

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Nataša D. Petrović-Stanojević

**ISPITIVANJE UČESTALOSTI
POLIMORFIZAMA BETA-2
ADRENERGIČNIH RECEPTORA I
POVEZANOSTI SA TERAPIJSKIM
ODGOVOROM KOD OSOBA SA
BRONHIJALNOM ASTMOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE

Nataša D. Petrović-Stanojević

**INVESTIGATING PREVALENCE OF
BETA-2 ADRENERGIC RECEPTORS
POLYMORPHISMS AND
CORRELATION WITH THERAPEUTIC
RESPONSE IN PATIENTS WITH
BRONCHIAL ASTHMA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor: Prof Dr Branislava Milenković, Medicinski fakultet Univerziteta
u Beogradu

Komisija:

1. Prof Dr Tatjana Pekmezović, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. Prof Dr Aleksandra Ilić-Dudvarski, Medicinski fakultet Univerziteta u
Beogradu

3. Dr sci Dragica Radojković, naučni savetnik, Institut za molekularnu
genetiku i genetski inženjering Univerziteta u
Beogradu

Datum odbrane:

Vladislavu, jer se obećanja moraju ispuniti

Ogromno hvala:

- Mom mentoru, **Prof Dr Branislavi Milenković**, Medicinski fakultet, Beograd, za dugogodišnje prijateljstvo, veru u ovaj rad i veliku i nesebičnu podršku od prvog dana;
- **Prof Dr Aleksandri Topić**, Farmaceutski fakultet, Beograd, za neverovatnu istrajnost, entuzijazam, posvećenost, strpljenje i upornost da se ovo istraživanje dovede do kraja;
- **Dr sci Dragici Radojković**, Naučnom savetniku Instituta za molekularnu genetiku i genetski inženjering, Beograd, koja je, kao rukovodilac Projekta Ministarstva za nauku i tehnologiju RS No 173008 "Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturalna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera", omogućila da ovo istraživanje uopšte bude realizovano;
- Poštovanim članovima Komisije, **Prof Dr Tatjani Pekmezović**, i **Prof Dr Aleksandri Ilić-Dudvarski**, Medicinski fakultet u Beogradu, koje su, svaka na svoj način i svaka u svojoj oblasti, svojim prijateljstvom i naklonošću mnogo doprinele čitavom procesu prijave, uobličavanja i finalizacije ovog rada;
- **Dr sci Aleksandri Nikolić**, i **Dr sci Mariji Stanković**, naučnim saradnicima Instituta za molekularnu genetiku i genetski inženjering, Beograd, višegodišnjim prijateljima i saradnicima, koje su obradile uzorke i pružile mnoge korisne ideje;
- **Mr pharm Dušanki Necić**, Metabolička laboratorija KBC "Zvezdara" - Beograd koja je beskrajno pomogla u obradi uzoraka;
- Svim kolegama **lekarima, medicinskim sestrama i tehničarima Kliničkog odeljenja pulmologije i alergologije sa imunologijom KBC "Zvezdara" - Beograd** koji su učestvovali u odabiru pacijenata i sakupljanju uzoraka za analizu;
- Članovima **Katedre Interne medicine Stomatološkog fakulteta u Beogradu** za veliku podršku i motivaciju;
- Na kraju, ali možda i najvažnije, svim **pacijentima** koji su svojim pristankom i učešćem omogućili nastanak ovog istraživanja

NASLOV: " Ispitivanje učestalosti polimorfizama beta-2 adrenergičnih receptora i povezanosti sa terapijskim odgovorom kod osoba sa bronhijalnom astmom"

SAŽETAK

Polimorfizmi gena za receptor beta2-adrenergičkih (ADRB2) su klinički relevantni iz nekoliko razloga, uključujući i kao faktor rizika za nastanak astme, stepen njene težine, kao i modulacije efikasnosti terapije beta2-agonista. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita povezanost između ADRB2 polimorfizama gena i astme u srpskoj populaciji, te da se proceni terapijski odgovor u odnosu na ADRB2 genotip.

U istraživanju je učestvovalo 171 bolesnika s astmom i 101 zdravih osoba kao kontrolna grupa.

Genotipizacija Arg16Gly i Gln27Glu polimorfizama je izvedena direktnim sekvenciranjem proizvoda lančane reakcije polimeraze (PCR).

U srpskoj odrasloj populaciji, nosioci 27Gln alela i 27Gln / Gln genotipa su pokazali veći rizik od nastanka astme [(OR) 2.5, 95% interval poverenja (CI) 1,6-3,8, a OR 3.00, 95% CI 1,7-5,3, odnosno], dok je nađeno da prisustvo 27Glu alela i 27Gln / Glu genotip imaju zaštitni efekat (OR 0.4; 95% CI 0,3-0,6, ili OR, 0.3, 95% CI 0.1-0.7, respektivno). Nadalje, utvrdili smo da prisustvo 27Gln alela u astmatičara mlađih od 50 godina dovodi do boljeg odgovora na terapiju s dugodelujućim beta2-agonistima (LABA) u kombinaciji sa niskim i umerenim dozama inhalacijskih kortikosteroida (ICS), za razliku od starijih gde nosioci 27Glu alela stariji od 50 godina imaju veću verovatnoću da će bolje odgovoriti na LABA + ICS terapiju.

U zaključku, identifikovali smo da su u srpskoj odrasloj populaciji 27Gln alel i homozigotna kombinacija 27Gln faktori rizika za nastanak astme, što može biti od kliničkog interesa u prevenciji bolesti. Nalaz da mlađi nosioci 27Gln alela

bolje odgovaraju na LABA + ICS terapiju može se u budućnost koristiti u personalizovanoj terapiji astme.

KLJUČNE REČI: polimorfizam ADRB2 gena, astma, inhalacijski kortikosteroidi, dugodelujući beta2-agonisti

NAUČNA OBLAST: Medicinske nauke

UŽA NAUČNA OBLAST: Pulmologija

UDK BROJ:

TITLE: Investigating the prevalence of beta - 2 adrenergic receptors polymorphisms and correlation with therapeutic response in patients with bronchial asthma

ABSTRACT

Polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene (ADRB2) are clinically relevant for several reasons, including as a risk factor for asthma development/severity and prediction for the effectiveness of treatment with beta2-agonists in reducing asthma symptoms. The aim of this study was to examine the association between ADRB2 gene polymorphisms and asthma in Serbian population, and to evaluate the therapeutic response in relation to the ADRB2 genotype.

The study included 171 patients with asthma and 101 healthy subjects as the control group.

Genotyping of Arg16Gly and Gln27Glu polymorphisms was performed by direct sequencing of polymerase chain reaction (PCR) products.

In Serbian adults, carriers of the 27Gln allele and 27Gln/Gln genotype were at higher risk of asthma [odds ratio (OR) 2.5, 95% confidence interval (CI) 1.6-3.8, and OR 3.00, 95% CI 1.7-5.3, respectively], while the presence of the 27Glu allele and 27Gln/Glu genotype were found to be protective of asthma (OR 0.4, 95% CI 0.3-0.6, and OR 0.3, 95% CI 0.1-0.7, respectively). Furthermore, we found that the presence of the 27Gln allele in asthmatics younger than 50 years leads to a better response to therapy with long-acting beta2-agonists (LABA) in combination with prevailing low and moderate doses of inhaled corticosteroids (ICS), while carriers of the 27Glu allele over 50 years old are more likely to respond to LABA + ICS therapy.

We identified that in Serbian adults the 27Gln allele and 27Gln homozygosity are risk factors for asthma, which may be of clinical interest in disease

prevention. The finding that younger carriers of the 27Gln allele respond better to LABA + ICS therapy may be utilized in personalized asthma treatment.

KEYWORDS: ADRB2 gene polymorphisms, asthma, inhaled corticosteroids, long-acting beta2-agonists

SADRŽAJ

1. UVOD.....	14
1.1. Istorijat.....	15
1.2. Beta agonisti u pulmologiji.....	16
1.3. Adrenergička kontrola glatkih mišića bronhija	18
1.4. Podela adrenoceptora	19
1.4.1. Alfa1 adrenoceptori.....	20
1.4.2. Alfa2 adrenoceptori.....	23
1.4.3. Beta1 adrenoceptor	23
1.4.4. Beta2 adrenoceptor	24
1.4.5. Beta3 adrenoceptor	25
1.5. Mehanizam relaksacije glatkog mišića bronha	25
1.6. Antiinflamatorni efekti	26
1.7. Disfunkcija ADRB2.....	28
1.7.1. Desenzitizacija putem fosforilacije	30
1.7.2. Desenzitizacija putem sekvestracije.....	31
1.7.3. Desensitizacija putem nishodne regulacije	31
1.7.4. ADRB paradoks	32
1.7.5. Kortikosteroidi i proces desenzitizacije.....	34
1.8. Genetski polimorfizam ADRB2.....	34

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	44
3. MATERIJAL I METODE	45
3.1. Selekcija ispitanika	45
3.2. Genotipizacija Arg16Gln i Gln27Glu polimorfizama	47
3.3. Klinička analiza.....	50
3.3.1. Test o kontroli astme (Asthma control test - ACT)	50
3.4. Statistička analiza	53
4. REZULTATI	55
4.1. Osnovne karakteristike grupa ispitanika	55
4.2. Povezanost ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i pojave astme.....	58
4.3. Povezanost ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i stepena težine astme.....	66
4.4. Povezanost ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i pogoršanja astme tokom celokupnog perioda praćenja pacijenata	68
4.5. Povezanost ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i težine astme u prvoj poseti	70
4.6. Povezanost ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora, terapije i težine astme.....	74

4.6.1. Uticaj ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i starosti pacijenata na parametre funkcije pluća u tri posete kod pacijenata na terapiji sa dugo-delujućim agonistima ADRB2 receptora (LABA)	74
4.6.2. Uticaj ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i starosti pacijenata na parametre funkcije pluća u trećoj poseti kod pacijenata na terapiji LABA korigovano za vrednosti dobijene u prvoj poseti	83
4.6.3. Povezanost između BMI-a, ispitivanih polimorfizama ADRB2 i astme	89
4.6.4. Uticaj pušenja na efikasnost terapije procenjena na osnovu parametara funkcije pluća u trećoj poseti posle uklanjanja uticaja funkcije pluća u prvoj poseti	92
5. DISKUSIJA.....	94
6. ZAKLJUČCI.....	105
7. LITERATURA	107

1. UVOD

Astma je heterogena bolest, koja se obično označava kao hronična inflamacija disajnih puteva, uz simptome teškog disanja, nedostatka daha, stezanja u grudnom košu, kašlja i varijabilnog ograničenja protoka vazduha kroz disajne puteve [1]. U proteklih dvadesetak godina u fokusu istraživača su genetske determinante ovog oboljenja, tako da, iako još uvek nije sasvim razjašnjeno koje od njih leže u molekularnoj osnovi odgovora na beta 2 - agoniste, pretpostavlja se da gen za beta-2 adrenergične receptore (ADRB2) ima važnu ulogu u ovom odgovoru [2]. U genu za ADRB2 opisano je više polimorfizama, od kojih su najčešći Gly16Arg i Gln27Glu. Za ova dva polimorfizma je pokazano da su funkcionalno relevantni, odnosno da njihovo prisustvo dovodi do fenotipske modulacije ADRB2 na membrani ćelije [3]. Funkcija mutiranog receptora izmenjena je prilikom primene beta-agonista, što može dovesti do promena u aktivaciji signalnih puteva koji su posredovani ovim receptorom. Najnovije studije, shvatajući značaj farmakogenomike u savremenoj terapiji, bave se razvijanjem novih, jednostavnijih i bržih načina određivanja polimorfizama receptora, ukazujući na značaj uvođenja ovih metoda u kliničku praksu [4]. S obzirom na međusobne interakcije dugo- i kratkodelujućih beta-agonista, kortikosteroida i antiholinergičkih bronhodilatatora, na ove procese mogu da utiču i drugi lekovi koji se primenjuju u terapiji astme [5]. Iako su sadašnji vidovi terapije za astmu veoma efikasni kod većine pacijenata, neki bolesnici imaju tendenciju da budu manje osetljivi na terapiju beta2-agonistima.

U poslednje dve decenije, značajan napredak je takođe postignut u razumevanju osnova strukture i funkcije humanog ADRB2 na molekularnom i genetskom nivou [6,7]. S obzirom da se ADRB2 eksprimira u različitim tkivima, njegovi polimorfizmi su ispitivani u različitim kardiovaskularnim (hipertenzija, srčana insuficijencija, aritmije), metaboličkim (Diabetes mellitus,

gojaznost, metabolički sindrom) i respiratornim oboljenjima (hronična opstruktivna bolest pluća, astma) [8].

Efekat beta 2-agonista se ostvaruje vezivanjem ovih molekula za molekule ADRB2 koji se nalaze na površini ćelija epitela i koji imaju ulogu u raznim procesima važnim za funkciju bronhija, pre svega u bronhodilataciji i inflamatornom odgovoru [9]. Uloga polimorfizama u ADRB2 genu do sada je proučavana najviše u astmi [10], a pretpostavlja se da je efekat ovih polimorfizama sličan i u drugim plućnim oboljenjima [11,12].

1.1. ISTORIJAT

John Newport Langley (1852–1925), fiziolog iz Kembridža, je u radovima krajem 19. i početkom 20. veka prvi pretpostavio da svaka ćelija ima specifične receptore koji se na ćelijskoj membrani vezuju za lekove ili transmitere inicirajući ili inhibišući specifične ćelijske funkcije [13,14].

Radeći paralelno ali nezavisno, Napoleon Cybulski, rektor Univerziteta u Krakovu, Poljska, je 1895.god. [15], i John Jacob Abel (1857–1938), osnivač i upravnik prve Katedre za farmakologiju u Americi, 1897. god, prvi su uspešno izolovali supstancu nazvanu epinefrin, kao neaktivni metabolit ekstrakta nadbubrežne žlezde [16]. Tek je japanski naučnik Takamine izolovao aktivnu supstancu patentirajući je pod imenom adrenalin [17]. Negde u to vreme, Paul Ehrlich (1854–1915), za teoriju o selektivnosti receptora dobija Nobelovu nagradu za medicinu 1908. god. [18].

Tek četiri decenije kasnije, 1948 god, Raymond Ahlquist objavljuje teoriju o dejstvu adrenalina na dve odvojene vrste ćelijskih receptora, nazvanih alfa i beta adrenoceptori [19]. Stimulacija prvih izaziva kontrakciju glatkih mišića disajnih puteva sledećim redosledom efikasnosti : adrenalin >

noradrenalin > isoproterenol. Nasuprot tome, stimulacija ADRB, izazvana istim supstancama, izaziva opuštanje glatkih mišića, ali sa drugačijim redosledom jačine agonista, isoproterenol > adrenalin > noradrenalin [20]. Revolucionarna ideja da isti simpatikomimetik izaziva kako ekscitatorni, tako i inhibitorni odgovor u zavisnosti od vrste receptora na koje deluje je tada prvi put široko prihvaćena u naučnoj javnosti.

Ovo otkriće dovodi do ubrzanog razvoja farmakoindustrije, tako da je 1958. god sintetisan prvi beta-blokator, dihloroisoproterenol, , kao prvi u nizu beta-blokatora, lekova koji su izazvali neverovatan pomak u terapiji niza kardioloških oboljenja [21,22,23,24].

1.2. BETA AGONISTI U PULMOLOGIJI

Prvi pokušaji peroralne primene ekstrakta nadbubrežne žlezde, kasnije nazvanog adrenalin, kod pacijenata sa astmom dogodili su se u poslednjoj dekadi 19. veka [25]. S obzirom da je sam metabolit na početku bio inaktivan, ili je bio inaktivisan metabolizmom kroz digestivni sistem, ovakav vid primene nije imao nikakvog efekta. Tek je 1930. god, sa započinjanjem subkutanog davanja leka, otkriven njegov pozitivan efekat na pacijente sa astmom. Medjutim, subkutani način aplikacije je imao uticaj na čitav organizam, izazivajući značajne neželjene efekte (strah, anksioznost, nemir, glavobolju, vrtoglavicu, palpitacije), koji nisu značajno redukovani ni kasnije pokušanim davanjem adrenalina inhalacijskim ili sublingvalnim putem.

Sledeći bronhodilatator, efedrin, predstavljen je zapadnoj medicini 1924. god, iako je korišćen prethodno stotinama godina u Kini [26]. Sinteza isoproterenola 1940. god. predstavlja sledeći značajan korak. Poslednjih godina razvoj selektivnih ADRB2 agonista je omogućio sintezu lekova sa manjim stepenom kardioloških neželjenih dejstava [27].

Prvi MDI (metered-dose-inhalatori), "pumpice", koji su imali precizno određenu dozu leka po udahu su Medihaler-Epi koji je sadržao epinefrin, i Medihaler-Iso sa izoprenalinom [28].

Ova tehnologija je kasnije ubrzano razvijana tokom 1970 -tih godina.

Dugodelujući beta2-agonist - orciprenalin , koji nije bio delotvoran kao isoproterenol proizveden je 1961.god. Nedugo potom, 1967. god. pokazano da su beta2-receptori odgovorni za bronhodilataciju što je dovelo do razvoja selektivnih lekova [29,30].

Polovinom 1960 - tih , otkriven je salbutamol (albuterol) , zatim terbutalin i fenoterol nekoliko godina kasnije. Svi su oni imali manje neželjenih efekata od isoproterenola.

Kasnije, farmaceutska kompanija GSK (GlaxoSmithKline) otkriva salmeterol, prvi komercijalni dugodelujući preparat sa bronhodilatatorni dejstvom u trajanju od 12 časova, koji je uveden na tržište 1990 god. Još jedan dugodelujući beta2-agonist, formoterol, usledio je ubrzo zatim. Uvodjenje dugodelujućih inhalacijskih beta2-agonista značajno je olakšalo i pojednostavilo terapiju hronične opstrktivne bolesti pluća (HOBP) i astme za pacijente.

U nadi da će se poboljšati komplijansa pacijenata i postići uzimanje leka u jednoj dnevnoj dozi, trenutno se u farmakoindustriji razvijaju ADRB2 agonisti dužeg polu-života. Među njima, značajno mesto zauzima indakaterol, koji je u Evropi registrovan krajem 2009, a u Americi polovinom 2011. god. [31,32].

2013. god. je tržištu predstavljen još jedan dugodelujući beta2-agonist, vilanterol, čije je dejstvo u trajanju od 24h značajno poboljšalo komplijansu i olakšalo lečenje [33].

1.3. ADRENERGIČKA KONTROLA GLATKIH MIŠIĆA BRONHIJA

Simpatikus kontroliše muskulaturu bronha putem cirkulišućih kateholamina delujući na ADRB2 prisutne na ćelijskoj membrane glatke muskulature i parasimpatičkim nervnim završecima [34-40].

Adrenalin, noradrenalin i dopamin su prirodno cirkulišuće supstance, od kojih prvi ima najznačajnije fiziološke efekte. Dejstvo adrenalina je promptno, u okviru 2 minuta, i kratkotrajno, završavajući se procesom oksidativne dezaminacije i metilacije katalizirane monoaminooksidazom (MAO) i katehol-O-metiltransferazom (KOMT) [41]. Kod osoba sa astmom, ali ne i kod zdravih ljudi, beta-blokatori često izazivaju bronhokonstrikciju, što dovodi do pretpostavke da bi stimulacija beta-adrenoceptora imala zaštitni efekat protiv ove pojave [42,43]. Ipak, do sada nije dokazano prisustvo serumskog adrenalina tokom akutnih pogoršanja astme ili nakon izlaganja intravenski primenjenim beta blokatorima (npr. propranolol). Stoga, izgleda da bronhokonstrikcija ne izaziva zaštitnu reakciju oslobađanja adrenalina kod ljudi.

Tonus glatke muskulature disajnih puteva se uglavnom održava dejstvom acetilholina (ACh) koji se oslobađa pod dejstvom parasimpatičkog sistema [44].

Studija bazirana na izometrijskom merenju tenzije bronhijalnih prstenova je pretpostavila da stimulacija ADRB2 može da dovede do inhibicije holinergičke neurotransmisije [45].

To bi značilo da, nezavisno od relaksantnog dejstva na tonus mišića glatke muskulature, ADRB2 mogu imati modulatorni efekat na holinergičnu neurotransmisiju. Upravo se nedostatku te uloge ADRB2 pripisuje dodatni bronhokonstriktorni efekat izazvan beta-blokatorima [46].

1.4. PODELA ADRENOCEPTORA

Adrenoceptori su 7-transmembranski receptori koji posreduju centralno i periferno dejstvo neurotransmitera, noradrenalina (norepinefrin), i hormona i neurotransmitera, adrenalina (epinefrin) [47]. Adrenoceptori se nalaze u gotovo svim perifernim tkivima i u okviru centralnog nervnog sistema. Noradrenalin i adrenalin igraju važnu ulogu u kontroli krvnog pritiska, kontraktilnosti i snazi miokarda, reaktivnosti disajnih puteva, i u različitim metaboličkim funkcijama centralnog nervnog sistema.

