122

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW

- ECF-A – ang. *eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*  
eozynofilowy czynnik chemotaktyczny
- ECP – ang. *eosinophil cationic protein*  
eozynofilowe białko kationowe
- EPO – ang. *eosinophil peroxidase*  
peroksydaza eozynofilowa
- Fcε-R1 – receptor o wysokim powinowactwie do IgE
- FENO – ang. *fractional exhaled nitric oxide*  
stężenie tlenku azotu w powietrzu wydychanym
- FEV1 – ang. *forced expiratory volume in 1 second*  
natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa
- GINA – ang. *The Global Initiative for Asthma*  
Światowa Inicjatywa dla Astmy
- GM-CSF – ang. *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*  
czynnik wzrostowy kolonii granulocytów I makrofagów
- GWAS – ang. *Genome-Wide Association Studies*
- IgE – immunoglobulina E
- IFN – interferon
- IL – interleukina
- ISAAC – ang. *The International Study of Asthma and Allergies in Childhood*  
Międzynarodowe Badanie nad Występowaniem Astmy i Alergii w  
Dzieciństwie

## WYKAZ SKRÓTÓW

- LABA – ang. *long acting beta2-agonists*  
długodziałające beta2-sympatykomimetyki
- LPS - lipopolisacharyd
- LTB4, LTC4, LTD4, LTE4 – leukotrieny B4, C4, D4, E4
- MBP – ang. *major basic protein*  
główne białko zasadowe
- NCF-A – ang. *neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis*  
czynnik chemotaktyczny dla neutrofilów
- PAF – ang. *platelet activating factor*  
czynnik aktywacji płytek krwi
- PEF – ang. *peak expiratory flow*  
szczytowy przepływ wydechowy
- PGD2 – prostaglandyna D2
- SABA – ang. *short acting beta2-agonists*  
krótkodziałające beta2-sympatykomimetyki
- SNP - ang. *single nucleotide polymorphism*  
polimorfizm pojedynczego nukleotydu
- TNF – ang. *tumor necrosis factor*  
czynnik martwicy guza
- VC – ang. *vital capacity*  
pojemność życiowa płuc
- wGKS – wziewne glikokortykosteroidy



## 2. WSTĘP

Astma oskrzelowa jest istotnym problemem zdrowotnym zarówno z punktu widzenia medycznego i epidemiologicznego, jak i społecznego oraz ekonomicznego. W ostatnich dziesięcioleciach obserwowano stopniowy wzrost liczby pacjentów chorych na astmę oskrzelową w większości krajów świata (115), przy czym zauważalne jest duże zróżnicowanie częstości występowania tej choroby w poszczególnych krajach - od 1 do nawet 30% (40). Zjawisko to może być wynikiem różnic rzeczywistych, ale także różnej interpretacji obowiązującej definicji astmy i stosowania niejednorodnych zasad rozpoznawania choroby. Według aktualnych danych na astmę oskrzelową choruje około 300 mln ludzi na świecie, w tym 10-15% populacji dziecięcej (39, 40). W Polsce liczby te wynoszą odpowiednio 2 mln i ponad 1 mln, co stanowi 5% populacji dorosłych i 10% populacji dzieci (15). U osób przed 40 rokiem życia astma jest jedną z najczęstszych chorób przewlekłych (15). Z uwagi na trudności diagnostyczne, częste zwłaszcza w grupie najmłodszych dzieci oraz zjawisko tzw. niedodiagnozowania uważa się, że dane te mogą być zaniżone. Potwierdzają to wyniki badania ISAAC przeprowadzonego w ponad 50 krajach świata, w tym także w Polsce (132, 133). Według danych z lat 1994/1995 (faza I) w Poznaniu rozpoznanie astmy oskrzelowej było postawione przez lekarza u 1,3% dzieci w wieku 6-7 lat i 2% w wieku 13-14 lat, podczas gdy objawy choroby wykazywało odpowiednio 17,3% i 17,1% (15). W latach 2001/2002 (faza II badania) zaobserwowano czterokrotny wzrost częstości rozpoznawania astmy u dzieci w Poznaniu - w grupie dzieci w wieku 6-7 lat astmę rozpoznano u 5,9%, a w grupie dzieci w wieku 13-14 lat diagnozę postawiono u 5,2% populacji. Nieleczona i niewystarczająco lub źle leczona astma oskrzelowa może prowadzić do wystąpienia uciążliwych i niebezpiecznych objawów, zmniejszenia wydolności oddechowej, ograniczenia codziennej aktywności chorego i absencji w szkole lub pracy. Roczna umieralność z powodu astmy na świecie sięga 250 000 (40), a koszty pośrednie i bezpośrednie związane z chorobą liczone są w miliardach dolarów.

## **2.1. Definicja astmy**

Zgodnie z aktualną definicją astma oskrzelowa jest przewlekłą chorobą zapalną, przebiegającą z nadreaktywnością dróg oddechowych, której konsekwencją są epizody świszczącego oddechu, duszności, ucisku w klatce piersiowej i kaszlu, najczęściej występujące w godzinach nocnych lub nad ranem (40). Dla astmy charakterystyczna jest rozlana obturacja oskrzeli, często odwracalna samoistnie bądź pod wpływem zastosowanego leczenia. W patomechanizm rozwoju objawów astmy oskrzelowej zaangażowanych jest wiele komórek i uwalnianych z nich produktów.

Astma zaliczana jest wraz z atopowym zapaleniem skóry i alergicznym nieżytem nosa lub spojówek do chorób o podłożu alergicznym, najczęściej atopowym, chociaż możemy wyróżnić także grupę chorych, u których nie stwierdza się wykładników atopii, co uzasadnia rozpoznanie astmy nieatopowej. U dzieci przeważa astma atopowa, występująca u około 85% populacji pacjentów poniżej 18 roku życia (34, 39). Istotą atopii jest genetycznie uwarunkowana skłonność do nadmiernej produkcji IgE w odpowiedzi na ekspozycję na powszechnie występujące alergeny i do rozwoju reakcji nadwrażliwości z udziałem tych przeciwciał. Reakcja ta polega na powtarzalnej, nadmiernej i natychmiastowej odpowiedzi organizmu, pojawiającej się po ekspozycji na alergen w dawce tolerowanej przez osoby zdrowe. Według klasyfikacji Gella i Coombsa reakcja natychmiastowa IgE-zależna klasyfikowana jest jako typ I (41).

Jakkolwiek procesy patofizjologiczne zachodzące w drogach oddechowych osób chorych na astmę nieatopową są analogiczne do tych, spotykanych u chorych z astmą atopową, to procesy immunologiczne oraz komórki i mediatory za nie odpowiedzialne nie są dobrze poznane.

## **2.2. Czynniki ryzyka wystąpienia astmy**

Patogeneza astmy jest złożona i o jej rozwoju decyduje wiele czynników. Wśród nich wyodrębnić można uwarunkowania genetyczne i wpływy środowiskowe. Czterokrotnie większą częstość występowania choroby obserwuje się u potomstwa osób chorujących na astmę oskrzelową, niż wśród dzieci zdrowych rodziców (28,

30). Również dzieci, których rodzeństwo ma rozpoznaną astmę oskrzelową częściej zapadają na tę chorobę (31). Do istotnych czynników ryzyka, zwiększających prawdopodobieństwo wystąpienia astmy, zalicza się także obciążenie innymi chorobami o podłożu atopowym, takimi jak alergiczny nieżyt nosa czy atopowe zapalenie skóry (34, 94). Również płeć ma wpływ na częstość występowania choroby (95). Wśród dzieci młodszych częstość występowania astmy u chłopców szacuje się na 5,1%, podczas gdy u dziewczynek odsetek ten wynosi 3,5%. W grupie dzieci starszych odsetki te wynoszą odpowiednio 3,3% vs. 2% (34). Spośród czynników środowiskowych mogących prowadzić do wystąpienia objawów astmy oskrzelowej wymienia się przede wszystkim ekspozycję na alergeny, czynną lub bierną ekspozycję na dym tytoniowy i inne zanieczyszczenia powietrza, przebyte we wczesnym dzieciństwie zapalenie oskrzelików bądź zakażenie wirusem *RS*, przebyte zakażenie *rynowirusami* oraz stosowanie paracetamolu z powodu gorączki w pierwszym roku życia dziecka (5, 109, 135). W ciągu ostatnich kilku lat zwraca się uwagę także na znaczenie otyłości jako czynnika sprzyjającego występowaniu i pogarszającego przebieg astmy (40).

### **2.3. Charakterystyka zapalenia i znaczenie wybranych cytokin w astmie**

W przebiegu astmy w drogach oddechowych, a także w tkance okołoskrzelowej toczy się przewlekły proces zapalny, w który zaangażowane są liczne komórki i substancje przez nie uwalniane. Dochodzi do zwiększonego wydzielania różnych mediatorów, między innymi histaminy, leukotrienów i prostaglandyn, które poprzez działanie na odpowiednie receptory powodują uszkodzenie nabłonka wyściełającego drogi oddechowe, zwiększenie wydzielania śluzu, pogrubienie błony podstawnej, skurcz mięśni gładkich oskrzeli i zmiany w zakresie regulacji nerwowej czynności dróg oddechowych. Nieustające procesy uszkodzenia i naprawy w efekcie doprowadzają do zjawiska tzw. *remodelingu*, czyli trwałej przebudowy ścian oskrzeli. Następstwem tych zmian jest upośledzenie przepływu powietrza w drogach oddechowych.

Spośród komórek zapalnych główną rolę w patogenezie astmy przypisuje się limfocytom Th2. Wydzielają one szereg chemokin i cytokin (m.in. IL3, IL4, IL5, IL9,

## WSTĘP

IL13, GM-CSF), które pobudzają produkcję przeciwciał IgE przez limfocyty B, wykazują działanie chemotaktyczne w stosunku do innych komórek zaangażowanych w proces zapalny, aktywują komórki tuczne (mastocyty), bazofile oraz eozynofile i pobudzają je do wydzielania mediatorów. Czynniki wydzielane przez eozynofile, takie jak MBP (ang. *major basic protein*) czy ECP (ang. *eosinophil cationic protein*) niszczą nabłonek dróg oddechowych, ECF-A (ang. *eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*) jest substancją chemotaktyczną dla komórek tucznych, a inne np. EPO (ang. *eosinophil peroxidase*), PAF (ang. *platelet activating factor*), IL16 są czynnikami regulującymi różne fazy reakcji zapalnej. Z kolei mastocyty i bazofile są źródłem uwalnianych w wyniku degranulacji substancji, takich jak histamina, proteazy i cytokiny (IL1, IL4, IL8) a komórki tuczne także ECF-A czy NCF-A (ang. *neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis*), a także powstających *de novo* metabolitów kwasu arachidonowego takich jak prostaglandyny (PGD<sub>2</sub>) i leukotrieny (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> i LTE<sub>4</sub>). Degranulacja jest wynikiem wiązania się alergenu ze swoistym IgE, opłaszczającym komórki tuczne, posiadające receptor Fcε-R1 o wysokim powinowactwie do IgE. Ten proces wydaje się odgrywać istotną rolę w wywoływaniu zaostrzenia objawów u chorych na astmę atopową.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat nastąpił ogromny postęp w zakresie szczegółowego poznania przebiegu alergicznej reakcji zapalnej, w tym roli poszczególnych interleukin, budowy i funkcji ich receptorów oraz określenie genów odpowiedzialnych za ich syntezę. Analizując udział poszczególnych cytokin w patogenezie astmy wybrano te, które wydają się być najbardziej istotne.

**IL1 B** jest typową cytokiną prozapalną. Powstaje z prekursora w wyniku działania proteazy - kaspazy 1. Wydzielana jest przez makrofagi, monocyty, neutrofile i limfocyty B. Jej uwalnianie indukowane jest m.in. przez inne cytokiny, składowe dopełniacza np. C5a lub przez LPS (lipopolisacharyd) bądź inne produkty pochodzące z mikroorganizmów. IL1 B powodują aktywację limfocytów, stymulację makrofagów oraz zwiększoną adhezję leukocytów do komórek śródbłonna. Gen kodujący IL1 B zlokalizowany jest na chromosomie 2q14 (1, 41, 65, 101).

**IL4** wydzielana jest przez limfocyty Th2, bazofile, eozynofile i komórki tuczne.

## WSTĘP

Wraz z IL13 stymuluje zjawisko przełączania klas przeciwciał (ang. *class switching*), nasilając produkcję IgE. Ponadto IL4 jest czynnikiem wpływającym na dojrzewanie limfocytów B i Th2. Gen kodujący tę interleukinę znajduje się na chromosomie 5q31 (41).

Receptor dla IL4 (**IL4-R**), którego gen znajduje się na chromosomie 16p11-12, zbudowany jest z 2 podjednostek: podjednostki alfa, będącej również składową receptora IL13-R i podjednostki beta. Pobudzenie IL4-R poprzez związanie z ligandem aktywuje kinazę tyrozynową 1 i 3, która poprzez przekaźnik STAT 6 prowadzi do uruchomienia transkrypcji i w konsekwencji zwiększonej produkcji IgE (41).

**IL5** również jest produkowana przez limfocyty Th2 oraz przez eozynofile i komórki tuczne. Odpowiada ona za wzrost i aktywację eozynofilów (41, 90). Gen dla IL5 zlokalizowany jest na chromosomie 5q31.

Z kolei **IL12** jest główną cytokiną indukującą odpowiedź typu Th1. Wydzielana jest głównie przez komórki prezentujące antygen po kontakcie ze składnikami ścian komórkowych bakterii. Zbudowana jest z dwóch podjednostek: p35 i p40. Odpowiada za aktywację i proliferację limfocytów T (głównie Th1), wydzielanie IFN- $\gamma$  i TNF oraz hamuje wydzielanie IgE. Gen kodujący IL12 znajduje się na chromosomie 5q31-33 (41).

**IL13** wydzielana jest przez limfocyty B, komórki tuczne, eozynofile i makrofagi. Wraz z IL4 bierze ona udział w zjawisku *class switching*, nasilając produkcję IgE i IgG4, ponadto aktywuje eozynofile i komórki tuczne. Gen dla tej interleukiny znajduje się na chromosomie 5q31 (41).

Kolejną interleukiną o potencjalnym znaczeniu w patogenezie astmy, wydzielaną m.in. przez komórki prezentujące antygen jest **IL15**. Jej gen zlokalizowany jest na chromosomie 4q31. Odpowiada ona za stymulację komórek NK, limfocytów cytotoksycznych i komórek tucznych oraz pobudza wydzielanie licznych cytokin (41).

Rola **IL18** (11q22.2-22.3) w patogenezie astmy oskrzelowej nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona, jednakże podejrzewa się jej udział w indukcji nadreaktywności dróg oddechowych. Ponadto nasila ona produkcję IFN- $\gamma$  przez limfocyty T i komórki NK

(20). Wydzielana jest przede wszystkim przez makrofagi, komórki Kupffera oraz keratynocyty i powstaje w wyniku działania kaspazy 1 na nieaktywny prekursor (41).

Receptor dla IL18 (**IL18-R**) zlokalizowany jest na limfocytach Th1. Znane są 2 typy tego receptora: IL18-Ralfa i IL18-Rbeta odpowiadające pod względem strukturalnym i funkcjonalnym receptorom dla IL1 (IL1-R1 i IL1-R3). Gen receptora IL18 znajduje się na chromosomie 2q12 (41).

#### **2.4. Charakterystyka kliniczna, rozpoznawanie i leczenie astmy**

Objawy kliniczne astmy oskrzelowej dziecięcej w poszczególnych grupach wiekowych są dość zróżnicowane. Związane jest to m.in. z odmiennociami w budowie i funkcji dróg oddechowych. W grupie starszych dzieci astma przebiega podobnie jak u dorosłych, a więc występuje kaszel, świszczący oddech, duszność, często o charakterze napadowym. U dzieci młodszych główną manifestacją choroby są nawracające obturacyjne zapalenia oskrzeli (13). U większości dzieci objawy astmy pojawiają się w pierwszych miesiącach lub latach życia - u 80% przed ukończeniem 5. roku życia. U 30% dzieci astma rozpoczyna się w okresie niemowlęcym, a u 50% chorych przed ukończeniem 2 roku życia (11, 102).

Na wczesny początek objawów mogą mieć wpływ czynniki genetyczne. Dowodzą tego badania, przeprowadzone przez Hesselmara i wsp., którzy wykazali związek pomiędzy wczesnym początkiem astmy a obciążonym wywiadem rodzinnym (50). Stwierdzili ponadto, iż dzieci o wcześniejszym początku objawów astmy były bardziej podatne na nawracające infekcje układu oddechowego i częściej chorowały na atopowe zapalenie skóry. Z kolei Klinnert i wsp. potwierdzili związek pomiędzy wczesnym początkiem objawów astmy (< 3 lat), a podwyższonym całkowitym stężeniem IgE i częstością infekcji układu oddechowego (80). Podobnie jak większość chorób przewlekłych, również astma oskrzelowa przebiega z okresami zaostrzeń i remisji. Okresy zaostrzenia charakteryzuje występowanie wyżej wymienionych objawów takich jak kaszel, duszność, świszczący oddech, a także zmniejszona tolerancja wysiłku i uczucie ucisku w klatce piersiowej. Objawy te mogą występować zarówno pojedynczo, jak i łącznie.

## WSTĘP

Typowe jest występowanie objawów w godzinach nocnych i wczesnorannych. Okresy remisji, czyli całkowicie wolne od objawów mogą trwać tygodnie, miesiące, lata.

Z praktycznego punktu widzenia bardzo ważne znaczenie ma wykrywanie czynników bezpośrednio odpowiedzialnych za wywoływanie objawów, a więc tak zwanych czynników spustowych. Czynniki te można podzielić na fizyczne, chemiczne, infekcyjne i psychogenne. Wśród czynników fizycznych mogących wyzwać objawy astmy oskrzelowej wymienia się wysiłek, zanieczyszczenie środowiska, pyły, substancje drażniące, wysoką lub niską temperaturę. Grupa czynników chemicznych obejmuje toksyny egzogenne i endogenne, leki (wśród nich najczęściej wymieniane niesteroidowe leki przeciwzapalne) oraz alergeny powietrzno pochodne i prawdopodobnie również pokarmowe. Występowanie objawów astmy w związku z ekspozycją na alergeny wyróżnia chorych na astmę atopową od chorych na astmę nieatopową, a pozostałe czynniki mają znaczenie u wszystkich chorych. Wśród alergenów powietrzno pochodnych zaostrzenia najczęściej wywołują roztocza kurzu domowego (*Dermatophagoides pteronyssinus*) i mączne (*Dermatophagoides farinae*), pyłki roślin (traw, drzew, chwastów), sierść i naskórek zwierząt (kota, psa, świnki morskiej) oraz grzyby pleśniowe (34). W grupie dzieci w wieku szkolnym nadwrażliwość na aeroalergeny dotyczy nawet 26-32% populacji (63). Uczulenie na roztocza kurzu domowego występuje u 15% dzieci, a na pyłki traw u 11%, natomiast u chorych na astmę dodatni wynik testów skórnych z alergenami *Dermatophagoides* uzyskano u 62% badanych (63).

Częstość zaostrzeń astmy w przebiegu zakażeń układu oddechowego i związek pomiędzy wystąpieniem choroby a wirusowymi infekcjami dróg oddechowych w pierwszych miesiącach życia potwierdzają znaczenie czynników infekcyjnych w patogenezie astmy. Najistotniejszą rolę w wywoływaniu zaostrzenia odgrywają zakażenia wirusowe (szczególnie *RSV* i *rynowirusy*), rzadziej bakterie (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*) (112).

Badania diagnostyczne, przeprowadzane w astmie oskrzelowej w celu

## WSTĘP

potwierdzenia rozpoznania i monitorowania leczenia można podzielić na nieinwazyjne i inwazyjne (biopsja błony śluzowej oskrzeli, płukanie oskrzelowo - pęcherzykowe). Pierwsza grupa stanowi podstawę rutynowej diagnostyki. Zaliczają się do niej badania czynnościowe (spirometria, próby prowokacyjne i test odwracalności obturacji), badania zmierzające do oceny nasilenia stanu zapalnego w drogach oddechowych (plwocina indukowana, pomiar stężenia tlenu azotu w powietrzu wydychanym, ocena kondensatu powietrza wydychanego) oraz badania alergologiczne. Te ostatnie mają na celu ustalenie podłoża atopowego choroby i identyfikację alergenów, wywołujących u chorych objawy astmy. W rozpoznawaniu uczulenia podstawą rutynowej diagnostyki są punktowe testy skórne, a w uzasadnionych sytuacjach wybiera się oznaczanie całkowitego stężenia IgE oraz stężeń alergenowo-swoistych IgE.

W rozpoznaniu astmy oskrzelowej ważne znaczenie ma ustalenie czynników ryzyka rozwoju choroby, stwierdzenie charakterystycznych objawów, wykluczenie innych przyczyn dolegliwości oraz wykonanie badań dodatkowych, oceniających zaburzenia czynnościowe układu oddechowego, reakcję zapalną oskrzeli i nadwrażliwość na alergeny. Do najczęstszych chorób, z którymi należy różnicować astmę oskrzelową zaliczamy zakażenia układu oddechowego, zespoły aspiracyjne, wady wrodzone układu oddechowego, wady wrodzone układu krążenia, mukowiscydozę, dysplazję oskrzelowo-płucną, zespoły dyskinezy rzęsek, chorobę refluksową przełyku i niedobory odporności.

Leczenie astmy oskrzelowej przebiega dwutorowo. Konieczne jest połączenie terapii przewlekłej, której celem jest uzyskanie kontroli choroby z leczeniem zaostrzeń. W leczeniu przewlekłym stosuje się wziewne glikokortykosteroidy (wGKS), leki antyleukotrienowe, długodziałające beta2-sympatykomimetyki (LABA), rzadko preparaty teofiliny o powolnym uwalnianiu, a w razie niewystarczających efektów glikokortykosteroidy podawane ogólnie. Ponadto w przypadku wąskiej grupy pacjentów (dzieci > 12 roku życia, u których do opanowania objawów choroby nie wystarczają duże dawki wGKS w połączeniu z LABA) zastosowanie znalazł preparat omalizumab - monoklonalne przeciwciało przeciw IgE. Jedyń jak dotąd metodą leczenia, modyfikującą naturalny przebieg



choroby jest swoista immunoterapia alergenowa (SIT). Z kolei do opanowania objawów choroby w przebiegu zaostrzenia służą krótko i szybko działające beta2-sympatykomimetyki (SABA), leki antycholinergiczne i krótkotrwałe stosowane glikokortykosteroidy systemowe. W odniesieniu do preparatów glikokortykosteroidowych, beta2-sympatykomimetyków (zarówno SABA jak i LABA) oraz leków antycholinergicznych za najbardziej optymalną formę podania uważana jest droga inhalacyjna.

Leki z grupy glikokortykosteroidów podawanych ogólnoustrojowo, zgodnie z aktualnymi wytycznymi, znajdują zastosowanie głównie w leczeniu zaostrzeń astmy, natomiast w terapii przewlekłej zarezerwowane są dla chorych z astmą o ciężkim przebiegu (39). Badania Eisnera i wsp. dowodzą, iż konieczność stosowania glikokortykosteroidów systemowych w przeszłości, jest istotnym czynnikiem ryzyka hospitalizacji z powodu astmy (32).

## 2.5. Podziały astmy

W literaturze istnieje kilka podziałów astmy oskrzelowej w zależności od różnych kryteriów. W oparciu o ocenę skuteczności aktualnego leczenia, wyróżniono trzy **stopnie kontroli astmy**. Na podstawie prezentowanych objawów klinicznych i wyników badań czynnościowych układu oddechowego zdefiniowano astmę oskrzelową kontrolowaną, częściowo kontrolowaną i niekontrolowaną. W pierwszej objawy takie jak kaszel, duszność czy świszczący oddech występują rzadko ( $\leq 2x$  na tydzień), nie powodują ograniczenia codziennej aktywności pacjenta, a wyniki spirometrii lub pomiary PEF mieszczą się w granicach normy. U pacjentów z astmą częściowo kontrolowaną objawy kliniczne astmy występują co najmniej 2 razy w tygodniu i mogą powodować zaburzenia snu lub ograniczenie codziennej aktywności chorego. W badaniach czynnościowych chorzy uzyskują wyniki poniżej normy (PEF lub FEV1 poniżej 80% wartości należnej). Astma oskrzelowa niekontrolowana charakteryzuje się występowaniem jednocześnie 3 lub więcej wymienionych wcześniej objawów. Zarówno częściowo kontrolowana, jak i niekontrolowana astma jest wskazaniem do modyfikacji leczenia celem osiągnięcia optymalnego poziomu kontroli choroby. Opisywany podział jest pochodną podziału

funkcjonującego wcześniej, opartego na stopniu ciężkości choroby.

Ze względu na **stopień ciężkości choroby** wyróżniamy astmę oskrzelową sporadyczną, przewlekłą lekką, przewlekłą umiarkowaną i przewlekłą ciężką. Klasyfikacji dokonuje się biorąc pod uwagę kryteria kliniczne (częstość i rodzaj objawów) oraz parametry czynnościowe (PEF i FEV1). Chorzy z astmą sporadyczną przed rozpoczęciem leczenia prezentują objawy choroby rzadziej niż 1 raz w tygodniu, a objawy nocne rzadziej niż 2 razy w miesiącu, ponadto zaostrzenia są krótkotrwałe, a wartości PEF lub FEV1 utrzymują się powyżej 80%, z maksymalną zmiennością mniejszą niż 20%. Osoby te nie wymagają przewlekłego leczenia, a jedynie doraźnego stosowania leków z grupy SABA. Astma przewlekła lekka charakteryzuje się występowaniem zaostrzeń częściej niż 1 raz w tygodniu, ale nie codziennie, a objawów nocnych częściej niż 2 razy w miesiącu. Wartości PEF lub FEV1 w tej grupie chorych utrzymują się powyżej 80%, natomiast zmienność tych parametrów mieści się w granicach 20-30%. Astma przewlekła umiarkowana charakteryzuje się codziennym występowaniem objawów chorobowych i objawami nocnymi częściej niż 1 raz w tygodniu. Zaostrzenia mogą zaburzać normalną aktywność chorego, a wartości PEF lub FEV1 mieszczą się w granicach 60-80% wartości należnej, ze zmiennością większą niż 30%. Astma przewlekła ciężka prowadzi do ograniczenia aktywności fizycznej chorego, objawy choroby występują codziennie, zaostrzenia nocne są częste, a wartości PEF lub FEV1 spadają poniżej 60% (39).

Liczne badania dowodzą, iż nie tylko występowanie astmy, ale i stopień ciężkości choroby w pewnej mierze jest uwarunkowany genetycznie (37, 67, 125, 134). Thomsen i wsp. ustalili ponadto, iż czynnik genetyczny może odpowiadać za nasilenie poszczególnych objawów związanych ze stopniem ciężkości choroby, takich jak świszczący oddech i duszność, podczas gdy nie potwierdzono takiego związku dla kaszlu i uczucia ucisku w klatce piersiowej (134). Na stopień ciężkości choroby wpływa także stan układu oddechowego, poziom przeciwciał, cytokin i komórek zapalnych, nasilenie procesu zapalnego oraz odpowiedź na leczenie, a dotychczasowe badania wskazują, iż one również mogą mieć podłoże genetyczne (127).

## WSTĘP

Ze względu na etiopatogenezę i znaczenie reakcji nadwrażliwości immunologicznej wyróżnia się astmę alergiczną i niealergiczną lub częściej **astmę atopową i nieatopową**, biorąc pod uwagę fakt, iż ocenie podlega głównie alergia IgE-zależna. Astmę nieatopową charakteryzuje brak udziału reakcji nadwrażliwości typu I w patogenezie choroby, ujemny wynik testów skórnych i brak IgE swoistych dla powszechnie występujących alergenów. Astma atopowa związana jest z występowaniem innych chorób atopowych, dodatnim wynikiem punktowych testów skórnych lub obecnością alergenowo-swoistych przeciwciał IgE. Badania z ostatnich lat wskazują na możliwość wyłącznie miejscowej produkcji IgE w obrębie błony śluzowej nosa lub oskrzeli (50).

