

Streszczenie

W przebiegu astmy oskrzelowej dochodzi do przebudowy ściany dróg oddechowych, co jest swoistą cechą tej choroby i u części pacjentów może prowadzić do nieodwracalnego zwężenia dróg oddechowych (nieodwracalnej bronchoobturacji). Stopień zaawansowania i szybkość rozwoju tego typu zmian jest zróżnicowany osobniczo, a zjawisko to prawdopodobnie pozostaje uwarunkowane genetycznie. Procesom przebudowy (ang. *remodeling*) tkanki, czy narządu towarzyszy proces rewaskularyzacji i powstawanie nowego unaczynienia. Liczbie nowopowstałych naczyń odpowiada zwiększone stężenie czynników angiogennych, do których należy między innymi czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF).

W dostępnej literaturze odczuwa się obecnie brak dostatecznej ilości doniesień, które oceniałyby ewentualny wpływ polimorfizmu genu VEGF na przebudowę w obrębie dróg oddechowych u osób dorosłych chorych na astmę oskrzelową. Dlatego też w niniejszej rozprawie podjęto próbę wykazania asocjacji polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism* – SNP) w pozycji -2549 -2567 del18 w obrębie regionu promotorowego genu dla czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego z rozwojem nieodwracalnego zwężenia dróg oddechowych. Ponadto dokonano analizy możliwej korelacji tego polimorfizmu i nieodwracalnej bronchoobturacji z podwyższonym średnim stężeniem VEGF w surowicy krwi oraz wzmożoną aktywnością komórek alergicznego zapalenia (bazofile) u pacjentów z astmą oskrzelową.

Badanie przeprowadzono na grupie łącznie 122 osób (w tym 80 kobiet) w wieku od 20 do 70 lat (mediana wieku 53 lata), z których 40 osób (w tym 26 kobiet) nie prezentowało przewlekłych schorzeń układu oddechowego (zdrowa grupa kontrolna). U kolejnych 42 osób (w tym 25 kobiet) w wieku od 24 do 69 lat (mediana wieku 55 lat), na podstawie badania spirometrycznego z β_2 -agonistą wziewnym według wytycznych GINA, zostało ustalone rozpoznanie astmy oskrzelowej z nieodwracalną bronchoobturacją, natomiast w grupie następnych 40 osób (w tym 29 kobiet) w wieku od 23 do 69 lat (mediana wieku 52 lata) z rozpoznaną astmą oskrzelową wykazano odwracalność zwężenia dróg oddechowych.

Początkowy etap badań obejmował określenie występowania polimorfizmu insercyjno-delecyjnego, który polega na dodaniu lub utracie fragmentu genu w obrębie regionu promotorowego genu dla VEGF w pozycji -2549 -2567 del18 – do tego celu zastosowana została metoda reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain*

reaction – PCR). We wszystkich badanych grupach stwierdzono dominację genotypu del18, bez względu na występowanie astmy oskrzelowej, czy ciężkość bronchoobturacji. Zarówno iloraz szans, jak i istotność statystyczna uzyskanych wyników badań wskazują, iż obecność genotypu del18 wykazuje asocjację zarówno z astmą oskrzelową, jak i z rozwojem nieodwracalnego zwężenia dróg oddechowych. Uwzględnić należy także dodatkowy czynnik nasilający ekspresję fenotypu choroby z nieodwracalną bronchoobturacją, którym jest palenie papierosów.