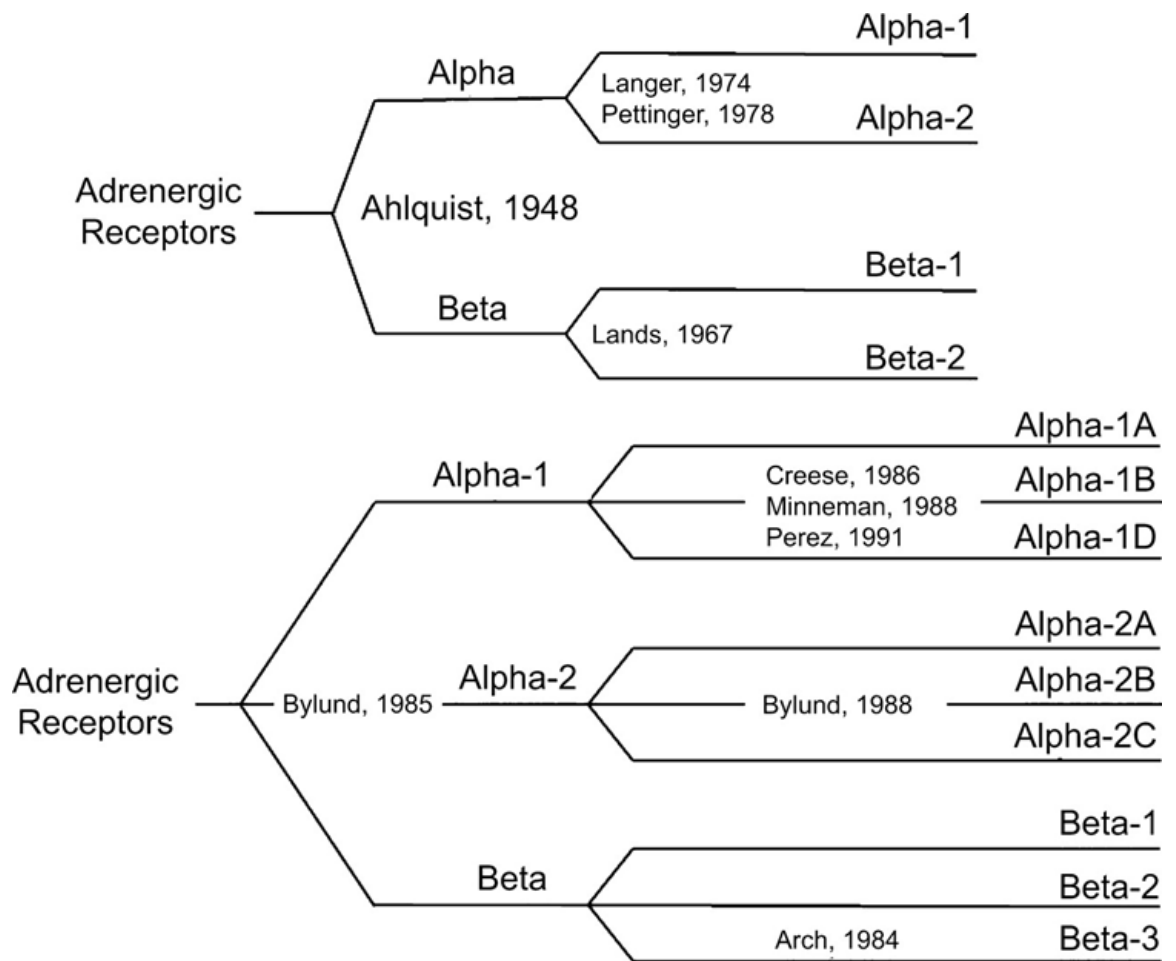
Agonistička i antagonistička interakcija farmakoloških supstanci sa adrenoceptorima su se pokazale korisnim u lečenju različitih kardioloških, pulmoloških, psihijatrijskih, uroloških, oftalmoloških, ginekoloških oboljenja, uključujući hipertenziju, anginu pectoris, zastojnu srčanu insuficijenciju, astmu, HOBP, depresiju, benignu hipertrofiju prostate, glaukom, šok, sprečavanje prevremenih kontrakcija u trudnoći.

Prva podela adrenoceptora na dve velike grupe, alfa i beta, na osnovu njihovih farmakoloških karakteristika publikovana je 1948. god. [19]. Kasnije su obe grupe podeljene na alfa1, alfa2, beta1 i beta2 subtipove [48,49]. Na osnovu farmakoloških i molekularnih ispitivanja, najkorisnijom se pokazala podela na tri osnovna tipa - alfa1, alfa2 i beta - od kojih je svaki podeljen na najmanje tri podtipa (Slika 1.1).

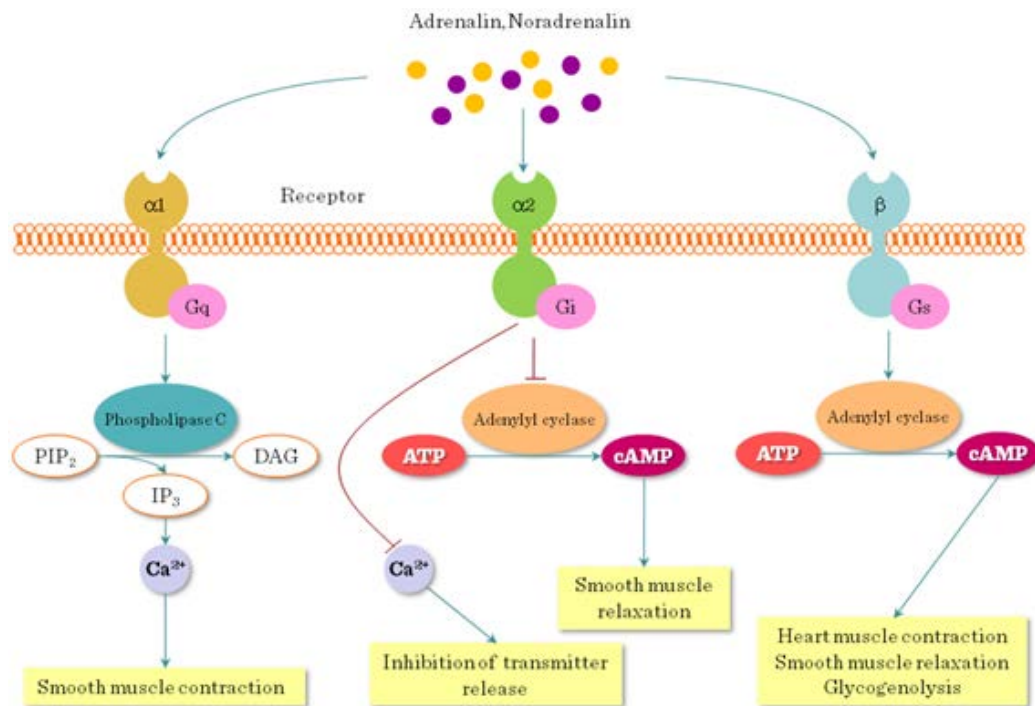
1.4.1. Alfa1 adrenoceptori

Specifična dejstva alfa1 receptora se uglavnom odnose na kontraktilnost glatke muskulature. Takođe izazivaju vazokonstikciju u tkivima kože, gastrointestinalnog sistema, bubrega i mozga [53]. Ostala tkiva gde se odvija konstrikcija glatkih mišića su ureter, vas deferens, kosa, uterus u trudnoći, uretralni sfinkter, urotel i lamina propria, bronhiole (u manjem obimu zbog relaksirajućeg efekta ADRB2), krvni sudovi cilijarnog tela (stimulacija izaziva midrijazu) [54].

Drugi efekti uključuju glikogenolizu i glukoneogenezu iz masnog tkiva i jetre, sekreciju znojnih žlezda i reapsorpciju Na⁺ iz bubrega [55]. Antagonisti alfa1 adrenoceptora imaju upotrebu u terapiji hipertenzije, anksioznosti, napada panike.



Slika 1.1: Originalna (gore) i sadašnja (dole) klasifikacija adrenoceptora koja naglašava ulogu Ahlquistovog rada iz 1948 [19,49,50]. Iz: Bylund DB. Adrenergic receptors: historical perspectives from the 20th century. In: Perez DM, editor. The Adrenergic Receptors in the 21st Century. Totowa: Humana, 2005: 3-21 [51].



Slika 1.2 : Efekti stimulacije adrenergičkih receptora: Adrenalin i noradrenalin se vezuju za receptore dejstvom na G proteine; alfa1 se vezuje za Gq, što rezultira povišenjem intracelularnog Ca²⁺ i sledstvene kontrakcije glatke muskulature; alfa2, s druge strane, se vezuje za Gi, što izaziva smanjenje oslobađanja neurotransmitera, kao i pad aktivnosti cAMP, što takođe rezultira kontrakcijom glatke muskulature. Beta receptor se vezuje za Gs, povećava aktivnost intracelularnog cAMP što izaziva kontrakciju mišića srca, relaksaciju glatkih mišića bronha i glikogenolizu.

Iz: Berki T, Boldizsár F, Szabó M, Talabér G, Varcza Z. G-protein-linked receptors (epinephrine, serotonin, glucagon). In: Berki T, Boldizsár F, Bognár R, editors. Signal Transduction (Medical Biotechnology). Pécsi Tudományegyetem; 2011. p. 62 [52].

1.4.2. Alfa2-adrenoceptori

Definisana su tri genetska i četiri farmakološki različita tipa alfa2-adrenoceptora: alfa2A, alfa2B, alfa2C i alfa2D [56] od kojih je samo alfa2A-adrenoceptor podtip nađen u ljudskom genomu. Alfa2 adrenoceptor je presinaptički receptor, koji se vezuje za Gi protein [48,57]. Specifični efekti alfa2 adrenoceptora uključuju: inhibiciju otpuštanja insulina i indukciju otpuštanja glukagona iz pankreasa; kontrakciju sfinktera u gastrointestinalnom traktu; presinaptičku inhibiciju oslobađanja noradrenalina iz CNS; povećanu agregaciju trombocita. (sl. 1.2)

Kao rezultat studija Landsa i sar. [58], ADRB su dalje podeljeni na beta1- ADRB1 i beta2- ADRB2 - subtipove. Dok prvi pokazuju gotovo identičan afinitet za adrenalin i noradrenalin, za ADRB2 subtip se smatra da je osetljiviji na adrenalin nego na noradrenalin. Autoradiografsko mapiranje je pokazalo da se ADRB mogu naći u plućima i to u različitim ćelijskim tipovima uključujući glatke mišićne ćelije disajnih puteva, i to od traheje do terminalnih bronhiola [59].

1.4.3. Beta1 adrenoceptor

Prisustvo ADRB1 u različitim životinjskih vrsta prvenstveno zavisi od razvijenosti bronhijalnog stabla i stepena adrenergičke aktivnosti [60]. Stimulacija ADRB1 adrenalinom i noradrenalinom izaziva pozitivno hronotropno i inotropno dejstvo na miokard i povećava brzinu srčane sprovodljivosti i automatizam, dok dejstvo na tkivo bubrega izaziva sekreciju renina [61,62]. Posebni efekti aktivacije ADRB1 uključuju: ubrzanje srčane frekvence, (pozitivan hronotropni efekat), ubrzanje srčane sprovodljivosti (pozitivan dromotropni efekat) i udarnog volumena (pojačanje kontraktilnosti

srca - pozitivan inotropni efekat); povećanje sekrecije renina iz jukstaglomerularnih ćelija bubrega; povećanu sekreciju grelina [63].

1.4.4. Beta2 adrenoceptor

Stimulacija ADRB2 izaziva relaksaciju glatkih mišića bronha, izaziva tremor skeletne muskulature, povećava glikogenolizu u jetri i skeletnim mišićima [64].

Uz pomenuti efekat relaksacije glatkih mišića bronha, ostali efekti aktivacije ADRB2 uključuju povećan cilijarni motilitet, promene vaskularne permeabilnosti, inhibiciju sekrecije ACh, modulaciju ćelijskog imunog odgovora [59,65].

Još uvek je nejasno da li ovi efekti doprinose terapijskoj efikasnosti ADRB2.

Specifična dejstva aktivacije ADRB2 uključuju, pored već pomenutih: sniženje motiliteta gastrointestinalnog trakta, vazodilataciju krvnih sudova, naročito u skeletnoj muskulaturi, (za razliku od vazokonstrikcije koju izazivaju alfa1 i alfa2 adrenoceptor, što je uglavnom dominantan efekat) [56]; lipolizu u masnom tkivu; anabolizam u skeletnoj muskulaturi, relaksaciju uterus, detrusora urina u zidu mokraćne bešike, stimulišu sekreciju insulina, inhibira otpuštanje histamina iz mastocita, povećava sekreciju renina iz bubrega [66].

1.4.5. Beta3 adrenoceptor

U skorije vreme, otkriven je treći podtip, ADRB3 [67, 68]. Njegova glavna uloga je stimulacija lipolize i termogeneze u skeletnim mišićima [69].

ADRB3 receptor je neosetljiv na uobičajene beta agoniste, te se često naziva "atipičnim" adrenoceptorom. Njihova teoretska uloga i farmakološka upotreba bi se mogla naći u sredstvima za redukciju telesne težine, ali je njihov efekat limitiran nuspojavama od kojih je najizraženiji mišićni tremor.

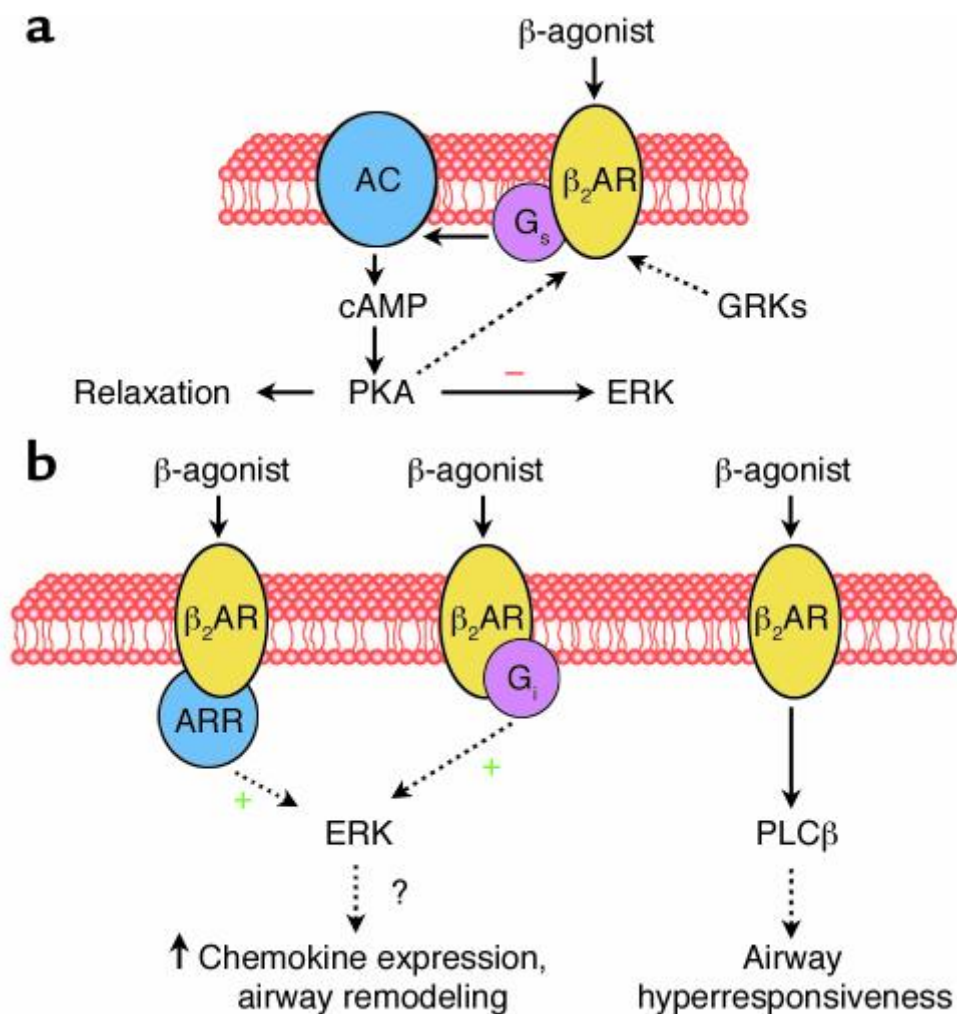
U poslednje se vreme akumuliraju farmakološki rezultati koji ukazuju na prisustvo i četvrtog tipa adrenoceptora lokalizovanog u srčanom tkivu različitih vrsta, ali ne i čoveka [70]. Iako se prema nekim karakteristikama preklapa sa ADRB3, i postoje posredni dokazi da je to odvojen entitet, još uvek nedostaje čvrst dokaz o njegovom postojanju [71]. Neki ga autori smatraju "varijantom" ADRB1 [72,73].

1.5. MEHANIZAM RELAKSACIJE GLATKOG MIŠIĆA BRONHA

Studije su pokazale da relaksacija muskulature disajnog puta kako u nivou centralnih, tako i na nivou perifernih disajnih puteva, zavisi isključivo od ADRB2 [74,75] (Sl. 1.3) Kod astmatičara, selektivna stimulacija ADRB1 nema bronhodilatacijski efekat [76]. Pre- i post-sinaptički mehanizmi intracelularne modulacije holinergičke neurotransmisije i tonusa glatkog mišića bronha prikazani su na Sl. 1.4. [77].

1.6. ANTIINFLAMATORNI EFEKTI

Smatra se da dugodelujući beta2 agonisti svoju protektivnu ulogu u astmi duguju još nekim dodatnim mehanizmima pored relaksacije glatke muskulature disajnog puta [78]. U bolestima kao što je astma, mišići bronha sekretuju medijatore inflamacije, prostanoide, cito- i hemokine [79], što dovodi do ubrzanja i amplifikacije zapaljenskog procesa u zidu disajnog puta. Smatra se da mišići disajnih puteva kod astmatičara proliferišu brže, proizvode više hemokina i citokina kao i različite tipove ekstracelularnih proteina matriksa u odnosu na zdrave osobe [80,81]. Ova pojava potiče od izmenjene homeostaze kalcijuma dovodeći do povećanja mitohondrijske aktivnosti i sniženog nivoa ključnih faktora transkripcije [82]. Skorašnji podaci ukazuju da i SABA i LABA imaju sposobnost da smanje ekspresiju inraćelijskog adhezijskog molekula-1 i oslobađanje granulocyte-macrophage colony-stimulating - faktora izazvanog interleukin-1beta u mišićima bronhijalnog stabla. Dodatno, supstance koje utiču na povećanje inraćelijskog cAMP, samim tim aktivirajući i protein kinazu A (PKA) mogu imati antiinflamatorni efekat u disajnim putevima [83].



Slika 1.3 (a) Mehanizam relaksacije glatkog mišića izazvan beta-agonistima. Molekul beta agoniste vezivanjem za beta2AR aktivira G protein, dovodeći do aktivacije adenil ciklaze (AC), formiranja cAMP, i sledstvene aktivacije protein kinaze A (PKA) što vodi do fosforilacije ciljnih proteina i, kao rezultat, relaksaciju glatkog mišića. PKA takođe izaziva fosforilaciju ADRB2, dovodeći do povećanog afiniteta za G protein. Beta-agonist paralelno izaziva fosforilaciju G protein receptor kinaze (GRK) na ADRB2, aktivirajući ADRBrestin (ARR).

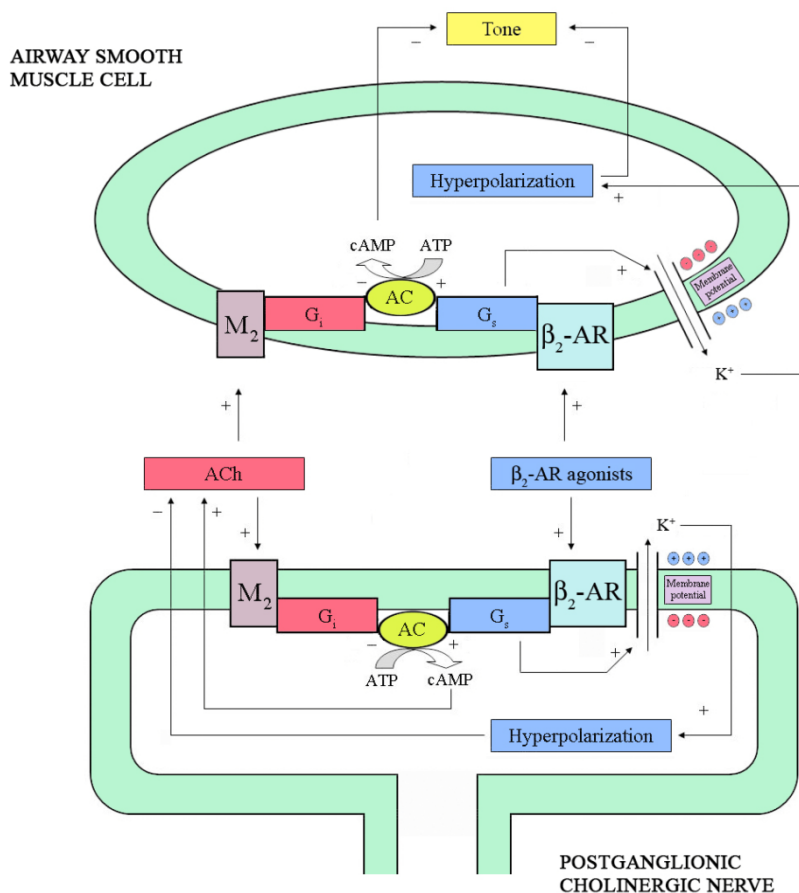
(b) stalna upotreba beta-agonista može povećati atktivaciju G_i proteina i/ili povećano vezivanje ARR. U tim uslovima, beta-agonisti mogu izazvati aktivaciju ekstraćelijske signal-regulišuće kinaze - ERK koja dovodi do

povećane produkcije inflamatornih citokina i dovodi do remodelovanja disajnih puteva. Stalna aktivacija ADRB2 takođe dovodi do ekspresije fosfolipaze C-beta (PLCbeta) i posledične bronhijalne hiperreaktivnosti [77].

Iz: Stephanie A. Shore, Jeffrey M. Drazen. Beta-Agonists and asthma: too much of a good thing? J Clin Invest. 2003;112(4):495-497.

1.7. DISFUNKCIJA ADRB2

Kada je ćelija ili tkivo prvi put izloženo dejstvu ADRB2 agonista, nastaje brz inicijalni odgovor koji se ogleda u produkciji cAMP. Međutim, izložena konstantnom uticaju leka, ćelija postaje "desenzibilisana", odnosno refrakтерна na dalju stimulaciju, te vrednosti cAMP padaju na skoro bazalni nivo i pored prisustva ADRB2 agonista. Ta desenzibilizacija zavisi kako od koncentracije ADRB2 agonista, tako i od vremena izlaganja dejstvu leka. Kod svih ćelija, procesi desenzitizacije se javljaju u akutnoj i hroničnoj fazi [84]. Postoje in vivo i in vitro dokazi da su ADRB2 manje osetljivi kod astmatičara nego u zdravoj populaciji [85,86]. Još uvek nije potpuno jasno, međutim, da li je ta smanjena osetljivost receptora uzrok ili posledica postojanja astme [68].