\* \* \*

Przedstawione powyżej informacje wskazują na złożoną i wieloczynnikową patogenezę astmy oraz różnorodność przebiegu klinicznego. W oparciu o to zróżnicowanie, astma postrzegana jest aktualnie nie jako jedna choroba, ale zespół chorobowy obejmujący różne fenotypy. Uwzględniając genetyczne podłoże astmy ciekawym zagadnieniem wydaje się być ustalenie związku pomiędzy polimorfizmami wybranych genów a fenotypem astmy, wyróżnianym na podstawie udziału atopii, stopnia ciężkości i przebiegu klinicznego choroby. Dominująca rola zapalenia w patogenezie astmy uzasadnia podjęcie badań w szczególności nad polimorfizmami genów cytokin, których rola w tym zapaleniu jest potwierdzona. Badania te oprócz wartości poznawczej mogą być także przydatne w prognozowaniu przebiegu choroby i ukierunkowaniu poszukiwania nowych możliwości terapeutycznych.

### 3. CELE I HIPOTEZY

#### Cele

Analiza związków polimorfizmów genów wybranych cytokin odgrywających rolę w patogenezie astmy oskrzelowej i ich receptorów z przebiegiem klinicznym choroby, atopią i czynnością układu oddechowego:

1. Analiza związku wybranych polimorfizmów ze stopniem ciężkości astmy oskrzelowej, z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby i z koniecznością stosowania steroidoterapii ogólnej
2. Analiza badanych polimorfizmów w zależności od podłoża atopowego astmy, występowania innych chorób o podłożu atopowym w wywiadzie (atopowe zapalenie skóry, alergiczny nieżyt nosa), uczulenia na alergeny powietrzno pochodne (pyłki traw, *Dermatophagoides farinae* i/lub *pteronyssinus*) i od całkowitego stężenia IgE w surowicy krwi
3. Analiza związku wybranych polimorfizmów z wartością FEV1 (w okresie bezobjawowym i w zaostrzeniu), z wynikiem testu prowokacji wysiłkiem i ze stężeniem NO w powietrzu wydychanym (FENO).

#### Hipotezy

1. Wybrane polimorfizmy mogą wpływać na przebieg astmy oskrzelowej – moment wystąpienia pierwszych objawów i ich nasilenie
2. Wybrane polimorfizmy mogą być powiązane z atopią i/lub wpływać na rozwój chorób o podłożu atopowym
3. Wybrane polimorfizmy mogą korelować z czynnością układu oddechowego, ocenianą za pomocą spirometrii, z nasileniem nadreaktywności dróg oddechowych, ocenianej za pomocą próby wysiłkowej i z nasileniem reakcji zapalnej, ocenianej przy pomocy pomiaru FENO.

#### 4. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Badaniem objęto 42 dzieci w wieku 5 -18 lat, chorujących na astmę oskrzelową, w tym 33 na astmę atopową i 9 na astmę nieatopową. Średnia wieku wynosiła 9,71 lat ( $\pm 3,98$ ). W badanej grupie było 16 dziewczynek (38%) i 26 chłopców (62%). Badani byli rekrutowani w Poradni Alergologicznej Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu i Poradni Alergologicznej Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Warunkiem przystąpienia do badania było wyrażenie pisemnej zgody przez rodzica lub opiekuna prawnego oraz w przypadku dzieci > 15 r.ż. również pacjenta na udział w badaniu, w tym wyrażenie zgody na badanie genetyczne. Przed kwalifikacją do badania u pacjentów wykluczono czynną i bierną ekspozycję na dym tytoniowy w okresie ostatnich 2 lat poprzedzających badanie.

Rozpoznanie astmy oskrzelowej postawiono na podstawie wywiadu, przebiegu choroby, odpowiedzi na leczenie oraz wyników badań dodatkowych. Początek objawów miał miejsce średnio w 4 r.ż. ( $3,16 \pm 2,84$ ), a czas trwania choroby wynosił od 1 do 15 lat (średnio  $6,55 \pm 3,62$ ). Z wywiadu wynikało, że wśród badanych z astmą oskrzelową o podłożu atopowym objawy alergicznego nieżytu nosa prezentowało 26 dzieci (79%), alergiczne zapalenie skóry współistniało u 23 pacjentów (70%), natomiast obie choroby równocześnie występowały u 18 badanych (54%).

Wśród dzieci zakwalifikowanych do badania wyodrębniono pacjentów z astmą oskrzelową o podłożu atopowym, uczulonych wyłącznie na pyłki traw (AT), z astmą oskrzelową o podłożu atopowym, uczulonych wyłącznie na roztocza kurzu (AR) i dzieci z astmą oskrzelową nieatopową (NA). Podziału tego dokonano na podstawie wyników testów skórnych i oznaczenia całkowitego stężenia IgE.

## CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Kryteria podziału na podgrupy:

AT - dodatni wynik testów skórnych z alergenami pyłków traw i ujemny wynik testów skórnych z alergenami roztoczy i innych podstawowych alergenów – 11 pacjentów

AR - dodatni wynik testów skórnych z alergenami roztoczy i ujemny wynik testów skórnych z alergenami pyłków traw i innych podstawowych alergenów – 22 pacjentów

NA - ujemny wynik testów skórnych z podstawowymi alergenami, w tym alergenami pyłków traw i roztoczy oraz prawidłowe stężenie IgE całk – 9 pacjentów

Wszyscy badani pacjenci otrzymywali preparat wGKS, a w grupie chorych na astmę o podłożu atopowym również preparat przeciwhistaminowy. Preparaty LABA stosowało 28 pacjentów, a leki antyleukotrienowe 21 pacjentów, co stanowi odpowiednio 67% i 50%. Steroidoterapii systemowej w okresach zaostrzeń wymagało 23 dzieci. Na podstawie przebiegu choroby i stosowanych dawek wGKS (przeliczonych na budesonid) dzieci podzielono na podgrupy chorych na astmę przewlekłą lekką (<200mcg budesonidu na dobę) n=7, umiarkowaną (200-400mcg budesonidu na dobę) n=21 i ciężką (>400mcg budesonidu na dobę) n=14.

Ogólną charakterystykę badanej grupy przedstawiono w tabeli 1.

CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Tabela 1. Ogólna charakterystyka badanej grupy

Cecha	Jednostka	Ogółem	AT	AR	NA
Pacjenci	(n)	42	33		9
			11	22	
Płeć					
- chłopcy	(n)	26	5	15	6
- dziewczynki	(n)	16	6	7	3
Wiek	(lata)	9,71	8,73	9,18	12,44
Początek choroby	(rok życia)	3,16	2,82	3,54	2,67
Czas trwania choroby	(lata)	6,55	5,91	5,81	9,67
Stopień ciężkości astmy					
- lekka	(n)	7	2	5	0
- umiarkowana	(n)	21	7	12	2
- ciężka	(n)	14	2	5	7
Leki przeciwhistaminowe	(n)	39	11	22	6
Leki antyleukotrienowe	(n)	21	3	10	8
LABA	(n)	28	8	12	8
Konieczność steroidoterapii systemowej	(n)	23	7	9	7
Współistnienie alergicznego nieżytu nosa	(n)	26	11	15	0
Współistnienie atopowego zapalenia skóry	(n)	23	9	14	0
Współistnienie ANN i AZS jednocześnie	(n)	18	9	9	0
Stężenie całkowite IgE					
- w granicach normy	(n)	14	2	3	9
- powyżej normy dla wieku	(n)	28	9	19	0
Stężenie całkowite IgE					
- wartość średnia	(kU/l)	-	139,91	318,79	41,8
- SD	(±)	-	151,25	559,90	
Wynik testów skórnych					
- średnia średnica bąbla < 3 mm	(n)	9	0	0	9
- średnia średnica bąbla 3 - 6 mm	(n)	22	6	16	0
- średnia średnica bąbla > 6 mm	(n)	11	5	6	0
Badanie spirometryczne	(n)	32	7	17	8
Wartość FEV1 w badaniu spirometrycznym					
- < 80% należnej wartości	(n)	4	0	2	2
- 81 – 90 % należnej wartości	(n)	9	1	5	3
- > 90% należnej wartości	(n)	19	6	10	3
Próba wysiłkowa	(n)	14	4	10	-
Zmienność FEV 1 po prowokacji wysiłkiem					
- < 5%	(n)	11	4	7	-
- 6-10%	(n)	2	0	2	-
- > 10%	(n)	1	0	1	-

## 5. MATERIAŁY I METODY

### 5.1. Metody kliniczne

-Wywiad:

U wszystkich chorych przeprowadzono standardowy wywiad lekarski. Szczególną uwagę zwracano na występowanie, nasilenie i sezonowość objawów astmy, w tym nawracające zapalenia oskrzeli, napadowy kaszel oraz epizody duszności i/lub świszczącego oddechu. Uwzględniano również takie dane jak wiek wystąpienia pierwszych objawów, czas trwania choroby, obciążenie rodzinne przewlekłymi chorobami układu oddechowego i chorobami alergicznymi, współistnienie innych chorób o podłożu atopowym - atopowego zapalenia skóry i alergicznego nieżytu nosa oraz stosowane leczenie w tym konieczność steroidoterapii systemowej w przeszłości.

-Testy skórne:

Testy skórne wykonano metodą punktową (ang. *skin prick test*). Przed przystąpieniem do badania pacjenci przez okres 14 dni nie przyjmowali leków przeciwhistaminowych. Zestaw diagnostyczny firmy Allergopharma zawierał roztwory najbardziej powszechnych alergenów wziewnych (*D. pteronyssinus*, *D. farinae*, trawy, trawy/zboża, *Alternaria*, *Cladosporium*, drzewa, chwasty, sierści psa i kota). Na czystą skórę powierzchni zgięciowej przedramion nakładano krople poszczególnych ekstraktów alergenowych, a następnie za pomocą lancetów o długości ostrza 1mm wykonywano nakłucie naskórka. Reakcję nadwrażliwości na alergen oceniano po 15 minutach za pomocą pomiaru wielkość bąbla pokrzywkowego – średnia średnica bąbla o 3mm większa od kontroli negatywnej uznawana była za wynik dodatni. Warunkiem kwalifikacji chorego do grupy badanej była obecność reakcji skórnej wyłącznie na *D. pteronyssinus* i/lub *D. farinae* albo na pyłki traw.

-Spirometria:

Badanie czynnościowe wykonano u pacjentów, których wiek umożliwił podjęcie wymaganej współpracy. Przeprowadzono je w godzinach przedpołudniowych w



Pracowni Badań Czynnościowych Układu Oddechowego Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu aparatem LungTest 1000. Badanie wykonywano w pozycji siedzącej, z założonym na nos klipsem, w stałych warunkach otoczenia (wilgotność poniżej 50%, temperatura powietrza 21-22°C). Badanie polegało na trzykrotnym wykonaniu manewru natężonego wydechu, w czasie którego rejestrowano prędkość i objętość przepływającego powietrza. Warunkiem akceptacji badania jest poprawność i powtarzalność uzyskanych krzywych przepływ-objętość. W spirometrii oceniano następujące parametry: VC - pojemność życiową płuc, FEV1 - natężoną objętość wydechową pierwszosekundową, FEV1 / VC % - wskaźnik odsetkowy stosunku natężonej objętości wydechowej pierwszosekundowej do pojemności życiowej płuc, PEF - szczytowy przepływ wydechowy, MEF 75, MEF 50, MEF 25 - maksymalne przepływy wydechowe podczas natężonego wydechu, odpowiednio przy 75%, 50% i 25% pojemności życiowej płuc. Uzyskane wartości odniesiono do norm odpowiednich dla płci, wieku, wzrostu, masy ciała i rasy.

-Próba wysiłkowa:

Badanie przeprowadzono w okresie bezobjawowym, w trakcie aktualnie stosowanego wziewnego leczenia przeciwzapalnego, jednakże po uprzednim odstawieniu leków bronchodilatacyjnych (SABA przez 8 godzin, LABA i teofiliny przez 48 godzin), przeciwhistaminowych (72 godziny) i antyleukotrienowych (przez 24 godziny). Przed przystąpieniem do badania wykluczano infekcję układu oddechowego oraz choroby układu krążenia i neurologiczne, mogące zagrażać pacjentowi lub wpływać na wynik badania. W badaniu spirometrycznym wykonywanym bezpośrednio przed przystąpieniem do próby wysiłkowej pacjent musiał uzyskać FEV1 powyżej 75% wartości należnej. Test wysiłkowy wykonywano w stałych warunkach otoczenia (wilgotność poniżej 50%, temperatura powietrza 21-22°C). Polegał on na biegu na bieżni (w przypadku dzieci w wieku poniżej 12 roku życia przez 6 minut, u starszych przez 8 minut) z jednoczesnym monitorowaniem saturacji hemoglobiny tlenem. Intensywność wysiłku utrzymywano na takim poziomie, aby uzyskać 80% tętna maksymalnego należnego dla danego pacjenta. Następnie oznaczano wymienione w poprzednim

punkcie parametry w 5, 15 i 30 minucie po wysiłku. Na podstawie uzyskanych wyników oceniano zmienność FEV1 w czasie próby wysiłkowej.

-Pomiar stężenia NO w powietrzu wydychanym (FENO):

Stężenie NO w powietrzu wydychanym mierzono metodą chemiluminescencji gazowej. Badanie przeprowadzono w godzinach przedpołudniowych w Pracowni Badań Czynnościowych Układu Oddechowego Szpitala Klinicznego im. K. Jonschera Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu aparatem NIOX-MINO firmy Aerocrine. Wykonywano je w pozycji siedzącej, w stałych warunkach otoczenia (wilgotność poniżej 50%, temperatura powietrza 21-22°C, stężenie NO w powietrzu atmosferycznym poniżej 5ppb). Badanie polega na wykonaniu kolejno maksymalnego wydechu poza ustnik aparatu, maksymalnego wdechu powietrza pozbawionego NO przez ustnik aparatu, a następnie wykonanie wydechu trwającego 6-10 sekund przez ustnik ze stałym przepływem powietrza (45-55ml/s). Taki przepływ powietrza zapewnia ciśnienie w drogach oddechowych unoszące podniebienie miękkie, co zapobiega przedostawaniu się powietrza atmosferycznego zawierającego NO z nosa do dolnych dróg oddechowych. Zakres pomiaru urządzenia mieści się w granicach 5-300ppb NO. Wyniki zależne są od wieku i wzrostu. Dla osób < 12 r.ż. wartości od 5 do 20 ppb uznawane są za prawidłowe.

## **5.2. Metody laboratoryjne**

-Pomiar całkowitego stężenia IgE:

Oznaczenie wykonano we krwi obwodowej pacjenta metodą fluoroimmunoenzymatyczną (FEIA) za pomocą zestawu ImmunoCAP Total IgE aparatem UniCAP 100 firmy Pharmacia Diagnostics AB. Zastosowana metoda polega na reakcji pomiędzy mysimi przeciwciałami anti-IgE opłaszczonymi na fazie stałej (celuloza) z zawartymi w surowicy pacjenta przeciwciałami IgE, a uzyskany kompleks jest inkubowany z przeciwciałami drugorzędowymi anti-IgE, skoniugowanymi z enzymem. Detekcji stężenia przeciwciał IgE w surowicy pacjenta dokonuje się za pomocą fluorescencji produktów reakcji enzymatycznej. Zakres pomiaru urządzenia mieści się w granicach 2-5000kU/l w nierozcieńczonej

próbce. Uzyskane wartości odnoszono do norm wiekowych.

-Pomiar stężenia alergenowo-swoistych przeciwciał IgE:

Do badania pobrano 2ml krwi obwodowej pacjenta. Oznaczenie wykonano aparatem UniCAP 100 firmy Pharmacia Diagnostics AB, metodą fluoroimmunoenzymatyczną. Metoda ta wykorzystuje reakcję pomiędzy specyficznymi alergenami opłaszczonymi na fazie stałej (celuloza) i alergenowo-specyficznymi IgE (as-IgE), zawartymi w surowicy pacjenta. Dodanie do utworzonych kompleksów przeciwciał anti-IgE skoniugowanych z enzymem umożliwia pomiar fluorescencji produktów reakcji enzymatycznej. Zakres pomiaru dla wykorzystanego zestawu diagnostycznego wynosi 0,35-100kU/l w nierozcieńczonej próbce.

Obie zastosowane metody charakteryzują się wysoką czułością, specyficznością (nie stwierdzono reakcji krzyżowych z immunoglobulinami klasy A, D, M ani G przy ich fizjologicznych stężeniach) i powtarzalnością (98%).

### **5.3. Metody molekularne**

-Przygotowanie próbek krwi pacjenta do badań molekularnych:

Polega ono na uzyskaniu frakcji komórek jednojądrzastych, z których następnie izoluje się materiał genetyczny - kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA).

--Fracjonowanie krwi:

Krew (objętość 4ml) zmieszana z antykoagulantem (0,5M EDTA, pH 8,0, objętość 4ml) podzielono na 2 porcje. Każdą z nich delikatnie nawarstwiono na porcję gradisolu-L (objętość 3ml). Następnie materiał odwirowano w rotorze horyzontalnym (400 x g przez 40 minut w temperaturze 18°C przy funkcji stopniowego przyspieszania i hamowania). Po odwirowaniu usunięto wierzchnią warstwę plazmatyczną. Warstwę limfocytów pozostawiono nienaruszoną, a następnie przeniesiono ją do nowej probówki wirówkowej. Do przeniesionej frakcji dodano roztwór równoważący (objętość ok. 6ml) i za pomocą pipety zawieszono limfocyty. Materiał ponownie odwirowano (200 x g przez 15 minut w temperaturze 18°C przy funkcji stopniowego przyspieszania i hamowania). Następnie usunięto supernatant i zawieszono osad komórkowy (limfocyty) w roztworze równoważącym

## MATERIAŁY I METODY

(objętość 6ml). Uzyskany materiał odwirowano (200 x g przez 10-15 minut w temperaturze 18°C przy funkcji stopniowego przyspieszania i hamowania). Usunięto supernatant, a frakcję komórkową zawieszono w roztworze równoważącym (tak, by końcowa objętość wynosiła max 1,5ml). Materiał przeniesiono do probówki eppendorfa i odwirowano jak poprzednio. Po usunięciu supernatantu frakcję limfocytów zawieszono w ok. 50µl buforu równoważącego i dodano 5-10 objętości RNAlater Stabilization Reagent. W wyniku tego procesu uzyskano materiał do izolacji DNA

--Izolacja DNA:

Do izolacji materiału genetycznego wykorzystano zestaw AllPrep DNA/RNA Mini Kit firmy Qiagen. Komórki zawieszono w RNAlater Stabilization Reagent odwirowano (3000 x g przez 10 minut). Usunięto supernatant, a do pozostałej frakcji komórek dodano 350µl buforu, zawierającego 1% β-merkaptoetanol. Po wymieszaniu zawiesinę pięciokrotnie przeciągnięto przez igłę o średnicy 0,9mm. Uzyskany lizat przeniesiono na kolumnę AllPrep DNA i odwirowano (8000 x g przez 30 sekund). Następnie dodano bufor AW1 (500µl) z etanolem i ponownie odwirowano (8000 x g przez 15 sekund). W kolejnym etapie do kolumny dodano bufor AW2 (500µl) z etanolem, a uzyskany materiał również umieszczono w wirówce (przy maksymalnej prędkości przez 2 minuty). Następnie do kolumny z DNA dodano 100µl buforu ekstrakcyjnego EB i po inkubacji (w temperaturze pokojowej przez 1 min) materiał ponownie odwirowano (8000 x g przez 1 minutę). Uzyskany materiał genetyczny (DNA) poddano następnie analizie ilościowej i jakościowej.

-Analiza ilościowa i jakościowa preparatów DNA na spektrofotometrze:

Pomiar przeprowadzono przy trzech długościach fali: 260nm, 280nm i 320nm, które odnoszą się odpowiednio do maksimum absorpcji dla DNA, dla białek i do wartości absorpcji tła. Do obliczenia stężenia DNA wykorzystano wartości absorbancji przy długości 260nm i 280nm, po odjęciu wartości tła.

Analiza ilościowa - stężenie DNA oblicza się na podstawie założenia, że 1 jednostka A260 odpowiada stężeniu 50µg/ml dwuniciowego DNA, ze wzoru:

*Stężenie DNA (µg/ml) = (A260 – A320) x 50 x rozcieńczenie*

Wszystkie próby do pomiaru stężenia DNA rozcieńczano 100x.

Analiza jakościowa – służy do określenia czystości genomowego DNA, który oblicza się ze stosunku A260 / A280. Wartość 1,5 oznacza obecność 50% białka w preparacie. Czystość wyizolowanego do badań DNA była wysoka i mieściła się w granicach 1,8-2,0.

-Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR):

Wykorzystano 10µl mieszaniny zawierającej genomowe DNA (60ng), określony starter (0,26µM), polimerazę (0,5U) oraz substraty (2,6mM dNTP) i substancje buforujące (22,5mM MgCl<sub>2</sub>, 75mM Tris-HCl przy pH=8,8 i 20mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Mieszaninę tę poddano szeregowi reakcji chemicznych w termocyklerze Mastercycler firmy Eppendorf celem namnożenia fragmentów DNA.

-Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR - RFLP):

Polega na analizie długości fragmentów DNA, które powstają po trawieniu enzymami restrykcyjnymi z grupy endonukleaz. Enzymy te tną DNA w ściśle określonych miejscach, po rozpoznaniu odpowiedniej sekwencji. W zależności od liczby miejsc restrykcyjnych i odległości między nimi uzyskujemy fragmenty DNA różnej długości. Metoda ta pozwala na identyfikację polimorfizmu, jeśli w efekcie mutacji powstaje nowe miejsce restrykcyjne lub dochodzi do utraty poprzednio istniejącego miejsca. Allele danego polimorfizmu rozróżnia się na podstawie wielkości fragmentów DNA widocznych po rozdziale elektroforetycznym.

Do genotypowania większości analizowanych w pracy polimorfizmów wykorzystano metodę RFLP. Jedynym wyjątkiem jest polimorfizm genu IL13 rs20541, do oznaczenia którego użyto komercyjnie dostępnego zestawu starterów i sond TaqMan SNP Genotyping Assays (firmy Applied Biosystems) z uwagi na brak enzymu, który pozwoliłby na rozróżnienie poszczególnych genotypów.

Sekwencje starterów oraz odpowiednie enzymy restrykcyjne pochodziły z danych literaturowych lub zostały zaprojektowane przez dr n. med. Aleksandrę Szczepankiewicz przy użyciu programu internetowego SNPcutter dostępnego na stronie internetowej [http://sky.bsd.uchicago.edu/SNP\\_cutter.htm](http://sky.bsd.uchicago.edu/SNP_cutter.htm). Ich opis zawarto w tabelach poniżej (tabela 2. i 3.).

-Elektroforeza pozioma:

W celu rozdzielenia produktów PCR – RFLP przeprowadzono elektroforezę w żelu agarozowym w obecności markera wielkości, pod napięciem 80-100V. Do detekcji rozdzielonych fragmentów zastosowano bromek etydyny w świetle o długości fali 260nm.

-Genotypowanie z sondami TaqMan i Real-Time PCR:

Polimorfizm R113Q w genie IL13 oznaczono przy użyciu komercyjnego zestawu sond i starterów TaqMan SNP Genotyping Assay, z zastosowaniem warunków reakcji podanych przez producenta (Applied Biosystems). Do rozróżnienia poszczególnych alleli w danej próbce DNA wykorzystano znakowanie sond barwnikami fluorescencyjnymi (VIC – allel A , FAM – allel G). W wyniku amplifikacji specyficznych fragmentów DNA (przy użyciu aparatu HT7900 Real-Time PCR system) możliwy był odczyt sygnału fluorescencji dla poszczególnych barwników. Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono genotyp badanej próbki.

Aby zapewnić wysoką wiarygodność uzyskiwanych wyników każda reakcja oprócz oznaczanych prób zawierała również kontrolę dodatnią (próbka o znanym genotypie) i kontrolę ujemną (woda). Ponadto przeprowadzano dodatkową weryfikację ponownie oznaczając genotypy wybranych próbek oraz powtarzając reakcję RFLP dla nie strawionych fragmentów DNA.

#### **5.4. Metody statystyczne**

Analizę rozkładu częstości genotypów przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statistica v.8.0. stosując test  $\chi^2$  Pearsona, a analizę rozkładu częstości alleli z wykorzystaniem testu dokładnego prawdopodobieństwa Fishera. Dla analiz przyjęto jako istotną statystycznie wartości (p) poniżej 0,05. Ilorazy szans (OR) oraz ich przedziały ufności (CI) dla tabel 2x2 przy obliczaniu alleli oraz interakcji wyznaczono przy użyciu programu GraphPad InStat3 dostępnego pod adresem: <http://www.graphpad.com>.

Analizę porównawczą średniego wieku wystąpienia pierwszych objawów, średnich wartości stężenia całkowitych IgE, wyników uzyskanych w badaniu

## MATERIAŁY I METODY

spirometrycznym (FEV1%) oraz stężenia FENO w zależności od genotypu pacjenta przeprowadzono 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.

MATERIAŁY I METODY

Tabela 2. Podsumowanie dotyczące metod molekularnych

Gen	SNP ID	Nazwa zwyczajowa	Źródło	Metoda	Enzym
<b>IL1 B</b>		-511C/T	(40)	RFLP	Ddel
<b>IL4</b>	rs2243250	-590C/T	(55)	RFLP	Avall
<b>IL4-R A</b>	rs1805010	Ile50Val	(55,98)	RFLP	Rsal
<b>IL5</b>	rs2069812	-746C/T	(98)	RFLP	Rsal
<b>IL12</b>		G378R =1132G/C	(3)	RFLP	Avall
		1188A/C	(24)	RFLP	TaqI
<b>IL13</b>	rs1881457	-1512A/C	własne opracowanie	RFLP	SsiI
	rs1800925	-1112C/T	(98)	RFLP	BstUI
	rs20541	R110Q	-	TaqMan	-
<b>IL15</b>	rs10519613	-	własne opracowanie	RFLP	DraI
	rs1057972	-	własne opracowanie	RFLP	BseNI
	rs2254514	-	własne opracowanie	RFLP	TasI
	rs10833	-	własne opracowanie	RFLP	Bsp14071
<b>IL18</b>	rs549908	105A/C	(89)	RFLP	TaqI
<b>IL18-R</b>	rs2270297	-	(125)	RFLP	BseNI



Tabela 3. Sekwencje starterów badanych polimorfizmów

Gen	SNP ID	Nazwa zwyczajowa	Startery ( <i>Forward</i> i <i>Reverse</i> )
<b>IL1 B</b>		-511C/T	TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC
			GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT
<b>IL4</b>	rs2243250	-590C/T	TAAACTTGGGAGAACATGGT
			TGGGGAAAGATAGAGTAATA
<b>IL4-R A</b>	rs1805010	Ile50Val	GGCAGGTGTGAGGAGCATCC
			GCCTCCGTTGTTCTCAGGTA
<b>IL5</b>	rs2069812	-746C/T	GAAGGTATTGGCTCATAGTAC
			GTCATGAACAGAATACGTA
<b>IL12</b>		G378R =1132G/C	GCCAGCCCGGGCTCAGAGCA
			TCTTGCGGCGCAGTCAG
		1188A/C	CTG ATC CAG GAT GAA AAT TTG G
			CCC ATG GCA ACT TGA GAG CTG G
<b>IL13</b>	rs1881457	-1512A/C	CATCTCCCGTTACATAAGGCCA
	rs1800925	-1112C/T	ACCCTCTCTGTCCACACTCGAA
			GGAATCCAGCATGCCTTGTGAGG
rs20541	R110Q	C__2259921_10	
<b>IL15</b>	rs10519613	-	CAAAGAATGTGAGGAACTGGAGG
	rs1057972	-	CTGTTGACCTGCAGCATTGGTA
			GCATTTGTTTAAGGGTGATAGTCAAA
	rs2254514	-	GAAGAATTGTCTTGGGCCACAC
CTAGATTGTATTGTAGGAGGAAT			
rs10833	-	CTCAAAGCCACGGTAAATCCTT	
		CTATATGTGAATCCTCTTCTGTA	
<b>IL18</b>	rs549908	105A/C	GCCACCACCACCAAGATTTACT
			TGTTTATTGTAGAAAACCTGGAATT
<b>IL18-R</b>	rs2270297	-	CCTCTACAGTCAGAATCAGT
			GGGCTTCATTGTATGAACTGGG
			AGGGAGAGAGAGGTTGAGGCAT

## **6. WYNIKI**

### **6.1. Analizowane polimorfizmy genów**

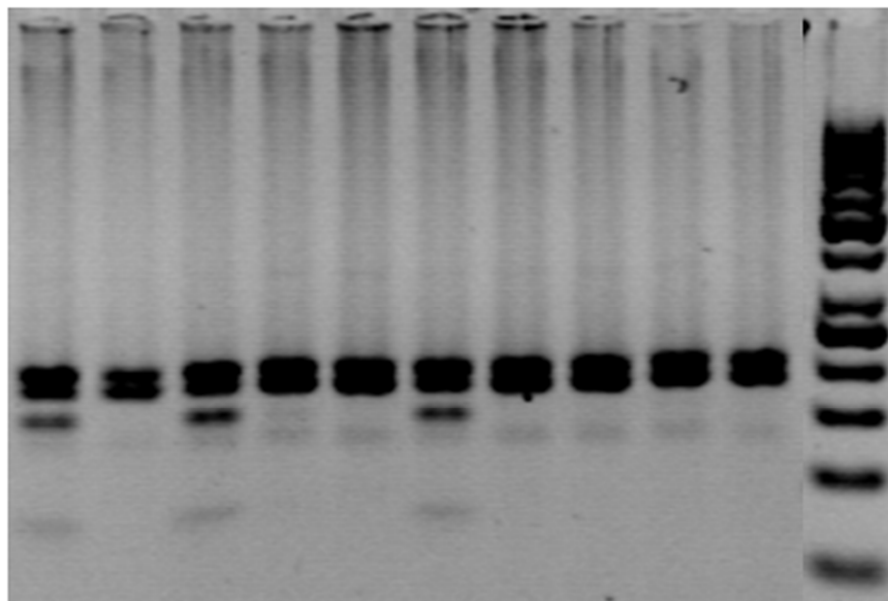
Polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP) polega na substytucji jednej zasady azotowej inną. Pomimo, iż nie każda taka substytucja prowadzi do zmiany kodowanego aminokwasu, to jednak warianty genów mogą się różnić w zakresie działania i odpowiedzi na różne mechanizmy regulatorowe. W niniejszej pracy analizowano 15 polimorfizmów w 9 genach wybranych interleukin i ich receptorów, związanych z astmą i/lub alergią atopową.