Kolejnym etapem badań własnych była analiza surowiczych stężeń VEGF w grupach badanych pacjentów z astmą oskrzelową i w grupie kontrolnej. Do oznaczenia stężenia VEGF w surowicy krwi pacjentów we wszystkich grupach badanych zastosowano ilościową metodę immunoenzymatyczną – test podwójnego wiązania ELISA (ang. „*sandwich*” *enzyme linked immunosorbent assay*). Na podstawie uzyskanych wyników badań wnioskować należy, że średnie surowicze stężenie VEGF pozostaje istotnie statystycznie wyższe u pacjentów z astmą oskrzelową, niż u osób bez przewlekłych schorzeń układu oddechowego. Po uwzględnieniu ciężkości bronchoobturacji, statystycznie istotną różnicę potwierdzono zestawiając zdrową grupę kontrolną i grupę chorych z astmą oskrzelową z nieodwracalną bronchoobturacją, u których stężenie VEGF było znacząco podwyższone. Ponadto zauważono, że osoby obciążone genotypem del18 genu VEGF wykazują statystycznie istotnie wyższe surowicze stężenia VEGF, niż osoby z genotypem ins genu VEGF. Średnie surowicze stężenie tego czynnika było najwyższe u pacjentów z astmą i genotypem del18, wyższe niż w grupie kontrolnej z genotypem del18, u pacjentów z astmą i genotypem ins oraz w grupie kontrolnej z genotypem ins. Uznać należy więc, że średnie osoczowe stężenie VEGF koreluje z ciężkością bronchoobturacji występując w zwiększonym stężeniu u astmatyków z nieodwracalnym zwężeniem dróg oddechowych; dodatkowo obecność genotypu del18 genu VEGF koreluje ze zwiększonym stężeniem tego czynnika w surowicy krwi.

Następnym etapem w badaniach ujętych w niniejszej pracy było wykorzystanie metody cytometrii przepływowej analizującej aktywność bazofilów na podstawie znakowania przeciwciałem anti-CD203c w grupach badanych w środowisku zawierającym jako czynnik stymulujący fMLP (kontrola pozytywna), a także VEGF we wzrastających stężeniach oraz w próbie komórek spoczynkowych, niestymulowanych. Uwzględniając aktywność bazofilów wyrażoną jako odsetek tych komórek z ekspresją receptora CD203c na ich powierzchni, w próbie niestymulowanej uzyskano zbliżoną medianę odsetka aktywnych bazofilów w grupie kontrolnej oraz w grupach badanych

osób z astmą oskrzelową, bez względu na genotyp i nasilenie bronchoobturacji. Po stymulacji bazofilów przy udziale fMLP wykazano istotną statystycznie różnicę w aktywności tych komórek uwzględniając polimorfizm del18 genu VEGF w grupie kontrolnej i u chorych z astmą oskrzelową, a także zestawiając obie te grupy z genotypem ins. Analizując aktywne bazofile po stymulacji rosnącymi stężeniami VEGF stwierdzono zbliżony odsetek aktywnych komórek w poszczególnych grupach badanych, a istotnie statystyczną różnicę zaobserwowano u chorych z astmą oskrzelową i z odmiennymi genotypami del18 vs ins genu VEGF, a także pomiędzy grupą pacjentów z astmą oskrzelową z genotypem del18, a grupą kontrolną z genotypem del18 genu VEGF. Umysławia to, że stymulacja bazofilów przy udziale VEGF wzmacnia aktywność tych komórek. Dodatkowo u pacjentów obciążonych genotypem del18, zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupie z astmą oskrzelową, aktywność bazofilów po stymulacji VEGF pozostaje wyższa niż w próbie komórek spoczynkowych, niestymulowanych.

Patomechanizm przebudowy oskrzeli w astmie jest z pewnością złożony. Uzyskane wyniki układają się w logiczny ciąg, który może wskazywać na kolejną, dotychczas nie rozważaną, ścieżkę tego procesu. Polimorfizm regionu promotorowego -2549 -2567 genu VEGF w postaci obecności genotypu del18 nie tylko jest skojarzony z podwyższonym stężeniem VEGF w surowicy krwi, ale również ze zwiększoną, pod wpływem VEGF, aktywacją bazofilów i przez to z większą predypozycją do uwalniania mediatorów z tych komórek. Oba te procesy sprzyjają rozwojowi remodelingu. Hipoteza powyższa jest warta przeprowadzenia dalszych badań na dużej próbce pacjentów.