Slika 1.4. Pre- i post-sinaptički mehanizmi intracelularne modulacije holinergičke neurotransmisije i tonusa glatkog mišića bronha. Na presinaptičkom nivou, stimulacija ADRB2 dovodi do hiperpolarizacije ćelijske membrane i smanjenja oslobađanje acetilholina (ACh). Nasuprot tome, direktna aktivacija adenil ciklaze (AC) pospešuje oslobađanje ACh . Stimulacija ADRB2 kao i direktna stimulacija AC otvara Ca kanale izazivajući hiperpolarizaciju ćelijske membrane. ACh oslobođen iz postganglijskih holinergičkih nerava vezuje se za M2 pre- i postsinaptičke muskarinske receptore, inhibirajući oslobađanje ACh povećavajući tonus glatkog mišića bronhija. cAMP: ciklični 3',5'-adenozin monofosfat; ATP: adenzin trifosfat; G_s i G_i: stimulatorne i inhibitorne subjedinice G-proteina.

Slična kaskada događaja se izgleda dešava u odgovoru na acetilholin (ACh) [78] oslobođen od strane holinergičkih nerava putem M3-muskarinskih receptora.

Dodatno, aktivacijom M2-muskarinskih receptora dolazi do inhibicije AC, i sledstvenog smanjenja nivoa cAMP i aktivnosti PKA. ATP: adenzin trifosfat.

Iz: Barisione G, Baroffio M, Crimi E, Brusasco V. Beta-Adrenergic Agonists Pharmaceuticals 2010, 3, 1016-1044 [20] .

Nedavno je dokazano da infekcija epitela rinovirusom smanjuje funkciju ADRB2 u glatkoj muskulaturi bronhija [87]. To može da objasni kliničku opservaciju o lošijem dejstvu terapije tokom pogoršanja astme izazvanih virusnim infekcijama. Neki autori pronalaze da inhibitorni uticaj interleukina-1beta na isoproterenolom izazvanu bronhodilataciju može biti poništena dejstvom inhibitora ciklooksigenaze 2 (COX2) [88]. U zaključku, verovatnije je da je smanjena osetljivost ADRB2 u astmatičara pre posledica oboljenja nego njen uzročnik.

1.7.1. Desenzitizacija putem fosforilacije

Kovalentna modifikacija ADRB predstavlja najraniji događaj u procesu desenzitizacije [89]. U vremenskom okviru kraćem od 30 minuta od ekspozicije agonistima in vitro nastupa fosforilacija ADRB što je detaljno objašnjeno na

Sl 1.5.

PKA je od cAMP-zavistan enzim koji se aktivira i pri malim koncentracijama ADRB2 agonista, kao što su cirkulišući kateholamini ili lekovi. Svi procesi koji dovode do povećanja intracelularne koncentracije cAMP dovoljne da aktivira PKA, rezultiraće u fosforilaciji ADRB2.

Ukoliko su cisteinil-leukotrieni, oslobođeni iz lokalnih ili cirkulišućih inflamatornih ćelija ili čak iz samih ćelija glatke muskulature bronhija, odgovorni za ADRB2 desenzitizaciju u astmi, onda konkurentna primena

cisteinil-LT1-R antagonista može da predstavlja korisnu strategiju u poboljšanju odgovora ADRB2 na agoniste u ovoj bolesti.

1.7.2. Desenzitizacija putem sekvestracije

Otpribliže 30 minuta nakon ekspozicije agonistima, ADRB2 na površini ćelije započinju proces koji dovodi do njihovog povlačenja, tj. sekvestraciji ka unutrašnjosti ćelije. Procenat receptora koji će biti podvrgnut ovom procesu zavisi od tipa tkiva. Kod ćelija koje poseduju manji broj receptora na površini, kao što su limfociti, oko 60% receptora će biti podvrgnuto ovom procesu [90].

Skoriji podaci ukazuju da su ADRB2 na površini ljudskih proinflatornih ćelija ekstremno osetljivi na ovu pojavu, dok su ADRB2 na površini ćelija glatke muskulature bronhija relativno rezistentni. Po prestanku dejstva agonista, receptori prethodno izloženi procesu sekvestracije, koji nisu u međuvremenu bili izloženi procesu degradacije, vraćaju se na površinu ćelije.

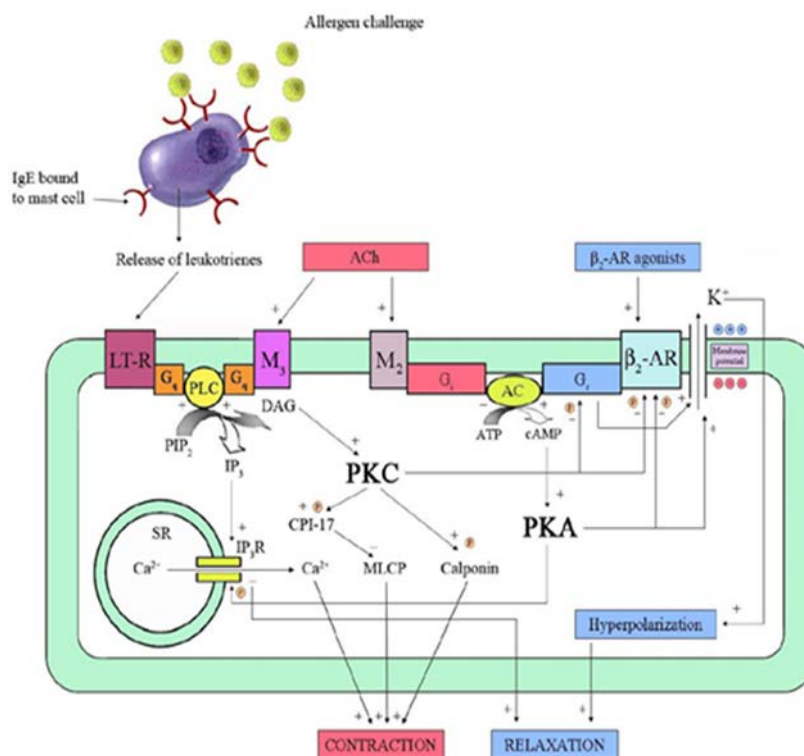
1.7.3. Desenzitizacija putem nishodne regulacije

Nekoliko časova nakon izlaganja agonistima, nastupa generalizovani gubitak funkcije ADRB2 receptora. Taj se proces naziva nishodnom regulacijom, i dostiže svoj plato 18–24 h po izlaganju beta agonistima. Tim se putem može izgubiti čak 90% receptora u nekim tkvima i smatra se glavnim uzrokom agonistima izazvanom ADRB2 desenzitizacijom. Pretpostavljeni mehanizmi odgovorni za ovaj uticaj su: smanjenje produkcije sa jedne, i povećanje degradacije receptorskih proteina, sa druge strane. Za prvonavedeni, pad proizvodnje novih receptora u prisustvu agonista, u najvećoj je meri odgovoran gubitak stabilnosti mRNA, kao i promena brzine transkripcije [91].

Drugi mehanizam nishodne regulacije se odnosi na prethodno pomenutu degradaciju sekvestriranih ADRB2.

1.7.4. ADRB paradoks

Već se duže vreme analizira mogućnost da dugotrajna i stalna upotreba dugodelujućih ADRB2 agonista (LABA) kao lekova koji se godinama unazad koriste u terapiji astme, može izazvati i pogoršanje kontrole bolesti. Nekoliko je studija pokazalo tranzitorno povećanje stepena bronhijalne hiperreaktivnosti na histamin kao rezultat ove terapije [92,93].



Slika 1.5. Mehanizmi relaksacije i ADRB2 desenzitizacije u glatkoj muskulaturi bronhija. Vezivanje specifičnog agonista za ADRB2 stimulira receptorom vezan protein G_s, koji aktivira adenil ciklazu (AC). Sledstveno povećanje cikličnog 3',5'-adenozin monofosfata (cAMP) aktivira protein kinazu A (PKA), koja izaziva fosforilaciju inozitol 1,4,5-trifosfatnog receptora (IP₃R) na sarkoplazmatičnom retikulumu (SR) i otvara Ca²⁺-aktivirane K⁺ (BKCa)

kanale, dovodeći do relaksacije. Aktiviran PKA izaziva fosforilaciju ADRB2, odvajajući ga od Gs-proteina. Izlaganjem aktivisanog mastocita alergenu izaziva oslobađanje leukotriena (LT). Njihovom interakcijom sa specifičnim receptorima, npr LT-R, aktivira se Gq-protein, koji pojačava aktivnost fosfolipaze C (PLC). PLC katalizira hidrolizu fosfatidilinozitol 4,5-bifosfata (PIP2), koji proizvodi IP3 i diacilglicerol (DAG). IP3 dovodi do kontrakcije povećavajući oslobađanje Ca^{2+} iz SR dok DAG aktivira protein kinazu C (PKC). Ova izaziva fosforilaciju nekoliko substrata kao što su kalponin i CPI-17, koji je inhibitor miozin-laki-lanac- fosfataze (MLCP). Dodatno, PKC izaziva fosforilaciju i ADRB2 i Gs-proteina.

Iz: Barisione G, Baroffio M, Crimi E, Brusasco V. Beta-adrenergic agonists. *Pharmaceuticals* 2010; 3: 1016-1044. [20]

Bronhodilatatorno dejstvo salmeterola je ostalo očuvano, ali je zaštitni uticaj na metaholinom izazvanu bronhokonstrikciju značajno umanjen prema studiji Cheunga i sar iz 1992. god. [94]. Izgleda da ADRB paradoksalno regulišu tonus bronhijalne muskulature emitovanjem signala koji izazivaju bronhijalnu konstrikciju. Ovi su rezultati identifikovali gen za fosfolipazu C-beta 1 kao potencijalni terapijski cilj u modifikovanju terapijskog odgovora na LABA kod astmatičara [95]. Dodatno objašnjenje bilo bi da stalna upotreba ADRB2 agonista može negativno uticati na ravnotežu faktora koji izazivaju inflamaciju u disajnim putevima i njihovo remodelovanje [96].

Dve su studije [97,98] pokazale da ADRB agonisti i antagonisti, mogu proizvesti recipročne efekte na procese ćelijske signalizacije u zavisnosti od dužine njihove primene. Dakle, kratkotrajno izlaganje beta - blokatorima je izazvalo bronhokonstrikciju, dok je, paradoksalno, hronična primena istih agenasa imala protektivni uticaj na metaholinom izazvano suženje disajnih puteva [97]. Ovaj bronhoprotektivni uticaj beta blokatora je bio povezan kako sa smanjenjem inflamacije i metaplazije mukusnih ćelija, ushodnom regulacijom ADB2 tako i sa smanjenom ekspresijom različitih spazmogenih ćelijskih

proteina [98]. Ovi murini modeli (na miševima) su kasnije potvrđeni u istraživanju sa deset pacijenata sa blagom astmom koji su tokom devet nedelja dobijali rastuće doze nadolola [99]. Kod osam od deset ispitanika terapija ovim beta blokatorom je dovela do značajnog, dozno-zavisnog sniženja bronhijalne reaktivnosti na metaholin. Naravno, ovakvi intrigirajući zaključci zahtevaju sprovođenje studija sa većim brojem ispitanika [100,101].

1.7.5. Kortikosteroidi i proces desenzitizacije

Dokazano je da kortikosteroidi povećavaju sintezu ADRB2, zaustavljajući procese nishodne regulacije i pojačavaju afinitet receptora za beta agoniste [102]. Kratkotrajna ekspozicija beklometazon dipropionatu dovodi do oporavljanja disfunkcije ADRB2 izazvane alergenima. Ovo se događa zahvaljujući povećanoj aktivnosti alfa-subjedinice Gs proteina, sugerišući dejstvo nezvezano sa transkripcijom gena [103].

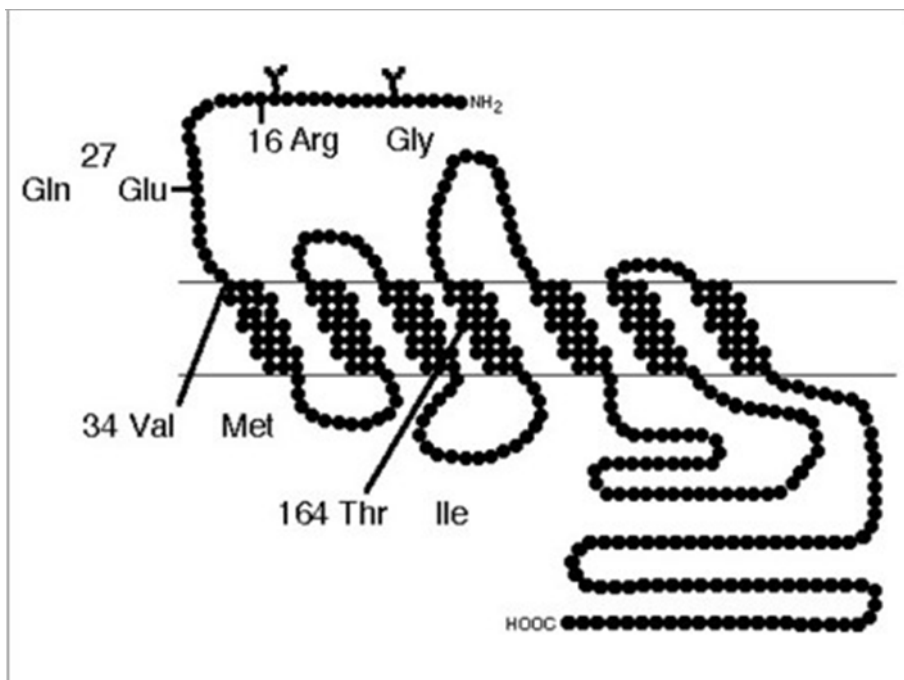
1.8. GENETSKI POLIMORFIZAM ADRB2

Odavno je dokazano da polimorfizam gena koji kodiraju ADRB2 u humanom genomu [104] utiče na heterogeni odgovor na ADRB2 agoniste i /ili disfunkciju receptora u astmi. [105,106,107].

Od devet jednonukleotidnih polimorfizama (single-nucleid polymorphism SNP) u regionu kodiranja i osam u regulatornom regionu ADRB2 gena 50, najviše ispitivani polimorfizmi u odnosu na fenotipove astme su dva SNP u kod regionu: Arg16Gln i Gln27Glu.

Za ova se dva ADRB2 polimorfizma, Arg16Gly i Gln27Glu, pretpostavlja da određuju i modifikuju odgovor na lečenje sa beta2-agonistima kod pojedinaca sa astmom [108,109] (Sl 1.6).

Izmena citozina guaninom na poziciji 46 ADRB2 gena determiniše zamenu arginina (Arg) glicinom (Gly) u kodonu 16.



Slika 1.6 Beta 2 adrenoceptor (ADRB2) i najčešći single - nucleid polimorfizmi SNP - tačkasti polimorfizam.

Iz: Pereira S, Gava I, Giro C, Mesquita E. Adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: what can genetics explain? Arq Bras Cardiol.2010; 6(94): 789-797. [110].

ADRB2 gen je lociran na hromozomu 5q31-32 i sadrži 413 amino kiselina. Prema SNP (single - nucleotid polimorfis) bazi, postoji preko 100 SNP u promoterskom regionu, 5 u 5'UTR regionu i 18 u kodirajućem regionu ovog gena. Od sedam najčešćih polimorfizama, (dva za beta-1, tri za beta-2, jedan za beta-3 i jedan za alpha-2c, mutacija dva najznačajnija SNP-a, Arg16Gly i

Gln27Glu, koji se nalaze na nukleotidnoj poziciji 46 i 79 kodirajućeg regiona ADRB2 gena, mogu izazvati promenu u redosledu aminokiselina (Slika 1.6). Tako izmenjeni redosled može biti odgovoran za nishodnu regulaciju ADRB2 i dovesti do njegove desenzitizacije [111].

Arg16Gly

U početku se smatralo da je Arg najčešći alel u populaciji i shodno tome je nazvan "wild-type allele". Međutim, kasnije studije su dokazale da je Gly učestaliji (Arg/Gly, alelska frekvencija 0.40/0.60). Ipak, kako je Arg inicijalno opisan kao "wild type", a Gly kao "mutant", ta podela se i dalje zadržala.

Gln27Glu

Supstitucijom adenina guaninom na poziciji 79 ARDB2 gena, nastaje zamena glutamina glutaminskom kiselinom na kodonu 27. Glutamin alel, se, kao učestaliji u populaciji, naziva "wild-type" alelom, dok je glutaminska kiselina nazvana "mutantnim" alelom. (Gln/Glu, alelska frekvencija 0.55/0.45).

Trh164Ile

Zamenom nukleotida na poziciji 491 ADRB2 gena, nastaje zamena aminokiselina na kodonu 164 (Trh164Ile).

Arg16Gly/Gln27Glu

Postoji značajna neravnoteža u populacijskoj raspodeli između kodona 16 and 27, tako da pojedinci koji su homozigoti za Glu27Glu gotovo uvek imaju i homozigotni Gly na kodonu 16 (Gly16Gly). Nasuprot tome, homozigoti Gln27Gln mogu biti kako homozigoti (Arg16Arg ili Gly16Gly), tako i heterozigoti (Arg16Gly) na kodonu 16. Kombinacija (haplotip) Arg16Glu27 se zbog toga najređe i sreće, u manje od 1% slučajeva.

Frekvencija alela uključenih u ADRB2 polimorfizam varira među pojedinim etničkim grupama. Kod Afroamerikanaca, učestalost Arg16 alela je 49%, dok kod belaca i Azijata ona iznosi 46%, odnosno 59%. Što se alela Glu27 tiče, ona iznosi respektivno 20%, 35% i 7%.

Frekvencija Ile164 kod belaca i Afroamerikanaca iznosi 2% do 4%; kod Azijata 0% do 1%, a kod Latinoamerikanaca oko 3% [111].

Ustanovljeno je da polimorfizmi na kodonima 16 and 27 ne utiču ni na kapacitet ADRB2 da se vežu za kateholamine, ni na aktivnost adenil ciklaze [111]. S druge strane, jasno je dokazano da su ovi polimorfizmi značajno povezani sa sklonošću ADRB2 da podlegnu procesima nishodne regulacije [112].

In vitro studije pokazuju viši stepen desenzitizacije nakon primene izoprenalina u slučaju postojanja Gly16 u odnosu na Arg16 varijantu. U istoj studiji Glu27 varijanta, izazivajući izmenu konformacije ADRB2, pokazuje veći otpor, tj iskazuje manji stepen nishodne regulacije od Gln27 varijante [110]. Shodno tome, pretpostavka je bila da Glu27 polimorfizam proizvodi ADRB2 receptore sa većim stepenom odgovora na adrenergičke agoniste.

Međutim, haplotip Gly16Glu27 je osetljiviji na fenomen nishodne regulacije u odnosu na Gly16Gln27 kombinaciju, najverovatnije zbog predominantne uloge Gly16 u odnosu na Glu27 varijantu.

Arg16Glu27 kombinacija je ona koja pokazuje najveći otpor, tj najmanju sklonost desenzitizaciji [112].

Nasuprot ovim rezultatima, u studijama *in vivo* analizirane su tri kombinacije: Arg16Gln27Thr164, Gly16Glu27Thr164 i Gly16Gln27Thr164. Posle dve nedelje peroralne primene izoprenalina, Gly16Glu27Thr164 kombinacija je pokazala najmanju desenzitizaciju, dok je, u drugim studijama, intravenska primena izoprenalina rezultirala većim stepenom desenzitizacije kod Arg16Gln27Thr164 kombinacije [113].

Ovi su se rezultati, koji ukazuju na značajnu osetljivost Arg16 alela u odnosu na fenomen nishodne regulacije, značajno razlikovali od očekivanih, i bili su u diskrepanci sa *in vitro* studijama. Jedno od mogućih objašnjenja za ovaj fenomen bi bilo da su u *in vivo* uslovima receptori već izloženi dejstvu kateholamina u bazalnim uslovima, te da se već dogodila nishodna regulacija kod Gly16 polimorfizma. Shodno tome, ti ADRB2 ni nemaju više sposobnost dalje desenzitizacije u odnosu na Arg16 kombinacije [104].

Dosadašnje epidemiološke i kliničke studije su pokazale da ADRB2 polimorfizam može imati značajne implikacije u patofiziologiji astme, ekspresije fenotipa astme, kao i terapijskog odgovora na ADRB2 agoniste.

Tako je kod Arg16Arg homozigota dokazana češća pojava egzacerbacija, [114,115] kao i da ovi pacijenti imaju manje koristi od terapije od onih sa Gly16Gly genotipom. To je istraživanje pokazalo da polimorfizam na poziciji 16 nema uticaja kod pacijenata na terapiji LABA uz srednju koncentraciju inhalacijskog kortikosteroida, izuzev u populaciji Afroamerikanaca čiji uticaj još treba da bude ispitan [116]. Funkcionalno, ADRB2 je podložan procesu desenzitizacije tokom konstantnog izlaganja beta agonistima zbog fosforilacije receptora pod dejstvom receptor kinaza [117]. Kodirajući region je polimorfan na kodonu 41, gde glutamin (Gln) može biti zamenjen leucinom (Leu) (minor alel), ali skoro isključivo kod ljudi afričkog porekla. Stoga, GRK5-Leu41 predstavlja polimorfizam koji promovise smanjenje funkcije ADRB2 tokom stalne ekspozicije agonistima, doprinoseći varijabilnosti odgovora na terapiju kod pacijenata afričkog porekla. Ukoliko se posmatra da je ekspresija ADRB2 regulisana dejstvom sistemskih kateholamina i/ili konstantnom izlaganju ADRB2 agonistima, tada se može zaključiti da je glutamin (Glu) 27 alel izražen u većoj meri u tkivu pluća, jer je refrakterniji na proces nishodne regulacije. Tako je u Holovoj studiji iz 1995. god pokazano da astmatičari sa Glu27 alelom imaju otprilike četverostruko niži stepen bronhijalne hiperreaktivnosti na

metaholin u odnosu na Gln 27 [118]. Nedavno je otkriven novi gen (arginin 1) povezan sa akutnim odgovorom na inhalacijske ADRB2 agoniste [119].

U isto vreme, publikovane su brojne studije o ulozi ovih genetskih varijacija u astmi i njihove povezanosti sa njenim fenotipovima. Neke studije su pokazale da je Gli16 alel povezan sa beta-agonistima posredovanom inhibicijom ADRB2, dok prisustvo Gln27 varijante izgleda da igra zaštitnu ulogu protiv ovog efekta [120, 121].