#### **6.1.1. Gen IL1 B**

##### **-511 C/T**

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji cytozyny (C) tyminą (T) w pozycji -511 genu IL1 B w chromosomie 2. Produkt PCR wielkości 360 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – Ddel. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel T identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 140 pz i 160 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 160 pz, 114 pz i 32 pz.

## WYNIKI

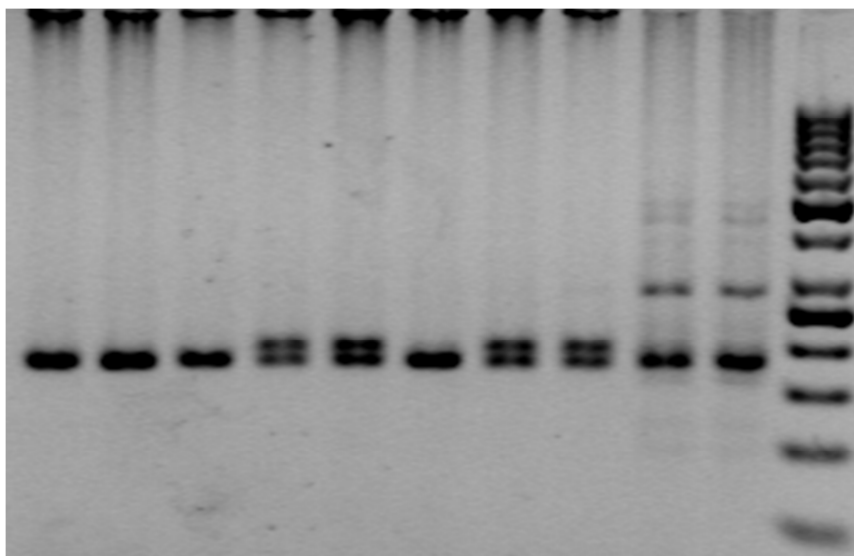


Rycina 1. Na zdjęciu uwidoczniiono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu -511C/T. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

### **6.1.2. Gen IL4 rs2243250**

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji cytozyny (C) tyminą (T) w pozycji -590 genu IL4 w chromosomie 5. Produkt PCR wielkości 195 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – Avall. Za pomocą metody RFLP i rozdziálu elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel T identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 195 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 17 pz i 19 pz.

## WYNIKI

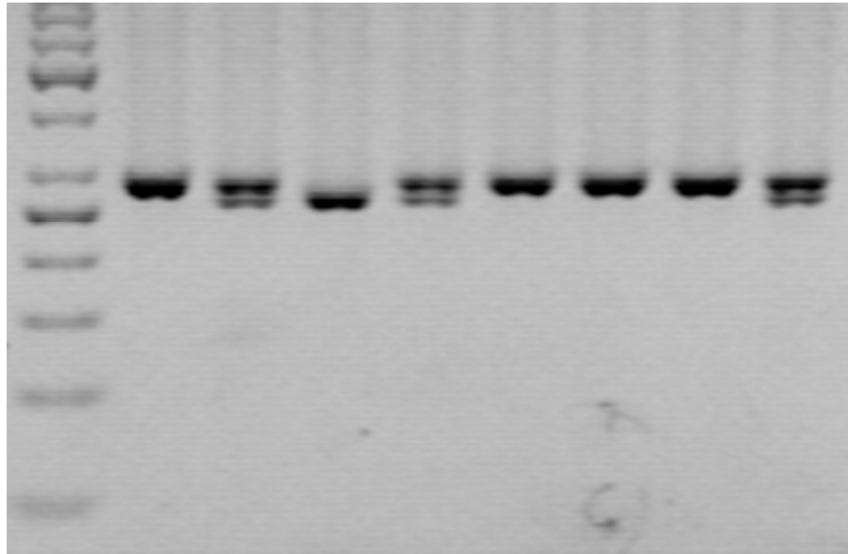


Rycina 2. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs2243250. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

### 6.1.3. Gen IL4-R A rs1805010

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji adeniny (A) guaniną (G) w exonie 5 w pozycji 35953 genu IL4-R A w chromosomie 16. Substytucja ta prowadzi do zmiany sekwencji kodowanych aminokwasów (izoleucyny na walinę). Znane są również inne substytucje w tej pozycji - cytozyna (C) lub tymina (T) zamiast adeniny (A), które również prowadzą do zmiany aminokwasów (odpowiednio na leucynę i fenyloalaninę), jednakże tych wariantów polimorficznych nie stwierdzono w badanej populacji. Produkt PCR wielkości 273 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – RsaI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel A identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 254 pz., natomiast allel G za pomocą fragmentów 273 pz.

## WYNIKI

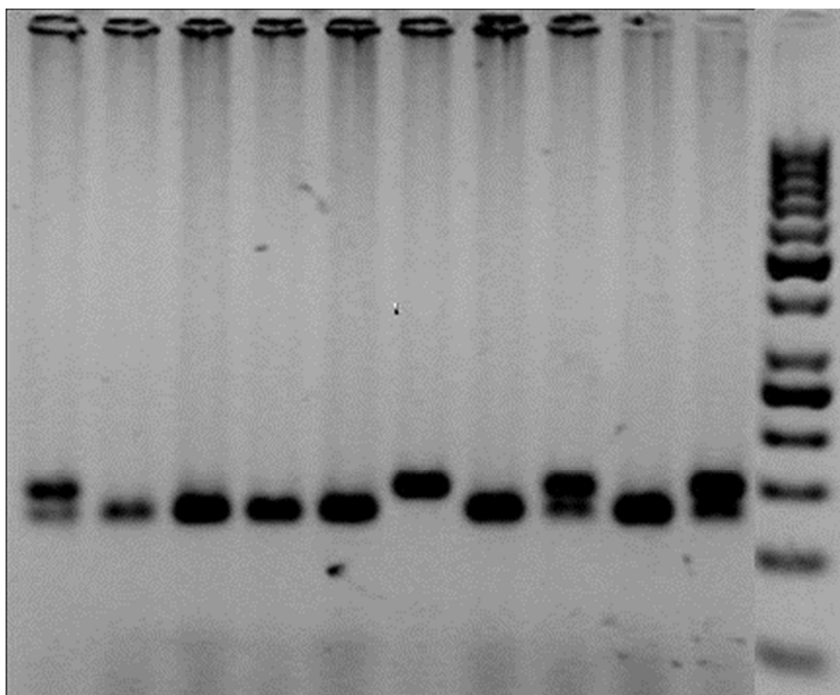


Rycina 3. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs1805010. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

### 6.1.4. Gen IL5 rs2069812

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji tyminy (T) cytozyną (C) w pozycji -746 genu IL5 w chromosomie 5. Produkt PCR wielkości 133 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – RsaI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel T identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 133 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 124 pz i 9 pz.

## WYNIKI

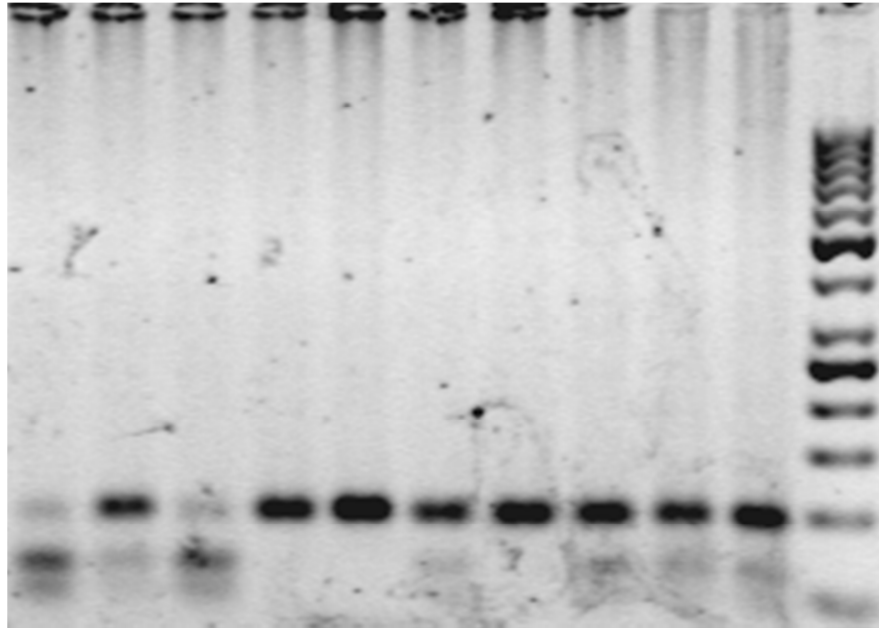


Rycina 4. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs2069812. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

### 6.1.5 Gen IL12 G378R

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji guaniny (G) cytozyną (C) w pozycji 1132 genu IL12 w chromosomie 5. Substytucja ta prowadzi do zmiany sekwencji aminokwasów (glicyny na argininę). Produkt PCR wielkości 96 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – Avall. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel G identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 96 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 55 pz i 41 pz.

## WYNIKI

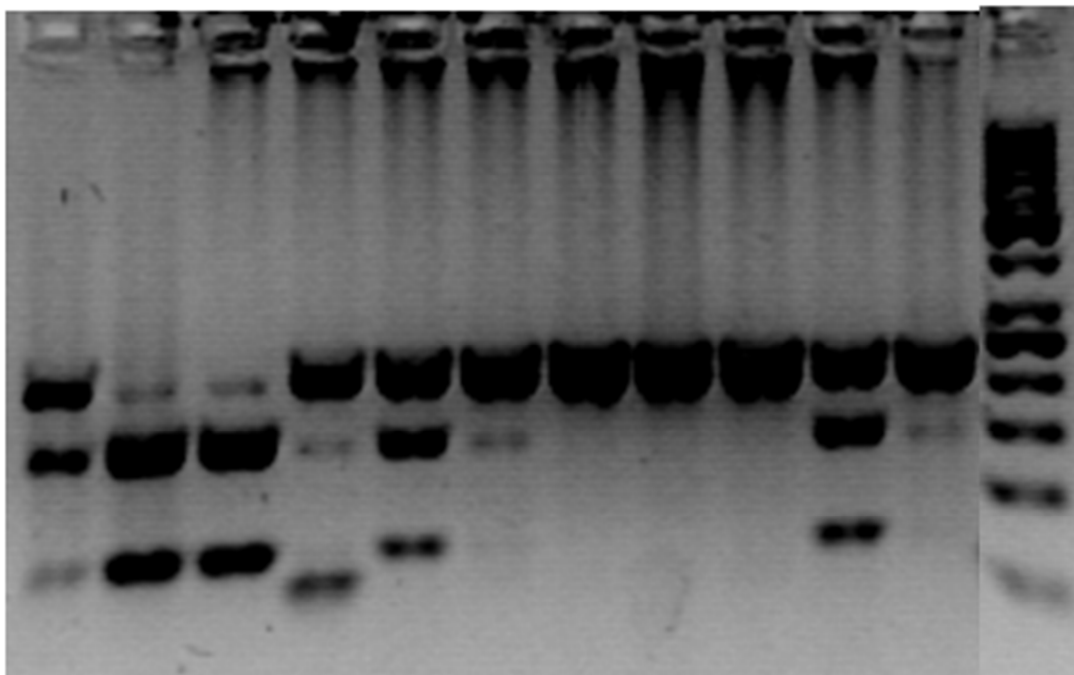


Rycina 5. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu G378R. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

### **1188 A/C**

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji adeniny (A) cytozyną (C) w regionie 3' UTR w pozycji 1188 genu IL12 w chromosomie 5. Produkt PCR wielkości 226 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – TaqI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel A identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 226 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 156 pz i 71 pz.

## WYNIKI



Rycina 6. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu 1188A/C. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder.

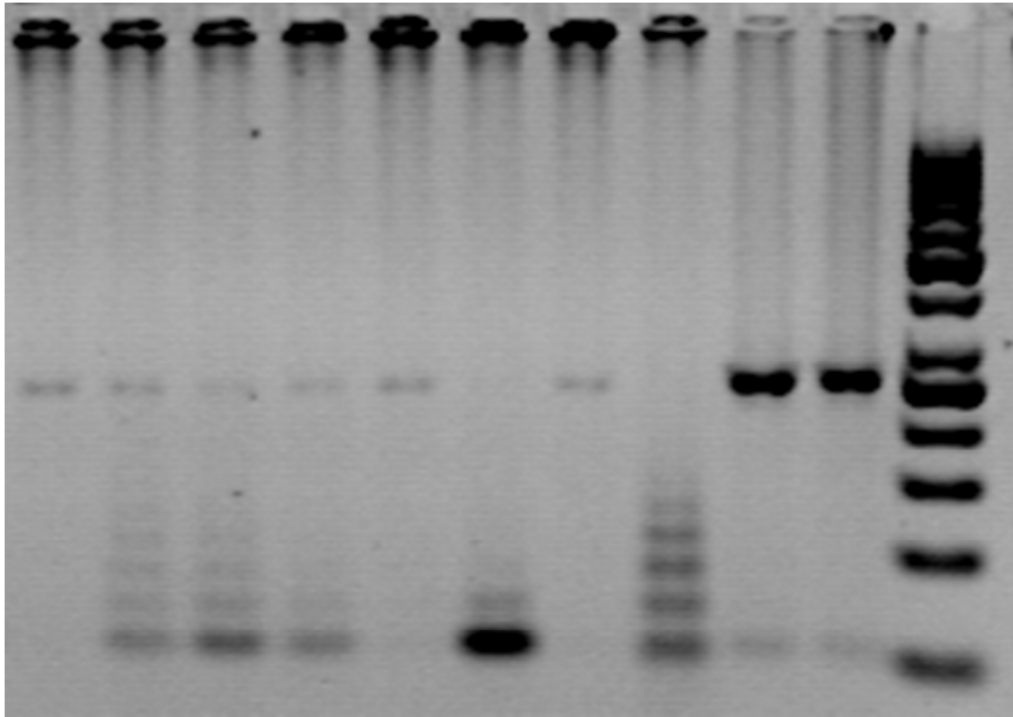
### 6.1.6. Gen IL13

#### rs1881457

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji adeniny (A) cytozyną (C) w regionie promotera w pozycji -1512 genu IL13 w chromosomie 5. Produkt PCR wielkości 395 pz poddano działaniu restryktazy - Ssil. Za pomocą metody RFLP i rozdzielenia elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel A identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 98 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 21 pz i 77 pz.



## WYNIKI

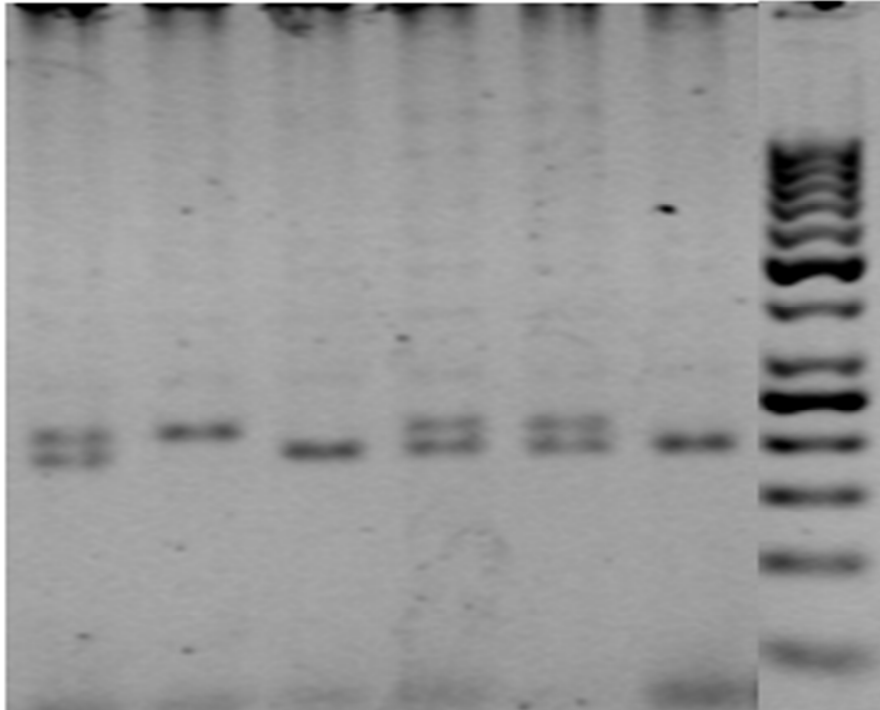


Rycina 7. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs1881457. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

### **rs1800925**

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji cytozyny (C) tyminą (T) w pozycji -1112 genu IL13 w chromosomie 5. Produkt PCR wielkości 247 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – BstUI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel T identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 247 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 224 pz.

## WYNIKI



Rycina 8. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs1800925. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

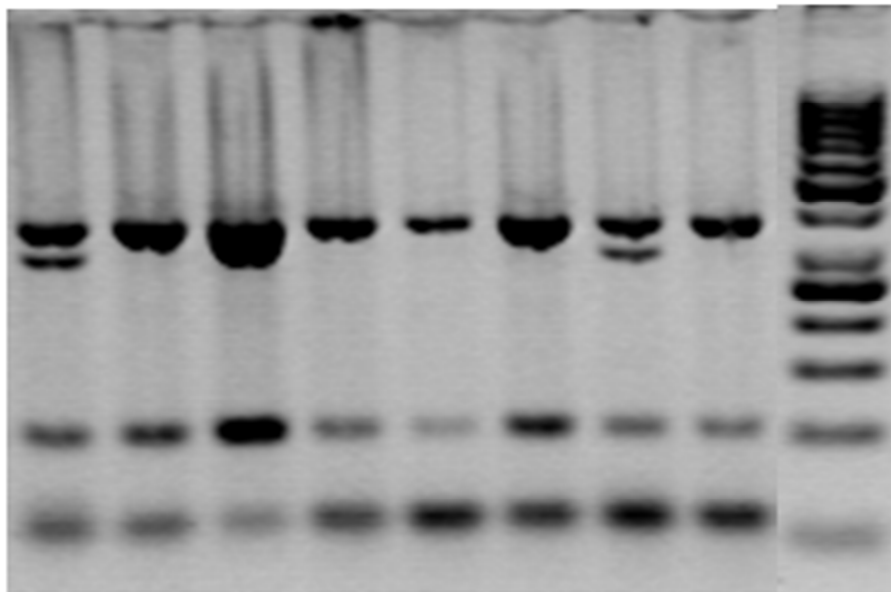
### **rs20541 (R110Q)**

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji adeniny (A) guaniną (G) w pozycji 7100 nukleotydu IL13 w chromosomie 5. Substytucja ta prowadzi do zmiany sekwencji aminokwasów (glutaminy na argininę). Do analizy tego polimorfizmu wykorzystano sondy i startery TaqMan oraz metodę PCR w czasie rzeczywistym. Allele identyfikowano na podstawie barwników fluorescencji użytych do znakowania alleli. Allel A wyznakowano za pomocą barwnika VIC, natomiast allel G za pomocą barwnika FAM.

## WYNIKI

### 6.1.7. Gen IL15 rs10519613

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji cytozyny (C) adeniną (A) w pozycji 83 genu IL15 w chromosomie 4. Produkt PCR wielkości 500 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – DraI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel A identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 327 pz, 109 pz i 64 pz, natomiast allel C za pomocą fragmentów 391 pz i 109 pz.



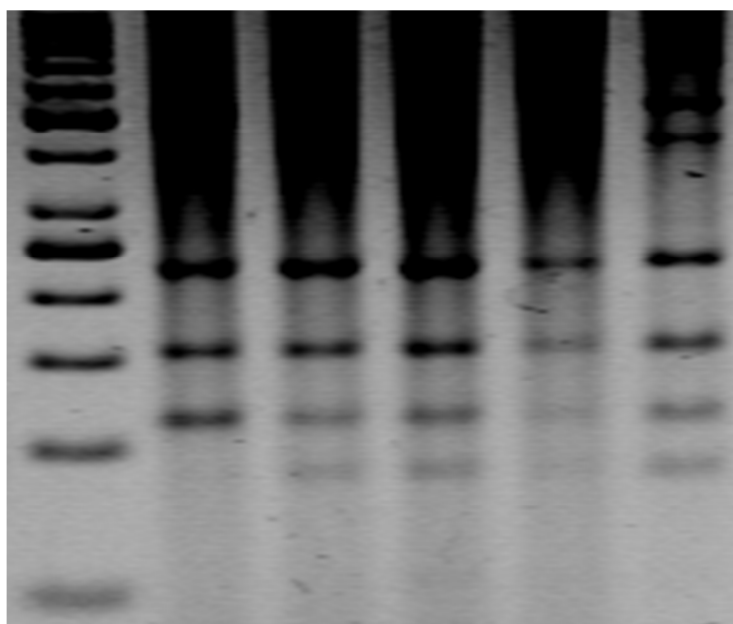
Rycina 9. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs10519613. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA

Ladder

## WYNIKI

### rs1057972

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji adeniny (A) tyminą (T) w pozycji 431 genu IL15 w chromosomie 4. Produkt PCR wielkości 497 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – BseNI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel A identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 232 pz, 156 pz i 89 pz i 20 pz, natomiast allel T za pomocą fragmentów 232 pz, 156 pz i 109 pz.

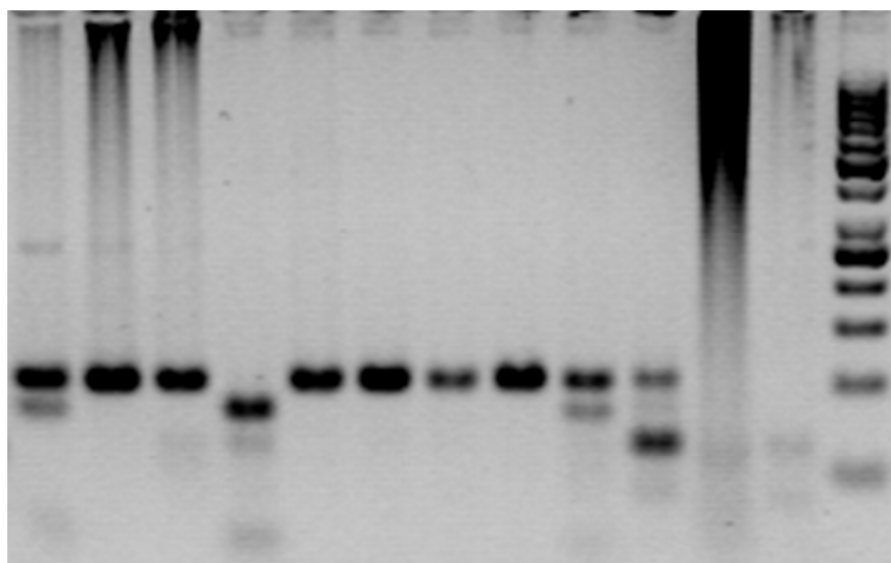


Rycina 10. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs1057972. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

## WYNIKI

### rs2254514

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji tyminy (T) cytozyną (C) w pozycji -80 genu IL15 w chromosomie 4. Produkt PCR wielkości 101 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – *TasI*. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel C identyfikowano obecnością fragmentu o wielkości 101 pz, natomiast allel T za pomocą fragmentów 81 pz i 20 pz.

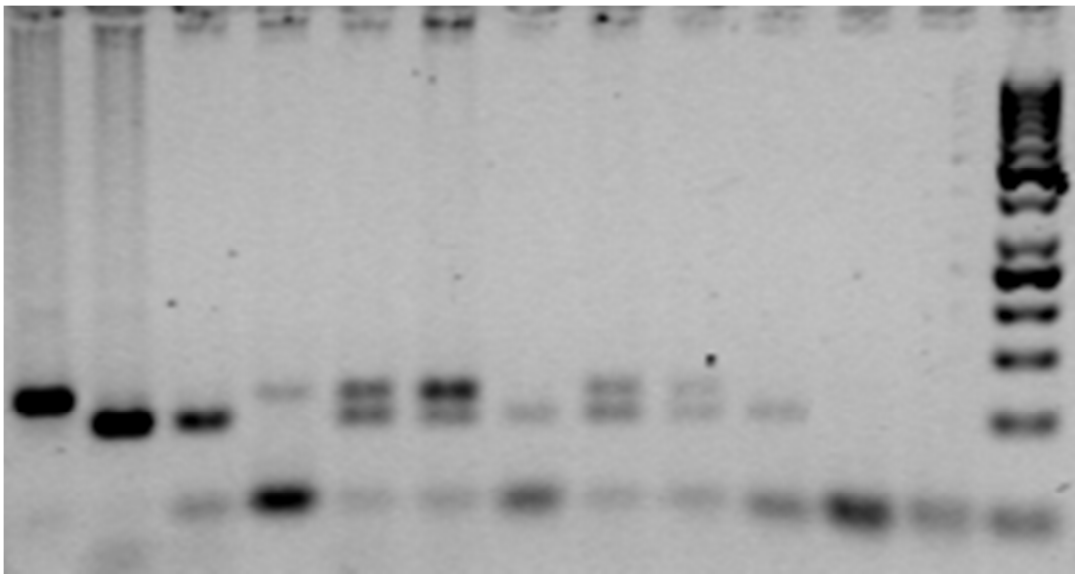


Rycina 11. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs2254514. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

## WYNIKI

### rs10833

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji tyminy (T) cytozyną (C) w pozycji 546 genu IL15 w chromosomie 4. Produkt PCR wielkości 124 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – Bsp14071. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel T identyfikowano obecnością fragmentu o wielkości 124 pz, natomiast allel C za pomocą fragmentów 104 pz i 20 pz.