Prisustvo polimorfizma Gly16Arg u ADRB2 genu povezano je sa beta-agonistima posredovanom inhibicijom ADRB2, dok prisustvo polimorfizma Gln27Glu poništava ovaj efekat [122, 123].

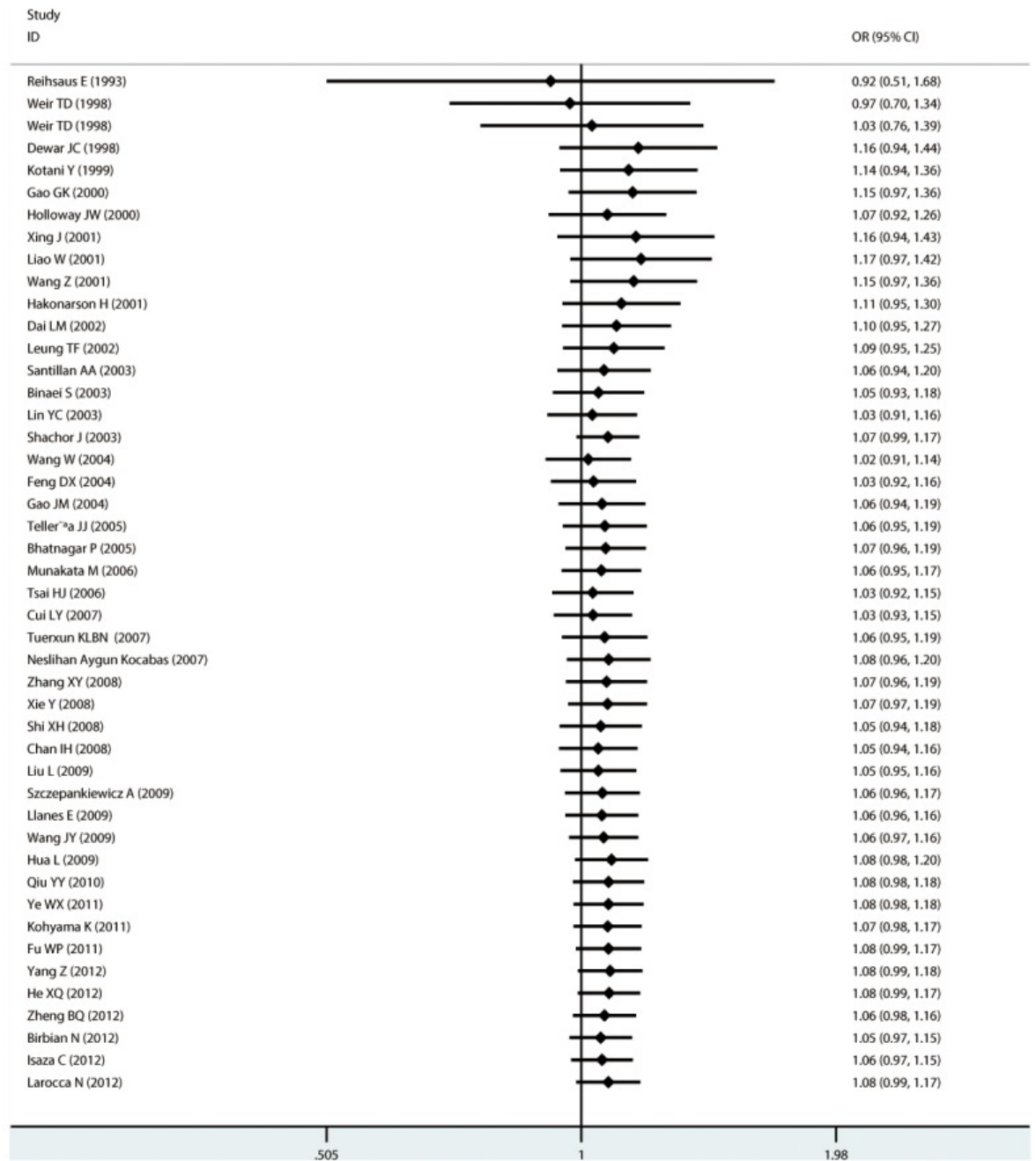
Postoje podaci da je kod osoba sa astmom prisustvo polimorfizma Gly16Arg povezano sa prisustvom težih oblika bolesti, većeg broja egzacerbacija i većeg broja očekivanih neželjenih efekata kratkododelujućih beta agonista [124,125,126], ali je vrlo malo podataka o tome kako pacijenti koji su nosioci pomenutih polimorfizama reaguju na nove oblike terapije uvedene poslednjih desetak godina (dugodelujući beta agonisti, sami ili u fiksnim kombinacijama sa kortikopreparatima) [127].

U protekloj deceniji, studije ukazuju da je Gli16 u korelaciji sa hiperreaktivnošću disajnih puteva, i pojavom nokturalne astme [128, 129, 130,131].

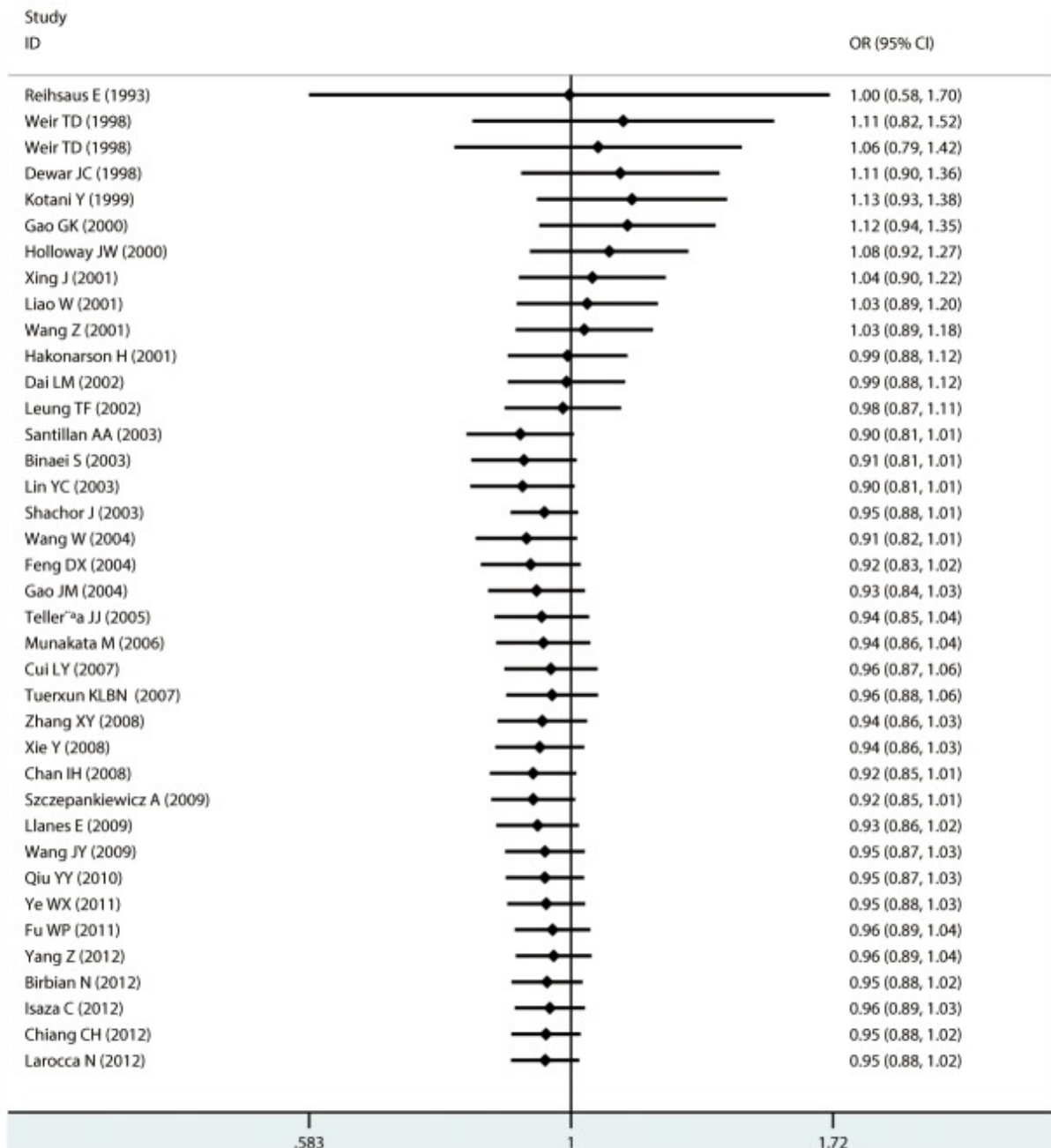
A Human Genome Epidemiology (Huge) Network meta-analiza je pokazala zaštitni efekat Glu27 alela kod astme, koji je modifikovan sa aminokiselinom u položaju 16 [132]. U mnogim je studijama uočeno da je genetska osnova različitih fenotipa astme u vezi sa dopunskim faktorima ove heterogene bolesti kao što su starost, pol i izloženost uticaju životne sredine. Epidemiološke studije u srpskoj populaciji su pokazale da je učestalost astme kod dece oko 5% [133], a kod odraslih oko 3%, sa stopom mortaliteta od 4.45/100.000 [134].

Skoro objavljena meta-analiza [135] pokušala je da sistematizuje dosadašnje, ponekad kontradiktorne, podatke i da pruži kumulativne zaključke iz dosadašnjih publikacija (uključene su studije publikovane od 1993. do 2012 god).

Prema njihovim nalazima, što se tiče Arg16Gly polimorfizma, postoji stabilan trend procenjenog rizika za nastanak astme u komparaciji alela za ovu kombinaciju (Sl 1.7.) Kao što je prikazano na Sl 1.8. za Gln27Glu, u svim analiziranim studijama nije definisan trend značajne povezanosti.



Slika 1.7. Forest-plot dijagram kumulativnih meta-analiza povezanosti Arg16Gly sa astmom prema komparaciji alela. Iz: Lian S, Chen X, Deng J, Wei X, Gong C, Chen Z et al. Beta-2 adrenergic receptor (adrb2) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies. PLoS One. 2014; 9(8): e104488. [135]



Slika 1.8. Forest-plot dijagram kumulativnih meta-analiza povezanosti Gln27Glu sa astmom prema komparaciji alela. Iz: Lian S, Chen X, Deng J, Wei X, Gong C, Chen Z et al. Beta-2 adrenergic receptor (adrb2) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies. PLoS One. 2014; 9(8): e104488. [135]

Sveukupni rezultati ne ukazuju na povezanost Arg16Gly, Gln27Glu, kao i drugih, ređe uočenih polimorfizama, Thr164Ile, Arg19Cys i rizika za pojavu astme u celokupnoj populaciji [131,136].

Što se tiče polimorfizma Gln27Glu, primećen je trend zaštitnog uticaja Gln/Glu i Glu/Glu genotipova u čijem prisustvu postoji manji rizik od nastanka astme. [132].

Što se tiče analize uticaja genotipova i etničke pripadnosti, nesignifikantan trend povećanja rizika za nastanak astme je primećen kod Arg16Gly polimorfizma u južnoameričkoj populaciji, a zaštićen kod Gln27Glu polimorfizma u severnoameričko [131]. Razlozi za statističku nesignifikantnost ovih razlike se mogu pronaći u relativno malim veličinama uzoraka, što znači da bi bilo potrebno sprovesti nova ispitivanja sa znatno većim brojem učesnika [137, 138].

Thr164Ile se takođe nalazi na kodirajućem regionu ADRB2 gena, a izmena citozina za timin može dovesti do promene aminokiselina iz treonina (Thr) u izoleucin (Ile) [139]. Svi navedeni polimorfizmi mogu dovesti do funkcionalnih izmena ADRB2. Najveći broj studija se odnosi na već navedene polimorfizme kodirajućeg regiona. Poslednjih se godina pojavljuju studije koje analiziraju polimorfizme promotorskog regiona. Arg19Cys se nalazi na 59-oj poziciji, a izmena timina u citozin dovodi do promene aminokiseline arginin (Arg) u cistein (Cys) [140]. Ova promena utiče na translaciju ADRB2 mRNK, čime reguliše ćelijsku ekspresiju receptora na površini [141].

Obzirom na ove podatke, važno je istražiti genetski faktore povezane sa astmom. Do danas, nijedna studija o ADRB2 polimorfizmu gena u astmi nije izvršena u srpskoj populaciji, te je osmišljeno istraživanje sa ciljem da se ispita uticaj ADRB2 polimorfizama gena na razvoj astme kod odraslih pacijenata u Srbiji i da se oceni terapijski odgovor u odnosu na ADRB2 genotip.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Određivanje učestalosti polimorfizma (Gly16Arg), (Gln27Glu) beta2-adrenergičkog receptora (ADRB2) kod osoba sa bronhijalnom astmom i zdravih ispitanika
2. Ispitivanje povezanosti kombinacija polimorfizama (Gly16Arg), (Gln27Glu) i agonista beta2-adrenergičkog receptora sa tokom bolesti i težinom kliničke slike kod osoba sa bronhijalnom astmom
3. Ispitivanje povezanosti kombinacija polimorfizama (Gly16Arg), (Gln27Glu) beta2-adrenergičkog receptora i terapijskog odgovora kod osoba sa bronhijalnom astmom lečenih dugodelujućim beta-agonistima (LABA), samostalno ili u fiksnoj kombinaciji sa kortikosteroidima

3. MATERIJAL I METODE

Tip studije: panel studija, kombinacija studije preseka i kohortne studije.

Mesto i period istraživanja: Kliničko odeljenje za pulmologiju, alergologiju i kliničku imunologiju KBC «Zvezdara», Beograd, period: april 2009. do novembra 2011. godine.

Studija je urađena u okviru projekta No 173008 "Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturalna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera" 2011-2016. god koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnologiju RS.

3.1. SELEKCIJA ISPITANIKA

U studiju je uključena grupa od 171 bolnički i ambulantno lečenih pacijenata sa dijagnostikovanom astmom Kliničkog odeljenja za pulmologiju, alergologiju i kliničku imunologiju KBC «Zvezdara», Beograd, u periodu od aprila 2009. do novembra 2011. godine, (Etički komitet broj IRB00003818), dok je kontrolnu grupu sačinjavala grupa od 101 zdravih dobrovoljaca, grupno mešovanih sa obolelima po polu i uzrastu, koji biohemijski i klinički nemaju nijednu akutnu i hroničnu bolest niti primaju bilo kakvu terapiju, a koji su u istom periodu regrutovani tokom sistematskih pregleda. Medijana follow-up period bio je 16 meseci, sa nizom 1-31 meseci.

Kriterijumi za uključivanje Uslov za uključenje u studiju je dijagnostikovana bronhijalna astma, uzrast stariji od 18 godina, potpisan pisani pristanak svakog učesnika.

Kriterijumi za isključivanje

Nesaglasnost pacijenta za učestvovanje u studiji, neadekvatna saradnja, trudnoća, teže konkomitantne bolesti koje ograničavaju procenu efekta terapije.

Dizajn studije

Za svih 171 pacijenata, astma je dijagnostikovana na osnovu fizičkog pregleda, upitnika o kvalitetu života [Astma Control Test (ACT)] i spirometrijskih parametara: forsirani ekspiratorni volumen u 1 s (FEV1) i forsirani vitalni kapacitet (FVC), meren pomoću Ganshorn SpiroJet PoverCube LF8.5F. Stepen kontrole astme i težina bolesti su procenjeni u skladu sa važećim smernicama Globalne inicijative za astmu (GINA) na osnovu rezultata ACT i spirometrijskih testiranja. Od ukupno 171 pacijenata uključenih u studiju, 149 su praćeni tokom tri uzastopna poseta lekaru, u cilju procene efikasnosti terapije sa beta2-agonistima.

Kontrolna grupa se sastojala od 101 zdravih ispitanika, i bili su obuhvaćeni službenici koji su bili na redovnom godišnjem sistematskom pregledu u Domu zdravlja "Stari Grad", Beograd, u periodu septembar-oktobar 2011.god. Svi kontrolni subjekti su bili podvrgnuti fizikalnom pregledu i laboratorijskom ispitivanju. Pacijenti sa bilo kakvom hroničnom bolesti i terapijom su bili isključeni iz ispitivanja.

Analizirani su podaci koji pokrivaju osnovne informacije (datum rođenja, antropometrijski podaci, upotreba lekova) i navika pušenja. Svi učesnici su dali pristanak za učestvovanje u ispitivanju.

Veličina uzorka procenjena je na osnovu raspoloživog broja pacijenata i pripadnika kontrolne grupe u posmatranom periodu u datim ustanovama, ali i imajući u vidu raspoloživost reagenasa za genetičke analize.

3.2. GENOTIPIZACIJA ARG16GLI I GLN27GLU POLIMORFIZAMA

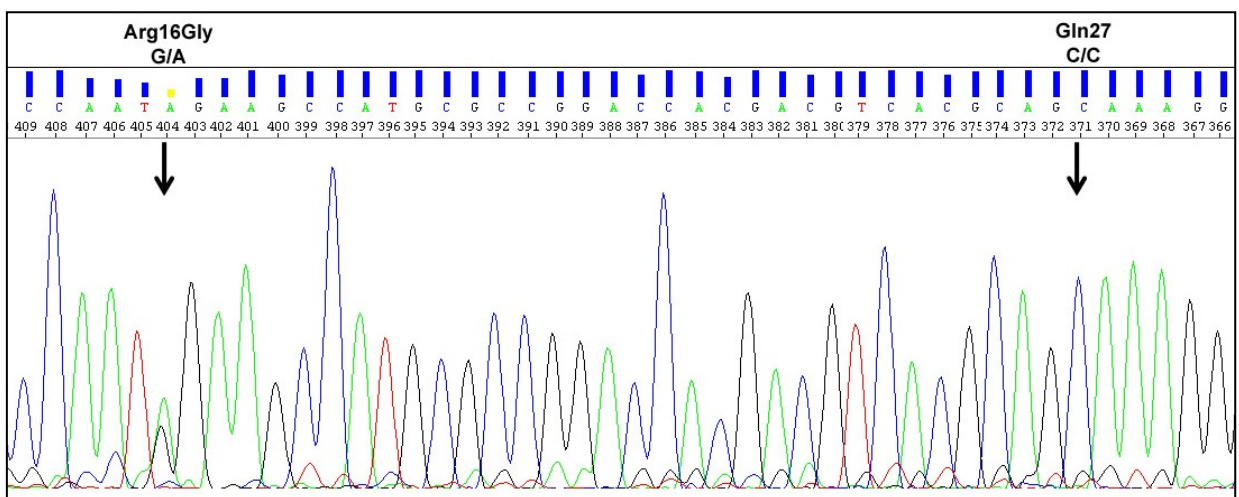
Kod svih ispitanika je bila izvršena analiza prisustva polimorfizama (Gly16Arg), (Gln27Glu) u genu za ADRB2. Za ovu analizu su korišćeni uzorci periferne krvi pacijenata, iz kojih je DNK izolovana komercijalnim kitom. Za analizu je korišćeno 5mL venske krvi uzete sa 3,8% Na-citratom u odnosu 9 : 1 i 5mL seruma. Segment DNK u kome se nalaze navedeni polimorfizmi analiziran je metodama PCR (polymerase chain reaction) i direktnog sekvenciranja DNK. Za umnožavanje segmenta DNK koji obuhvata deo 5' regulatornog regiona i deo egzona 1 gena ADRB2 korišćeni su oligonukleotidi 5'-CTGAATGAGGCTTCCAGGCGT-3' (ADRB2F) i 5'-ACAATCCACACCATCAGAAT-3' (ADRB2R).

Za izolovanje DNK iz limfocita periferne venske krvi korišćen je komercijalni kit GeneJET™ Genomic DNA Purification (ThermoScientific). Metodom PCR korišćenjem oligonukleotida ADRB2F i ADRB2R umnožen je na prethodno opisan način [142] segment dužine 584bp koji obuhvata region u kome se nalaze varijante Arg16Gly i Gln27Glu. Prečišćavanje fragmenata DNK dobijenih reakcijom lančanog umnožavanja je izvršeno komercijalnim kitom GeneJET™ PCR Purification (ThermoScientific).

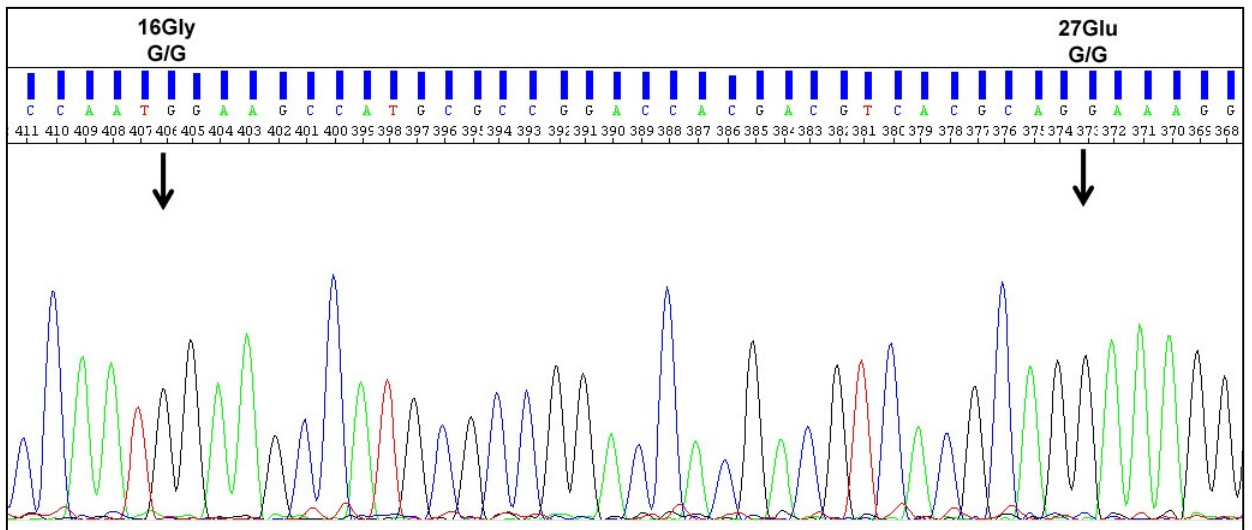
Sekvenciranje DNK je vršeno komercijalnim kitom Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Nakon umnožavanja, dobijeni produkti reakcije sekvenciranja su prečišćeni i rastvoreni u 20µL HiDi Formamide (Applied Biosystems). Tako pripremljeni uzorci su naneti na aparat i podvrgnuti kapilarnoj elektroforezi. Sekvenciranje je vršeno na četvorokapilarnom automatizovanom sistemu za elektroforezu sa sistemom za detekciju zasnovanim na fluorescenciji 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Podaci dobijeni sekvenciranjem obrađeni su pomoću softvera Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems).