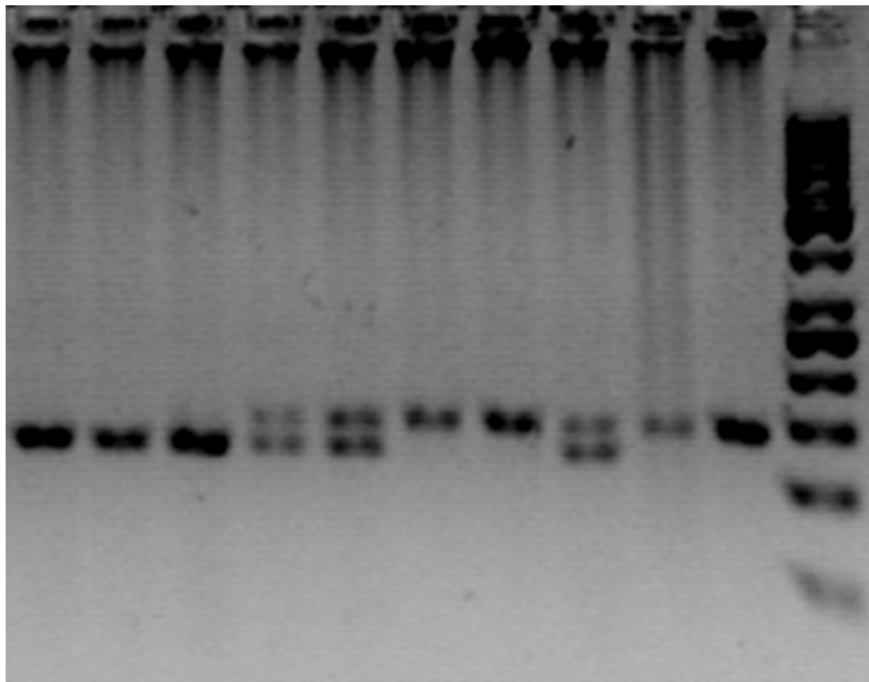


Rycina 12. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs10833. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

## WYNIKI

### 6.1.8. Gen IL18 rs549908

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji adeniny (A) cytozyną (C) w pozycji 105 genu IL18 w chromosomie 11. Produkt PCR wielkości 148 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – TaqI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel A identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 148 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 123 pz i 25 pz.

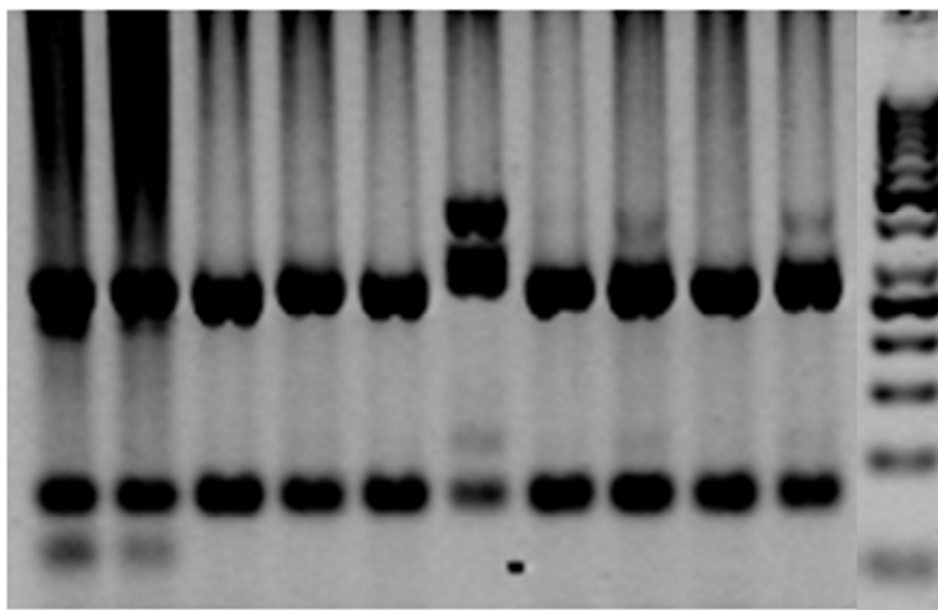


Rycina 13. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs549908. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder

## WYNIKI

### 6.1.9. Gen IL18-R rs2270297

Polimorfizm ten prowadzi do substytucji tyminy (T) cytozyną (C) w obrębie intronu w pozycji 156 genu IL18-R w chromosomie 2. Produkt PCR wielkości 307 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego – BseNI. Za pomocą metody RFLP i rozdziału elektroforetycznego uzyskano fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym allelom. Allel T identyfikowano obecnością fragmentów o wielkości 169 pz., natomiast allel C za pomocą fragmentów 147 pz i 22 pz.



Rycina 14. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom polimorfizmu rs2270297. Marker wielkości Gene Ruler 50bp DNA Ladder



WYNIKI

**6.2. Analiza związku badanych polimorfizmów ze stopniem ciężkości astmy oskrzelowej**

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów ze stopniem ciężkości astmy oskrzelowej przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą o różnym stopniu ciężkości

Gen SNP		Astma lekka		Astma umiarkowana		Astma ciężka		p	OR	
		n	%	n	%	n	%			
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	3	42,86	11	52,38	7	58,33	0,713	1,076
		CT	3	42,86	7	33,33	5	41,67		
		CC	1	14,29	3	14,29	0	0,00		
	Allele	T	9	64,29	29	69,05	19	79,17	0,584	
		C	5	35,71	13	30,95	5	20,83		
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0,215	2,209
		CT	5	71,43	9	42,86	4	30,77		
		CC	2	28,57	12	57,14	9	69,23		
	Allele	T	5	35,71	9	21,43	4	15,38	0,331	
		C	9	64,29	33	78,57	22	84,62		
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	3	42,86	6	28,57	3	25,00	0,205	2,559
		AG	3	42,86	13	61,90	4	33,33		
		AA	1	14,29	2	9,52	5	41,67		
	Allele	G	9	64,29	25	59,52	10	41,67	0,278	
		A	5	35,71	17	40,48	14	58,33		
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	0	0,00	1	4,76	1	7,69	0,866	0,052
		CT	3	42,86	7	33,33	3	23,08		
		CC	4	57,14	13	61,90	9	69,23		
	Allele	T	3	21,43	9	21,43	5	19,23	0,974	
		C	11	78,57	33	78,57	21	80,77		
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	3	42,86	11	52,38	4	30,77	0,452	0,185
		CG	3	42,86	6	28,57	8	61,54		
		CC	1	14,29	4	19,05	1	7,69		
	Allele	G	9	64,29	28	66,67	16	61,54	0,911	
		C	5	35,71	14	33,33	10	38,46		

## WYNIKI

<i>IL12</i> 1188 A/C	Genotypy	AA	3	42,86	13	61,90	8	61,54	0,876	1,198
		AC	3	42,86	7	33,33	4	30,77		
		CC	1	14,29	1	4,76	1	7,69		
	Allele	A	9	64,29	33	78,57	20	76,92	0,549	
		C	5	35,71	9	21,43	6	23,08		
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	5	71,43	10	50,00	11	84,62	0,230	6,287
		AC	2	28,57	7	35,00	2	15,38		
		CC	0	0,00	3	15,00	0	0,00		
	Allele	A	12	85,71	27	67,50	24	92,31	0,043	
		C	2	14,29	13	32,50	2	7,69		
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	2	33,33	4	20,00	2	15,38	0,422	0,279
		CT	1	16,67	12	60,00	7	53,85		
		CC	3	50,00	4	20,00	4	30,77		
	Allele	T	5	41,67	20	50,00	11	42,31	0,869	
		C	7	58,33	20	50,00	15	57,69		
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	0	0,00	6	28,57	0	0,00	0,050	10,478
		AG	3	42,86	8	38,10	3	23,08		
		GG	4	57,14	7	33,33	10	76,92		
	Allele	A	3	21,43	20	47,62	3	11,54	0,005	
		G	11	78,57	22	52,38	23	88,46		
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	6	100	19	95,00	7	53,85	0,005	9,566
		AC	0	0,00	1	5,00	6	46,15		
		AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	12	100	39	97,50	20	76,92	0,008	
		A	0	0,00	1	2,50	6	23,08		
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	2	33,33	4	21,05	3	23,08	0,155	1,690
		AT	3	50,00	14	73,68	5	38,46		
		AA	1	16,67	1	5,26	5	38,46		
	Allele	T	7	58,33	22	57,89	11	42,31	0,429	
		A	5	41,67	16	42,11	15	57,69		
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	4	57,14	10	52,63	8	66,67	0,249	0,130
		CT	2	28,57	9	47,37	2	16,67		
		TT	1	14,29	0	0,00	2	16,67		
	Allele	C	10	71,43	29	76,32	18	75,00	0,936	
		T	4	28,57	9	23,68	6	25,00		
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	0	0,00	2	10,53	1	8,33	0,927	0,235
		CT	4	66,67	11	57,89	8	66,67		
		CC	2	33,33	6	31,58	3	25,00		
	Allele	T	4	33,33	15	39,47	10	41,67	0,888	
		C	8	66,67	23	60,53	14	58,33		
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	1	16,67	8	40,00	7	58,33	0,250	4,846
		AC	2	33,33	9	45,00	3	25,00		
		CC	3	50,00	3	15,00	2	16,67		
	Allele	A	4	33,33	25	62,50	17	70,83	0,088	
		C	8	66,67	15	37,50	7	29,17		

WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	5	100	21	100	6	50,00	<b>0,0004</b>	14,114
		CT	0	0,00	0	0,00	6	50,00		
		CC	0	0,00	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	10	100	42	100	18	75,00	<b>0,0009</b>	
		C	0	0,00	0	0,00	6	25,00		

Rozkład genotypów i alleli analizowanych polimorfizmów pomiędzy dziećmi z różnym stopniem ciężkości astmy oskrzelowej (lekkim, umiarkowanym i ciężkim) różnił się w sposób istotny statystycznie dla 4 polimorfizmów. Polimorfizmy, dla których stwierdzono istotną statystycznie asocjację z ciężkością choroby to rs1881457 i rs20541 w genie IL13, rs10519613 w genie IL15 oraz rs2270297 w genie IL18-R. Analizując korelację pomiędzy trzecim polimorfizmem a stopniem ciężkości choroby wykazano częstsze występowanie allelu A oraz genotypu heterozygotycznego polimorfizmu rs10519613 genu IL15 u osób z astmą ciężką. W czwartym z wymienionych SNPów stwierdzono częstsze występowanie allelu C lub genotypu heterozygotycznego dla astmy ciężkiej. W badanej populacji dla żadnego z wymienionych SNP nie stwierdzono występowania drugiego genotypu homozygotycznego (CC dla rs2270297 i AA dla rs10519613) ze względu na mniejszą częstość tych wariantów w populacji ogólnej. Pozostałymi spośród polimorfizmów, dla których stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy częstością występowania poszczególnych alleli a stopniem ciężkości astmy oskrzelowej były rs1881457 i rs20541 (R110Q). Dla pierwszego z tych dwóch polimorfizmów stwierdzono znacznie większą częstość występowania allelu C, a dla drugiego – allelu A w grupie chorych z astmą o umiarkowanym stopniu ciężkości. Dla pozostałych analizowanych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych asocjacji ze stopniem ciężkości choroby.

### 6.3. Analiza związku badanych polimorfizmów z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów astmy przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby

Gen SNP	Genotypy	n	Średni wiek wystąpienia pierwszych objawów (lata)	SD	p
<i>IL1 B</i> -511C/T	TT	21	2,87	2,93	0,436
	CT	15	2,60	1,45	
	CC	4	4,50	4,12	
<i>IL4</i> rs2243250	TT	-	-	-	0,356
	CT	18	7,89	23,30	
	CC	23	3,31	3,07	
<i>IL4-R A</i> rs1805010	GG	12	3,75	3,17	0,436
	AG	20	2,55	2,14	
	AA	8	2,65	2,80	
<i>IL5</i> rs2069812	TT	2	2,10	2,69	0,742
	CT	13	2,92	2,63	
	CC	26	6,77	19,40	
<i>IL12</i> G378R	GG	18	2,22	1,93	0,390
	CG	17	9,31	23,86	
	CC	6	3,33	1,21	
<i>IL12</i> 1188 A/C	AA	24	3,26	3,03	0,499
	AC	14	9,36	26,41	
	CC	3	3,00	3,46	
<i>IL13</i> rs1881457	AA	26	6,78	19,42	0,766
	AC	11	3,18	2,44	
	CC	3	2,00	1,73	
<i>IL13</i> rs1800925	TT	8	2,50	2,45	0,628
	CT	20	7,95	22,09	
	CC	11	3,29	2,43	

## WYNIKI

<i>IL13</i> rs20541	AA	6	3,33	3,27	0,609
	AG	14	2,59	1,97	
	GG	21	7,71	21,56	
<i>IL15</i> rs10519613	CC	32	6,15	17,50	0,500
	AC	7	1,60	1,36	
	AA	-	-	-	
<i>IL15</i> rs1057972	TT	9	2,44	1,74	0,675
	AT	22	7,32	21,08	
	AA	7	2,60	2,96	
<i>IL15</i> rs2254514	CC	22	6,91	21,10	0,824
	CT	15	3,92	3,64	
	TT	3	2,33	0,58	
<i>IL15</i> rs10833	TT	3	1,33	0,58	0,303
	CT	23	2,75	2,62	
	CC	11	11,73	29,67	
<i>IL18</i> rs549908	AA	16	9,26	24,65	0,494
	AC	14	3,64	2,62	
	CC	8	1,88	1,13	
<i>IL18-R</i> rs2270297	TT	32	3,09	2,79	<b>0,033</b>
	CT	6	18,20	40,58	
	CC	-	-	-	

Porównując średni wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby w zależności od genotypów analizowanych polimorfizmów, stwierdzono istotne statystycznie różnice dla polimorfizmu rs2270297 w genie IL18-R. U pacjentów z genotypem heterozygotycznym CT pierwsze objawy choroby odnotowywano w znacznie późniejszym wieku niż u dzieci z genotypem TT. Genotyp CC był nieobecny w analizowanej grupie dzieci. Dla pozostałych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic.

#### 6.4. Analiza związku badanych polimorfizmów z koniecznością stosowania steroidoterapii systemowej

Wyniki analizy asocjacyjnej badanych polimorfizmów z koniecznością stosowania terapii glikokortykosteroidami systemowymi w wywiadzie przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od konieczności stosowania steroidów systemowych w leczeniu

Gen SNP			steroidoterapia w wywiadzie				p	OR
			nie		tak			
			n	%	n	%		
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	10	52,63	11	52,38	0,993	0,981
		CT	7	36,84	8	38,10		
		CC	2	10,53	2	9,52		
	Allele	T	27	71,05	30	71,43	1,000	
		C	11	28,95	12	28,57		
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	0,397	0,677
		CT	7	36,84	11	50,00		
		CC	12	63,16	11	50,00		
	Allele	T	7	18,42	11	25,00	0,595	
		C	31	81,58	33	75,00		
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	3	15,79	9	42,86	0,157	0,553
		AG	12	63,16	8	38,10		
		AA	4	21,05	4	19,05		
	Allele	G	18	47,37	26	61,90	0,260	
		A	20	52,63	16	38,10		
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	2	10,53	0	0,00	0,155	1,037
		CT	4	21,05	9	40,91		
		CC	13	68,42	13	59,09		
	Allele	T	8	21,05	9	20,45	1,000	
		C	30	78,95	35	79,55		
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	6	31,58	12	54,55	0,313	0,576
		CG	10	52,63	7	31,82		
		CC	3	15,79	3	13,64		
	Allele	G	22	57,89	31	70,45	0,256	
		C	16	42,11	13	29,55		

## WYNIKI

<i>IL12</i> 1188 A/C	Genotypy	AA	11	57,89	13	59,09	0,868	1,074
		AC	7	36,84	7	31,82		
		CC	1	5,26	2	9,09		
	Allele	A	29	76,32	33	75,00	1,000	
		C	9	23,68	11	25,00		
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	9	50,00	17	77,27	0,197	0,358
		AC	7	38,89	4	18,18		
		CC	2	11,11	1	4,55		
	Allele	A	25	69,44	38	86,36	0,098	
		C	11	30,56	6	13,64		
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	4	22,22	4	19,05	0,072	0,578
		CT	6	33,33	14	66,67		
		CC	8	44,44	3	14,29		
	Allele	T	14	38,89	22	52,38	0,261	
		C	22	61,11	20	47,62		
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	2	10,53	4	18,18	0,558	0,989
		AG	8	42,11	6	27,27		
		GG	9	47,37	12	54,55		
	Allele	A	12	31,58	14	31,82	1,000	
		G	26	68,42	30	68,18		
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	14	82,35	18	81,82	0,966	1,033
		AC	3	17,65	4	18,18		
		AA	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	31	91,18	40	90,91	1,000	
		A	3	8,82	4	9,09		
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	5	29,41	4	19,05	0,476	1,023
		AT	8	47,06	14	66,67		
		AA	4	23,53	3	14,29		
	Allele	T	18	52,94	22	52,38	1,000	
		A	16	47,06	20	47,62		
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	11	68,75	11	50,00	0,511	1,817
		CT	4	25,00	9	40,91		
		TT	1	6,25	2	9,09		
	Allele	C	26	81,25	31	70,45	0,421	
		T	6	18,75	13	29,55		
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	3	18,75	0	0,00	0,116	1,763
		CT	9	56,25	14	66,67		
		CC	4	25,00	7	33,33		
	Allele	T	15	46,88	14	33,33	0,336	
		C	17	53,12	28	66,67		
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	8	47,06	8	38,10	0,694	1,098
		AC	5	29,41	9	42,86		
		CC	4	23,53	4	19,05		
	Allele	A	21	61,76	25	59,52	1,000	
		C	13	38,24	17	40,48		

WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	15	88,24	17	80,95	0,540	1,684
		CT	2	11,76	4	19,05		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	32	94,12	38	90,48	0,685	
		C	2	5,88	4	9,52		

Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów wśród pacjentów, którzy w przeszłości wymagali stosowania terapii glikokortykoidami systemowymi w leczeniu astmy oskrzelowej w porównaniu z pacjentami, którzy nie wymagali takiego leczenia w ciągu ostatnich 2 lat nie wykazał żadnych istotnych statystycznie różnic.

Porównując częstość alleli analizowanych polimorfizmów również nie zaobserwowano istotnych asocjacji dla żadnego spośród analizowanych wariantów genów.



### 6.5. Analiza badanych polimorfizmów u chorych na astmą atopową i nieatopową

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów u pacjentów z astmą atopową w porównaniu z pacjentami z astmą nieatopową przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą atopową i nieatopową

Gen SNP		Asthma atopowa		Asthma nieatopowa		p	OR	
		n	%	n	%			
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	16	48,48	5	71,43	0,447	2,800
		CT	13	39,39	2	28,57		
		CC	4	12,12	0	0,00		
	Allele	T	45	68,18	12	85,71	0,329	
C		21	31,82	2	14,29			
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	0,046	0,192
		CT	17	51,52	1	12,50		
		CC	16	48,48	7	87,50		
	Allele	T	17	25,76	1	6,25	0,174	
C		49	74,24	15	93,75			
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	12	36,36	0	0,00	0,0006	0,09
		AG	18	54,55	2	28,57		
		AA	3	9,09	5	71,43		
	Allele	G	42	63,64	2	14,29	0,0009	
A		24	36,36	12	85,71			
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	1	3,03	1	12,50	0,515	1,359
		CT	11	33,33	2	25,00		
		CC	21	63,64	5	62,50		
	Allele	T	13	19,70	4	25,00	0,732	
C		53	80,30	12	75,00			
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	15	45,45	3	37,50	0,271	1,257
		CG	12	36,36	5	62,50		
		CC	6	18,18	0	0,00		
	Allele	G	42	63,64	11	68,75	0,778	
C		24	36,36	5	31,25			

## WYNIKI

<i>IL12</i> 1188 A/C	Genotypy	AA	20	60,61	4	50,00	0,771	0,647
		AC	11	33,33	3	37,50		
		CC	2	6,06	1	12,50		
	Allele	A	51	77,27	11	68,75	0,522	
		C	15	22,73	5	31,25		
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	18	56,25	8	100	0,067	12,158
		AC	11	34,38	0	0,00		
		CC	3	9,38	0	0,00		
	Allele	A	47	73,44	16	100	<b>0,017</b>	
		C	17	26,56	0	0,00		
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	6	19,35	2	25,00	0,933	1,214
		CT	16	51,61	4	50,00		
		CC	9	29,03	2	25,00		
	Allele	T	28	45,16	8	50,00	0,783	
		C	34	54,84	8	50,00		
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	6	18,18	0	0,00	0,068	0,109
		AG	13	39,39	1	12,50		
		GG	14	42,42	7	87,50		
	Allele	A	25	37,88	1	6,25	<b>0,016</b>	
		G	41	62,12	15	93,75		
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	28	90,32	4	50,00	<b>0,008</b>	0,152
		AC	3	9,68	4	50,00		
		AA	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	59	95,16	12	75,00	<b>0,029</b>	
		A	3	4,84	4	25,00		
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	7	23,33	2	25,00	0,254	0,636
		AT	19	63,33	3	37,50		
		AA	4	13,33	3	37,50		
	Allele	T	33	55,00	7	43,75	0,574	
		A	27	45,00	9	56,25		
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	17	54,84	5	71,43	0,425	1,116
		CT	12	38,71	1	14,29		
		TT	2	6,45	1	14,29		
	Allele	C	46	74,19	11	78,57	1,000	
		T	16	25,81	3	21,43		
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	2	6,67	1	14,29	0,800	1,207
		CT	19	63,33	4	57,14		
		CC	9	30,00	2	28,57		
	Allele	T	23	38,33	6	42,86	0,769	
		C	37	61,67	8	57,14		
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	11	35,48	5	71,43	0,209	2,829
		AC	13	41,94	1	14,29		
		CC	7	22,58	1	14,29		
	Allele	A	35	56,45	11	78,57	0,145	
		C	27	43,55	3	21,43		

WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	29	96,67	3	37,50	0,00005	0,037
		CT	1	3,33	5	62,50		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	59	98,33	11	68,75	0,0012	
		C	1	1,67	5	31,25		

Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów różnił się w sposób istotny statystycznie po porównaniu grupy pacjentów z astmą atopową z chorymi na astmę bez podłoża atopowego w przypadku 4 polimorfizmów: rs2243250 genu IL4, rs1805010 genu IL4-R A, rs10519613 genu IL15 i rs2270297 genu IL18-R. Dla pierwszego z nich stwierdzono istotnie częstsze występowanie genotypu CT u chorych z astmą atopową, w porównaniu z chorymi na astmę nieatopową. Również w przypadku rs1805010 genu IL4-R A stwierdzono znaczną przewagę genotypów AG i GG w grupie chorych na astmę atopową. Z kolei w analizie rs2270297 genu IL18-R stwierdzono występowanie genotypu TT u prawie wszystkich pacjentów, u których choroba ma podłoże atopowe. Podobną zależność stwierdzono także dla genotypu CC wariantu genu IL15 rs10519613.

Porównując częstość alleli analizowanych polimorfizmów między grupą pacjentów z astmą atopową a grupą pacjentów z astmą nieatopową dla większości z nich również nie zaobserwowano istotnych różnic. Statystyczne znaczenie miało 5 SNP: rs1881457 genu IL13 (u chorych z astmą nieatopową nie stwierdzono występowania allelu C), rs20541 genu IL13 (w astmie nieatopowej zdecydowana przewaga allelu G) oraz wymienione wcześniej rs1805010 genu IL4-RA (związek allelu A z astmą nieatopową), rs10519613 genu IL15 i rs2270297 genu IL18-R (związek odpowiednio allelu C i allelu T z astmą atopową).

WYNIKI

**6.6. Analiza związku badanych polimorfizmów z występowaniem atopowego zapalenia skóry (AZS) u chorych na astmę atopową**

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów z AZS w wywiadzie przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą atopową w zależności od występowania AZS w wywiadzie

Gen SNP			AZS w wywiadzie				p	OR
			nie		tak			
			n	%	n	%		
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	4	40,00	12	52,17	0,713	0,812
		CT	5	50,00	8	34,78		
		CC	1	10,00	3	13,04		
	Allele	T	13	65,00	32	69,57	0,777	
		C	7	35,00	14	30,43		
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	<b>0,017</b>	0,229
		CT	2	20,00	15	65,22		
		CC	8	80,00	8	34,78		
	Allele	T	2	10,00	15	32,61	0,069	
		C	18	90,00	31	67,39		
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	4	40,00	8	34,78	0,942	1,089
		AG	5	50,00	13	56,52		
		AA	1	10,00	2	8,70		
	Allele	G	13	65,00	29	63,04	1,000	
		A	7	35,00	17	36,96		
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	0	0,00	1	4,35	0,720	1,028
		CT	4	40,00	7	30,43		
		CC	6	60,00	15	65,22		
	Allele	T	4	20,00	9	19,57	1,000	
		C	16	80,00	37	80,43		
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	3	30,00	12	52,17	0,097	0,322
		CG	3	30,00	9	39,13		
		CC	4	40,00	2	8,70		
	Allele	G	9	45,00	33	71,74	0,052	
		C	11	55,00	13	28,26		

WYNIKI

<i>IL12</i> 1188 A/C	Genotypy	AA	5	50,00	15	65,22	0,662	0,567
		AC	4	40,00	7	30,43		
		CC	1	10,00	1	4,35		
	Allele	A	14	70,00	37	80,43	0,358	
		C	6	30,00	9	19,57		
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	6	60,00	12	54,55	0,464	1,677
		AC	4	40,00	7	31,82		
		CC	0	0,00	3	13,64		
	Allele	A	16	80,00	31	70,45	0,547	
		C	4	20,00	13	29,55		
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	0	0,00	6	28,57	0,160	0,389
		CT	6	60,00	10	47,62		
		CC	4	40,00	5	23,81		
	Allele	T	6	30,00	22	52,38	0,111	
		C	14	70,00	20	47,62		
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	0	0,00	6	26,09	0,064	0,192
		AG	3	30,00	10	43,48		
		GG	7	70,00	7	30,43		
	Allele	A	3	15,00	22	47,83	<b>0,013</b>	
		G	17	85,00	24	52,17		
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	9	90,00	19	90,48	0,967	0,950
		AC	1	10,00	2	9,52		
		AA	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	19	95,00	40	95,24	1,000	
		A	1	5,00	2	4,76		
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	2	20,00	5	25,00	0,742	0,739
		AT	6	60,00	13	65,00		
		AA	2	20,00	2	10,00		
	Allele	T	10	50,00	23	57,50	0,595	
		A	10	50,00	17	42,50		
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	4	44,44	13	59,09	0,676	0,588
		CT	4	44,44	8	36,36		
		TT	1	11,11	1	4,55		
	Allele	C	12	66,67	34	77,27	0,523	
		T	6	33,33	10	22,73		
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	0	0,00	2	9,09	0,241	1,361
		CT	7	87,50	12	54,55		
		CC	1	12,50	8	36,36		
	Allele	T	7	43,75	16	36,36	0,765	
		C	9	56,25	28	63,64		
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	5	50,00	6	28,57	0,382	2,333
		AC	4	40,00	9	42,86		
		CC	1	10,00	6	28,57		
	Allele	A	14	70,00	21	50,00	0,175	
		C	6	30,00	21	50,00		

## WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	9	100	20	95,24	0,506	1,337
		CT	0	0,00	1	4,76		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	18	100	41	97,62	1,000	
		C	0	0,00	1	2,38		

Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów z uwzględnieniem podziału pacjentów na tych, którzy w przeszłości prezentowali objawy atopowego zapalenia skóry oraz takich, u których tych objawów dotychczas nie stwierdzano wykazał istotną statystycznie różnicę jedynie dla polimorfizmu *IL4* rs2243250, dla którego zaobserwowano, że genotyp CT zdecydowanie częściej występował u osób, u których stwierdzano zmiany skórne.

Porównując częstość alleli analizowanych polimorfizmów zaobserwowano istotną statystycznie różnicę dla polimorfizmu *IL13* rs20541, a allelem związanym z objawami atopowego zapalenia skóry w wywiadzie okazał się allel A.

WYNIKI

**6.7. Analiza związku badanych polimorfizmów z występowaniem alergicznego nieżytu nosa (ANN) u chorych na astmę atopową**

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów z ANN w wywiadzie przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą atopową w zależności od występowania ANN w wywiadzie

Gen SNP			ANN w wywiadzie				p	OR
			nie		tak			
			n	%	n	%		
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	3	42,86	13	50,00	0,942	0,800
		CT	3	42,86	10	38,46		
		CC	1	14,29	3	11,54		
	Allele	T	9	64,29	36	69,23	0,753	
		C	5	35,71	16	30,77		
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	0,235	1,852
		CT	5	71,43	12	46,15		
		CC	2	28,57	14	53,85		
	Allele	T	5	35,71	12	23,08	0,491	
		C	9	64,29	40	76,92		
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	4	57,14	8	30,77	0,300	1,563
		AG	2	28,57	16	61,54		
		AA	1	14,29	2	7,69		
	Allele	G	10	71,43	32	61,54	0,550	
		A	4	28,57	20	38,46		
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	0	0,00	1	3,85	0,813	0,621
		CT	2	28,57	9	34,62		
		CC	5	71,43	16	61,54		
	Allele	T	2	14,29	11	21,15	0,718	
		C	12	85,71	41	78,85		
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	3	42,86	12	46,15	0,709	0,705
		CG	2	28,57	10	38,46		
		CC	2	28,57	4	15,38		
	Allele	G	8	57,14	34	65,38	0,785	
		C	6	42,86	18	34,62		

## WYNIKI

<i>IL12</i> rs1188 A/C	Genotypy	AA	5	71,43	15	57,69	0,680	2,000
		AC	2	28,57	9	34,62		
		CC	0	0,00	2	7,69		
	Allele	A	12	85,71	39	75,00	0,494	
C		2	14,29	13	25,00			
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	2	28,57	16	64,00	0,246	0,376
		AC	4	57,14	7	28,00		
		CC	1	14,29	2	8,00		
	Allele	A	8	57,14	39	78,00	0,170	
C		6	42,86	11	22,00			
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	1	14,29	5	20,83	0,476	1,286
		CT	5	71,43	11	45,83		
		CC	1	14,29	8	33,33		
	Allele	T	7	50,00	21	43,75	0,764	
C		7	50,00	27	56,25			
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	1	14,29	5	19,23	0,950	0,888
		AG	3	42,86	10	38,46		
		GG	3	42,86	11	42,31		
	Allele	A	5	35,71	20	38,46	1,000	
G		9	64,29	32	61,54			
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	6	85,71	22	91,67	0,639	0,565
		AC	1	14,29	2	8,33		
		AA	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	13	92,86	46	95,83	0,542	
A		1	7,14	2	4,17			
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	2	28,57	5	21,74	0,919	1,120
		AT	4	57,14	15	65,22		
		AA	1	14,29	3	13,04		
	Allele	T	8	57,14	25	54,35	1,000	
A		6	42,86	21	45,65			
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	4	57,14	13	54,17	0,574	0,833
		CT	2	28,57	10	41,67		
		TT	1	14,29	1	4,17		
	Allele	C	10	71,43	36	75,00	0,743	
T		4	28,57	12	25,00			
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	0	0,00	2	8,70	0,558	0,568
		CT	4	57,14	15	65,22		
		CC	3	42,86	6	26,09		
	Allele	T	4	28,57	19	41,30	0,534	
C		10	71,43	27	58,70			
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	1	14,29	10	41,67	0,409	0,491
		AC	4	57,14	9	37,50		
		CC	2	28,57	5	20,83		
	Allele	A	6	42,86	29	60,42	0,359	
C		8	57,14	19	39,58			



WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	7	100	22	95,65	0,575	1,593
		CT	0	0,00	1	4,35		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	14	100	45	97,83	1,000	
		C	0	0,00	1	2,17		

Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów z uwzględnieniem podziału pacjentów na tych, którzy w przeszłości prezentowali objawy alergicznego nieżytu nosa oraz takich, u których tych objawów dotychczas nie stwierdzano nie wykazał istotnych statystycznie różnic dla żadnego spośród analizowanych polimorfizmów.

Porównując częstość alleli analizowanych SNP również nie zaobserwowano asocjacji, których poziom istotności spełniałby przyjęte kryteria ( $p < 0,05$ ).

### 6.8. Analiza związku badanych polimorfizmów z nadwrażliwością na pyłki traw

Wyniki analizy asocjacyjnej polimorfizmów u pacjentów z nadwrażliwością na pyłki traw (AT) w porównaniu z pacjentami z astmą nieatopową (NA), którzy tej nadwrażliwości nie wykazywali przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania nadwrażliwości na pyłki traw

Gen SNP		NA		AT		p	OR	
		n	%	n	%			
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	5	71,43	6	54,55	0,633	0,444
		CT	2	28,57	4	36,36		
		CC	0	0,00	1	9,09		
	Allele	T	12	85,71	16	72,73	0,441	
		C	2	14,29	6	27,27		
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	0,435	2,368
		CT	1	12,50	3	27,27		
		CC	7	87,50	8	72,73		
	Allele	T	1	6,25	3	13,64	0,624	
		C	15	93,75	19	86,36		
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	0	0,00	3	27,27	<b>0,019</b>	8,667
		AG	2	28,57	7	63,64		
		AA	5	71,43	1	9,09		
	Allele	G	2	14,29	13	59,09	<b>0,014</b>	
		A	12	85,71	9	40,91		
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	1	12,50	0	0,00	0,174	1,4
		CT	2	25,00	7	63,64		
		CC	5	62,50	4	36,36		
	Allele	T	4	25,00	7	31,82	0,729	
		C	12	75,00	15	68,18		
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	3	37,50	6	54,55	0,085	0,795
		CG	5	62,50	2	18,18		
		CC	0	0,00	3	27,27		
	Allele	G	11	68,75	14	63,64	1,000	
		C	5	31,25	8	36,36		

WYNIKI

<i>IL12</i> rs1188 A/C	Genotypy	AA	4	50,00	6	54,55	0,965	1,212
		AC	3	37,50	4	36,36		
		CC	1	12,50	1	9,09		
	Allele	A	11	68,75	16	72,73	1,000	
		C	5	14,29	6	27,27		
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	8	100,00	6	60,00	<b>0,043</b>	0,111
		AC	0	0,00	4	40,00		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	A	16	100,00	16	80,00	0,113	
		C	0	0,00	4	20,00		
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	2	25,00	3	30,00	0,638	1,5
		CT	4	50,00	6	60,00		
		CC	2	25,00	1	10,00		
	Allele	T	8	50,00	12	60,00	0,737	
		C	8	50,00	8	40,00		
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	0	0,00	3	27,27	0,222	8,571
		AG	1	12,50	2	18,18		
		GG	7	87,50	6	54,55		
	Allele	A	1	6,25	8	36,36	0,052	
		G	15	93,75	14	63,64		
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	4	50,00	9	90,00	0,060	6,333
		AC	4	50,00	1	10,00		
		AA	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	12	75,00	19	95,00	0,149	
		A	4	25,00	1	5,00		
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	2	25,00	0	0,00	0,153	0,818
		AT	3	37,50	7	77,78		
		AA	3	37,50	2	22,22		
	Allele	T	7	43,75	7	38,89	1,000	
		A	9	56,25	11	61,11		
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	5	71,43	6	54,55	0,221	0,927
		CT	1	14,29	5	45,45		
		TT	1	14,29	0	0,00		
	Allele	C	11	78,57	17	77,27	1,000	
		T	3	21,43	5	22,73		
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	1	14,29	1	10,00	0,861	1,091
		CT	4	57,14	7	70,00		
		CC	2	28,57	2	20,00		
	Allele	T	6	42,86	9	45,00	1,000	
		C	8	57,14	11	55,00		
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	5	71,43	4	36,36	0,345	0,272
		AC	1	14,29	3	27,28		
		CC	1	14,29	4	36,36		
	Allele	A	11	78,57	11	50,00	0,160	
		C	3	21,43	11	50,00		

WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	3	37,50	11	100	0,002	21,522
		CT	5	62,50	0	0,00		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	11	68,75	22	100	0,008	
		C	5	14,29	0	0,00		

Po porównaniu grupy pacjentów z nadwrażliwością na pyłki traw stwierdzoną za pomocą dodatniego wyniku testów skórnych z grupą pacjentów z astmą nieatopową, którzy tej nadwrażliwości nie wykazywali zaobserwowano, że rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów różnił się w sposób istotny statystycznie dla wariantu rs1805010 genu *IL4-R A*, rs1881457 genu *IL13* i dla rs2270297 genu *IL18-R*. Dla polimorfizmu *IL4-R A* zaobserwowano związek genotypów AG i GG z uczuleniem na pyłki traw, dla polimorfizmu *IL13* wykazano związek genotypu AC z uczuleniem, a dla polimorfizmu *IL18-R* stwierdzono zdecydowaną przewagę genotypu TT w grupie pacjentów uczulonych. Dla pozostałych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych różnic w rozkładzie genotypów między porównywanymi grupami pacjentów.

Porównując częstość alleli między analizowanymi podgrupami zaobserwowano istotne statystycznie różnice dla polimorfizmów *IL4-R A* (rs1805010) i *IL18-R* (rs2270297). Allelami związanymi z uczuleniem na pyłki traw okazały się allel G polimorfizmu rs1805010 i allel T polimorfizmu rs2270297.

### 6.9. Analiza związku badanych polimorfizmów z nadwrażliwością na roztocza kurzu

Wyniki analizy asocjacyjnej polimorfizmów u pacjentów z nadwrażliwością na roztocza kurzu (AR) w porównaniu z pacjentami z astmą nieatopową (NA), którzy tej nadwrażliwości nie wykazywali przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania nadwrażliwości na roztocza kurzu

Gen SNP			NA		AR		P	OR
			n	%	n	%		
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	5	71,43	10	45,45	0,395	0,322
		CT	2	28,57	9	40,91		
		CC	0	0,00	3	13,64		
	Allele	T	12	85,71	29	65,91	0,194	
C		2	14,29	15	34,09			
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	<b>0,013</b>	7,000
		CT	1	12,50	14	63,64		
		CC	7	87,50	8	36,36		
	Allele	T	1	6,25	14	31,82	<b>0,049</b>	
C		15	93,75	30	68,18			
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	0	0,00	9	40,91	<b>0,003</b>	11,6
		AG	2	28,57	11	50,00		
		AA	5	71,43	2	9,09		
	Allele	G	2	14,29	29	65,91	<b>0,001</b>	
A		12	85,71	15	34,09			
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	1	12,50	1	4,55	0,648	0,473
		CT	2	25,00	4	18,18		
		CC	5	62,50	17	77,27		
	Allele	T	4	25,00	6	13,64	0,433	
C		12	75,00	38	86,36			
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	3	37,50	9	40,91	0,485	0,795
		CG	5	62,50	10	45,45		
		CC	0	0,00	3	13,64		
	Allele	G	11	68,75	28	63,64	0,769	
C		5	31,25	16	36,36			

WYNIKI

<i>IL12</i> rs1188 A/C	Genotypy	AA	4	50,00	14	63,64	0,672	1,768
		AC	3	37,50	7	31,82		
		CC	1	12,50	1	4,55		
	Allele	A	11	68,75	35	79,55	0,492	
C		5	14,29	9	20,45			
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	8	100,00	12	54,55	0,065	0,070
		AC	0	0,00	7	31,82		
		CC	0	0,00	3	13,64		
	Allele	A	16	100,00	31	70,45	<b>0,013</b>	
C		0	0,00	13	29,55			
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	2	25,00	3	14,29	0,712	0,615
		CT	4	50,00	10	47,62		
		CC	2	25,00	8	38,10		
	Allele	T	8	50,00	16	38,10	0,552	
C		8	50,00	26	61,90			
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	0	0,00	3	13,64	<b>0,046</b>	9,444
		AG	1	12,50	11	50,00		
		GG	7	87,50	8	36,36		
	Allele	A	1	6,25	17	38,64	<b>0,023</b>	
G		15	93,75	27	61,36			
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	4	50,00	19	90,48	<b>0,016</b>	6,667
		AC	4	50,00	2	9,52		
		AA	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	12	75,00	40	95,24	<b>0,043</b>	
A		4	25,00	2	4,76			
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	2	25,00	7	33,33	0,203	2,089
		AT	3	37,50	12	57,14		
		AA	3	37,50	2	9,52		
	Allele	T	7	43,75	26	61,90	0,246	
A		9	56,25	16	38,10			
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	5	71,43	11	55,00	0,585	0,719
		CT	1	14,29	7	35,00		
		TT	1	14,29	2	10,00		
	Allele	C	11	78,57	29	72,50	0,738	
T		3	21,43	11	27,50			
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	1	14,29	1	5,00	0,713	0,717
		CT	4	57,14	12	60,00		
		CC	2	28,57	7	35,00		
	Allele	T	6	42,86	14	35,00	0,749	
C		8	57,14	26	65,00			
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	5	71,43	7	35,00	0,204	0,409
		AC	1	14,29	10	50,00		
		CC	1	14,29	3	15,00		
	Allele	A	11	78,57	24	60,00	0,331	
C		3	21,43	16	40,00			

WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	3	37,50	18	94,74	<b>0,001</b>	16,818
		CT	5	62,50	1	5,26		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	11	68,75	37	97,37	<b>0,007</b>	
		C	5	14,29	1	2,63		

Po porównaniu grupy pacjentów z nadwrażliwością na roztocza kurzu stwierdzoną za pomocą dodatniego wyniku testów skórnych z grupą pacjentów, którzy tej nadwrażliwości nie wykazywali stwierdzono asocjację genotypów wariantów rs2243250 genu *IL4*, rs1805010 genu *IL4-R A*, rs20541 genu *IL13*, rs10519613 genu *IL15* oraz rs2270297 genu *IL18-R* z uczuleniem na roztocza kurzu. W grupie osób z nadwrażliwością na roztocza kurzu wykazano przewagę genotypu CT polimorfizmu *IL4*, genotypów AG i GG wariantu *IL4-R A*, genotypu AG polimorfizmu *IL13* (R110Q), genotypu CC polimorfizmu *IL15* i genotypu TT polimorfizmu *IL18-R*.

Porównując częstość alleli między badanymi podgrupami pacjentów zaobserwowano istotne statystycznie różnice dla polimorfizmów, *IL4*, *IL4-R A*, *IL13* (rs1881457 i rs20541), *IL15* (rs10519613) i *IL18-R*, a allelami zwiększającym ryzyko rozwoju nadwrażliwości na roztocza kurzu okazały się: allel T polimorfizmu rs2243250, allel G polimorfizmu rs1805010, allel C polimorfizmu rs1881457, allel A polimorfizmu rs20541, allel C polimorfizmu rs10519613 i allel T polimorfizmu rs2270297.

### 6.10. Analiza związku badanych polimorfizmów u chorych na astmę atopową z nadwrażliwością na pyłki traw (AT) i na roztocza kurzu (AR)

Wyniki analizy asocjacyjnej wybranych polimorfizmów u pacjentów z nadwrażliwością na pyłki traw (AT) w porównaniu z pacjentami z nadwrażliwością na roztocza kurzu (AR), przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania nadwrażliwości na pyłki traw lub roztocza kurzu

Gen SNP		AT		AR		p	OR	
		n	%	n	%			
<i>IL1 B</i> -511C/T	Genotypy	TT	6	54,55	10	45,45	0,865	0,639
		CT	4	36,36	9	40,91		
		CC	1	9,09	3	13,64		
	Allele	T	16	72,73	29	65,91	0,585	
		C	6	27,27	15	34,09		
<i>IL4</i> rs2243250	Genotypy	TT	0	0,00	0	0,00	<b>0,049</b>	2,956
		CT	3	27,27	14	63,64		
		CC	8	72,73	8	36,36		
	Allele	T	3	13,64	14	31,82	0,142	
		C	19	86,36	30	68,18		
<i>IL4-R A</i> rs1805010	Genotypy	GG	3	27,27	9	40,91	0,732	1,388
		AG	7	63,64	11	50,00		
		AA	1	9,09	2	9,09		
	Allele	G	13	59,09	29	65,91	0,599	
		A	9	40,91	15	34,09		
<i>IL5</i> rs2069812	Genotypy	TT	0	0,00	1	4,55	<b>0,031</b>	0,338
		CT	7	63,64	4	18,18		
		CC	4	36,36	17	77,27		
	Allele	T	7	31,82	6	13,64	0,104	
		C	15	68,18	38	86,36		
<i>IL12</i> G378R	Genotypy	GG	6	54,55	9	40,91	0,279	1,0
		CG	2	18,18	10	45,45		
		CC	3	27,27	3	13,64		
	Allele	G	14	36,36	28	63,64	1,000	
		C	8	63,64	16	36,36		



WYNIKI

<i>IL12</i> rs1188 A/C	Genotypy	AA	6	54,55	14	63,64	0,821	1,458
		AC	4	36,36	7	31,82		
		CC	1	9,09	1	4,55		
	Allele	A	16	72,73	35	79,55	0,547	
C		6	27,27	9	20,45			
<i>IL13</i> rs1881457	Genotypy	AA	6	60,00	12	54,55	0,464	0,596
		AC	4	40,00	7	31,82		
		CC	0	0,00	3	13,64		
	Allele	A	16	80,00	31	70,45	0,547	
C		4	20,00	13	29,55			
<i>IL13</i> rs1800925	Genotypy	TT	3	30,00	3	14,29	0,234	0,41
		CT	6	60,00	10	47,62		
		CC	1	10,00	8	38,10		
	Allele	T	12	60,00	16	38,10	0,171	
C		8	40,00	26	61,90			
<i>IL13</i> rs20541	Genotypy	AA	3	27,27	3	13,64	0,201	1,102
		AG	2	18,18	11	50,00		
		GG	6	54,55	8	36,36		
	Allele	A	8	36,36	17	38,64	1,000	
G		14	63,64	27	61,36			
<i>IL15</i> rs10519613	Genotypy	CC	9	90,00	19	90,48	0,967	1,053
		AC	1	10,00	2	9,52		
		AA	0	0,00	0	0,00		
	Allele	C	19	95,00	40	95,24	1,000	
A		1	5,00	2	4,76			
<i>IL15</i> rs1057972	Genotypy	TT	0	0,00	7	33,33	0,123	2,554
		AT	7	77,78	12	57,14		
		AA	2	22,22	2	9,52		
	Allele	T	7	38,89	26	61,90	0,156	
A		11	61,11	16	38,10			
<i>IL15</i> rs2254514	Genotypy	CC	6	54,55	11	55,00	0,522	0,775
		CT	5	45,45	7	35,00		
		TT	0	0,00	2	10,00		
	Allele	C	17	77,27	29	72,50	0,768	
T		5	22,73	11	27,50			
<i>IL15</i> rs10833	Genotypy	TT	1	10,00	1	5,00	0,652	0,658
		CT	7	70,00	12	60,00		
		CC	2	20,00	7	35,00		
	Allele	T	9	45,00	14	53,87	0,575	
C		11	55,00	26	46,13			
<i>IL18</i> rs549908	Genotypy	AA	4	36,36	7	35,00	0,315	1,5
		AC	3	27,27	10	50,00		
		CC	4	36,36	3	15,00		
	Allele	A	11	50,00	24	60,00	0,593	
C		11	50,00	16	40,00			

WYNIKI

<i>IL18-R</i> rs2270297	Genotypy	TT	11	100	18	94,74	0,439	0,555
		CT	0	0,00	1	5,26		
		CC	0	0,00	0	0,00		
	Allele	T	22	100	37	97,37	1,000	
		C	0	0,00	1	2,63		

Po porównaniu grupy pacjentów z nadwrażliwością na pyłki traw z grupą pacjentów z nadwrażliwością na roztocza kurzu zaobserwowano, że rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów różnił się w sposób istotny statystycznie tylko dla wariantów rs2243250 genu IL4 i rs2069812 genu IL5. Dla pierwszego z polimorfizmów zaobserwowano związek genotypu CC z nadwrażliwością na pyłki traw, a genotypu CT z uczuleniem na roztocza kurzu, a dla drugiego związek genotypu CC z nadwrażliwością na roztocza, a genotypu CT z nadwrażliwością na pyłki traw. Dla pozostałych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych różnic w rozkładzie genotypów między porównywanymi grupami pacjentów.

Porównując częstość alleli między analizowanymi podgrupami również nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic dla żadnego polimorfizmu.

## WYNIKI

**6.11. Analiza związku badanych polimorfizmów z całkowitym stężeniem IgE**

Wyniki analizy asocjacyjnej średniej wartości całkowitego stężenia IgE u pacjentów z poszczególnymi genotypami analizowanych polimorfizmów przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od stężenia IgE

Gen SNP	Genotypy	n	Średnie stężenie IgE (kU/l)	SD	p
<i>IL1 B</i> -511C/T	TT	21	170,75	320,28	0,07
	CT	15	163,13	169,93	
	CC	4	688,93	1141,64	
<i>IL4</i> rs2243250	TT	-	-	-	0,078
	CT	18	350,72	603,24	
	CC	23	112,85	164,71	
<i>IL4-R A</i> rs1805010	GG	12	377,28	661,57	0,227
	AG	20	196,96	320,90	
	AA	8	40,24	33,65	
<i>IL5</i> rs2069812	TT	2	91,00	74,95	0,719
	CT	13	154,64	173,97	
	CC	26	258,32	523,80	
<i>IL12</i> G378R	GG	18	296,50	619,10	0,584
	CG	17	147,67	145,32	
	CC	6	176,83	243,19	
<i>IL12</i> 1188 A/C	AA	24	220,95	479,42	0,347
	AC	14	141,32	177,26	
	CC	3	542,33	794,24	
<i>IL13</i> rs1881457	AA	26	94,79	91,55	<b>0,004</b>
	AC	11	337,24	425,02	
	CC	3	879,07	1315,66	
<i>IL13</i> rs1800925	TT	8	187,78	175,85	0,695
	CT	20	281,97	587,85	
	CC	11	145,01	197,34	

## WYNIKI

<i>IL13</i> rs20541	AA	6	602,92	893,10	<b>0,036</b>
	AG	14	228,13	369,27	
	GG	21	99,86	142,29	
<i>IL15</i> rs10519613	CC	32	240,46	477,09	0,401
	AC	7	85,20	73,64	
	AA	-	-	-	
<i>IL15</i> rs1057972	TT	9	413,82	753,24	0,302
	AT	22	153,64	300,67	
	AA	7	140,37	228,15	
<i>IL15</i> rs2254514	CC	22	147,27	129,42	0,390
	CT	13	362,94	724,58	
	TT	3	246,60	348,78	
<i>IL15</i> rs10833	TT	3	80,47	54,85	0,596
	CT	23	190,55	311,85	
	CC	11	331,29	691,71	
<i>IL18</i> rs549908	AA	16	119,84	99,33	0,151
	AC	14	411,63	967,20	
	CC	8	123,61	104,34	
<i>IL18-R</i> rs2270297	TT	32	249,46	478,31	0,375
	CT	6	71,75	72,10	
	CC	-	-	-	

Porównując średnie stężenie IgE wśród pacjentów z poszczególnymi genotypami analizowanych polimorfizmów, istotne statystycznie różnice stwierdzono dla dwóch polimorfizmów w genie IL13: rs1881457 oraz rs20541 (R110Q). U pacjentów z genotypem CC polimorfizmu rs1881457 średnie całkowite stężenie IgE miało istotnie wyższą wartość niż u chorych z pozostałymi genotypami. Analizując asocjację drugiego spośród omawianych polimorfizmów genu IL 13 ze średnią wartością całkowitego stężenia IgE stwierdzono znacznie wyższe wartości IgE u chorych, będących homozygotami pod względem allelu A. Dla pozostałych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic.

## WYNIKI

### 6.12. Analiza związku badanych polimorfizmów z wartością FEV1 w okresie bezobjawowym

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów z wartością FEV1 w okresie bezobjawowym przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od wyniku FEV1 w okresie bezobjawowym

Gen SNP	Genotypy	n	Średnia wartość FEV1 w okresie bezobjawowym (% wartości należnej)	SD	p
<i>IL1 B</i> -511C/T	TT	14	97,71	17,70	<b>0,028</b>
	CT	9	76,89	22,42	
	CC	4	102,00	9,13	
<i>IL4</i> rs2243250	TT	-	-	-	0,306
	CT	14	95,43	18,03	
	CC	13	87,08	23,37	
<i>IL4-R A</i> rs1805010	GG	11	92,00	14,14	0,482
	AG	13	87,92	26,08	
	AA	3	104,33	14,57	
<i>IL5</i> rs2069812	TT	1	65,00	0,00	0,430
	CT	10	94,00	18,79	
	CC	16	91,44	22,07	
<i>IL12</i> G378R	GG	13	100,08	14,20	0,098
	CG	10	85,00	26,86	
	CC	4	79,25	10,90	
<i>IL12</i> 1188 A/C	AA	17	89,35	23,54	0,619
	AC	9	96,56	15,59	
	CC	1	80,00	0,00	
<i>IL13</i> rs1881457	AA	17	98,76	15,62	<b>0,008</b>
	AC	7	86,14	17,14	
	CC	3	62,00	30,61	
<i>IL13</i> rs1800925	TT	4	87,50	21,58	0,562
	CT	13	94,77	15,10	
	CC	8	84,75	28,89	

WYNIKI

<i>IL13</i> rs20541	AA	6	101,67	12,88	0,047
	AG	11	97,09	19,90	
	GG	10	79,00	20,91	
<i>IL15</i> rs10519613	CC	23	90,17	22,01	0,432
	AC	2	103,00	15,56	
	AA	-	-	-	
<i>IL15</i> rs1057972	TT	6	90,00	17,39	0,922
	AT	16	91,31	24,32	
	AA	2	84,50	19,09	
<i>IL15</i> rs2254514	CC	14	92,14	25,76	0,668
	CT	10	95,20	12,27	
	TT	2	80,50	13,44	
<i>IL15</i> rs10833	TT	1	109,00	0,00	0,616
	CT	15	88,27	24,82	
	CC	9	93,22	16,01	
<i>IL18</i> rs549908	AA	7	86,71	27,74	0,846
	AC	13	92,00	18,85	
	CC	5	93,20	21,70	
<i>IL18-R</i> rs2270297	TT	23	90,22	21,38	0,849
	CT	1	86,00	0,00	
	CC	-	-	-	

Porównując średnią wartość FEV1 w okresie bezobjawowym między poszczególnymi genotypami analizowanych polimorfizmów, istotne statystycznie różnice stwierdzono dla następujących polimorfizmów: -511 C/T w genie *IL1 B* oraz rs1881457 i rs20541 (R110Q) w genie *IL13*. W przypadku polimorfizmu -511 C/T *IL1 B* średnia wartość FEV1 w okresie bezobjawowym była wyższa w przypadku genotypów homozygotycznych niż dla genotypu heterozygotycznego, przy czym pacjenci będący homozygotami TT osiągnęli wartości nieco niższe niż dla genotypu CC. U pacjentów z genotypem CC polimorfizmu rs1881457 stwierdzono natomiast istotnie niższe wartości FEV1 w okresie bezobjawowym w porównaniu z pacjentami o pozostałych genotypach. Dla polimorfizmu rs20541 genu *IL13* analiza asocjacji ze średnią wartością FEV1 w okresie bezobjawowym wykazała znacznie niższe wartości FEV1 u chorych, posiadających genotyp GG. Dla pozostałych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic.