Iz uzoraka periferne krvi svih pacijenata i zdravih ispitanika izolovana je DNK koja je potom korišćena za analizu gena ADRB2 [142]. Segment gena ADRB2 koji obuhvata varijante Arg16Gly i Gln27Glu umnožen je PCR metodom, produkti su prečišćeni i potom podvrgnuti sekvenciranju DNK. Rezultati analize prikazani su na slikama 3.1-3.3.

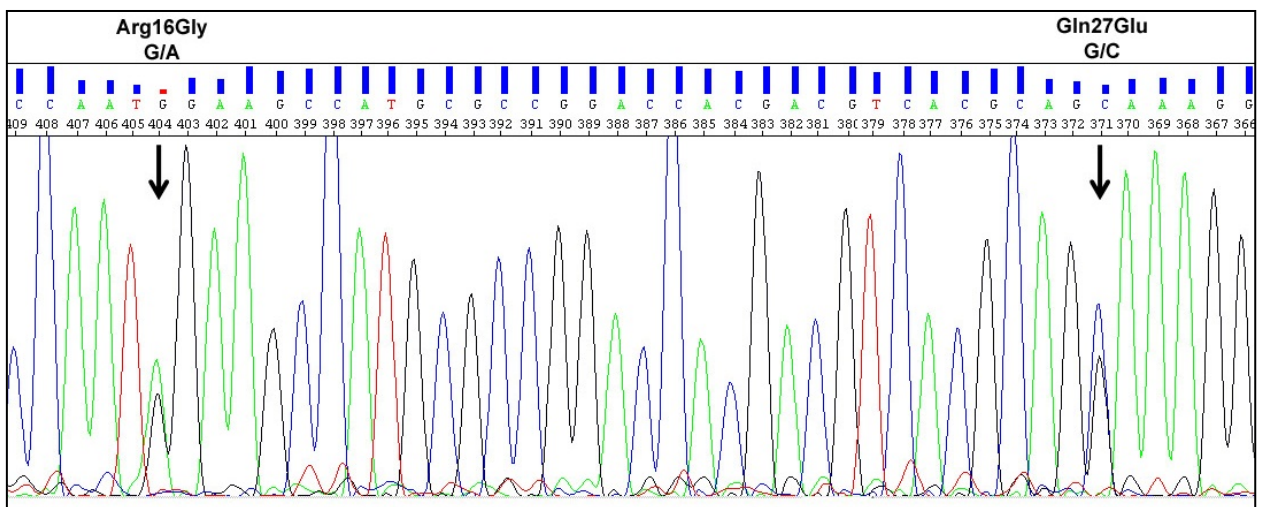
Na taj način je za svakog ispitanika određeno koja je kombinacija analiziranih polimorfizama prisutna, na osnovu čega su pacijenti podeljeni u podgrupe i klinički praćeni. Ove genetske analize su urađene na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu.



Slika 3.1. Deo sekvence gena ADRB2 kod nosioca varijante Arg16Gly (heterozigot) i Gln27 (homozigot)



Slika 3.2. Deo sekvence gena ADRB2 kod nosioca varijante 16Gly (homozigot) i Gln27 (homozigot)



Slika 3.3. Deo sekvence gena ADRB2 kod nosioca varijante Arg16Gly (heterozigot) i Gln27 (heterozigot)

3.3. KLINIČKA ANALIZA

Grupa pacijenata sa bronhijalnom astmom je bila praćena tokom perioda od prosečno 16 meseci (najkraći period je iznosio 1 mesec, a najduži 31 mesec) do dve godine na redovnim kontrolama, kao i vanredno u slučaju pogoršanja. Na svakoj kontroli pacijenti su bili fizikalno pregledani i popunjavali upitnik o kvalitetu života (Asthma Control Test – ACT) [143]. Spirometrijsko ispitivanje (aparatus Ganshorn SpiroJet PowerCube LF8.5F) je rađeno na svakoj poseti. Tok bolesti, kontrola astme i težina kliničke slike bila je određena prema važećim Smernicama Evropskog respiratornog društva (GINA) [144], vrednostima ATC, i vrednostima spirometrijskih parametara opstrukcije. Ishodna varijabla je bila broj i stepen težine pogoršanja bolesti u datom periodu posmatranja.

3.3.1. Test o kontroli astme (Asthma control test - ACT)

Specifični ciljevi terapije astme su postizanje najbolje moguće kliničke kontrole i smanjenja opasnosti od nepovoljnih ishoda u budućnosti. Od 2000-ih, Globalna inicijativa za astmu (GINA) i Nacionalni program za obrazovanje i prevenciju astme (NAEPP) definisali su pojam kontrole kao upravljanje kliničkim karakteristikama bolesti, uključujući simptome, noćno buđenje, stepena korišćenja relivera, najmanje moguće ograničenje aktivnosti, i očuvanje funkcije pluća [143].

Loša kontrola astme može povećati očekivane buduće rizike od astme, uključujući i pogoršanja, ubrzanog smanjenja plućne funkcije, te neželjenih efekata lekova koji se koriste u terapiji. Na osnovu ovih ciljeva, GINA i NAEPP su utvrdile tri stepena kontrole astme (kontrolisana / dobro kontrolisani, delimično kontrolisana / nije dobro kontrolisana i nekontrolisana / vrlo slabo kontrolisana astma) [144]. ACT je multidimenzionalna, standardizovana i proverena metoda i najrašireniji je instrument za procenu kliničke kontrole u bolesnika s astmom starijih od 12 godina koji sadrži 5 pitanja koja se odnose na

učestalost simptoma, i potrebe za upotrebom reliver terapije u prethodne 4 nedelje. Bodovi se kreću u rasponu od 5 (najlošije kontrolisana) do maksimalnih 25 (potpuna kontrola). Za ACT, odabrano je 5 pitanja od početnih 22 predloženih od strane grupe koja se sastojala od 4 lekara primarne zdravstvene zaštite i 7 specijalista astme u Americi [145]. ACT je jednostavan za korišćenje upitnik koji je preveden na više od 80 jezika i posebno je dizajniran za korišćenje u kliničkoj praksi. Kao prvo, pruža jednostavniji procenu kontrole i ne zahteva prethodnu procenu disajne funkcije - spirometriju. Zato je korisniji za kliničare koji u svakodnevnoj praksi imaju veliku frekvenciju pacijenata u ograničenom vremenskom periodu, naročito u medicinski lošije razvijenim sredinama. Drugo, ACT je koristan alat koji omogućava i lekarima opšte medicine da procene potrebu za korekcijom terapije (Step-up ili step-down) . Treće, ACT je pogodan za periodično praćenje bolesnika s astmom, jer se može primenjivati i na daljinu, putem pošte, ili preko interneta. Nadalje, ACT je alat za selekciju pacijenata u kliničkim ispitivanjima sa predefinisanim grupama – npr. osobe sa dobro ili loše kontrolisanom astmom. Važno je napomenuti da su u nekim velikim ispitivanjima zabeležene i relativno niske vrednosti korelacije između rezultata ACT i drugih parametara kontrole astme, kao što su FEV1 ili vrednosti FENO, što podržava ideju da se stepen kontrole astme ne može zaključiti isključivo iz fizioloških mera, nego zavisi i od lične percepcije kontrole koje pacijent ima o svojoj bolesti. U dosadašnjim ispitivanjima i meta analizama, pokazao se kao najbolji od postojećih upitnika [146], što je i bio razlog da se koristi u ovom radu.

1. U protekle 4 nedelje, koliko često vas je astma ometala u obavljanju uobičajenih aktivnosti?
2. U protekle 4 nedelje, koliko često vam je nedostajao dah?
3. U protekle 4 nedelje, koliko često su vas simptomi astme (šištanje u grudima, kašalj, nedostatak vazduha, stezanje u grudima ili bol u grudima), budili noću ili ujutru ranije nego obično?
4. U protekle 4 nedelje, koliko često vam je bila potrebna pumpica za otklanjanje simptoma ili aparat za inhalaciju?
5. Kako biste ocenili kontrolu vaše astme u protekle 4 nedelje?

TEST O KONTROLI ASTME Ovaj test će pomoći i vama i lekaru u proceni pravog stanja vaše astme. Zaokružite broj pored odgovora za svako pitanje i na kraju ih saberite.

1. U protekle četiri nedelje koliko često vas je astma ometala u obavljanju uobičajenih aktivnosti?

Uvek	1	Vrlo često	2	Povremeno	3	Retko	4	Nikada	5
------	---	------------	---	-----------	---	-------	---	--------	---

2. U protekle četiri nedelje koliko često vam je nedostajao dah?

Češće od jednom dnevno	1	Jednom dnevno	2	Tri do šest puta nedeljno	3	Jednom ili dva puta nedeljno	4	Nikada	5
------------------------	---	---------------	---	---------------------------	---	------------------------------	---	--------	---

3. U protekle četiri nedelje koliko često su vas simptomi astme budili noću ili ujutru ranije nego obično?

Četiri ili više noći nedeljno	1	Dve do tri noći nedeljno	2	Jednom nedeljno	3	Jednom ili dva puta nedeljno	4	Nikada	5
-------------------------------	---	--------------------------	---	-----------------	---	------------------------------	---	--------	---

4. U protekle četiri nedelje koliko često vam je bila potrebna pumpica za otklanjanje simptoma ili aparat za inhalaciju?

Tri ili više puta dnevno	1	Jednom ili dva puta dnevno	2	Dva ili tri puta nedeljno	3	Jednom nedeljno ili ređe	4	Nikada	5
--------------------------	---	----------------------------	---	---------------------------	---	--------------------------	---	--------	---

5. Kako biste ocenili kontrolu vaše astme u protekle četiri nedelje?

Uopšte nije kontrolisana	1	Slabo kontrolisana	2	Donekle kontrolisana	3	Dobro kontrolisana	4	Kontrolisana u potpunosti	5
--------------------------	---	--------------------	---	----------------------	---	--------------------	---	---------------------------	---

Rezultati

Maksimalnih 25 bodova – Čestitam! Tokom protekle četiri nedelje vaša astma je bila pod potpunom kontrolom. Niste imali simptome niti	vas je astma ometala. Obratite se lekaru ako se to promeni. Od 20 do 24 bodova – Blizu ste cilja Tokom protekle četiri nedelje vaša	astma je bila dobro kontrolisana, ali ne potpuno. Vaš lekar bi vam mogao pomoći da postignete potpunu kontrolu.	Manje od 20 bodova – Daleko od cilja Vaša astma verovatno nije bila dobro kontrolisana tokom
--	--	---	--

Slika 3.4. Pitanja i izgled upitnika Asthma Control Test (ACT) na srpskom jeziku. Test sadrži 5 pitanja koja se odnose na učestalost simptoma, i potrebe za upotrebom reliver terapije u prethodne 4 nedelje. Bodovi se kreću u rasponu 5 (najlošije kontrolisana) do maksimalnih 25 (potpuna kontrola).

Tabela 3.1. Interpretacija broja bodova u Asthma Control Testu [143].

Broj bodova	Interpretacija
≥ 20	dobro kontrolisana astma
16-19	delimično kontrolisana astma
≤ 15	nekontrolisana astma
promena od ≥ 3 boda -	klinički značajna

3.4. STATISTIČKA ANALIZA

Za testiranje raspodele ADRB2 genotipova i slaganje sa Hardy-Weinbergovom ravnotežom u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa astmom korišćen je χ^2 test za nivo verovatnoće $p > 0,05$. Za testiranje razlike u frekvenciji genotipova i alela između pacijenata i kontrolne grupe bio je takođe primenjen χ^2 test. Kod onih genotipova gde je bila prisutna statistički značajna razlika u frekvencijama između kontrolne grupe i pacijenata, za kvantitativnu procenu rizika ili zaštitnog efekta, određenog genotipa na pojavu astme bila je primenjena univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza i izračunat odds ratio (OR) uz odgovarajući interval pouzdanosti za verovatnoću 95%, kao mera efekta genotipa. Statistički značajne vrednosti verovatnoće dobijene za kombinacije alela su korigovane pomoću Bonferroni metode za broj testiranih poređenja ($n=6$).

Post-hoc statistička analiza snage je sprovedena pomoću Quanto softvera (verzija 1.2) za SNP Gln27Glu [18 18.Gauderman W, Morrison J. Quanto 1.2: a computer program for power and sample size calculations for genetic-

epidemiology studies. 2007. Available at <http://hydra.Usc.Edu/gxe>. Accessed 26 June 2014.].

Za analizu kliničkih podataka, kada je vršeno poređenje unutar i između grupa primenjeni su parametarski i neparametarski testovi, u zavisnosti da li je distribucija parametara bila normalna ili je odstupala od normalne raspodele. Procena normalnosti raspodele je ispitana primenom Kolmogorov-Smirnov testa. Za analizu povezanosti genotipa i kliničkih karakteristika korišćena je korelaciona i binarna logistička regresiona analiza. Opšte karakteristike subjekata uključenih u studiju su poređeni korišćenjem parametarskog student t-testa, ili neparametarskim Mann-Whitney U testom.

Kombinovana analiza varijanse za ponovljena merenja (mixed between-within subjects ANOVA) je primenjena da bi se ispitao uticaj polimorfizma ispitivanih gena (prisustvo/odsustvo 16Arg alela, prisustvo/osustvo 27Gln alela i kombinacija ovih alela) i starosti pacijenta na parametar funkcije pluća FEV1% i parametar kontrole astme ACT, dobijenih u tri uzastopne posete kod pacijenata sa astmom koji su primali terapiju lekovima dugo-delujućim agonistima ADRB2 receptora (LABA).

Primenom dvofaktorske analize kovarijanse (two-way ANCOVA) ispitan je zajednički uticaj starosti pacijenta i polimorfizama (Arg16Gly i Gln27Glu) na efikasnost primenjene LABA terapije koja je procenjena pomoću parametara funkcije pluća (FEV1, %) i kontrole astme (ACT). Nezavisne varijable su bile prisustvo/odsustvo 16Arg alela, 27Gln alela i godine. Zavisne varijable (FEV1% i ACT) dobijene u trećoj poseti su korigovane za vrednosti koje su dobijene u prvoj poseti, čime je uklonjen njihov uticaj na vrednosti dobijene u trećoj poseti.

Vrednost za verovatnoću $p \leq 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Za statističku analizu korišćen je softver SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

4. REZULTATI

4.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE GRUPA ISPITANIKA

Osnovne karakteristike grupe pacijenata sa astmom i kontrolne grupe prikazane su u Tabeli 4.1. Statistički značajna razlika između dve grupe javila se u kategoriji životne dobi i pušačkog statusa ($p < 0,01$). Pacijenti sa astmom su bili nešto mlađi ($44,1 \pm 14,7$) u odnosu na kontrolnu grupu ($48,2 \pm 11,0$). Učestalost pušača i bivših pušača bila je značajno niža u grupi pacijenata (13,4%) u odnosu na kontrolnu grupu (43,9%), što je očekivan podatak. Prosečan period praćenja bolesnika je iznosio 16 meseci (najkraći period je iznosio 1 mesec, a najduži 31 mesec). Nije bilo razlike u vrednostima za indeks telesne mase (body-mass index, BMI) između grupe pacijenata ($26,7 \pm 4,8$) i kontrolne grupe ($26,1 \pm 4,2$). Što se tiče spirometrijskih parametara težine opstrukcije, najveći broj ispitanika imao je vrednost FEV1 > 80% (61,7%), laku i srednje tešku opstrukciju imalo je 34,9%, a tešku opstrukciju 3,4% ispitanika u grupi pacijenata. Nasuprot tome, terapiju samo sa lekovima iz grupe SABA (20%) ili ICS + SABA (14%) imalo je 34% od ukupnog broja pacijenata, dok je na fiksnoj kombinaciji LABA+ICS bio najveći procenat pacijenata (58%). Ostale vidove terapije (inhibitor leukotriene, ksantinski preparat) koristilo je 8% pacijenata.

Tabela 4.1. Karakteristike pacijenata sa astmom i kontrolne grupe

Karakteristike	Pacijenti (n=171)	Kontrola (n=101)
Starost (godine), medijana	44 (19-76) ^a	51 (21-70)
BMI, kg/m ² ($\bar{x} \pm SD$)	26,5 \pm 4,8	26,1 \pm 4,2
Muškarci, %	40	28
Pušači, %	12 ^a	44
Meseci praćenja, medijana (opseg)	16 (1-31)	-
Stepen težine opstrukcije, %		
FEV1 >80	61,7	-
laka i srednje teška (FEV1 40-80)	34,9	-
teška (FEV1 <40)	3,4	-
Terapija, %		
ICS	14	-
SABA	20	-
LABA+ICS	58	-
Drugo	8	-

^a Razlika između pacijenata i kontrolne grupe (p<0,01)

BMI - body mass index; FEV1- forsirani ekspirijumski volumen u 1 sekundi, FVC- forsirani vitalni kapacitet; ICS-inhalacijski kortikosteroidi; LABA+ICS - dugodelujući beta2-agonisti u fiksnoj kombinaciji sa ICS; SABA- kratkodelujući beta2-agonisti.

Tabela 4.2. Raspodela pacijenata prema vrsti terapije

Vrsta terapije	Pacijenti (n=149)
Salbutamol pp	30
Niska doza ICS (ciklesonid)	20
Niska doza ICS+LABA flutikazon-propionat + salmeterol fiksna kombinacija	3
Niska doza ICS+LABA budesonid+ formoterol fiksna kombinacija	39
Srednja doza ICS+LABA beklometazon i salmeterol	9
Srednja doza ICS+LABA flutikazon-propionat + salmeterol fiksna kombinacija	16
Srednja doza ICS+LABA budesonid+ formoterol fiksna kombinacija	9
Visoka doza ICS+LABA flutikazon-propionat + salmeterol fiksna kombinacija	9
Visoka doza ICS+LABA budesonid+ formoterol fiksna kombinacija	2
Drugi lek za kontrolu astme (montelukast, ksantin)	12

Tabela 4.3. Uporedne vrednosti ukupnih dnevnih doza ICS

Dnevna doza ICS	Pacijenti n=149 (%)	Ukupna dnevna doza ICS
Bez ICS	42 (28,2)	0
Niska	62 (41,6)	do 250 mcg BDP-HFA ili FP; do 400 mcg BUD; do 320 mcg CIC
Srednja	34(22,8)	do 500 mcg BDP-HFA ili FP; do 800 mcg BUD; do 640 mcg CIC
Visoka	11(7,4)	≥500 mcg BDP-HFA ili FP; ≥800 mcg BUD; ≥640 mcg CIC

BDP-HFA = beklometazon dipropionat; FP = flutikazon propionat; BUD = budesonid; CIC = ciklesonid [148]

4.2. POVEZANOST ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA ADRB2 RECEPTORA I POJAVE ASTME

U Tabeli 4.4. prikazana je frekvencija pojavljivanja genotipova i alela za polimorfizme Arg16Gly i Gln27Glu kod astmatičara i u kontrolnoj grupi. Utvrđeno je odstupanje od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže kod oba polimorfizma, u obe populacije ispitanika, i kod pacijenata i u kontrolnoj grupi, kako kod svih ispitanika, tako i kod žena. Međutim, kod muškaraca se odstupanje od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže, kod oba polimorfizma pojavljuje samo u grupi astmatičara.

Utvrđena je statistički značajna razlika frekvencije genotipova i alela između pacijenata i kontrolne grupe, kako u grupi svih pacijenata, tako i u grupama posmatranim prema polu. Homozigoti 27Gln/Gln, kao i osobe koje su nosioci 27Gln alela imaju značajan rizik za pojavu astme [OR(95%CI) za 27Gln/Gln: 3,0 (1,7-5,3) i za 27Gln alel: 2,5 (1,6-3,8)]. Ovaj rizik je utvrđen i kod oba pola, s tim što je kod muškaraca prisustvo ovog genotipa i alela bilo

povezano sa nešto većim rizikom [OR(95%CI) za 27Gln/Gln: 4,0 (1,6-10,0) i za 27Gln alel: 3,7 (1,5-6,4)] u odnosu na žene [OR(95%CI) za 27Gln/Gln: 2,8 (1,4-5,6) i za 27Gln alel: 2,5 (1,4-4,4)]. Prisutan 27Glu alel se pokazao kao protektivan za pojavu astme. Nosioци Glu27Gln genotipa i 27Glu alela su imali smanjen rizik za pojavu astme [OR(95%CI) za 27Gln/Glu: 0,3 (0,1-0,7) i za 27Glu alel: 0,4 (0,3-0,6)]. Ovakav protektivni efekat 27Glu alela utvrđen je kod oba pola. Za polimorfizam Arg16Gly nisu uočene razlike u frekvencijama genotipova i alela između pacijenata sa astmom i kontrolne grupe.

Slike 4.1. i 4.2. prikazuju raspodelu genotipova oba ispitivana polimorfizma kod svih zdravih ispitanika i svih pacijenata sa astmom, kao i prema polu, pomoću kružnih dijagrama.

U Tabeli 4.5. prikazana je raspodela kombinacija genotipova 16Arg/Gly i 27Gln/Glu polimorfizama kod grupe pacijenata sa astmom i kontrolne grupe. Dve kombinacije genotipova, 16Arg/Gly-27Gln/Gln i 16Gly/Gly-27Gln/Gln su bile zastupljenije u grupi bolesnika sa astmom, dok je genotip 16Arg/Gly-27Gln/Glu bio značajno zastupljeniji u zdravoj kontroli. Prisustvo 27Gln alela u kombinaciji, je pokazao značajan rizik za pojavu astme [OR(95%CI) za 16Arg/Gly-27Gln/Gln: 2,2 (1,0-4,6) i za 16Gly/Gly-27Gln/Gln: 2,0 (1,0-3,7)], dok je protektivni efekat 27Glu alela zapažen i u kombinaciji genotipova [OR(95%CI) za 16Arg/Gly-27Gln/Glu: 0,3 (0,1-0,7)].