## WYNIKI

### 6.13. Analiza związku badanych polimorfizmów z wartością FEV1 w okresie zaostrzenia

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów z wartością FEV1 w okresie zaostrzenia przedstawiono w tabeli 15.

Tabela 15. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od wyniku FEV1 w badaniu spirometrycznym w okresie zaostrzenia

Gen SNP	Genotypy	n	Średnia wartość FEV1 w okresie zaostrzenia (% wartości należnej)	SD	p
<i>IL1 B</i> -511C/T	TT	8	97,88	24,20	0,447
	CT	3	87,67	11,93	
	CC	2	76,00	21,21	
<i>IL4</i> rs2243250	TT	-	-	-	0,754
	CT	7	90,29	28,38	
	CC	6	94,33	12,61	
<i>IL4-R A</i> rs1805010	GG	6	88,00	18,15	0,547
	AG	7	95,71	25,30	
	AA	-	-	-	
<i>IL5</i> rs2069812	TT	-	-	-	0,316
	CT	6	85,33	15,06	
	CC	7	98,00	25,91	
<i>IL12</i> G378R	GG	9	92,67	24,43	0,699
	CG	3	96,67	16,01	
	CC	1	74,00	0,00	
<i>IL12</i> 1188 A/C	AA	6	103,17	22,56	0,226
	AC	5	85,20	16,81	
	CC	2	76,50	23,33	
<i>IL13</i> rs1881457	AA	8	101,63	19,29	0,041
	AC	5	77,00	17,39	
	CC	-	-	-	
<i>IL13</i> rs1800925	TT	2	60,50	0,71	0,022
	CT	7	104,14	19,05	
	CC	3	83,67	11,24	

WYNIKI

<i>IL13</i> rs20541	AA	3	83,00	19,29	0,442
	AG	6	100,83	21,96	
	GG	4	86,00	23,59	
<i>IL15</i> rs10519613	CC	12	91,67	22,65	0,793
	AC	1	98,00	0,00	
	AA	-	-	-	
<i>IL15</i> rs1057972	TT	2	78,50	24,75	0,441
	AT	9	97,33	22,70	
	AA	1	74,00	0,00	
<i>IL15</i> rs2254514	CC	7	83,71	16,85	0,111
	CT	5	107,60	22,11	
	TT	1	74,00	0,00	
<i>IL15</i> rs10833	TT	1	61,00	0,00	0,098
	CT	9	89,33	15,47	
	CC	3	111,00	28,79	
<i>IL18</i> rs549908	AA	4	99,50	9,47	0,651
	AC	5	97,00	27,50	
	CC	3	84,67	21,36	
<i>IL18-R</i> rs2270297	TT	11	92,82	23,53	-
	CT	-	-	-	
	CC	-	-	-	

Porównując średnią wartość FEV1 w okresie zaostrzenia między poszczególnymi genotypami analizowanych polimorfizmów, istotne statystycznie różnice stwierdzono dla dwóch spośród tych polimorfizmów: rs1881457 i rs1800925 w genie IL13. W przypadku pierwszego polimorfizmu średnia wartość FEV1 w okresie zaostrzenia była niższa w przypadku genotypu AC w porównaniu z genotypem AA. Natomiast w przypadku drugiego polimorfizmu najniższe wartości FEV1 w okresie zaostrzenia uzyskali pacjenci, będący homozygotami TT. Dla pozostałych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic.



WYNIKI

**6.14. Analiza związku badanych polimorfizmów ze średnią wartością zmienności FEV1 w czasie próby wysiłkowej**

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów ze średnią wartością zmienności FEV1 w czasie próby wysiłkowej przedstawiono w tabeli 16.

Tabela 16. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od zmienności FEV1 w czasie próby wysiłkowej

Gen SNP	Genotypy	n	Średnia zmienna FEV1 w czasie próby wysiłkowej (% wartości wyjściowej)	SD	p
<i>IL1 B</i> -511C/T	TT	7	-9	15	0,595
	CT	5	-3	5	
	CC	2	-2	1	
<i>IL4</i> rs2243250	TT	-	-	-	0,204
	CT	7	-10	15	
	CC	7	-2	3	
<i>IL4-R A</i> rs1805010	GG	6	-11	16	0,427
	AG	6	-3	4	
	AA	2	-2	1	
<i>IL5</i> rs2069812	TT	-	-	-	0,271
	CT	5	-1	4	
	CC	9	-9	13	
<i>IL12</i> G378R	GG	7	-8	15	0,653
	CG	5	-5	4	
	CC	2	0	6	
<i>IL12</i> 1188 A/C	AA	11	-7	13	0,896
	AC	2	-4	1	
	CC	1	-2	0	
<i>IL13</i> rs1881457	AA	11	-3	4	0,064
	AC	2	-23	29	
	CC	1	-2	0	
<i>IL13</i> rs1800925	TT	1	-2	0	0,905
	CT	11	-7	13	
	CC	2	-4	4	

WYNIKI

<i>IL13</i> rs20541	AA	1	-2	0	0,864
	AG	6	-5	3	
	GG	7	-8	16	
<i>IL15</i> rs10519613	CC	11	-3	3	0,037
	AC	3	-18	23	
	AA	-	-	-	
<i>IL15</i> rs1057972	TT	3	-6	4	0,932
	AT	9	-7	14	
	AA	2	-3	3	
<i>IL15</i> rs2254514	CC	8	-9	15	0,347
	CT	6	-3	1	
	TT	-	-	-	
<i>IL15</i> rs10833	TT	-	-	-	0,198
	CT	8	-3	4	
	CC	5	-12	18	
<i>IL18</i> rs549908	AA	5	-3	4	0,134
	AC	6	-2	1	
	CC	3	-17	22	
<i>IL18-R</i> rs2270297	TT	13	-6	16	0,724
	CT	1	-10	0	
	CC	-	-	-	

Porównując średnią zmienność FEV1 w czasie próby wysiłkowej między poszczególnymi genotypami analizowanych polimorfizmów, istotnie statystycznie różnice stwierdzono dla polimorfizmu rs10519613 w genie IL15. Średnia zmienność FEV1 była niższa w przypadku homozygot CC, a wyższa u heterozygot AC. Dla pozostałych polimorfizmów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic.

## WYNIKI

### 6.15. Analiza związku polimorfizmów wybranych genów cytokin i ich receptorów z wartością FENO

Wyniki analizy asocjacyjnej analizowanych polimorfizmów ze średnią wartością FENO przedstawiono w tabeli 17.

Tabela 17. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od wyniku FENO

Gen SNP	Genotypy	n	Średnie stężenie FENO (ppb)	SD	p
<i>IL1 B</i> -511C/T	TT	7	24,14	8,88	0,075
	CT	5	26,20	15,61	
	CC	2	52,00	25,46	
<i>IL4</i> rs2243250	TT	-	-	-	0,150
	CT	7	35,14	18,18	
	CC	7	22,57	11,70	
<i>IL4-R A</i> rs1805010	GG	6	35,50	21,32	0,376
	AG	6	22,00	9,95	
	AA	2	29,50	6,36	
<i>IL5</i> rs2069812	TT	-	-	-	0,346
	CT	5	23,20	10,47	
	CC	9	32,00	18,27	
<i>IL12</i> G378R	GG	7	30,14	18,58	0,959
	CG	5	27,20	15,40	
	CC	2	28,50	17,68	
<i>IL12</i> 1188 A/C	AA	11	30,82	17,45	0,587
	AC	2	26,00	1,41	
	CC	1	13,00	0,00	
<i>IL13</i> rs881457	AA	11	26,64	11,66	<b>0,011</b>
	AC	2	20,50	10,61	
	CC	1	70,00	0,00	
<i>IL13</i> rs1800925	TT	1	13,00	0,00	0,580
	CT	11	29,27	17,44	
	CC	2	34,50	0,71	
<i>IL13</i> rs20541	AA	1	70,00	0,00	<b>0,006</b>
	AG	6	30,00	9,25	
	GG	7	22,00	12,25	

WYNIKI

<i>IL15</i> rs10519613	CC	11	30,73	17,31	0,426
	AC	3	22,00	9,54	
	AA	-	-	-	
<i>IL15</i> rs1057972	TT	3	50,00	18,03	0,020
	AT	9	23,22	9,59	
	AA	2	22,50	16,26	
<i>IL15</i> rs2254514	CC	8	27,55	11,81	0,804
	CT	6	30,17	21,74	
	TT	-	-	-	
<i>IL15</i> rs10833	TT	-	-	-	0,104
	CT	8	22,50	13,48	
	CC	5	38,00	18,15	
<i>IL18</i> rs549908	AA	5	22,00	14,42	0,333
	AC	6	36,33	18,25	
	CC	3	25,33	11,24	
<i>IL18-R</i> rs2270297	TT	13	27,62	16,01	0,316
	CT	1	45,00	0,00	
	CC	-	-	-	

Porównując średnie stężenie FENO między poszczególnymi genotypami analizowanych polimorfizmów, istotne statystycznie różnice stwierdzono dla trzech spośród tych polimorfizmów: rs1881457 oraz rs20541 (R110Q) w genie IL13 i rs1057972 w genie IL15. U pacjentów z genotypem CC polimorfizmu rs1881457 średnia wartość FENO była wyższa niż u chorych z pozostałymi genotypami. Z kolei analizując asocjację drugiego spośród omawianych polimorfizmów genu IL 13 ze średnią wartością FENO stwierdzono znacznie wyższe wartości u chorych będących homozygotami pod względem allelu A. W przypadku polimorfizmu *IL15* wyższe wartości stężenia FENO zaobserwowano u osób posiadających genotyp TT. Dla pozostałych polimorfizmów nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic.

## 7. DYSKUSJA

Wśród czynników warunkujących rozwój astmy wymienia się zarówno czynniki genetyczne, jak i wpływy środowiskowe, a w szczególności kontakt organizmu z alergenami i czynnikami drażniącymi, zanieczyszczenia środowiska, przebyte choroby infekcyjne oraz styl życia. Aktualna teoria dotycząca patogenezy astmy zakłada, że udział czynnika genetycznego w jej rozwoju jest wynikiem sumy nakładających się niewielkich efektów wielu genów (69). Spośród blisko 30 000 genów zidentyfikowanych w projekcie poznania ludzkiego genomu (HUGO), ponad 100 uznano za geny kandydujące w patogenezie tej choroby, a dotychczasowe badania wielu z nich wypadły obiecująco.

Istnieje wiele genów, dla których dotychczas stwierdzono istotne statystycznie asocjacje z astmą. Udowodniono ich rolę w wielu obszarach patogenezy choroby. Związek z nadreaktywnością oskrzeli wykazano m.in. dla genów *ADAM33* i *GSTP1*, a z nasileniem procesu zapalnego dla genów *CD14* i *DPP10*. Za zjawisko *remodelingu* dróg oddechowych, hyperplazję komórek kubkowych i włóknienie okołoskrzelowe odpowiada z kolei m.in. gen *CCL5*. Korelację z predyspozycją do rozwoju choroby wykazano natomiast dla genów *GPR154* i *ORMDL3* (10, 69). Ten ostatni jest uznawany za jeden z kluczowych czynników determinujących rozwój astmy u dzieci. W dotychczasowych badaniach uzyskano także korelację pomiędzy regionem sąsiadującym z genem *ORMDL3* na chromosomie 17q21 (wariantu rs7216389) a stopniem ciężkości choroby i wczesnym początkiem objawów (45). Ze skłonnością do atopii związany jest natomiast gen *TNF* i gen *GPR154* (69). Również odpowiedź na leczenie jest uwarunkowana genetycznie, czego najlepszym przykładem jest wpływ polimorfizmu genu receptora  $\beta$ 2-adrenergicznego (*ADRB2*) na reakcję na leki z grupy  $\beta$ 2-sympatykomimetyków (69, 91). Z kolei produkt genu *IL4* ma dwójakie działanie – wpływa na reakcje

zapalne i jest związany ze zjawiskiem atopii (nadwrażliwości atopowej). Zgodnie z teorią wielogenową u pacjentów z astmą obserwuje się również połączony wpływ różnych genów. Taką zależność stwierdzono m.in. dla SNP w obrębie genu *AMCazy* (kwaśnej chitynazy) oraz genów *IL4* i *IL13* (47). Rolę wymienionych genów w patogenezie astmy potwierdziły badania typu GWAS. W badaniach tych asocjację z astmą w przypadku genu *ADAM33* wykazano dla 18SNP, genu *CCL5* dla 2 SNP, genu *TNF* dla 5 SNP, genu *CD14* dla 2 SNP, genu *DPP10* dla 5 SNP, genu *GPR154* dla 12 SNP, genu *GSTP1* dla 2 SNP, genu *IL4* dla 3 SNP, genu *IL4-R* dla 8 SNP (105). Wiele badań, prowadzonych na mniejszą skalę potwierdza również udział genów innych interleukin w patogenezie choroby.

Z uwagi na ograniczone prowadzenie badań w grupie pacjentów pediatrycznych, badania tej populacji są rzadziej wykonywane i często dotyczą grup o mniejszej liczebności, a ich wyniki mogą wykazywać asocjacje nie obserwowane w badaniach prowadzonych z udziałem populacji dorosłych pacjentów. Doświadczenia przeprowadzone w kanadyjskim ośrodku badawczym na modelu zwierzęcym potwierdziły, iż w rozwijających się płucach ekspresja poszczególnych genów z wiekiem może ulegać zmianie (17), co częściowo może tłumaczyć powyższe różnice. Na różnice w wynikach uzyskanych w badaniach genetycznych mogą również wpływać różnice rasowe i geograficzne, a także środowisko życia i płeć.

Analiza badanych polimorfizmów u pacjentów pediatrycznych z astmą ujawniła asocjację licznych genów z występowaniem choroby, jej przebiegiem, zaburzeniami czynności układu oddechowego i występowaniem atopii. W grupie dzieci koreańskich stwierdzono związek pomiędzy polimorfizmami w genie *TNF- $\alpha$*  a występowaniem nadreaktywności dróg oddechowych (54). Z kolei badania prowadzone wśród dzieci chorych na astmę w chińskiej populacji Han wykazały związek występowania choroby z polimorfizmami w obrębie genu *Fc $\epsilon$ -R1  $\beta$*  oraz genu *ADRB2* (91). Potwierdzono również związek polimorfizmów w genie *IL13* u chińskich dzieci z ryzykiem wystąpienia choroby (139). W innym badaniu udowodniono natomiast, że geny *IL4* i *IL13* wraz ze wspomnianym wcześniej

genem *ORMDL3* mogą być ważnymi determinantami rozwoju astmy dziecięcej (119). Także w badaniach typu GWAS analizowano i potwierdzono związki genów *IL13*, *IL4*, *IL12* i receptora *IL4-R* z astmą dziecięcą w 3 niezależnych badaniach populacyjnych (105). W fazie drugiej badania ISAAC wykazano natomiast asocjację genu *IL13* z całkowitym stężeniem immunoglobuliny IgE oraz związek genu receptora *IL4-R* z epizodami świszczącego oddechu u dzieci (37). Ponadto w badaniach populacji dziecięcej udowodniono również wpływ kombinacji polimorfizmów genów *IL4*, *IL4-R* i *IL13* na stężenie IgE u chorych na astmę (72).

Z uwagi na niewątpliwe znaczenie procesów immunologicznych w rozwoju astmy, w tym również istotną rolę cytokin i ich receptorów, w niniejszej pracy przedstawiono analizę 15 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) genów siedmiu cytokin - *IL1*, *IL4*, *IL5*, *IL12*, *IL13*, *IL15* i *IL18* oraz dwóch receptorów cytokin – *IL4-R* i *IL18-R*. Do grupy genów najczęściej analizowanych pod kątem asocjacji z chorobami o podłożu alergicznym i z astmą należy gen *IL4*. Istnieją również liczne doniesienia dotyczące związku pomiędzy polimorfizmami w genie *IL13*, a występowaniem astmy i alergii (48, 56, 67), natomiast nieliczne są dane potwierdzające udział *IL15* w patogenezie astmy. Badania przeprowadzone wśród mieszkańców Tomstwa potwierdzają asocjację polimorfizmów genu *IL5* z występowaniem astmy atopowej (36). Z kolei *IL1* według dotychczasowych badań może wpływać na ekspresję mRNA innych genów, a przez to na skłonność do występowania nadreaktywności dróg oddechowych (44, 142, 146), natomiast *IL18* bierze udział w procesie polaryzacji limfocytów T oraz jest jednym z mediatorów procesu zapalnego w drzewie oskrzelowym. Według doniesień z 2011 roku z zapadalnością na astmę u dzieci i z nadreaktywnością dróg oddechowych powiązany jest również gen *IL18-R* (61). Na podstawie dotychczasowych badań stwierdzono także wpływ *IL12* na równowagę Th1 / Th2, poprzez promowanie odpowiedzi Th1. U osób z astmą, zaliczaną do grupy chorób Th2 – zależnych, stężenie tej interleukiny w surowicy krwi jest istotnie niższe niż w populacji (43, 145), z czego wypływają silne przesłanki do uznania jej genu za gen kandydujący w astmie. W badaniu kohortowym pacjentów z astmą w populacji chińskiej Zhang i

wsp. analizowali 20 różnych SNP w genie IL4-R. Dla 6 z nich stwierdzono istotny statystycznie związek z ryzykiem wystąpienia choroby (141). Wobec danych literaturowych wybrane polimorfizmy genów interleukin i ich receptorów wydają się dobrymi kandydatami do analizy ich korelacji z astmą oskrzelową.

Niniejsze badania zostały przeprowadzone w grupie 42 dzieci chorujących na astmę oskrzelową. Przeanalizowano korelację pomiędzy wybranymi polimorfizmami genów interleukin i ich receptorów, a czasem trwania i stopniem nasilenia choroby, klinicznymi i laboratoryjnymi wykładnikami atopii i parametrami czynnościowymi układu oddechowego oraz nasileniem stanu zapalnego w drogach oddechowych. Znajomość takich asocjacji w przyszłości mogłaby się przyczynić do uproszczenia procesu diagnostyki i zwiększenia skuteczności terapii w astmie. Z uwagi na stosunkowo niewielką liczebność grupy badanej, uzyskane wyniki mają charakter wstępny i wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach.

### **7.1. Polimorfizm genu dla IL1**

Z uwagi na fakt, iż IL1 jest jednym z lepiej poznanych markerów stanu zapalnego, w przeprowadzonych dotychczas badaniach genu tej interleukiny analizowano jego korelację z wieloma chorobami. Jest on m.in. genem kandydującym w reumatoidalnym zapaleniu stawów (68), a w badaniach przeprowadzonych wśród niepalących kobiet z populacji chińskiej udowodniono, iż polimorfizm *IL1B* (-31T/C) zwiększa również ryzyko występowania raka płuc (93). Nie stwierdzono natomiast asocjacji polimorfizmów tego genu z udarem niedokrwiennym (86) i z zespołem nerczycowym (79).

Podwyższone stężenie IL1 u pacjentów z objawami atopii sugeruje jej rolę w patogenezie astmy oskrzelowej (60, 117). Istnieją liczne doniesienia potwierdzające zależność pomiędzy polimorfizmami genu IL1, a predyspozycją do rozwoju astmy i jej przebiegiem (38, 101, 146). Również analiza polimorfizmu genu IL1-R, pełniącego m.in. funkcję inhibitora IL1 wykazała korelację tego polimorfizmu z występowaniem astmy nieatopowej w populacji japońskiej (101). Pomimo przytoczonych powyżej doniesień, istnieją badania, które nie potwierdzają



asocjacji polimorfizmów genu IL1 z astmą oskrzelową. Dotyczy to m.in. eksonu 5 genu IL1 i regionu promotora genu tej interleukiny (46). Jednocześnie analiza wpływu immunoterapii na poziom IL1 u dzieci z astmą, przeprowadzona przez polskich badaczy nie wykazała zmniejszenia stężenia tej cytokiny po leczeniu (62, 137).

Badania przeprowadzone u pacjentów irańskich chorych na astmę oskrzelową, dotyczące polimorfizmu **-511C/T** *IL1 B* wykazały, iż najczęstszym genotypem był genotyp heterozygotyczny TC, jednakże nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie (100). Z kolei w badaniu populacji rasy kaukaskiej częściej występuje genotyp TT, co koreluje z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy. Badania wykonane u tureckich dzieci z astmą ujawniły z kolei większą częstość genotypów CC i allelu C u osób zdrowych (146). Wyniki te wydają się potwierdzać zależność pomiędzy badanym polimorfizmem genu IL1, a predyspozycją do rozwoju astmy.

W niniejszych badaniach wykazano również istotny statystycznie związek polimorfizmu -511C/T genu IL1 B z czynnością płuc w okresie bezobjawowym, mierzoną za pomocą wartości FEV1, którego to porównania brak w dostępnej literaturze. Dotychczasowe badania prowadzone w populacji dorosłych palaczy wykazały natomiast, iż polimorfizm -511C/T ma związek z gwałtownym pogorszeniem czynności płuc w tej grupie osób (65), jednakże w niniejszej pracy nie potwierdzono zależności pomiędzy omawianym polimorfizmem a wartością FEV1 w okresie zaostrzenia objawów ani ze zmiennością FEV1 w czasie próby wysiłkowej, świadczącymi o nadreaktywności dróg oddechowych.

## **7.2. Polimorfizm genu dla IL 4**

W badaniu populacji pacjentów do 18 roku życia z podwyższonym całkowitym stężeniem IgE oraz dzieci chorych na astmę oskrzelową wykazano zwiększoną zawartość IL4 w kondensacie powietrza wydychanego (90). Rola tej interleukiny w patogenezie choroby i jej związek z atopią udokumentowane są w wielu badaniach, w tym w cytowanych poniżej.

Asocjacje polimorfizmów genu IL4 z astmą opisano w piśmiennictwie w 15 populacjach (105). Związek z chorobami o podłożu alergicznym i z astmą wykazano m.in. dla polimorfizmów rs2070874, rs734244, rs2243267, rs2243270 i rs2243290 (67). Również 4 inne polimorfizmy w obrębie promotora genu mogące wpływać na ekspresję IL4 są związane z występowaniem astmy u dzieci (143). Badacze niemieccy także potwierdzili związek polimorfizmów w genie IL4 z astmą dziecięcą oraz ich wpływ na stężenie IgE (71). Według danych literaturowych, korelację zmienności genetycznej *IL4* ze stężeniem IgE udowodniono dla 9 polimorfizmów, a związek z astmą dla 5 polimorfizmów (2).

Z kolei badanie kohortowe przeprowadzone przez Zhang i wsp. nie potwierdziło asocjacji analizowanych przez tę grupę badaczy polimorfizmów genu IL4 (C455+19G/T i C-33C/T) z astmą (141). Również przeprowadzone w populacji hinduskiej analizy polimorfizmu w obrębie regionu promotora nie wykazały związku z astmą (10). Pomimo przedstawionych powyżej negatywnych wyników analiz, większość badań dowodzi istotnej roli wariantów genu IL4 w patogenezie astmy.

Polimorfizm genu IL4 **rs2243250** jest dość powszechny wśród osób rasy kaukaskiej, występuje bowiem u około 27% populacji (35). Przedstawione w niniejszej pracy badania wykazały związek analizowanego polimorfizmu z astmą atopową, występowaniem objawów atopowego zapalenia skóry i z nadwrażliwością na alergeny roztoczy w grupie badanej, nie stwierdzono jednakże istotnego statystycznie wpływu tego polimorfizmu na całkowite stężenie IgE.

Przeprowadzona przez badaczy z ośrodka chińskiego metaanaliza wykazała korelację analizowanego polimorfizmu, który znajduje się w obrębie promotora genu IL4 z ryzykiem zachorowania na astmę i astmę atopową (92). Genotyp CC zmniejsza to ryzyko (tzw. genotyp protekcyjny). Podobnej asocjacji nie stwierdzono dla astmy nieatopowej (92). Badania populacji kaukaskiej potwierdziły związek analizowanego polimorfizmu z występowaniem astmy u osób dorosłych (6). Z kolei badanie dzieci z populacji koreańskiej nie ujawniło istotnych statystycznie różnic pomiędzy wariantami omawianego SNP u osób z astmą atopową, astmą

nieatopową i u osobników zdrowych, jednakże w powiązaniu z polimorfizmem genu receptora IL4-R wykazano wpływ SNP rs2243250 na zwiększenie ryzyka wystąpienia astmy (88). Również wyniki badań de Faria i wsp. nie wykazały istotnej statystycznie różnicy między występowaniem i stopniem ciężkości astmy, a polimorfizmem rs2243250 (35). Z kolei analiza przeprowadzona przez badaczy z Australii wykazała brak wpływu genotypów tego SNP na występowanie atopowego zapalenia skóry u dzieci (33). Nie potwierdzają tego badania de Faria i wsp., które ujawniły powiązanie omawianego polimorfizmu z wyższym stężeniem IgE w niektórych grupach etnicznych (Malezja) oraz z atopią, astmą, atopowym zapaleniem skóry i wartościami FEV1 w astmie (35). Wyniki podobne do rezultatów uzyskanych przez de Faria i wsp., dotyczące atopowego zapalenia skóry i atopii u chorych na astmę uzyskano w niniejszej pracy.

### **7.3. Polimorfizm genu receptora dla IL4**

W wielośrodkowym, międzynarodowym badaniu dzieci chorujących na astmę i choroby alergiczne wykazano istotną statystycznie asocjację pomiędzy polimorfizmami *IL4-R A* (rs1805015 i rs1801275) a epizodami świszczącego oddechu, występującymi w ciągu ostatniego roku oraz z dodatnimi wynikami testów skórnych i stężeniem alergenowo-swoistych IgE (37). W innym badaniu wykazano również korelację pomiędzy polimorfizmami genu IL4-R a zwiększoną odpowiedzią IgE-zależną (35). Analiza polimorfizmu Q576R nie wykazała związku tego polimorfizmu z występowaniem świstów wczesnodziecięcych u dzieci do 4 roku życia (104). Stwierdzono natomiast, iż polimorfizm ten nasila zapalenie i *remodeling* w drogach oddechowych u chorych na astmę (128). Dla innych polimorfizmów genu IL4-R również zaobserwowano istotne korelacje. Wymieniony wcześniej polimorfizm rs1805015 w populacji afroamerykańskiej chorych na astmę wykazał związek z podstawowymi parametrami czynnościowymi płuc (4). Z kolei badania dzieci chorych na astmę w Chinach i w Słowenii ujawniły istotną statystycznie asocjację pomiędzy polimorfizmem Q551R i astmą, szczególnie jej nieatopową postacią (8, 97). Ponadto Hasselmar i wsp. w swoich analizach udowodnili, iż rs2057768 może wpływać ma mniejsze nasilenie objawów

atopowego zapalenia skóry, a polimorfizm rs2107356 na mniejsze nasilenie objawów alergicznego nieżytu nosa, szczególnie związanego z nadwrażliwością na pyłki (49). Wykazano również korelację pomiędzy polimorfizmem Ile75Val genu IL4-R a stopniem ciężkości choroby u osób uczulonych na pleśnie. Dotyczy on głównie chorych z umiarkowaną i ciężką postacią astmy (81).

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza asocjacji polimorfizmów wybranych genów z przebiegiem astmy, atopią, czynnością układu oddechowego oraz nasileniem procesu zapalnego w drogach oddechowych pacjentów z astmą ujawniła istotne statystyczne różnice pomiędzy polimorfizmem **rs1805010** genu IL4-R u dzieci chorych na astmę atopową i nieatopową. Stwierdzono ponadto asocjację pomiędzy tym polimorfizmem, a nadwrażliwością na trawy i roztocza, potwierdzoną pozytywną reakcją w testach skórnych. Nie wykazano natomiast jakichkolwiek związków tego SNP z wartościami FEV1 uzyskiwanymi w badaniach spirometrycznych, ani z wartością FENO.

Według danych literaturowych omawiany polimorfizm genu IL4-R koreluje ze stopniem ciężkości astmy oskrzelowej (6, 35). W łagodnej postaci choroby częściej występuje genotyp GG. Takiej korelacji nie potwierdziły niniejsze badania. Choć w analizowanej populacji u dzieci z astmą ciężką przeważał genotyp AA, to różnica ta nie była istotna statystycznie. Istnieją również badania potwierdzające związek polimorfizmu rs1805010 z astmą o podłożu alergicznym (53). W badaniach przeprowadzonych przez Wjst i wsp. stwierdzono z kolei związek tego SNP ze stężeniem IgE, ale nie był on istotny statystycznie (138). Wyższe stężenia IgE związane były z genotypem GG (138), co potwierdza wyniki uzyskane w niniejszej analizie. Chan i wsp. potwierdzili związek tego polimorfizmu z całkowitym stężeniem IgE w grupie dzieci chorych na astmę (18, 19). W badaniach Takabayashiego i wsp. (129) także wykazano asocjację polimorfizmu rs1805010 z astmą atopową u dzieci, szczególnie u pacjentów z początkiem choroby do drugiego roku życia, co potwierdzają wyniki uzyskane w niniejszej pracy wśród dzieci starszych. Z kolei w badaniu populacji japońskiej nie stwierdzono związku omawianego SNP z występowaniem atopii ani astmy atopowej (110). Również

badanie rodzin z astmą atopową w populacji włoskiej nie potwierdziło takiego związku (106). W badaniach populacji duńskiej udowodniono natomiast, iż polimorfizm rs1805010 genu IL4-R znajduje się w nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem Ala57Thr w tym genie. Haplotyp Ile50/Thr57 w wymienionym badaniu związany był ze zmniejszeniem ryzyka rozwoju atopii (75). Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez badaczy chińskich nie znaleziono istotnych statystycznie różnic w występowaniu astmy dla tego polimorfizmu, zarówno w populacji dzieci jak i dorosłych (76, 89, 130, 141). Analiza przeprowadzona wśród dzieci w USA nie wykazała również związku rs1805010 z czynnością płuc (26), co jest zgodne z wynikami mojej pracy.

#### **7.4. Polimorfizm genu dla IL 5**

Pierwszego dowodu na związek wariantów genu IL5 z astmą dostarczyli badacze rosyjscy, którzy potwierdzili istotną statystycznie asocjację polimorfizmu C-703T z chorobą (36). Późniejsze badania ujawniły również korelację polimorfizmów genu IL5 z częstszymi napadami duszności u dzieci chorych na astmę (120). Również analiza SNP w obrębie genu receptora IL5-R A ujawniła asocjację z astmą, szczególnie wyraźną w grupie osób z astmą atopową (23). W badaniu kohortowym polimorfizmów zlokalizowanych w obrębie eksonów genu IL5, przeprowadzonym w Australii, nie stwierdzono natomiast żadnych związków z astmą (118).

Dotychczasowe analizy polimorfizmu **rs2069812** genu IL5 ujawniły związek wariantów tego polimorfizmu z czynnością płuc u dzieci z astmą w populacji koreańskiej (55). W piśmiennictwie dostępne są również dowody na korelację pomiędzy allelem T tego polimorfizmu, a mniejszym ryzykiem rozwoju atopii i astmy atopowej (70). Nie potwierdzają tego badania przeprowadzone u dzieci uczulonych na pyłki drzew oliwnych z objawami alergicznego nieżyty nosa i astmą, które nie ujawniły korelacji wariantów rs2069812 z atopią (96). Badanie kohortowe badaczy chińskich także nie wykazało związków tego polimorfizmu z astmą (141), jednakże w niniejszej pracy wykazano istotną statystycznie różnicę w rozkładzie genotypów polimorfizmu rs2069812, porównując pacjentów z nadwrażliwością na pyłki traw i roztocza kurzu.

### 7.5. Polimorfizmy genu dla IL12

W analizie przeprowadzonej w populacji chińskiej wśród chorych na astmę stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy 2 polimorfizmami *IL12* (rs568404 i rs3212227) a częstością występowania astmy (21). Z kolei dla polimorfizmów w pozycji 4237 i 6402 analizowanego genu udowodniono związek ze stopniem ciężkości tej choroby (122). Również polimorfizm pojedynczego nukleotydu w obrębie promotora genu *IL12B* ujawnił korelację ze stopniem ciężkości astmy, ale nie z rozwojem choroby (108). Nie potwierdził tego Khoo i wsp., którzy wykazali korelację pomiędzy polimorfizmami w genie *IL12* a stężeniem IgE u mężczyzn i parametrami spirometrycznymi u kobiet (74). Według danych literaturowych w badaniach prowadzonych w populacji dzieci potwierdzono również istotny statystycznie związek SNP w genie *IL12* z astmą atopową (52).

W przeprowadzonych w tej pracy analizach dwóch polimorfizmów genu *IL12* (**G378R** i **1188 A/C**) u dzieci z astmą nie stwierdzono asocjacji z badanymi parametrami. Powyższe wyniki korelują również z brakiem asocjacji tych polimorfizmów w populacji japońskiej (3, 111)

### 7.6. Polimorfizmy genu dla IL13

Wiele badań wskazuje na korelację stężenia *IL13* ze stopniem ciężkości astmy, z procesem *remodelingu* dróg oddechowych i z atopią. Według danych literaturowych u dzieci z astmą oskrzelową wzrasta liczba komórek produkujących *IL13* (99), co powoduje hiperplazję komórek kubkowych (wydzielających śluz) i zmniejszenie liczby komórek rzęskowych (131). Badanie przeprowadzone w 3 populacjach dzieci rasy kaukaskiej wykazało również związek polimorfizmów genów *IL13* ze stężeniem IgE (42). Z kolei badanie przeprowadzone w stosunkowo niewielkiej grupie dzieci chińskich chorych na astmę, w którym analizowano 7 polimorfizmów w genach *IL13* i *IL4* nie potwierdziło związku tych polimorfizmów z astmą (64). Do podobnych wniosków odnośnie korelacji pomiędzy SNP w obrębie genu *IL13* a występowaniem astmy oraz ciężkością choroby doszli DeMeo i wsp. (27). Niezależnie od wyników badań genetycznych, większość badaczy jest zgodna co do powiązania *IL13* z atopią i stopniem nasilenia astmy. Odnotowano

ponadto korelację polimorfizmów genu IL13 z podstawowymi parametrami czynności płuc w populacji afroamerykańskiej chorych na astmę (rs2069743) oraz u dzieci w Korei (polimorfizm +2044G/A) i związek z ryzykiem wystąpienia choroby (polimorfizm +2044G/A) (4, 77, 114).

Z kolei w badaniach przeprowadzonych w populacji egipskiej, pomimo asocjacji polimorfizmów genu IL13 ze stężeniem IgE, nie stwierdzono związku polimorfizmu +1398 genu IL13 z występowaniem alergicznego nieżytu nosa u dzieci (58). Koreluje to z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy, bowiem analiza wpływu polimorfizmów wybranych interleukin i ich receptorów na występowanie alergicznego nieżytu nosa nie wykazała istotnych statystycznie różnic dla żadnego spośród analizowanych polimorfizmów. Związek polimorfizmów *IL13* (rs1881457 i rs1800925) z zapaleniem błony śluzowej nosa wykazano natomiast w badaniu przeprowadzonym u pacjentów z astmą aspirynową (113).

Na podstawie przeprowadzonych wcześniej analiz wykazano związek trzech polimorfizmów genu IL13 (**rs1881457**, **rs20541**, **rs1800925**) z ryzykiem atopii (7), czego nie potwierdzono w niniejszym badaniu dla polimorfizmu rs1800925. U astmatyków uzyskano także zależność pomiędzy wartościami FEV1 i polimorfizmami rs1800925 i rs1881457 (7), co potwierdziły wyniki moich badań. Dla polimorfizmu rs1881457 stwierdzono korelację z wartością FEV1 w okresie bezobjawowym i w zaostrzeniu, podczas gdy dla polimorfizmu rs1800925 wykazano wpływ na wartości FEV1 uzyskiwane w okresie zaostrzenia objawów choroby. Jednocześnie w moim badaniu ujawniono nie stwierdzaną wcześniej zależność pomiędzy polimorfizmem rs20541 a parametrami spirometrycznymi w okresie wolnym od objawów. Z kolei badania rs1800925 i rs20541 przeprowadzone przez badaczy rosyjskich nie potwierdziły asocjacji tych polimorfizmów z rozwojem astmy i ze stężeniem IgE (29), podczas gdy w mojej pracy korelację z całkowitym stężeniem IgE stwierdziłam nie tylko dla polimorfizmu rs20541, ale również dla rs1881457. W innym badaniu, przeprowadzonym u dzieci z astmą atopową, potwierdzono asocjację SNP rs1881457 i rs1800925 ze zwiększonym całkowitym stężeniem IgE (78). Autorzy rosyjscy ustalili natomiast

korelację pomiędzy analizowanymi polimorfizmami a stopniem ciężkości choroby (29), i tę zależność uzyskałam w moim badaniu dla polimorfizmu rs20541. Dodatkowo w moim badaniu wykazałam związek polimorfizmu rs1881457 ze stopniem ciężkości choroby, którego badacze rosyjscy nie stwierdzili. Udowodniłam również asocjację polimorfizmu rs1881457 z nadwrażliwością na pyłki traw i roztocza kurzu.

Dotychczasowe badania polimorfizmu rs1800925 genu *IL13* wskazały na silną korelację pomiędzy tym SNP a ciężkim przebiegiem astmy, objawami ANN i dodatnim wynikiem testów skórnych oraz z podwyższonym całkowitym stężeniem IgE (37). Również badania kohortowe dowodzą jego istotnej roli w patogenezie astmy oskrzelowej (12). Korelacje tego polimorfizmu z astmą i alergią potwierdzono również badając populację afroamerykańskich dzieci ze środowiska miejskiego (67). Genotyp TT tego polimorfizmu wykazywał istotne statystycznie korelacje z występowaniem atopowego zapalenia skóry (107), czego nie potwierdzono w obecnej analizie. W dotychczasowych badaniach wykazano również asocjację pomiędzy allelem T a wzrostem stężenia IgE (140) i asocjację tego allelu z ryzykiem wystąpienia zaostrzeń astmy w populacji dzieci z Kostaryki, stosujących wziewne preparaty glikokortykosteroidowe (57). Badania potwierdziły również udział polimorfizmu rs1800925 w mechanizmie autoregulacji genowej, stwierdzono bowiem iż allel T poprzez wpływ na aktywność promotora genu *IL13* moduluje transkrypcję tego genu (16). Analizowany polimorfizm wykazuje również znaczącą asocjację z ostrą infekcją wirusem RS, jednakże nie jest do końca jasne, czy infekcja ta wywołuje astmę, czy tylko dotyka osób, które z powodu genetycznej predyspozycji (przewaga odpowiedzi Th2) w przyszłości ją rozwiną (121). Oprócz niewątpliwej roli w patogenezie astmy, potwierdzonej licznymi badaniami, polimorfizm rs1800925 może również mieć wpływ na przebieg terapii. Badania ujawniły bowiem jego asocjację z odpowiedzią na montelukast (73), czego nie stwierdzono dla innych polimorfizmów genu *IL13*.

Z kolei analizy innego polimorfizmu *IL13* – rs20541, podobnie jak w przypadku poprzedniego polimorfizmu również dowiodły silnej korelacji pomiędzy tym SNP a



astmą, alergią, ciężkim przebiegiem astmy, objawami alergicznego nieżyty nosa i dodatnim wynikiem testów skórnych (12, 37, 67, 141). Stwierdzono ponadto związek powyższego polimorfizmu ze stężeniem IgE (14, 37, 57) oraz z eozynofilią (14, 57). Również badania prowadzone w populacji dzieci chorych na astmę potwierdziły związek rs20541 ze stężeniem IgE w tej grupie (19). W badaniach Miyake i wsp. zaobserwowano natomiast istotną statystycznie korelację genotypu AA z występowaniem atopowego zapalenia skóry (107). Taką zależność potwierdzają również wyniki mojej pracy. Ponadto wykazałam także związek SNP *rs20541* z nadwrażliwością na roztocza kurzu. Nie potwierdziłam natomiast korelacji omawianego polimorfizmu z wartościami FEV1 uzyskiwanymi w okresie zaostrzenia, ani ze zmiennością FEV1 w czasie próby wysiłkowej. Chen i wsp. zaobserwowali asocjację wariantu Q polimorfizmu rs20541 ze zwiększoną nadreaktywnością dróg oddechowych (22). Koreluje to z uzyskanymi przeze mnie wynikami dotyczącymi istotnego statystycznie związku pomiędzy SNP rs1881457 i rs20541, a wartością FENO, którego stężenie jest wykładnikiem nasilenia reakcji zapalnej w drogach oddechowych. Analiza interakcji gen-gen pozwoliła także na ustalenie udziału omawianego polimorfizmu *IL13* wraz z polimorfizmem rs1805010 genu *IL4-R* w patogenezie astmy (18).

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach wykazano asocjacje wszystkich 3 polimorfizmów *IL13* z astmą oskrzelową.

### **7.7. Polimorfizmy genu dla IL 15**

Badacze niemieccy potwierdzili związek polimorfizmu rs10519613 genu *IL15* z astmą (9). Natomiast badania przeprowadzone przez Christensen i wsp. wśród rodzin obciążonych chorobami o podłożu alergicznym nie wykazały asocjacji polimorfizmów genu *IL15* (rs3806798, rs1519551, rs2322262, rs1493012) z fenotypem atopowym (25). Z kolei Kurz i wsp. w swojej analizie 5 polimorfizmów genu *IL15* nie stwierdzili korelacji tych SNP z astmą ani atopią, jednakże analiza haplotypów za pomocą metody FAMHAP ujawniła różnice w ich występowaniu między chorymi na astmę a grupą kontrolną (83).

W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach dla 2 spośród analizowanych polimorfizmów *IL15* (**rs2254514**, **rs10833**) nie stwierdzono żadnych korelacji z astmą oskrzelową, atopią, wartościami FEV1 uzyskiwanymi w spirometrii ani wartością FENO.

Wśród analizowanych polimorfizmów genu *IL15* korelacje z astmą stwierdzono dla **rs10519613**, co potwierdza rezultaty uzyskane przez Bierbauma i wsp. (9). Warianty tego polimorfizmu związane są ze stopniem ciężkości choroby oraz ze zmiennością FEV1 uzyskaną w czasie próby wysiłkowej. Potwierdzono ponadto jego asocjację z nadwrażliwością na roztocza kurzu oraz różnicę pomiędzy chorymi na astmę atopową i nieatopową w zakresie genotypu tego polimorfizmu. Z kolei dla polimorfizmu **rs1057972** wykazano związek ze stężeniem NO w powietrzu wydychanym. Uzyskane rezultaty sugerują konieczność prowadzenia dalszych badań, celem określenia roli omawianego polimorfizmu genu *IL15* w patogenezie astmy oskrzelowej.

### **7.8. Polimorfizm genu dla *IL18***

Udział polimorfizmów genów *IL18* w patogenezie astmy jest dość kontrowersyjny, albowiem większość prowadzonych do tej pory badań nie wykazała ich związku z chorobą. Brak powiązań *IL18* z astmą potwierdzają badania Roviny i wsp., którzy stwierdzili iż stężenie *IL18* w płwocinie chorych na astmę i zdrowych osobników jest znacznie niższe u osób palących niż u niepalących, niezależnie od tego czy chorowały one na astmę (124). Również w badaniach populacji tunezyjskiej nie potwierdzono związków wariantów *IL18* ze stopniem ciężkości astmy, ani ze stężeniem IgE (84). Pomimo tych danych, pojawiają się w literaturze doniesienia o korelacji polimorfizmów *IL 18* z astmą i alergią. Wykazano na przykład asocjację pomiędzy polimorfizmami genu *IL18*, a stężeniem IgE alergenowo-specyficznych dla roztoczy (126). Z kolei analizy polimorfizmów w regionie promotora genu wykazały istotną statystycznie korelację z astmą (84, 98). Jedno z nielicznych badań populacji polskiej, dotyczące 2 polimorfizmów w regionie promotora (C-137G i C-607G) analizowanych jako diplotyp ujawniło ich związek ze stopniem ciężkości choroby (116).

Analiza polimorfizmu **rs549908** w populacji chińskiej wykazała, iż genotyp CC zwiększa ryzyko wystąpienia astmy (87). W innym badaniu zaobserwowano z kolei związek allelu A tego polimorfizmu z astmą, nie stwierdzono natomiast asocjacji rs549908 ze stężeniem IgE w astmie (51). Stwierdzono równocześnie, iż polimorfizm ten znajduje się w nierównowadze sprzężeń z polimorfizmem G-137C regionu flankującego 5' (51). Powyższe wyniki nie znalazły odzwierciedlenia w niniejszej pracy, albowiem w badanej grupie pacjentów nie stwierdzono istotnego statystycznie związku polimorfizmu rs549908 z analizowanymi parametrami u pacjentów z astmą.

### **7.9. Polimorfizm genu receptora dla IL18**

Badania przeprowadzone w populacji duńskiej, brytyjskiej i norweskiej potwierdziły asocjację polimorfizmów genu receptora IL18-R z astmą, astmą atopową i nadreaktywnością dróg oddechowych. Korelacje te dotyczyły odpowiednio 5 SNP (rs2287037, rs1420099, rs1420098, rs1362348 i rs1974675), 5 SNP (rs 1420099, rs1362348, rs2058622, rs1974675 i rs1420094) i 3 SNP (rs1420099, rs1362348 i rs1974675) (144). Analiza polimorfizmu **rs2270297** w niniejszej pracy wykazała natomiast związek omawianego polimorfizmu genu IL18-R z kilkoma analizowanymi parametrami. Asocjację tego polimorfizmu stwierdzono w przypadku stopnia ciężkości astmy i wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby, jak również pomiędzy grupą chorych na astmę atopową i dziećmi z astmą nieatopową. Stwierdzono ponadto korelację polimorfizmu rs2270297 z nadwrażliwością na pyłki traw i roztocza kurzu.

\* \* \*

Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy dowodzą, iż polimorfizmy genów wybranych interleukin i ich receptorów odgrywają istotną rolę w patogenezie astmy oskrzelowej. Mogą one wpływać zarówno na występowanie astmy, jak i jej przebieg, stopień ciężkości choroby, obecność atopii oraz czynność układu oddechowego. Dostępne dane literaturowe potwierdzają wyniki uzyskane w

## DYSKUSJA

niniejszej pracy. Z uwagi na brak grupy kontrolnej, utrudniający weryfikację wyników oraz stosunkowo małą liczebność grupy badanej, związaną z rygorystycznymi kryteriami doboru pacjentów (nadwrażliwość tylko na 1 alergen w grupie chorych z astmą atopową, wykluczenie czynnej i biernej ekspozycji na dym tytoniowy w okresie ostatnich 2 lat poprzedzających badanie) zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki wymagają prowadzenia dalszych badań, celem potwierdzenia uzyskanych rezultatów.

## 8. WNIOSKI

1. Polimorfizmy badanych genów interleukin i ich receptorów mogą wpływać na przebieg astmy u dzieci. Związek z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów wykazano dla polimorfizmu genu IL18-R, natomiast polimorfizmy genów IL13, IL15 i IL18-R korelowały ze stopniem ciężkości choroby.  
Nie stwierdzono związku badanych polimorfizmów z koniecznością stosowania steroidoterapii ogólnoustrojowej.
2. Badane polimorfizmy genów dla IL4, IL4-R A, IL13, IL15 i IL18-R wykazują związek z obecnością atopii u chorych na astmę. Ponadto polimorfizmy genów dla IL4 i IL13 mają związek z występowaniem atopowego zapalenia skóry.  
Zarówno uczulenie na pyłki traw, jak i uczulenie na roztocza są związane z polimorfizmami genów dla IL4-R A, IL13 i IL18-R. Różnice u chorych z uczuleniem na pyłki traw i roztocza dotyczą polimorfizmów genów dla IL4, IL5 i IL15.  
Na stężenie IgE mają wpływ polimorfizmy genu dla IL13.
3. Analizowane polimorfizmy korelują z czynnością układu oddechowego ocenianą na podstawie wartości FEV1 w okresie bezobjawowym (dla genu IL1 B i IL13), wartości FEV1 w okresie zaostrzenia (dla genu IL13), zmienności FEV1 w próbie prowokacji (dla genu IL15).  
Wartość stężenia FENO zależna jest od polimorfizmów genów IL13 i IL15.

## 9. PIŚMIENICTWO

1. Allen M, Heinzmann A, Noguchi E i wsp. Positional cloning of a novel gene influencing asthma from chromosome 2q14. *Nat Genet.* 2003; 35(3):258-63.
2. Basehore MJ, Howard TD, Lange LA i wsp. A comprehensive evaluation of IL-4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(1):80-7.
3. Bassuny WM, Ihara K, Kimura J i wsp. Association study between interleukin-12 receptor beta1/beta2 genes and type 1 diabetes or asthma in the Japanese population. *Immunogenetics.* 2003; 55(3):189-92.
4. Battle NC, Choudhry S, Tsai HJ i wsp. Ethnicity-specific gene-gene interaction between IL-13 and IL-4R alpha among African Americans with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175(9):881-7.
5. Beasley R, Clayton T, Crane J i wsp. Association between paracetamol use in infancy and childhood, and risk of asthma, rhinoconjunctivitis, and eczema in children aged 6-7 years: analysis from Phase Three of the ISAAC programme. *Lancet* 2008; 372(9643):1039-1048.
6. Beghe B, Barton S, Rorke S i wsp. Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33(8):1111-7.
7. Beghe B, Hall IP, Parker SG i wsp. Polymorphisms in IL-13 pathway genes in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Allergy.* 2010; 65(4):474-81.
8. Berce V, Potocnik U. Association of Q551R polymorphism in the interleukin-4 receptor gene with nonatopic asthma in Slovenian children. *Wien Clin Wochenschr.* 2010; (Suppl 2):11-8.
9. Bierbaum S, Nickel R, Zitnik S i wsp. Confirmation of association of IL-15 with pediatric asthma and comparison of different controls. *Allergy.* 2006; 61(5):576-80.

10. Bijanzadeh M, Ramachandra NB, Mahesh PA i wsp. Association of IL-4 and ADAM33 gene polymorphisms with asthma in an Indian population. *Lung*. 2010; 188(5):415-22.
11. Bisgaard H, Szeffler S. Prevalence of asthma-like symptoms in young children. *Pediatr Pulmonol* 2007; 42(8):723-8.
12. Black S, Teixeira AS, Loh AX i wsp. Contribution of functional variation in the IL-13 gene to allergy, hay fever and asthma in the NSHD longitudinal 1946 birth cohort. *Allergy*. 2009; 64(8):1172-8.
13. Blair H. Natural history of childhood asthma: 20-year follow-up. *Arch Dis Child* 1997; 52(8):613-9.
14. Bottema RW, Reijmerink NE, Kerkhof M i wsp. Interleukin-13, CD-14, pet and tobacco smoke influence atopy in three Dutch cohorts: the allergenic study. *Eur Respir J*. 2008; 32(3):593-602.
15. Bręborowicz A, Światły A, Alkiewicz J, Moczko J. Występowanie chorób alergicznych u dzieci szkolnych miasta Poznania w świetle badań epidemiologicznych ISAAC. *Nowa Pediatria* 1998; 6:6-9.
16. Cameron L, Webster RB, Stempel JM i wsp. Th2 cell-selective enhancement of human IL-13 transcription by IL-13-1112C>T, a polymorphism associated with allergic inflammation. *J Immunol*. 2006; 177(12):8633-42.
17. Carpe N, Mandeville I, Ribeiro L, Ponton A i wsp. Genetic influences on asthma susceptibility in the developing lung. *Am J Respir Cell Moll Biol*. 2010; 43(6):720-30.
18. Chan IH, Leung TF, Tang NI i wsp. Gene-gene interaction for asthma and plasma total IgE concentration in Chinese children. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(1):127-33.
19. Chan IH, Tang NL, Leung TF i wsp. Study of gene-gene interactions for endophenotypic quantitative traits in Chinese asthmatic children. *Allergy*. 2008; 63(8):1031-9.
20. Chen J, Yuan YS, Li Q i wsp. Interleukin-27 affects IFN-gamma and IL-4 activities in children with asthma. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010; 12(7):521-3.

21. Chen T, Liang W, Gao L i wsp. Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin-12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population. *Hum Immunol.* 2011; 72(7):603-6.
22. Chen W, Ericksen MB, Levin LS i wsp. Functional effect of the R110Q IL-13 genetic variant alone and in combination with IL-4RA genetic variants. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(3):553-60.
23. Cheong HS, Kim LH, Park BL i wsp. Association analysis of interleukin-5 receptor alpha subunit (IL-5RA) polymorphisms and asthma. *J Hum Genet.* 2005; 50(12):628-34.
24. Chin Gk, Adams Cl, Carey BS i wsp. The value of serum neopterin, interferon-gamma levels and interleukin-12B polymorphisms in predicting acute renal allograft rejection. *Clin Exp Immunol.* 2008; 152(2):239-44.
25. Christensen U, Haagerup A, Binderup HG i wsp. Family based association analysis of the IL-2 and IL-15 genes in allergic disorders. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14(2):227-35.
26. Cortina SD, Drotar D, Ericksen M i wsp. Genetic biomarkers of health-related quality of life in pediatric asthma. *J Pediatr.* 2011; 159(1):21-26.
27. DeMeo DL, Lange C, Silverman EK i wsp. Univariate and multivariate family-based association analysis of the IL-13 ARG130GLN polymorphism in the Childhood Asthma Management Program. *Genet Epidemiol.* 2002; 23(4):335-48.
28. Diepgen TL, Blettner M. Analysis of familial aggregation of atopic eczema and other atopic diseases by ODDS RATIO regression models. *J Invest Dermatol* 1996; 106(5):977-87.
29. Dmitrieva-Zdorova EV, Voronko OE, Aksenova MG i wsp. Association of interleukin-13 gene polymorphisms with atopic bronchial asthma. *Genetica.* 2010; 46(1):111-7.
30. Dold S, Wjst M, von Mutius E i wsp. Genetic risk for asthma, allergic rhinitis, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 1992; 67(9): 1018-22.
31. Duffy DL, Martin MG, Battistutta D i wsp. Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(12):1351-58.



32. Eisner MD, Katz PP, Yelin EH i wsp. Risk factors for hospitalization among adults with asthma: the influence of sociodemographic factors and asthma severity. *Respir Res.* 2001; 2(1):53-60.
33. Elliott K, Fitzpatrick E, Hill D i wsp. The -590C/T and -34C/T interleukin-4 promoter polymorphisms are not associated with atopic eczema in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108(2):285-7.
34. Emeryk A, Bręborowicz A, Lis G. *Astma i choroby obturacyjne u dzieci.* Elsevier Urban&Partner, Wrocław 2010.
35. de Faria IC, de Faria EJ, Toro AA i wsp. Association of TGF-beta1, CD-14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. *J Pediatr. (Rio J).* 2008; 84(3):203-10.
36. Freidin MB, Puzyrev VP, Ogorodova LM i wsp. Polymorphism of interleukins and interleukin receptor genes: population distribution and association with atopic bronchial asthma. *Genetika.* 2002; 38(12):1710-8.
37. Genuneit J, Cantelmo JL, Weinmayr G i wsp. A multi-centre study of candidate genes for wheeze and allergy: the international Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase 2. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39(12):1875-88.
38. di Giovine FS, Takhsh E, Blakemore AI i wsp. Single base polymorphism at-511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1beta). *Hum Mol Genet.* 1992; 1(6):450.
39. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma GINA Update 2006. <http://www.ginasthma.org>.
40. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma GINA Update 2008. <http://www.ginasthma.org>.
41. Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia.* PWN Warszawa 2010.
42. Graves PE, Kabesch M, Halonen M i wsp. 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):506-13.
43. Hagendorens MM, Ebo DG, Bridts Ch i wsp. Flow cytometrical determination of regulatory cytokines (IL-10, IL-12) and circulating dendritic cell cytokines in allergic asthmatic children. *Cytokine.* 2004; 21; 26(2): 82-8.