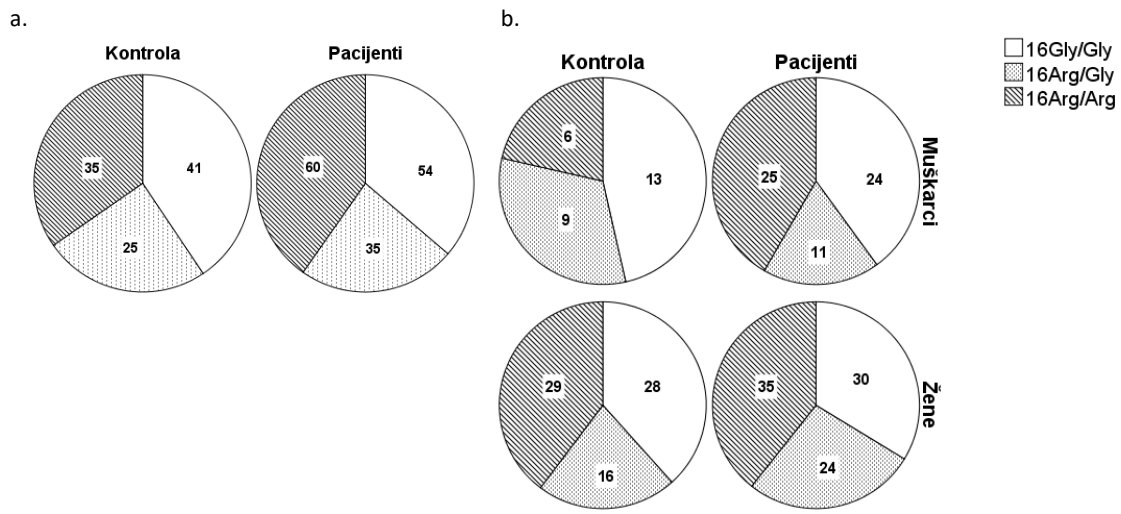
Slika 4.3. prikazuje raspodelu kombinacije genotipova oba ispitivana polimorfizma kod svih zdravih ispitanika i svih pacijenata sa astmom, kao i prema polu, pomoću kružnih dijagrama.

Tabela 4.4. Frekvencije (%) genotipova i alela za polimorfizme Arg16Gly i Gln27Glu kod astmatičara i u kontrolnoj grupi

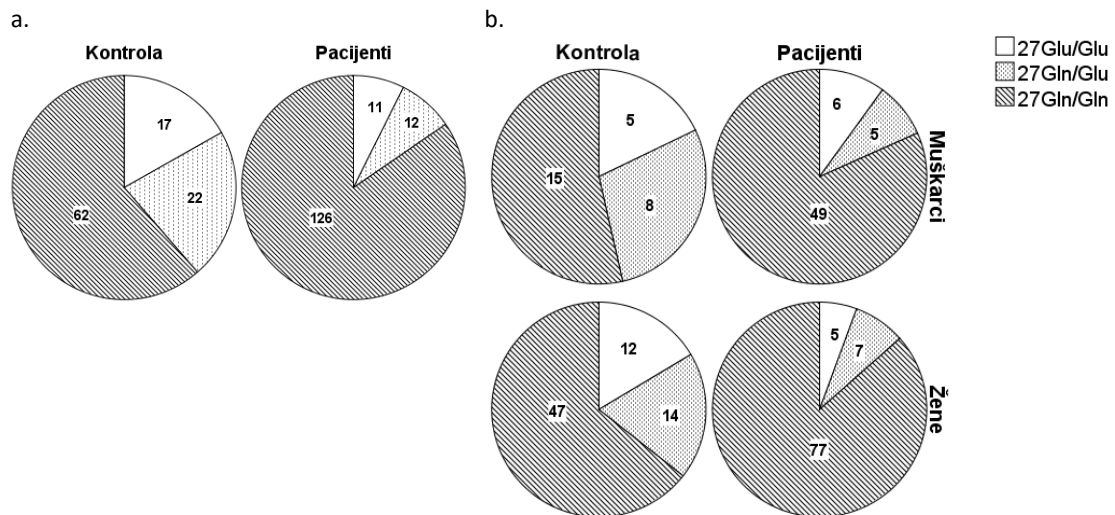
ADRB2 polimorfizam	Pacijenti-svi (n=171)	Kontrola-svi (n=101)	p^a	OR (95% CI)	Pacijenti-muškarci (n=68)	Kontrola-muškarci (n=31)	p^a	OR (95% CI)	Pacijenti-žene (n=106)	Kontrola-žene (n=75)	p^a	OR (95% CI)
<i>Arg16Gly</i>												
16Arg/Arg	39,2	34,6	0,49	1,2 (0,7-2,0)	36,8	19,4	0,08	2,4 (0,9-6,7)	39,6	40,0	1,00	1,0 (0,6-1,9)
16Arg/Gly	22,8	24,8	0,62	0,9 (0,5-1,6)	20,6	29,0	0,35	0,6 (0,2-1,7)	24,5	22,7	0,77	1,1 (0,5-2,2)
16Gly/Gly	38,0	40,6	0,74	0,8 (0,5-1,4)	42,6	51,6	0,41	0,7 (0,3-1,6)	35,9	37,3	0,84	0,9 (0,5-1,7)
16Arg allele	50,6	47,0	0,48	1,1 (0,8-1,6)	47,1	33,9	0,07	1,8 (0,9-3,3)	51,9	51,3	1,00	1,0 (0,7-1,6)
16Gly allele	49,4	53,0	0,48	0,8 (0,6-1,2)	52,9	66,1	0,10	0,6 (0,3-1,1)	48,1	48,7	1,00	0,9 (0,6-1,5)
p_{HWE}^b	< 0,001	< 0,001			< 0,001	0,2			< 0,001	< 0,001		
<i>Gln27Glu</i>												
27Gln/Gln	82,5	61,4	< 0,001	3,0 (1,7-5,3)	80,9	51,6	0,003	4,0 (1,6-10,0)	83,9	65,3	0,004	2,8 (1,4-5,6)
27Gln/Glu	8,2	21,8	0,001	0,3 (0,1-0,7)	8,8	32,3	0,003	0,2 (0,1-0,6)	8,5	18,7	0,04	0,4 (0,2-0,9)
27Glu/Glu	9,4	16,8	0,06	0,5 (0,2-1,1)	10,3	16,1	0,41	0,6 (0,2-2,1)	7,6	16,0	0,07	0,4 (0,2-1,1)
27Gln allele	86,5	72,3	< 0,001	2,5 (1,6-3,8)	85,3	67,8	0,002	3,7 (1,5-6,4)	88,2	74,7	< 0,001	2,5 (1,4-4,4)
27Glu allele	13,5	27,7	< 0,001	0,4 (0,3-0,6)	14,7	32,2	0,01	0,4 (0,2-0,7)	11,8	25,3	< 0,001	0,4 (0,2-0,7)
p_{HWE}^b	< 0,001	< 0,001			< 0,001	0,2			< 0,001	< 0,001		

CI interval poverenja OR odds ratio

^a razlika između pacijenata i kontrole; ^b p vrednost za HWE-Hardy Weinberg-ovu ravnotežu



Slika 4.1. Grafički prikaz distribucije genotipova polimorfizma Arg16Gly u kontrolnoj grupi (n=101) i kod pacijenata sa astmom (n=171): a. kod svih ispitanika; b. prema polu.



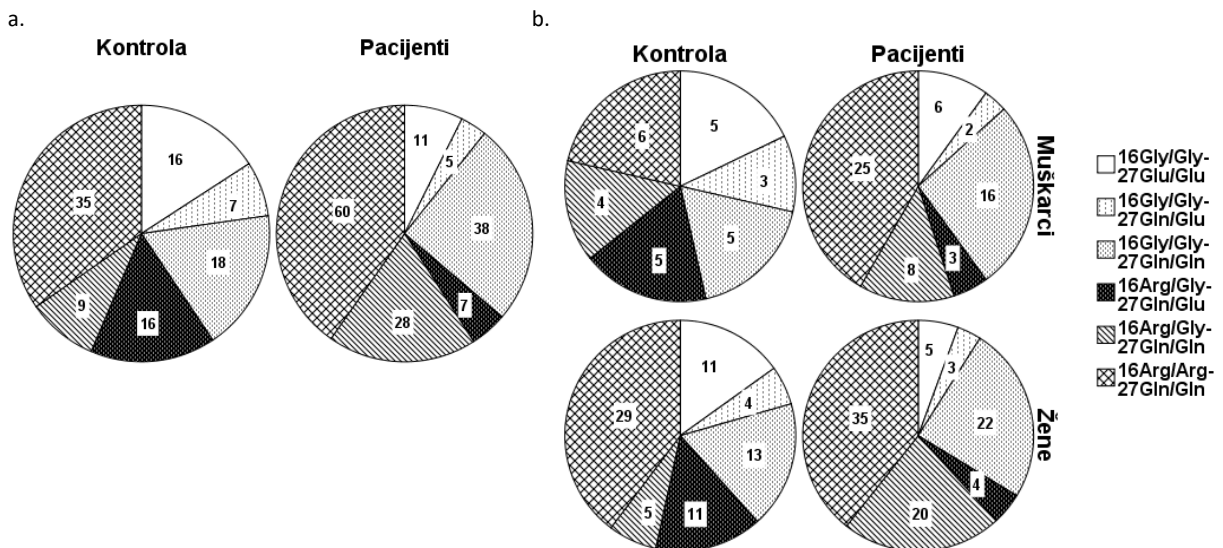
Slika 4.2. Grafički prikaz distribucije genotipova polimorfizma Gln27Glu u kontrolnoj grupi (n=101) i kod pacijenata sa astmom (n=171): a. kod svih ispitanika; b. prema polu.

Tabela 4.5. Učestalost (%) genotipskih kombinacija Arg16Gly i Gln27Glu polimorfizama kod grupe pacijenata sa astmom i kontrolne grupe

Kombinacije genotipova	Pacijenti (n=171)	Kontrola (n=101)	p^a	OR (95% CI)
16Arg/Arg-27Gln/Gln	37,4	34,7	0,44	1,2 (0,7-2,0)
16Arg/Gly-27Gln/Gln	18,8	9,9	0,04	2,2 (1,0-4,6)
16Arg/Gly-27Gln/Glu	4,6	14,9	0,003 ^b	0,3 (0,1-0,7)
16Gly/Gly-27Gln/Gln	26,4	15,8	0,03	2,0 (1,0-3,7)
16Gly/Gly-27Gln/Glu	3,5	8,9	0,07	0,4 (0,1-1,1)
16Gly/Gly-27Glu/Glu	9,3	15,8	0,13	0,6 (0,3-1,2)

CI - interval poverenja, OR odds ratio

razlika između grupe pacijenata i kontrolne grupe; ^b razlika ostaje i nakon primene Bonferronijeve korekcije ($p=0,018$).



Slika 4.3. Grafički prikaz distribucije kombinacija genotipova polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu u kontrolnoj grupi (n=101) i kod pacijenata sa astmom (n=171): a. kod svih ispitanika; b. prema polu.

Za ispitivanje uticaja rizičnih faktora na verovatnoću razvoja astme kod odraslih, korišćena je binarna logistička regresiona analiza (enter metod). U Tabeli 4.6. prikazan je binarni regresioni model za predikciju astme kod odraslih. Dobijeni model predikcije astme obuhvatio je tri nezavisne promenljive: 27Gln alel, pol i godine i bio je statistički značajan ($p=0,003$). Model u celini objašnjava varijansu pojave astme između 5,6 % (r^2 po Cox-u i Snell-u) i 7,6 % (r^2 po Nagelkerke-u), i model može tačno da klasifikuje prisustvo astme kod 61,5 % osoba. Nezavisni prediktori pojave astme u ispitivanoj populaciji su bili: prisustvo 27Gln alela, muški pol i mlađi uzrast.

Tabela 4.6. Binarni logistički regresioni model za predikciju astme kod odraslih (kontrolna grupa n=101, pacijenti sa astmom n=149)

Prediktor	β (S.E)	p	OR (95% CI)
27Gln alel	0,973 (0,421)	0,021	2,64 (1,16-6,04)
Pol	-0,564 (0,289)	0,050	0,56 (0,32-1,00)
Godine	-0,020 (0,010)	0,050	0,98 (0,96-1,00)
Konstanta	0,853 (0,636)	0,180	2,34
Celokupan model: χ^2 (df 3, N=149) 14,3; $p=0,003$			

β (S.E): koeficijent regresije β (standardna greška β), OR (95% CI): odds ratio (95% interval pouzdanosti); kodiranje kategorijskih preomenljivih: za pojavu astme: nije prisutna=0, prisutna=1; za Gln-alel: nije nosilac=0, jeste nosilac=1; za pol: muškarci=0, žene=1.

U Tabeli 4.7. prikazane su kliničke karakteristike pacijenata sa astmom (n=149) u odnosu na ispitivani genotip ADRB2 receptora i kombinaciju alela. Utvrđeno je da su pacijenti sa astmom koji su bili homozigoti 27Gln/Gln bili statistički značajno mlađi [godine, medijana (25.-75.percentil): 42,5 (31,0-54,0), p=0,036] u odnosu na pacijente sa genotipovima 27Gln/Glu [godine, medijana (25.-75.percentil): 55,5 (45,7-58,0)] i 27Glu/Glu [godine, medijana (25.-75.percentil): 52,0 (33,0-69,0)]. Ovaj uticaj nije uočen za polimorfizam Arg16Gly.

Međutim, uočeno je da su pacijenti koji su imali kombinaciju alela 16Gly-27Gln bili značajno mlađi [godine, medijana (25.-75.percentil): 38,0 (26,0-55,0) p=0,043] u odnosu na pacijente sa kombinacijama alela 16Gly-27Glu [godine, medijana (25.-75.percentil): 53,5 (34,7-70,5)] i 16Arg-27Gln [godine, medijana (25.-75.percentil): 45,0 (34,7-56,0)].

Ostale karakteristike ispitanika u grupi pacijenata nisu se značajno razlikovale prema ispitivanim genotipovima ili kombinacijama alela.

Tabela 4.7. Kliničke karakteristike pacijenata sa astmom (n=149) u odnosu na genotip i kombinacije alela

Parametar	Genotipovi						Kombinacija alela				P ^a
	16Arg/Ar	16Arg/GI	16Gly/GI	27Gln/GI	27Gln/GI	27Gln/GI	16Gly-27Glu	16Gly-27Gln	16Arg-27Gln		
r	g	y	y	n	u	u					
Pol, %											
Muškarci (n=60)	41,7	18,3	40	81,7	8,3	10	11,7	28,3	60	0,409	
Žene (n=89)	39,3	27	33,7	86,5	7,9	5,6	5,6	29,2	65,2		
Godine, medijana (25-75 percentil)	44 (34,0-51,0)	46 (35,0-58,0)	42,5 (28,0-56,2)	42,5 (31,0-54,0)	55,5 ^b (45,7-58,0)	52,0 ^b (33,0-69,0)	53,5 (34,7-70,5)	38,0 ^c (26,0-55,0)	45 (34,7-56,0)	0,043	
Pušač, %											
Da (n=17)	23,5	35,3	41,2	94,1	0	5,9	8,1	28,9	63,1	0,801	
Ne (n=132)	42,4	22	35,6	83,3	9,1	7,6	8,3	28	63,6		
BMI, %											
≤25 (n=64)	39,1	23,4	37,5	89,1	4,7	6,3	6,3	32,8	60,9	0,565	
≥26 (n=85)	41,2	23,5	35,3	81,2	10,6	8,2	9,4	25,9	64,7		
LABA+ICS, %											
Da (n=87)	41,4	20,7	37,9	85,1	5,7	9,2	9,2	29,9	60,9	0,752	
Ne (n=62)	38,7	27,4	33,9	83,9	11,3	4,8	6,5	27,4	66,1		
Pogoršanja, %											
Da (n=82)	43,3	19,4	37,3	88	6	6	7,5	29,9	62,7	0,386	
Ne (n=67)	37,8	26,8	35,4	81,7	9,8	8,5	8,5	28	63,4		

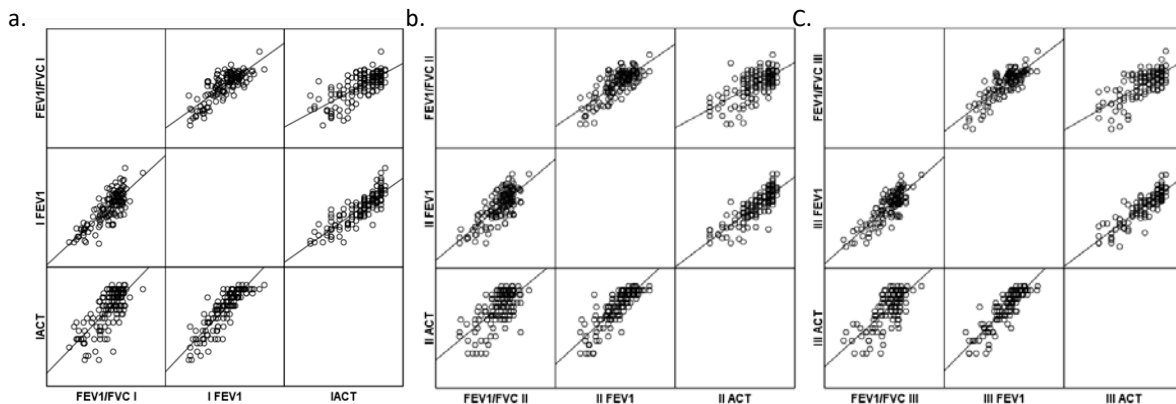
razlika između genotipova/haplotipova; ^b razlika u odnosu na Gln/Gln ($p < 0.05$), ^c razlika u odnosu na Gly-Glu ($p < 0.010$).

4.3. POVEZANOST ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA ADRB2 RECEPTORA I STEPENA TEŽINE ASTME

Ispitana je korelacija između parametara plućne funkcije FEV₁, FEV₁/FVC i rezultata za ACT, u prvoj, drugoj i trećoj poseti koje su dobijene kod pacijenata sa astmom. Očekivano, dobijene su statistički značajne pozitivne korelacije ($p < 0.001$), što je prikazano u Tabeli 4.8. i grafički na Slici 4. 4. pomoću tačkastog dijagrama korelacije (scatter plot).

Tabela 4.8. Pearson-ova analiza korelacije parametara plućne funkcije i ACT-a dobije u tri posete kod pacijenata sa astmom (n=149)

Prva poseta		FEV1/FVC	FEV1	ACT
FEV1/FVC	Pearson-ov r	1	0,810	0,744
	p	-	<0,001	<0,001
FEV1	Pearson r	0,810	1	0,866
	p	<0,001	-	<0,001
ACT	Pearson-ov r	0,744	0,866	1
	p	<0,001	<0,001	-
Druga poseta		FEV1/FVC	FEV1	ACT
FEV1/FVC	Pearson-ov r	1	0,763	0,670
	p	-	<0,001	<0,001
FEV1	Pearson r	763	1	0,834
	p	<0,001	-	<0,001
ACT	Pearson-ov r	0,670	0,834	1
	p	<0,001	<0,001	-
Treća poseta		FEV1/FVC	FEV1	ACT
FEV1/FVC	Pearson-ov r	1	0,829	0,727
	p	-	<0,001	<0,001
FEV1	Pearson r	0,829	1	0,872
	p	<0,001	-	<0,001
ACT	Pearson-ov r	0,727	0,872	1
	p	<0,001	<0,001	-



Slika 4.4 Tačkasti dijagram korelacija parametara plućne funkcije i ACT-a dobijenih u: a. prvoj, b. drugoj i c. trećoj poseti

4.4. POVEZANOST ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA ADRB2 RECEPTORA I POGORŠANJA ASTME TOKOM CELOKUPNOG PERIODA PRAĆENJA PACIJENATA

Primenom neparametarskog χ^2 testa ispitan je uticaj genotipova i kombinacije alela ispitivanih polimorfizama na pogoršanje astme (bez pogoršanja i sa ≥ 1 pogoršanja) u ispitivanoj populaciji pacijenata. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.9. Nijedan genotip ili kombinacija alela nije bila povezana sa pogoršanjem astme u ispitivanoj populaciji pacijenata.

Tabela 4.9. Ispitivanje povezanosti polimorfizama Arg16Gly, Gln27Glu i pogoršanja astme

Polimorfizam		Pogoršanje broj (%)		Pearson-ov χ^2	P
		bez pogoršanja	≥ 1 pogoršanja		
Arg16Gly	16Gly/Gly	29 (53,7)	25 (46,3)	1,179	0,555
	16Arg/Gly	22 (62,9)	13(37,1)		
	16Arg/ Arg	31 (51,7)	29 (48,3)		
16Arg +/-	16Arg -	29 (53,7)	25 (46,3)	0,061	0,806
	16Arg +	53 (55,8)	42 (44,2)		
Gln27Glu	27Glu/Glu	7 (63,6)	4 (36,4)	1,161	0,560
	27Glu/Gln	8 (66,7)	4 (33,3)		
	27Gln/Gln	67 (53,2)	59 (46,8)		
27Gln +/-	27Gln -	7 (63,6)	4 (36,4)	0,355	0,551
	27Gln +	75 (54,3)	63 (45,7)		
Kombinacije Alela	16Arg-27Gln	52 (55,3)	42 (44,7)	0,097	0,952
	16Gly-27Gln	23 (53,5)	20 (46,5)		
	16Gly-27Glu	7 (58,3)	5 (41,7)		

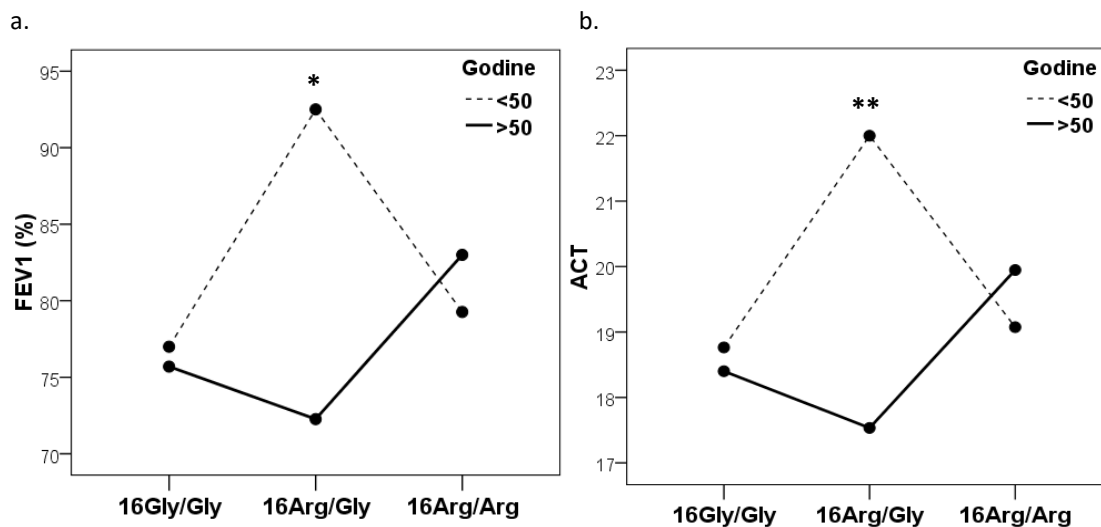
4.5. POVEZANOST ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA ADRB2 RECEPTORA I TEŽINE ASTME U PRVOJ POSETI

Uticaj starosti pacijenta (starosne grupe: mlađi i stariji od 50 godina) sa astmom i polimorfizama (Arg16Gly i Gln27Glu) na funkciju pluća i kontrolu astme koja je procenjena na osnovu vrednosti dobijenih za FEV1% i ACT, ispitan je primenom metode dvofaktorska analiza varijanse (Two-way between-groups ANOVA). Godine pacijenta i genotip su bili nezavisne promenljive, a vrednosti za FEV1% i ACT su bili zavisne promenljive. Rezultati dobijeni pomoću deskriptivne statističke analize (srednja vrednost, standardna devijacija i broj ispitanika) su prikazani u Tabelama 4.10., 4.11. i 4.12. Dijagrami u kojima je prikazana srednja vrednost za FEV1% i ACT kod pacijenata sa različitim genotipovima i u dve starosne grupe su prikazani na Slikama 4.5., 4.6. i 4.7.