44. Hakonarson H, Maskeri N, Carter C i wsp. Autocrine interaction between IL-5 and IL-1 beta mediates altered responsiveness of atopic asthmatic sensitized airway smooth muscle. *J Clin Invest.* 1999; 104(5):657-67.
45. Halapi E, Gudbjarysson DF, Jonsdottir GM i wsp. A sequence variant on 17q21 is associated with age at onset and severity of asthma. *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(8):902-8.
46. Hang LW, Hsia TC, Chen WC i wsp. Interleukin-10 gene -627 allele variants, not interleukin-1 beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms, are associated with atopic bronchial asthma. *J Clin Lab Anal.* 2003; 17(5):168-73..
47. Heinzmann A, Brugger M, Bierbaum S i wsp. Joint influences of Acidic-Mammalian-Chitinase with interleukin-4 and Toll-like receptor-10 with interleukin-13 in the genetics of asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010; 21(4 Pt 2):e679-86.
48. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M i wsp. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mo 1 Genet.* 2000; 1; 9(4):549-59.
49. Hesselmar B, Bergin AM, Park H i wsp. Interleukin-4 receptor polymorphisms in asthma and allergy: relation to different disease phenotypes. *Acta Pediatr.* 2010; 99(3):399-403.
50. Hesselmar B, Enelund AC, Eriksson B i wsp. The heterogeneity of asthma phenotypes in children and young adults. *J Allergy (Cairo).* 2012; 2012: 163089.
51. Higa S, Hirano, T, Mayumi M i wsp. Assotiation between interleukin-18 gene polymorphism 105A/C and asthma. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33(8):1097-102.
52. Hirota T, Suzuki Y, Hasegawa K i wsp. Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 116(4):789-95.
53. Hoebee B, Rietveld E, Bont L i wsp. Association of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis with interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha polymorphisms. *J Infect Dis.* 2003; 187(1):2-11.
54. Hong SJ, Kim HB, Kang MJ i wsp. TNF-alfa (-308 G/A) and CD14 (-159T/C) polymorphisms in the bronchial responsiveness of Korean children with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 119(2):398-404.

55. Hong SJ, Lee SY, Kim HB i wsp. IL-5 and thromboxane A2 receptor gene polymorphisms are associated with decreased pulmonary function in Korean children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(4):758-63.
56. Hosseini-Farahabadi S, Tavakkol-Afshari J, Rafatpanah H i wsp. Association between the polymorphisms of IL-4 gene promoter (-590C>T), IL-13 coding region (R130Q) and IL-16 gene promoter (-295T>C) and allergic asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2007; 6(1):9-14.
57. Hunninghake GM, Soto-Quiros ME, Avila L i wsp. Polymorphisms in IL-13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120(1):84-90.
58. Hussein Ym, El-Tarhouny SA, Shalby SM i wsp. Interleukin-13 receptor A1 gene polymorphism and IL-13 serum level in atopic and non-atopic Egyptian children. *Immunol Invest*. 2011; 40(5):523-34.
59. Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF i wsp. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet*. 2005; 14(7):935-41.
60. Ichikawa K, Baba M, Yoshizawa I i wsp. Interleukin 1 production by peripheral blood mononuclear cells of children with bronchial asthma in remission. *Alerugi*. 1995; 44(9):1132-9.
61. Imaoka H, Gauvreau GM, Watson RM i wsp. Interleukin-18 and Interleukin-18 receptor- alfa expression in allergic asthma. *Eur Respir J*. 2011; 38(4):981-3.
62. Jerzyńska J, Stelmach W, Majak P i wsp. Effect of specific immunotherapy on serum levels of tumor necrosis factor alpha in asthmatic children. *Allergy Asthma Proc*. 2008; 29(3):274-9.
63. Jędrychowski W, Flak E, Mróz E i wsp. Uczulenie na alergeny wziewne u dzieci szkolnych z astmą oskrzelową. *Przegl Lek* 2000; 57:441-445.
64. Jiang P, Liu J, Yan XB i wsp. Several interleukin-4 and interleukin-13 gene single nucleotide polymorphisms among Chinese asthmatic patients. *Allergy Asthma Proc*. 2009; 30(4):413-8.
65. Joos L ,McIntyre L, Ruan J i wsp. Association of IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist haplotypes with rate of decline in lung function in smokers. *Thorax*. 2001; 56(11):863-6.

66. Joos GF, O Connor B. Indirect airway challenges. *Eur Respir J.* 2003; 21(5):1050-1068.
67. Joubert BR, Reif DM, Edwards SW i wsp. Evaluation of genetic susceptibility to childhood allergy and asthma in an African American urban population. *BMC Medical Genetics* 2011; (12):25
68. Jung MY, Kang SW, Kim SK i wsp. The interleukin-1 family gene polymorphisms in Korean patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2010; 39(3):190-6.
69. Kabesch M. Candidate genes and the genetic epidemiology of asthma. *Paediatric Respiratory Reviews.* 2004; 5(Suppl A):23-5
70. Kabesch M, Depner M, Dahmen I i wsp. Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy. *Allergy.* 2007; 62(4):423-8.
71. Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D i wsp. A complete screening of the IL-4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112(5):893-8.
72. Kabesch M, Schedel M, Carr D i wsp. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117(2):269-74.
73. Kang MJ, Lee SY, Kim HB i wsp. Association of IL-13 polymorphisms with leukotriene receptor antagonist drug responsiveness in Korean children with exercise-induced bronchoconstriction. *Pharmacogenet Genomics.* 2008; 18(7):551-8.
74. Khoo SK, Hayden Cm, Roberts M i wsp. Associations of the IL-12 promoter polymorphisms in longitudinal data from asthmatic patients 7 to 42 years of age. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113(3):475-81.
75. Khoo SK, Zhang G, Backer V i wsp. Associations of a novel IL-4RA polymorphism, Ala57Thr, in Greenlander Inuit. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 118(3):627-34.
76. Kim HA, Heo YJ, Lee SH i wsp. No potential role of genetic polymorphisms for IL-4, IL-13 and IL-4 receptor in respiratory allergy: a study in adults working at social welfare facilities in Korea. *J UOEH.* 2006; 1; 28(4):369-79.

77. Kim HB, Kang MJ, Lee SY i wsp. Combined effect of tumor necrosis factor –alpha and interleukin-13 polymorphisms on bronchial hyperresponsiveness in Korean children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008; 38(5):774-80.
78. Kim HB, Lee YC, Lee SY i wsp. Gene- gene interaction between IL-13 and IL-13Ra1pha1 is associated with total IgE in Korean children with atopic asthma. *J Hum Genet*. 2006; 51(12):1055-62.
79. Kim SD, Park JM, Kim IS i wsp. Association of IL-1 beta, IL-1 ra, and TNF-alpha gene polymorphisms in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2004; 19(3):295-9.
80. Klinnert MD, Nelson HS, Price MR i wsp. Onset and persistence of childhood asthma: predictors from infancy. *Pediatrics* 2001; 108(4):e69.
81. Knutsen AP, Vijay HM, Kariuki B i wsp. Association of IL-4Ra single nucleotide polymorphisms, HLA-DR and HLA-DQ in children with Alternaria-sensitive moderate-severe asthma. *Clin Mol Allergy*. 2010; 18(8):5.
82. Kormann MS, Carr D, Klopp i wsp. G-Protein-coupled receptor polymorphisms are associated with asthma in a large German population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171(12):1358-62.
83. Kurz T, Strauch K, Dietrich H i wsp. Multilocus haplotype analyses reveal association between 5 novel IL-15 polymorphisms and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(5):896-901.
84. Lachheb J, Chelbi H, Ammar J i wsp. Promoter polymorphism of the IL-18 gene is associated with atopic asthma in Tunisian children. *Int J Immunogenet*. 2008; 35(1):63-8.
85. Lama M, Chatterjee M, Nayak CR i wsp. Increased interleukin-4 and decreased interferon-gamma levels in serum of children with asthma. *Cytokine* 2011; 55(3):335-8.
86. Lee BC, Ahn SY, Doo HK i wsp. Susceptibility for ischemic stroke in Korean population is associated with polymorphisms of the interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha genes, but not the interleukin-1 beta gene. *Neurosci Lett*. 2004; 26; 357(1):33-6.
87. Lee CC, Lin WY, Wan L i wsp. Association of interleukin-18 gene polymorphism with asthma in Chinese patients. *J Clin Lab Anal*. 2008; 22(1):39-44.

88. Lee SG, Kim BS, Kim JH i wsp. Gene-gene interaction between interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha in Korean children with asthma. *Clin Exp Allergy*. 2004; 34(8):1202-8.
89. Leung TF, Tang NL, Chan IH i wsp. Distribution in allele frequencies of predisposition-to-atopy genotypes in Chinese children. *Pediatr Pulmonol*. 2002; 34(6):419-24.
90. Leung TF, Wong GW, Ko FW i wsp. Analysis of growth factors and inflammatory cytokines in exhaled breath condensate from asthmatic children. *Int Arch Allergy Immunol*. 2005; 137(1):66-72.
91. Li H, Xiaoyan D, Quanhua L i wsp. Single-nucleotide polymorphisms in genes predisposing to asthma in children of Chinese Han nationality. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(5):391-5.
92. Li Y, Guo B, Zhang L i wsp. Association between C-589T polymorphisms of interleukin-4 gene promoter and asthma: a meta-analysis. *Respir Med*. 2008; 102(7):984-92.
93. Lim WY, Chen Y, Ali SM i wsp. Polymorphisms in inflammatory pathway genes, host factors and lung cancer risk in Chinese female never-smokers. *Carcinogenesis* 2011; 32(4):522-9.
94. Lis G, Cichoń-Jarosz E, Gazurek D i wsp. Powiązanie atopii z nadreaktywnością oskrzeli u dzieci szkolnych. *Przegl Lek* 2002; 59(10):780-784.
95. Lis G, Pietrzyk JJ, Cichoń-Jarosz E i wsp. Astma oskrzelowa: kto choruje częściej dziewczęta czy chłopcy?. *Przegl Lek*. 1997; 54(9):620-4.
96. Llanes E, Quiralte J, Lopez E i wsp. Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL-13, IL-4RA, IL-5 and ADRB2 genes. *Int Arch Immunol*. 2009; 148(3):228-38.
97. Lv J, Liu Q, Hua L i wsp. Association of five single nucleotide polymorphism loci with asthma in children of Chinese Han nationality. *J Asthma*. 2009 ; 46(6):582-5.
98. Ma Y, Zhang B, Tang RK, i wsp. Interleukin-18 promoter polymorphism and asthma risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(2):1371-6.

99. Machura E, Mazur B, Rusek-Zychma M, Barć-Czarnecka M. Cytokine production by peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells in atopic childhood asthma. *Clin Dev Immunol*, 2010; (2010): artykuł nr 606139.
100. Mahdavian SA, Rezaei N, Moradi B i wsp. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Iranian patients with asthma. *J Clin Immunol*. 2009; 29(1):57-62.
101. Mao XQ, Kawai M, Yamashita T i wsp. Imbalance production between interleukin -1 beta (IL-beta) and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) in bronchial asthma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 24; 276(2):607-12.
102. Martinez FD, Wright AL, Taussing LM i wsp. Asthma and wheezing in the first six years of life. *N Engl J Med* 1995; 332(3):133-138.
103. Melen E, Bruce S, Doekes G i wsp. Haplotypes of G protein-coupled receptor 154 are associated with childhood allergy and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 15; 171(10):1089-95.
104. Melen E, Umerkajeff S, Nyberg F i wsp. Interaction between variants in the interleukin-4 receptor alpha and interleukin-9 receptor genes in childhood wheezing: evidence from a birth cohort study. *Clin Exp Allergy*. 2006; 36(11):1391-8.
105. Michel S, Liang L, Depner M i wsp. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PLoS One*. 2010; 12; 5(11):e13894.
106. Migliaccio C, Patuzzo C, Malerba G i wsp. No linkage or association of five polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha gene with atopic asthma in Italian families. *Eur J Immunogenet*. 2003; 30(5):349-53.
107. Miyake Y, Kiyohara C, Koyanagi M i wsp. Case-control study of eczema associated with IL-13 genetic polymorphisms in Japanese children. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011; 154(4):328-35.
108. Morahan G, Huang D, Wu M i wsp. Association of IL-12B promoter polymorphisms with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet*. 2002; 10; 360(9331):455-9.

109. Morais–Almeida M, Gaspar A, Pires G i wsp. Risk factors for asthma symptoms at school age: an 8-year prospective study. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28(2):183-9.
110. Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T i wsp. No association between atopy/asthma and the IL e50Val polymorphism of IL-4 receptor. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 160(1):342-5.
111. Noguchi E, Yokouchi Y, Shibasaki M i wsp. Identification of missense mutation in the IL-12B gene: lack of association between IL-12B polymorphisms and asthma and allergic rhinitis in the Japanese population. *Genes Immun*. 2001; 2(7):401-3.
112. Norman E, Gnarpe J, Wettergren B i wsp. Association between Chlamydia pneumoniae antibodies and wheezing in young children and the influence of sex. *Thorax* 2006; 61(12):1054-8.
113. Palikhe NS, Kim SH, Cho BY i wsp. IL-13 gene polymorphisms are associated with rhinosinusitis and eosinophilic inflammation in aspirin intolerant asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2010; 2(2):134-40.
114. Park HW, Lee JE, Kim SH i wsp. Genetic variation of IL-13 as a risk factor of reduced lung function in children and adolescents: a cross-sectional population-based study in Korea. *Respir Med*. 2009; 103(2):284-8.
115. Patel SP, Jarvelin MR, Little MP. Systematic review of worldwide variations of the prevalence of wheezing symptoms in children. *Environ Health* 2008; (7):57.
116. Pawlik A, Kaminski M, Kuśnierczyk P i wsp. Interleukin-18 promoter polymorphism in patients with atopic asthma. *Tissue Antigens*. 2007; 70(4):314-8.
117. Pellegrino M, Minervini B, Musto P i wsp. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. Two possible mediators of allergic inflammation. *Minerva Pediatr*. 1996; 48(7-8):309-12.
118. Pereira E, Goldblatt J, Rye P i wsp. Mutation analysis of interleukin-5 in an asthmatic cohort. *Hum Mutat*. 1998; 11(1):51-4.
119. Pinto LA, Stein RT, Kabesch M. Impact of genetics in childhood asthma. *J Pediatr (Rio J)*. 2008 ; 84(Suppl 4):68-75.
120. Pukelsheim K, Stoeger T, Kutschke D i wsp. Cytokine profiles in asthma families depend on age and phenotype. *PLoS One* 2010; 5(12):e14299.



121. Puthothu B, Krueger M, Forster J i wsp. Association between severe respiratory syncytial virus infection and IL-13/IL-4 haplotypes. *J Infect Dis.* 2006; 1; 193(3):438-41.
122. Randolph AG, Lange C, Silverman EK i wsp. The IL-12B gene is associated with asthma. *AM J Hum Genet.* 2004; 75(4):709-15.
123. Reijmerink NE, Postma DS, Koppelman GH. The candidate gene approach in asthma: what happens with the neighbours? *Eur J Hum Genet.* 2010; 18(1):17.
124. Rovina N, Dima E, Gerassimou C i wsp. IL- 18 in induced sputum and airway hyperresponsiveness in mild asthmatics: effect of smoking. *Respir Med.* 2009; 103(12):1919-25.
125. Sarafino EP, Goldfedder J. Genetic factors in the presence, severity, and triggers of asthma. *Arch Dis Child.* 1995; 73(2):112-6.
126. Shin Hd, Kim LH, Park BL i wsp. Association of interleukin-18 (IL-18) polymorphisms with specific IgE levels to mite allergens among asthmatic patients. *Allergy* 2005; 60(7):900-6.
127. Slager RE, Hawkins GA, Li X i wsp. Genetics of asthma susceptibility and severity. *Clin Chest Med.* 2012; 33(3):431-43.
128. Tachdjian R, Mathias C, Al Khatib S, i wsp. Pathogenicity of a disease-associated human IL-4 receptor allele in experimental asthma. *J Exp Med.* 2009; 206(10):2191-204.
129. Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y i wsp. Childhood atopic asthma: positive association with a polymorphism of IL-4 receptor alpha gene but not with that of IL-4 promoter or Fc epsilon receptor I beta gene. *Exp Clin Immunogenet.* 2000; 17(2):63-70.
130. Tang Y, Xu ZH, Wu XQ i wsp. A study on the association between polymorphism of the interleukin-4 receptor alpha gene and bronchial asthma in a population of Han nationality. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2006; 29(7):440-3.
131. Thavagnanam S, Parker JC, McBrien ME i wsp. Effects of IL-13 on mucociliary differentiation of pediatric asthmatic bronchial epithelial cells. *Pediatr Res.* 2011; 69(2):95-100.

132. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J* 1998; 12(2):315-35.
133. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: (ISSAC). *Lancet* 1998, 351(9111):1225-32.
134. Thomsen SF, van der Sluis S, Kyvik KO i wsp. A study of asthma severity in adult twins. *Clin Respir J*. 2012; 6(4):228-37.
135. Valkonen H, Waris M, Ruohola A i wsp. Recurrent wheezing after respiratory syncytial virus or non-respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy: a 3-year follow-up. *Allergy*; 2009; 64(9):1359-65.
136. Velez DR, Fortunato S, Thorsen P i wsp. Spontaneous preterm birth in African Americans is associated with infection and inflammatory response gene variants. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 200(2):209.e1-27.
137. Wang JY, Lei HY, Hsieh KH. The effect of immunotherapy on interleukin-1 and tumor necrosis factor production of monocytes in asthmatic children. *J Asthma*, 1992; 29(3):193-201.
138. Wjst M, Kruse S, Illig T i wsp. Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants. *Eur J Immunogenet*. 2002; 29(3):263-8.
139. Wu X, Li Y, Chen Q i wsp. Association and gene-gene interactions of eight common single-nucleotide polymorphisms with pediatric asthma in middle China. *J Asthma* 2010; 47(3):238-44.
140. Wu B, Liu JL, Chen M i wsp. Correlation of interleukin-13 gene – 1112c/T polymorphism with asthma and total plasma IgE levels. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2004; 27(10):668-71.
141. Zhang H, Zhang Q, Wang L i wsp. Association of IL4R gene polymorphisms with asthma in Chinese populations. *Hum Mutat*. 2007; 28(10):1046.

142. Zhang Y, Xu CB, Cardell LO. Long-term exposure to IL-1beta enhances Toll-IL-1 receptor- mediated inflammatory signaling in murine airway hyperresponsiveness. *Eur Cytokine Netw.* 2009; 20(3):148-56.
143. Zhou Y, Fu J, Wu J i wsp. Cloning and polymorphism analysis of IL-4 proximal promoter in asthmatic children. *Chin Med J (Engl)*. 2002; 115(11):1624-7.
144. Zhu G, Whyte Mk, Vesbo J i wsp. Interleukin-18 receptor 1 gene polymorphisms are associated with asthma. *Eur J Hum Genet*. 2008; 16(9):1083-90.
145. Zedan MM, El-Chennawi Fa, Fouda AE. Interleukin-12 and peripheral blood invariant natural killer T cells as an axis in childhood asthma pathogenesis. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2010; 9(1):43-8.
146. Zeyrek D, Demir E, Alpman A i wsp. Association of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in Turkish children with atopic asthma. *Allergy Asthma Proc*. 2008; 29(5):468-74.

## 10. STRESZCZENIE

W niniejszej pracy analizowano związek polimorfizmów genów wybranych cytokin i ich receptorów z przebiegiem astmy u dzieci. W badaniach brali udział pacjenci z astmą atopową uczuleni na pyłki traw (n=11), uczuleni na roztocza kurzu (n=22) oraz pacjenci z astmą nieatopową (n=9). Analizowano asocjację 15 polimorfizmów (-511 C/T genu IL1 B, rs2243250 genu IL4, rs1805010 genu IL4-R A, rs2069812 genu IL5, G378R i 1188A/C genu IL12, rs1881457, rs1800925 i rs20541 genu IL13, rs10519613, rs1057972, rs2254514 i rs10833 genu IL15, rs549908 genu IL18 oraz rs2270297 genu IL18-R) z przebiegiem astmy, atopią i występowaniem chorób o podłożu atopowym oraz z czynnością układu oddechowego.

Do genotypowania większości polimorfizmów wykorzystano metodę PCR-RFLP. Jedynym wyjątkiem był polimorfizm genu IL13 rs20541, do oznaczenia którego użyto komercyjnie dostępnego zestawu starterów i sond TaqMan SNP Genotyping Assays. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statistica v.8.0. stosując test  $\chi^2$  Pearsona oraz test dokładnego prawdopodobieństwa Fishera. Dla zmiennych interwałowych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test post-hoc Newman-Keulsa.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono związek z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby dla polimorfizmu rs2270297 genu IL18-R oraz związek ze stopniem ciężkości choroby dla polimorfizmów rs1881457 i rs2541 genu IL13 i rs10519613 genu IL15. Nie wykazano natomiast związku żadnego z badanych polimorfizmów z koniecznością stosowania steroidoterapii systemowej. Związek z atopią wykazano dla polimorfizmów rs2243250 genu IL4, rs1805010 genu IL4-R A, rs1881457 I R110Q genu IL13, rs10519613 genu IL15 oraz rs2270297 genu IL18-R. Stwierdzono ponadto związek polimorfizmów rs2243250 genu IL4 oraz rs20541 genu IL13 z występowaniem atopowego zapalenia skóry w wywiadzie. Żaden z analizowanych polimorfizmów nie wykazał asocjacji z

## STRESZCZENIE

występowaniem alergicznego nieżytu nosa. Nadwrażliwość na pyłki traw związana jest z polimorfizmami rs1805010 genu IL4-R A, rs1881457 genu IL13 i rs2270297 genu IL18-R, a nadwrażliwość na roztocza z rs2243250 genu IL4, rs1805010 genu IL4-R A, rs1881457 i R110Q genu IL13, rs10519613 genu IL15 i rs2270297 genu IL18-R. Stwierdzono ponadto różnicę w rozkładzie genotypów polimorfizmów rs2243250 genu IL4 i rs2069812 genu IL5 porównując osoby z nadwrażliwością na pyłki traw i roztocza kurzu. Wpływ na całkowite stężenie IgE wykazują z kolei polimorfizmy w genie IL13 (rs1881457 oraz R110Q). Na wartość FEV1 w okresie bezobjawowym wpływają polimorfizmy -511C/T genu IL1 B oraz rs1881457 i rs20541 genu IL13, a na wartość FEV1 w okresie zaostrzenia rs1881457 i rs1800925 genu IL13. Polimorfizm rs10519613 genu IL15 wykazuje związek ze zmiennością FEV1 w czasie próby nieswoistej prowokacji wysiłkiem, a wartość stężenia FENO zależna jest od polimorfizmów rs1881457 i rs20541 genu IL13 oraz polimorfizmu rs1057972 genu IL15.

Z uwagi na niewielką liczebność grupy badanej konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań nad rolą analizowanych polimorfizmów w astmie oskrzelowej, celem potwierdzenia uzyskanych w niniejszej pracy rezultatów.

## 11. SUMMARY

This PhD thesis focused on the association of selected cytokines' genes polymorphisms with asthma. Three groups of patients were qualified for the study: patients with atopic asthma and grass pollen allergy (n=11), with atopic asthma and dust mites allergy (n=22) and with non-atopic asthma (n=9). The aim of this analysis was the association of 15 polymorphisms (-511 C/T of IL1 B gene, rs2243250 of IL4 gene, rs1805010 of IL4-R A gene, rs2069812 of IL5 gene, G378R and 1188A/C of IL12 gene, rs1881457, rs1800925 and rs20541 of IL13 gene, rs10519613, rs1057972, rs2254514, rs10833 of IL15 gene, rs549908 of IL18 gene and rs2270297 of IL18-R gene) with asthma progress, atopy and prevalence of atopic diseases and lung function.

Genotyping of polymorphisms was mostly performed using PCR-RFLP with exception of polymorphism rs20541 of IL13 gene, which was identified using commercial kit of probes and starters TaqMan SNP Genotyping Assays. Statistical analysis of nominal variables was performed using Statistica v.8.0. software with  $\chi^2$  Pearson's test and Fisher's test. For interval variables, ANOVA analysis with Newman-Keuls post-test was performed.

The results confirmed association of rs2270297 of IL18-R gene with the age of first asthma symptoms and association of rs1881457, rs2541 of IL13 gene and rs10519613 of IL15 gene with asthma severity. There was no significant association between any of the analyzed polymorphisms and systemic steroid therapy. This study also confirmed the association between rs2243250 of IL4 gene, rs1805010 of IL4-R A gene, rs1881457 and R110Q of IL13 gene, rs10519613 of IL15 gene and rs2270297 of IL18-R gene and atopy. However none of the polymorphisms showed the association with allergic rhinitis, the association with atopic eczema was found for 2 of these polymorphisms (rs2243250 of IL4 gene and rs20541 of IL13 gene). According to this study, association with grass pollen

## SUMMARY

hypersensitivity and rs1805010 of IL4-R A gene, rs1881457 of IL13 gene and rs2270297 of IL18-R was found, and there was a significant association of dust mites hypersensitivity and rs2243250 of IL4 gene, rs1805010 of IL4-R A gene, rs1881457 and R110Q of IL13 gene, rs10519613 of IL15 gene and rs2270297 of IL18-R gene. Moreover, the difference between IL4 gene and IL5 gene polymorphisms was found, comparing the group with grass pollen allergy and dust mite allergy. Total IgE serum concentration was associated with IL13 gene polymorphisms (rs1881457 and R110Q). The FEV1 value during asthma remission showed the association with -511C/T of IL1 B gene, rs1881457 and rs20541 polymorphisms of IL13 gene, while the FEV1 value during the exacerbation showed the association with IL13 gene polymorphisms: rs1881457 and rs1800925. Moreover, the rs10519613 associates with the FEV1 changes after nonspecific provocation of bronchial hyperresponsiveness. The mean NO concentration was associated with rs1881457 and rs20541 of IL13 gene and with rs1057972 of IL15 gene.

Considering the limited number of children qualified for this study in order to confirm the obtained results further analysis between selected polymorphisms and asthma should be performed.

## 12. SPIS TABEL

Tabela 1. Ogólna charakterystyka badanej grupy

Tabela 2. Podsumowanie dotyczące metod molekularnych

Tabela 3. Sekwencje starterów badanych polimorfizmów

Tabela 4. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą o różnym stopniu ciężkości

Tabela 5. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów z wiekiem wystąpienia pierwszych objawów choroby

Tabela 6. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od konieczności stosowania steroidów systemowych w leczeniu

Tabela 7. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą atopową i nieatopową

Tabela 8. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania AZS w wywiadzie

Tabela 9. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania ANN w wywiadzie

Tabela 10. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania nadwrażliwości na pyłki traw

Tabela 11. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania nadwrażliwości na roztocza kurzu



## SPIS TABEL

Tabela 12. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od występowania nadwrażliwości na pyłki traw lub roztocza kurzu

Tabela 13. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od stężenia IgE

Tabela 14. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od wyniku FEV1 w okresie bezobjawowym

Tabela 15. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od wyniku FEV1 w badaniu spirometrycznym w okresie zaostrzenia

Tabela 16. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od zmienności FEV1 w czasie próby wysiłkowej

Tabela 17. Analiza porównawcza genotypów wybranych polimorfizmów u pacjentów z astmą w zależności od wyniku FENO

### 13. SPIS RYCIN

Rycina 1. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom -511C/T *IL1 B*

Rycina 2. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs2243250 *IL4*

Rycina 3. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs1805010 *IL4-R A*

Rycina 4. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs2069812 *IL5*

Rycina 5. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom G378R *IL12*

Rycina 6. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom 1188A/C *IL12*

Rycina 7. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs1881457 *IL13*

Rycina 8. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs1800925 *IL13*

Rycina 9. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs10519613 *IL15*

Rycina 10. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs1057972 *IL15*

Rycina 11. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs2254514 *IL15*

Rycina 12. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs10833 *IL15*

Rycina 13. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs549908 *IL18*

Rycina 14. Na zdjęciu uwidoczniono fragmenty DNA odpowiadające poszczególnym genotypom rs2270297 *IL18-R*