Analiza je pokazala zajednički uticaj polimorfizma 16Arg/Gly i starosti pacijenta na funkciju pluća pri prvoj poseti (FEV1: $p=0,043$; ACT: $p=0,024$) (Slika 4.5.). Kod asmaticara mlađih od 50 godina utvrđena je statistički značajna razlika između različitih 16Arg/Gly genotipova (FEV1: $p=0,016$; ACT: $p=0,021$), primenom metode jednofaktorska ANOVA a primenom post-hoc testa za poređenje između grupa (LSD metoda-least significant difference) u istoj starosnoj grupi utvrđena je najpovoljnija funkcija pluća kod heterozigota 16Arg/Gly u odnosu na homozigote 16Gly/Gly (FEV1: $p=0,006$; ACT: $p=0,009$), kao i u odnosu na genotip 16Arg/Arg (FEV1: $p=0,015$; ACT: $p=0,015$). U populaciji pacijenata sa astmom starijih od 50 godina nije pokazan udruženi uticaj godina i polimorfizma Arg16Gly na funkciju pluća koja je ispitana prilikom prve posete (FEV1: $p=0,465$; ACT: $p=0,325$).

Tabela 4.10. Podaci deskriptivne statistike za polimorfizam Arg16Gly u dve starosne grupe pacijenata sa astmom za FEV1% i ACT

Godine	Genotipovi	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	N
		Zavisna promenljiva: FEV1%		Zavisna promenljiva: ACT		
<50	16Arg/Arg	79,27	19,536	19,07	4,367	41
	16Arg/Gly	92,50	17,422	22,00	2,974	20
	16Gly/Gly	77,00	20,755	18,76	4,906	34
>50	16Arg/Arg	83,00	25,073	19,95	4,588	19
	16Arg/Gly	72,27	30,860	17,53	5,842	15
	16Gly/Gly	75,70	22,707	18,40	3,926	20

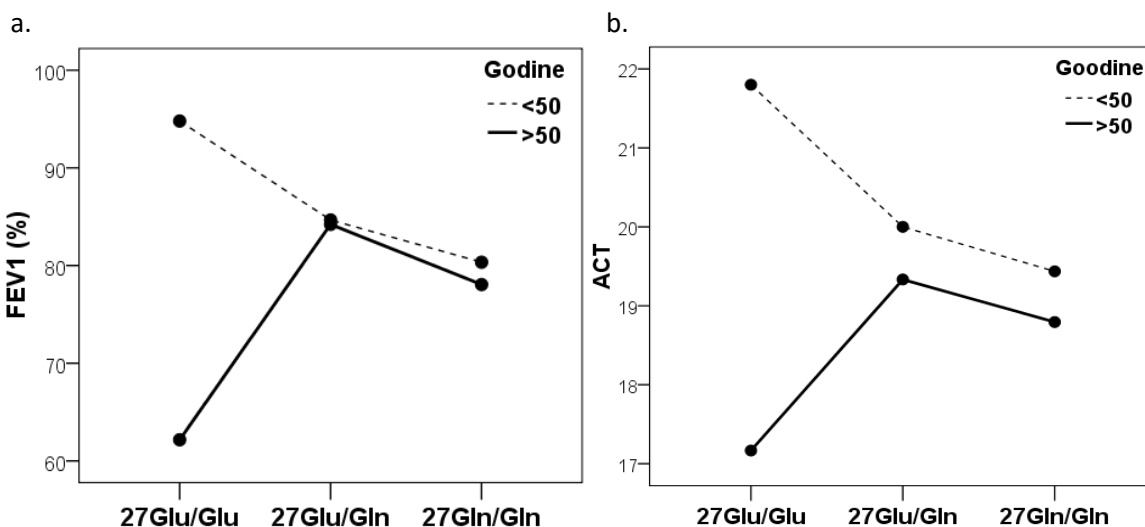


Slika 4.5. Uticaj genotipova Arg16Gly i godina (<50 godina i >50 godina) na parameter funkcije pluća dobijene prilikom prve posete: a. FEV1, * statistički značajna razlika u odnosu na 16Gly/Gly ($p=0,006$) i u odnosu na 16Arg/Arg ($p=0,015$); b. ACT, ** statistički značajna razlika u odnosu na 16Gly/Gly ($p=0,009$) i u odnosu na 16Arg/Arg ($p=0,015$).

Analiza zajedničkog uticaja polimorfizma Gln27Glu i starosti na funkciju pluća pri prvoj poseti nije pokazala statističku značajnost (FEV1: $p=0,101$; ACT: $p=0,394$) (Slika 4.6.).

Tabela 4.11. Podaci desriptivne statistike za polimorfizam Gln27Glu u dve starosne grupe pacijenata sa astmom za FEV1% i ACT

Godine	Genotipovi	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	N
		Zavisna promenljiva: FEV1%		Zavisna promenljiva: ACT		
<50	27Glu/Glu	94,80	4,658	21,80	1,304	5
	27Glu/Gln	84,67	13,577	20,00	2,000	3
	27Gln/Gln	80,34	20,763	19,44	4,617	87
>50	27Glu/Glu	62,17	19,722	17,17	4,355	6
	27Glu/Gln	84,22	24,350	19,33	4,500	9
	27Gln/Gln	78,05	26,645	18,79	4,937	39

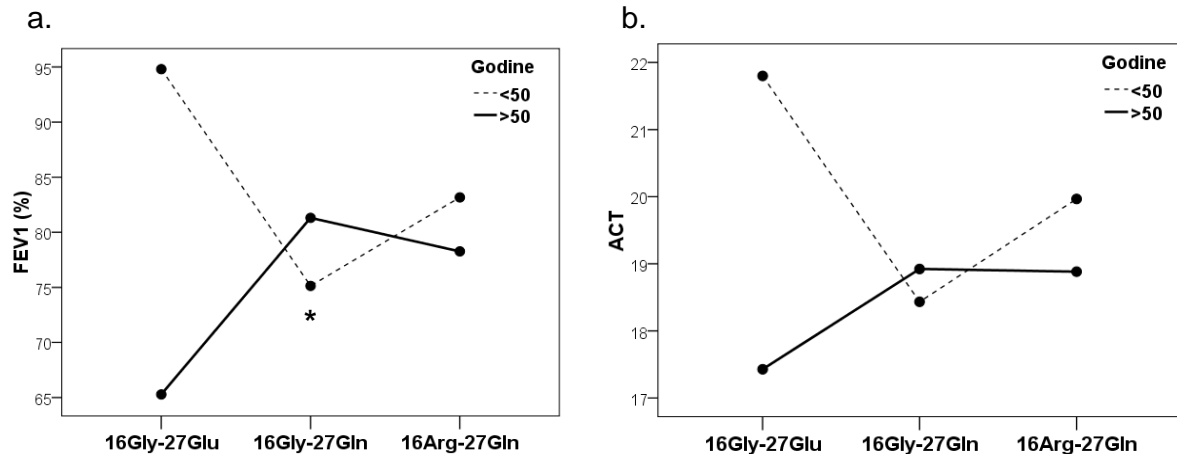


Slika 4. 6. Uticaj genotipova Gln27Glu i godina (<50 godina i >50 godina) na parameter funkcije pluća dobijene prilikom prve posete: a. FEV1; b. ACT .

Analiza zajedničkog uticaja kombinacije alela i starosti pokazala je statističku značajnost kod parametra funkcije FEV1% ($p=0,05$; Slika 4.7. a.), ali ne i kod ACT-a ($p=0,283$; Slika 4.7. b.). Kod pacijenata mlađih od 50 godina, primenom ANOVA testa utvrđena je statistički značajna razlika između nosilaca određenih kombinacija alela ($p=0,05$), a post-hoc testom je utvrđeno da pacijenti sa kombinacijom alela 16Gly-27Gln imaju značajno nižu vrednost za FEV1% u odnosu na nosioce kombinacije 16Gly-27Glu ($p=0,043$), dok je razlika u vrednosti FEV1% između kombinacija 16Gly-27Gln i Arg16-27Gln bila na granici značajnosti ($p=0,074$).

Tabela 4.12. Podaci deskriptivne statistike za kombinacije polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu u dve starosne grupe pacijenata sa astmom za FEV1% i ACT

Godine	Genotipovi	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	N
		Zavisna promenljiva: FEV1%		Zavisna promenljiva: ACT		
<50	16Gly-27Glu	94,80	4,658	21,80	1,304	5
	16Gly-27Gln	75,13	21,599	18,43	5,137	30
	16Arg-27Gln	83,17	19,606	19,97	4,178	60
>50	16Gly-27Glu	65,29	19,805	17,43	4,036	7
	16Gly-27Gln	81,31	22,867	18,92	3,926	13
	16Arg-27Gln	78,26	27,860	18,88	5,238	34



Slika 4.7. Uticaj kombinacija alela Arg16Gly i Gln27Glu polimorfizama i godina (<50 godina i >50 godina) na parameter funkcije pluća dobijene prilikom prve posete: a, FEV1%; b, ACT, * statistički značajna razlika u odnosu na 16Gly-27Glu (p=0,043).

4.6. POVEZANOST ISPITIVANIH POLIMORFIZAMA ADRB2 RECEPTORA, TERAPIJE I TEŽINE ASTME

4.6.1. Uticaj ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i starosti pacijenata na parametre funkcije pluća u tri posete kod pacijenata na terapiji sa dugo-delujućim agonistima ADRB2 receptora (LABA)

Kombinovana analiza varijanse za ponovljena merenja (mixed between-within subjects ANOVA) je primenjena da bi se ispitaio uticaj polimorfizma ispitivanih gena (prisustvo/odsustvo 16Arg alela, prisustvo/odsustvo 27Gln alela i kombinacija ovih alela) i starosti pacijenta na parametar funkcije pluća-FEV1% i

parametar kontrole astme-ACT dobijenih u tri posete kod pacijenata sa astmom koji su primali terapiju lekovima LABA.

U Tabelama 4.13, 4.14 i 4.15. su prikazani podaci deskriptivne statističke analize, a u Tabeli 4.16. su prikazani rezultati multivarijacione analize kojom je ispitan pojedinačni i zajednički uticaj ispitivanih polimorfizama i starosti pacijenata na parametre funkcije pluća u tri uzastopne posete. Na Slikama 4.8, 4.9 i 4.10. su grafički prikazani dobijeni rezultati.

Analiza je pokazala da se vrednosti za FEV1% i ACT od prve do treće posete statistički značajno razlikuju u zavisnosti od prisustva/odsustva 27Gln alela i starosnih grupa pacijenata (za FEV1: $p=0,001$; za ACT: $p=0,026$), dok su kombinacije alela i starosne grupe uticale samo na promenu vrednosti FEV1 ($p=0,009$), a ne i na promenu ACT-a ($p=0,102$). Polimorfizam 16Arg, nije pokazao zajednički uticaj sa godinama pacijenta na promene FEV1% i ACT-a u tri uzastopne posete (za FEV1: $p=0,825$; za ACT: $p=0,993$).

Na Slikama 4.9.a i 4.10.a. su prikazani grafici koji pokazuju da su mlađi astmatičari, na terapiji sa LABA, koji su bili 27Glu/Glu homozigoti (27Gln -) ili sa kombinacijom 16Gly-27Glu, imali najznačajniji pad funkcije pluća u trećoj poseti (oba parametra FEV1% i ACT) u odnosu na pacijente koji su bili nosioci 27Gln alela i drugih kombinacija alela iste starosne grupe. Nasuprot ovome, u populaciji starijih astmatičara (Slike 4.9.b. i 4.10.b.) na terapiji sa LABA lekovima primećuje se da 27Glu/Glu homozigoti (27Gln -) imali bolju kontrolu astme u trećoj poseti u odnosu na nosioce 27Gln alela, a sličan trend se uočava i kod pacijenata sa kombinacijom alela 16Gly-27Glu.

Tabela 4.13. Podaci deskriptivne statistike promena parametara funkcije pluća (FEV1 i ACT) u toku tri uzastopne posete (I, II i III) kod pacijenata koji su primali LABA lekove u zavisnosti od Arg16Gly polimorfizma u dve starosne grupe (mlađi ili stariji od 50 godina)

Godine	Polimorfizam	Parametar	\bar{x}	SD	Parametar	\bar{x}	SD	N
<50	16Arg -	I FEV1	71,24	22,799	I ACT	16,88	4,662	17
	16Arg +		78,03	18,976		19,10	4,083	29
>50	16Arg -		66,36	14,468		17,00	3,442	14
	16Arg +		70,44	27,804		17,39	5,553	18
<50	16Arg -	II FEV1	71,29	19,387	II ACT	17,53	4,017	17
	16Arg +		76,69	18,511		19,24	3,542	29
>50	16Arg -		73,86	16,663		18,50	4,363	14
	16Arg +		76,83	28,189		18,61	4,421	18
<50	16Arg -	III FEV1	75,18	17,586	III ACT	18,53	3,842	17
	16Arg +		78,52	19,915		19,52	3,690	29
>50	16Arg -		72,79	19,212		17,57	4,941	14
	16Arg +		69,39	26,250		16,83	4,342	18

Tabela 4.14. Podaci deskriptivne statistike promena parametara funkcije pluća (FEV1 i ACT) u toku tri uzastopne posete (I, II i III) kod pacijenata koji su primali LABA lekove u zavisnosti od Gln27Glu polimorfizma u dve starosne grupe (mlađi ili stariji od 50 godina)

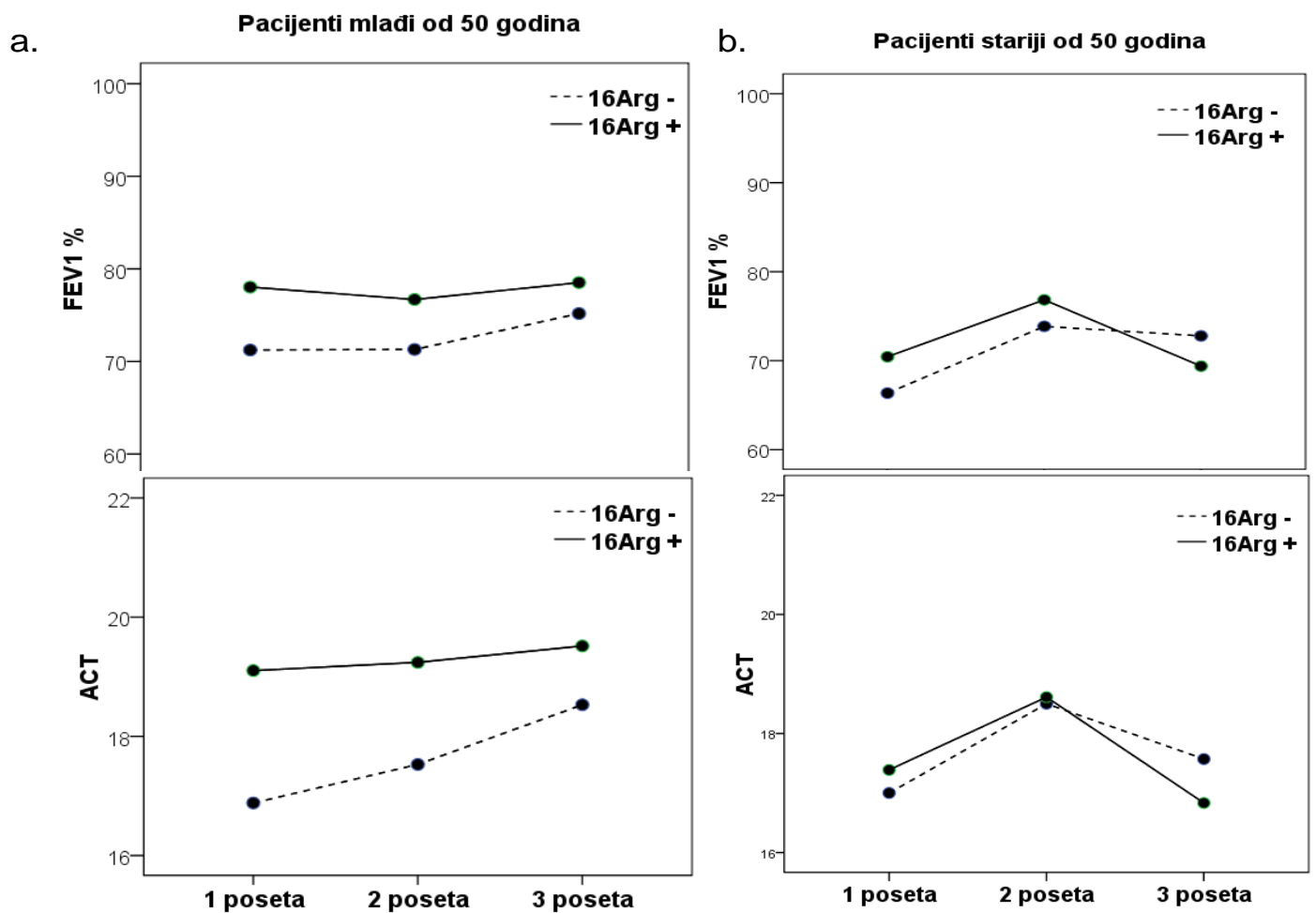
Godine	Polimorfizam	Parametar	\bar{x}	SD	Parametar	\bar{x}	SD	N
<50	27Gln -	I FEV1	94,00	1,414	I ACT	20,50	0,707	2
	27Gln +		74,68	20,562		18,18	4,463	44
>50	27Gln -		62,17	19,722		17,17	4,355	6
	27Gln +		70,15	23,443		17,23	4,836	26
<50	27Gln -	II FEV1	88,50	0,707	II ACT	21,00	1,414	2
	27Gln +		74,07	18,999		18,50	3,819	44
>50	27Gln -		73,00	22,361		20,17	4,535	6
	27Gln +		76,12	24,200		18,19	4,280	26
<50	27Gln -	III FEV1	64,00	33,941	III ACT	15,50	9,192	2
	27Gln +		77,89	18,460		19,32	3,463	44
>50	27Gln -		78,50	26,913		19,83	5,707	6
	27Gln +		69,12	22,408		16,54	4,130	26

Tabela 4.15. Podaci deskriptivne statistike promena parametara funkcije pluća (FEV1 i ACT) u toku tri uzastopne posete (I, II i III) kod pacijenata koji su primali LABA lekove u zavisnosti od kombinacije alela oba ispitivana polimorfizma u dve starosne grupe (mlađi ili stariji od 50 godina)

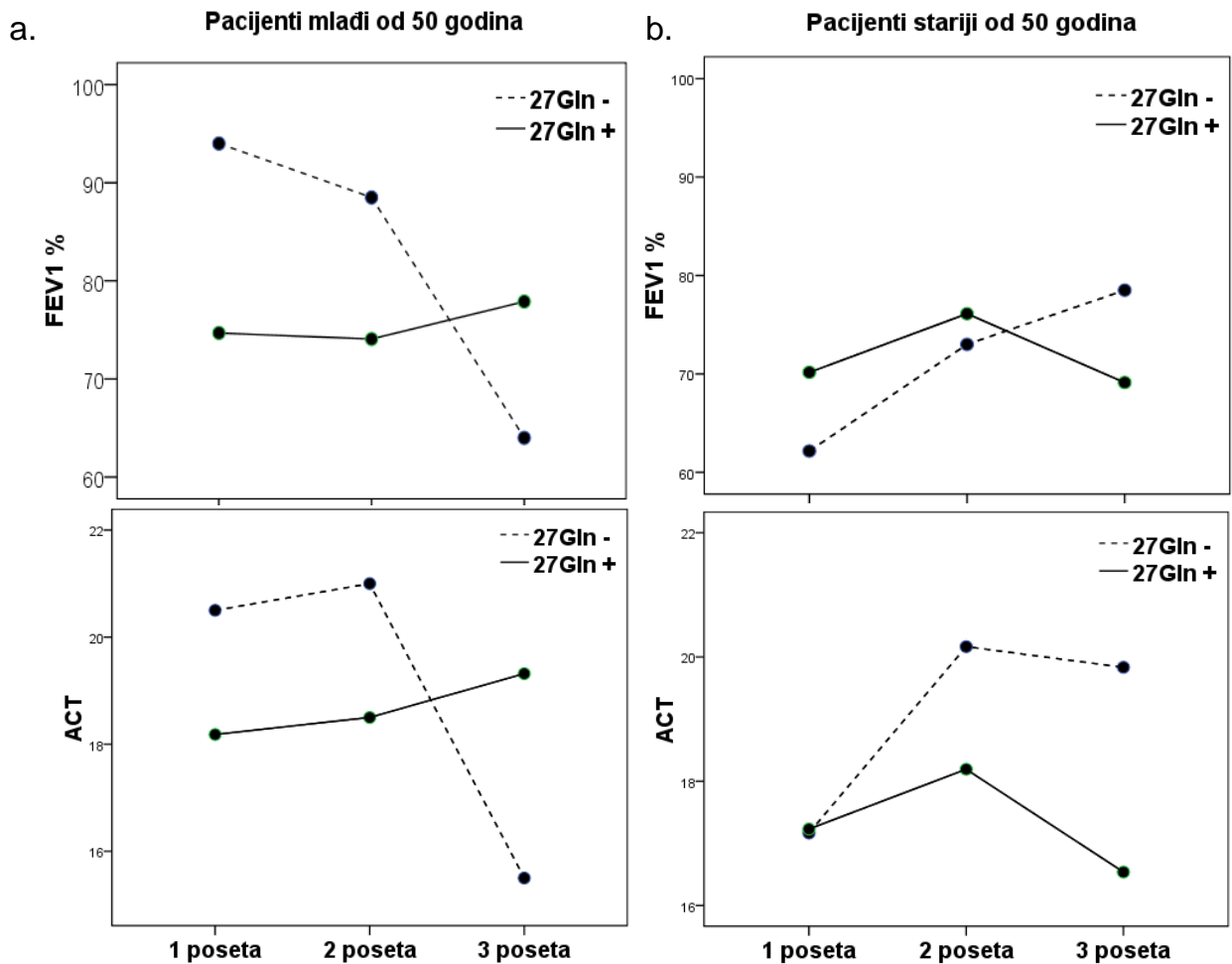
Godine	Polimorfizam	Parametar	\bar{x}	SD	Parametar	\bar{x}	SD	N		
<50	16Gly-27Glu	I FEV1	94,00	1,414	I ACT	20,50	0,707	2		
	16Gly-27Gln		70,81	24,192		16,88	4,978	16		
	16Arg-27Gln		76,89	18,282		18,93	4,045	28		
>50	16Gly-27Glu		62,17	19,722		17,17	4,355	6		
	16Gly-27Gln		69,50	9,196		16,88	2,900	8		
	16Arg-27Gln		70,44	27,804		17,39	5,553	18		
<50	16Gly-27Glu		II FEV1	88,50		,707	II ACT	21,00	1,414	2
	16Gly-27Gln			71,63		21,596		17,44	4,179	16
	16Arg-27Gln			75,46		17,612		19,11	3,531	28
>50	16Gly-27Glu	73,00		22,361	20,17	4,535		6		
	16Gly-27Gln	74,50		12,547	17,25	4,062		8		
	16Arg-27Gln	76,83		28,189	18,61	4,421		18		
<50	16Gly-27Glu	III FEV1		64,00	33,941	III ACT		15,50	9,192	2
	16Gly-27Gln			77,87	16,049			18,94	2,955	16
	16Arg-27Gln			77,89	19,990			19,54	3,756	28
>50	16Gly-27Glu		78,50	26,913	19,83		5,707	6		
	16Gly-27Gln		68,50	10,915	15,88		3,796	8		
	16Arg-27Gln		69,39	26,250	16,83		4,342	18		

Tabela 4.16. Multivarijantni test ispitivanja pojedinačnih i zajedničkih uticaja različitih promenljivih (posete, posete*geni, posete*starosne grupe, posete*geni*starosne grupe) na vrednosti FEV1 i ACT kod pacijenata na terapiji sa LABA u tri uzastopne posete

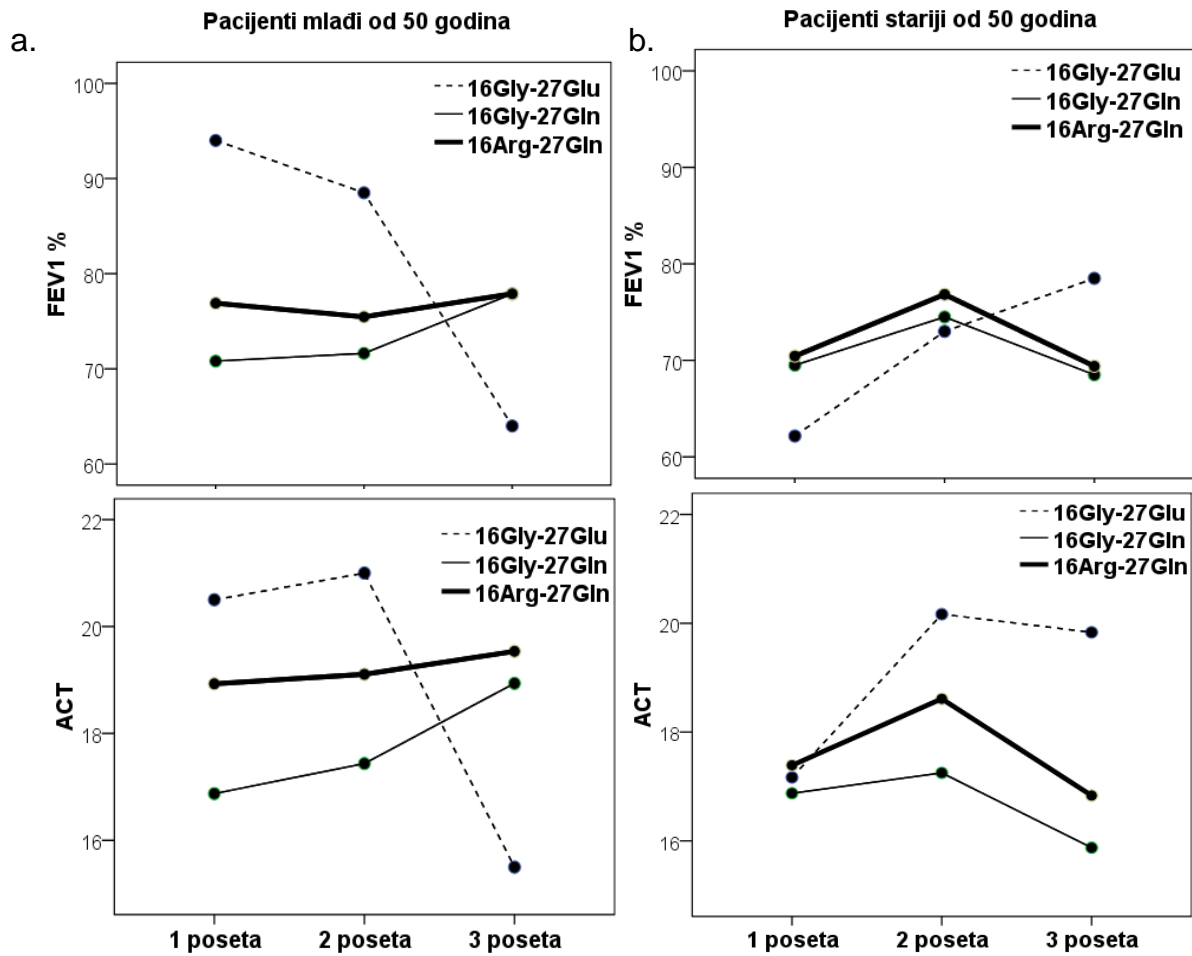
Uticaj promenljivih	Wilks-ov lambda	P	Parcijalni eta kvadrat	Wilks-ov lambda	P	Parcijalni eta kvadrat
	FEV1: 16Arg +/-			ACT: 16Arg +/-		
Posete	0,964	0,264	0,036	0,963	0,248	0,037
posete*Arg +/-	0,920	0,048	0,080	0,940	0,106	0,060
posete*godine	0,975	0,403	0,025	0,983	0,538	0,017
posete*Arg+/-*godine	0,995	0,825	0,005	1,000	0,993	0,000
	FEV1: 27Gln +/-			ACT: 27Gln +/-		
Posete	0,955	0,189	0,045	0,943	0,115	0,057
posete*Gln +/-	0,975	0,396	0,025	0,969	0,316	0,031
posete*godine	0,907	0,028	0,093	0,971	0,338	0,029
posete*Gln +/-*godine	0,834	0,001	0,166	0,905	0,026	0,095
	FEV1: Kombinacije alela			ACT: Kombinacije alela		
Posete	0,957	0,212	0,043	0,947	0,144	0,053
posete*kombinacije alela	0,940	0,113	0,060	0,990	0,702	0,010
posete*godine	0,967	0,665	0,017	0,962	0,597	0,019
posete*kombinacije*godine	0,828	0,009	0,090	0,897	0,102	0,053



Slika 4.8. Grafički prikaz promena vrednosti za FEV1% i ACT dobijenih u tri uzastopne posete u zavisnosti od prisustva ili odsustva 16Arg alela kod pacijenata koji su primali LABA i godina: a. mlađi od 50 godina; b. stariji od 50 godina



Slika 4.9. Grafički prikaz promena vrednosti za FEV1% i ACT dobijenih u tri uzastopne posete u zavisnosti od prisustva ili odsustva 27Gln alela kod pacijenata koji su primali LABA i godina: a. mlađi od 50 godina; b. stariji od 50 godina



Slika 4.10. Grafički prikaz promena vrednosti za FEV1% i ACT dobijenih u tri uzastopne posete u zavisnosti od kombinacija 16Arg i 27Gln alela kod pacijenata koji su primali LABA i godina: a. mlađi od 50 godina; b. stariji od 50 godina.

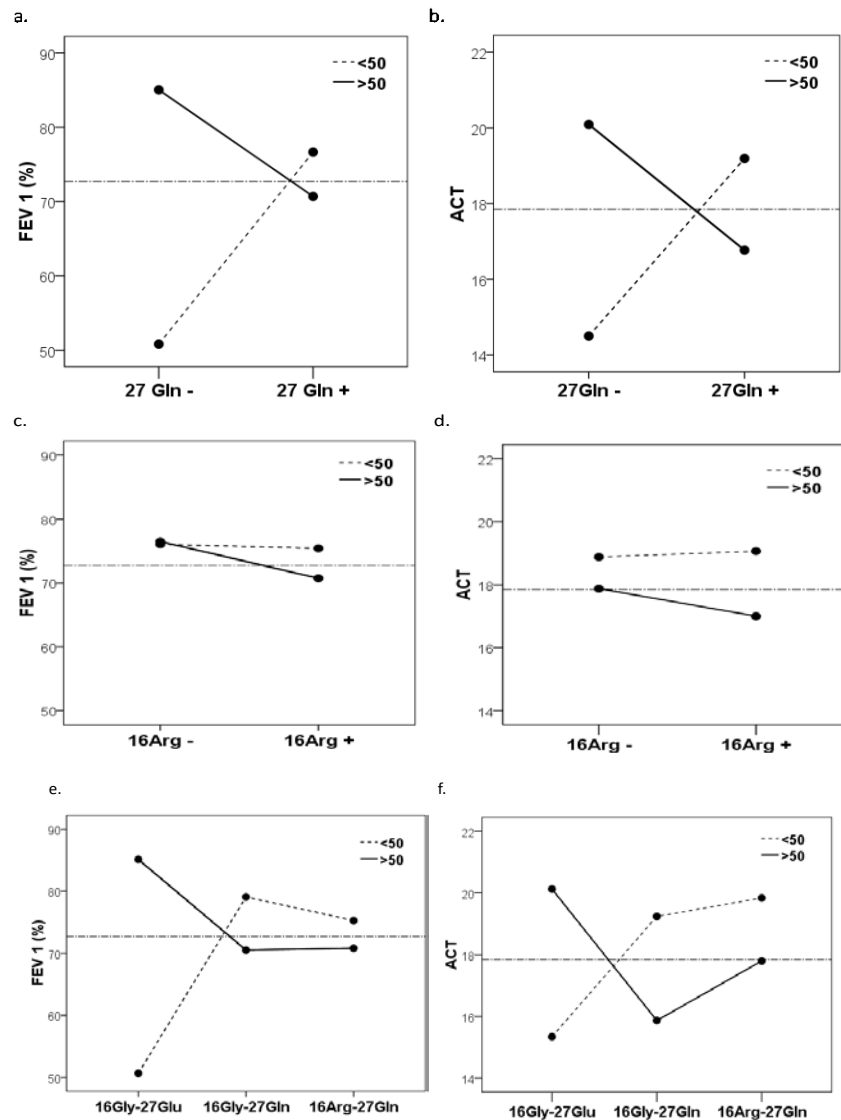
4.6.2. Uticaj ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i starosti pacijenata na parametre funkcije pluća u trećoj poseti kod pacijenata na terapiji LABA korigovano za vrednosti dobijene u prvoj poseti

Zajednički uticaj starosti pacijenta i polimorfizama (Arg16Gly i Gln27Glu) na efikasnost terapije sa dugo-delujućim agonistima ADRB2 receptora (LABA), procenjena na osnovu parametara funkcije pluća (FEV1%) i kontrole astme (ACT) ispitan je metodom dvofaktorske analize kovarijance (two-way ANCOVA). Ovom analizom je procenjena efikasnost terapije na osnovu parametara funkcije pluća koje su dobijene u trećoj poseti kada se ukloni uticaj vrednosti za ove parametare koje su dobijene u prvoj poseti. Rezultati deskriptivne statističke analize su prikazani u Tabeli 4.17. , a Slika 4.11. grafički prikazuje dobijene rezultate.

Analiza je pokazala da postoji trend zajedničkog uticaja 27Gln alela i starosti kod primenjene terapije dugo-delujućim agonistima ADRB2 receptora na FEV1 ($p=0,005$) i ACT ($p=0,012$), u trećoj poseti, kada se ukloni uticaj parametara funkcije pluća u prvoj poseti (Slika 4.11. a. i b.), a nije pokazan udruženi uticaj 16Arg alela i starosti, niti na FEV1 ($p=0,519$), ni na ACT ($p=0,556$). Kombinacija alela i starost pacijenta su značajno uticali na vrednosti za FEV1 ($p=0,019$), a efekat na ACT je bio na granici statističke značajnosti ($p=0,076$). Kao i u prethodnoj analizi (Tabela 4.16.) pokazalo se da su mlađi pacijenti, nosioci 27Glu/Glu genotipa i kombinacije alela 16Gly-27Glu imali najveće pogoršanje funkcije pluća u trećoj poseti, ako se ukloni uticaj funkcije pluća koji je ispitan u prvoj poseti.

Tabela 4.17. Podaci deskriptivne statistike o uticaju dugo-delujućih agonista ADRB2 receptora, polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu i starosti pacijenta na funkciju pluća u trećoj poseti korigovano za funkciju pluća u prvoj poseti

Godine	Polimorfizam	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	N
		Zavisna promenljiva: FEV1%		Zavisna promenljiva: ACT		
<50	27Gln -	64,00	33,941	15,50	9,192	2
	27Gln +	77,89	18,460	19,32	3,463	44
>50	27Gln -	78,50	26,913	19,83	5,707	6
	27Gln +	69,12	22,408	16,54	4,130	26
<50	16Arg -	75,18	17,586	18,53	3,842	17
	16Arg +	78,52	19,915	19,52	3,690	29
>50	16Arg -	72,79	19,212	17,57	4,941	14
	16Arg +	69,39	26,250	16,83	4,342	18
<50	16Gly-27Glu	64,00	33,941	15,34	4,608	2
	16Gly-27Gln	77,87	16,049	19,24	11,441	16
	16Arg-27Gln	77,89	19,990	19,83	5,832	28
>50	16Gly-27Glu	78,50	26,913	20,13	2,704	6
	16Gly-27Gln	68,50	10,915	15,87	6,395	8
	16Arg-27Gln	69,39	26,250	17,80	8,054	18



Slika 4.11. Uticaj alela i kombinacije alela za Arg16Gly i Glu27Gln polimorfizme i starosti kod pacijenata koji su primali dugo-delujuće agoniste ADRB2 receptora na vrednosti FEV1 dobijenih u trećoj poseti kada se ukloni uticaj vrednosti dobijene u prvoj poseti (----- srednja vrednost za FEV u prvoj poseti 72,7 % i za ACT 17,85: a. FEV1 za Glu27Gln polimorfizam; b. ACT za Glu27Gln polimorfizam; c. FEV1 za Arg16Gly polimorfizam; d. ACT za Arg16Gly polimorfizam; e. FEV1 za kombinacije alela oba polimorfizma; f. ACT za kombinacije alela oba polimorfizma.

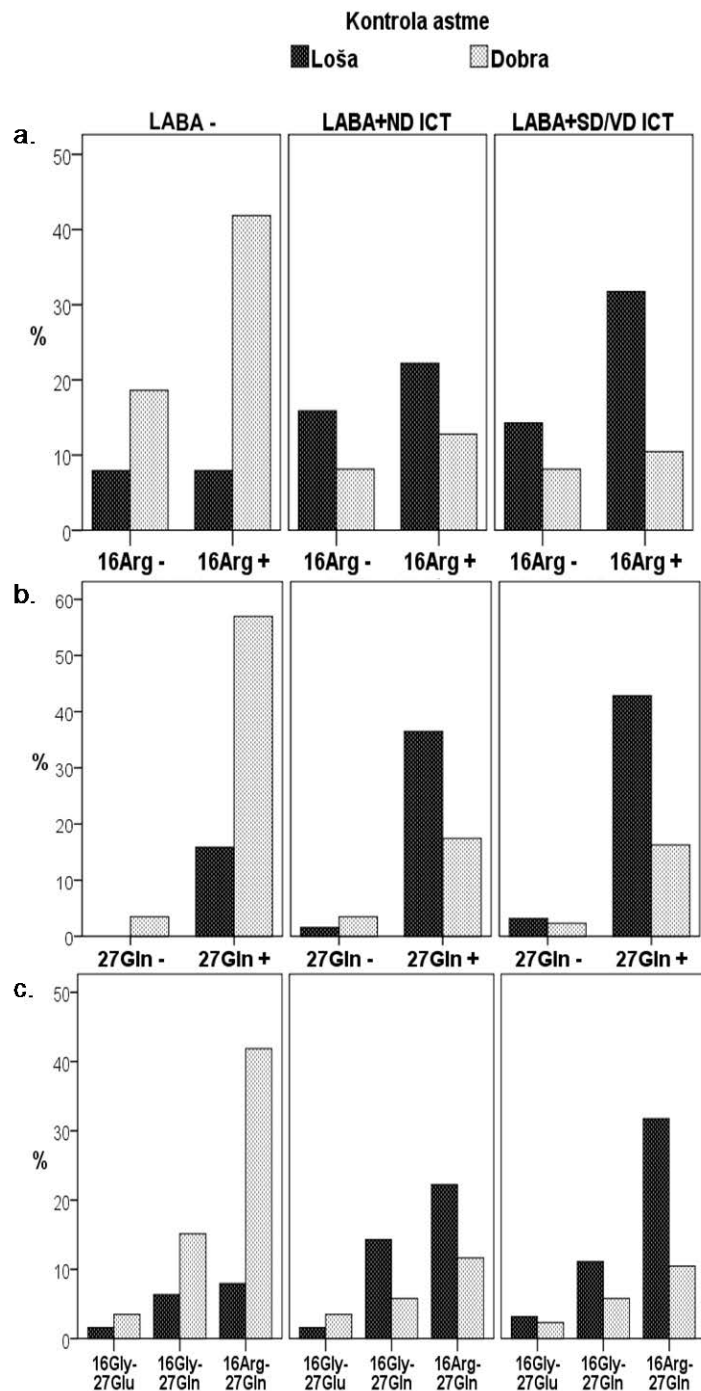
4.6.3. Uticaj ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora na kontrolu astme u zavisnosti od primenjene terapije

Rezultati analize uticaja primenjene terapije (LABA sa različitim dozama inhalacionih kortikosteroida i drugih lekova) na kontrolu astme u zavisnosti od polimorfizma ispitivanih gena prikazani su u Tabeli 4.18. i grafički, na Slici 4.12. (stubičasti grafik).

Kod pacijenata koji su primali LABA terapiju i koji su bili nosioci 16Arg alela, 27Gln alela i kombinacije alela 16Arg-27Gln zapažena je lošija kontrola astme, dok su pacijenti koji su primali druge lekove, imali bolju kontrolu astme, nezavisno od genotipa ili kombinacije alela.

Tabela 4.18. Uticaj terapije (LABA+niska doza ICT, LABA+srednja/visoka doza ICT i LABA - drugi lekovi), polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu na kontrolu astme (dobro ili loše kontrolisana astma)

Polimorfizam	Kontrola astme	Terapija			Pearson-ov χ^2	P
		broj (%-u odnosu na kontrolu astme)	LABA -	LABA+ ND ICT		
16Arg -	Loša	5 (20,8)	10 (41,7)	9 (37,5)	5,948	0,051
	Dobra	16 (53,3)	7 (23,3)	7 (23,3)		
16Arg +	Loša	5 (12,8)	14 (35,9)	20 (51,3)	25,754	< 0,001
	Dobra	36 (64,3)	11 (19,6)	9 (16,1)		
27Gln -	Loša	0 (0)	1 (33,3)	2 (66,7)	2,177	0,337
	Dobra	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25,0)		
27Gln +	Loša	10 (16,7)	23 (38,3)	27 (45,0)	29,744	< 0,001
	Dobra	49 (62,8)	15 (19,2)	14 (17,9)		
16Gly-27Glu	Loša	1 (25,0)	1 (25,0)	2 (50,0)	0,750	0,687
	Dobra	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25,0)		
16Gly-27Gln	Loša	4 (20,0)	9 (45,0)	7 (35,0)	6,061	0,048
	Dobra	13 (56,5)	5 (21,7)	5 (21,7)		
16Arg-27Gln	Loša	5 (12,8)	14 (35,9)	20 (51,3)	26,317	< 0,001
	Dobra	36 (65,5)	10 (18,2)	9 (16,4)		



Slika 4.12. Distribucija (%) pacijenata sa dobrom ili loše kontrolisanom astmom u zavisnosti od prisustva/odsustva 16Arg, 27Gln ili kombinacije alela i primenjene

terapije (LABA+ND ICT: LABA i niska doza ICT: LABA+SD/VD ICT: LABA+srednja/visoka doza ICT; LABA-: drugi lekovi)

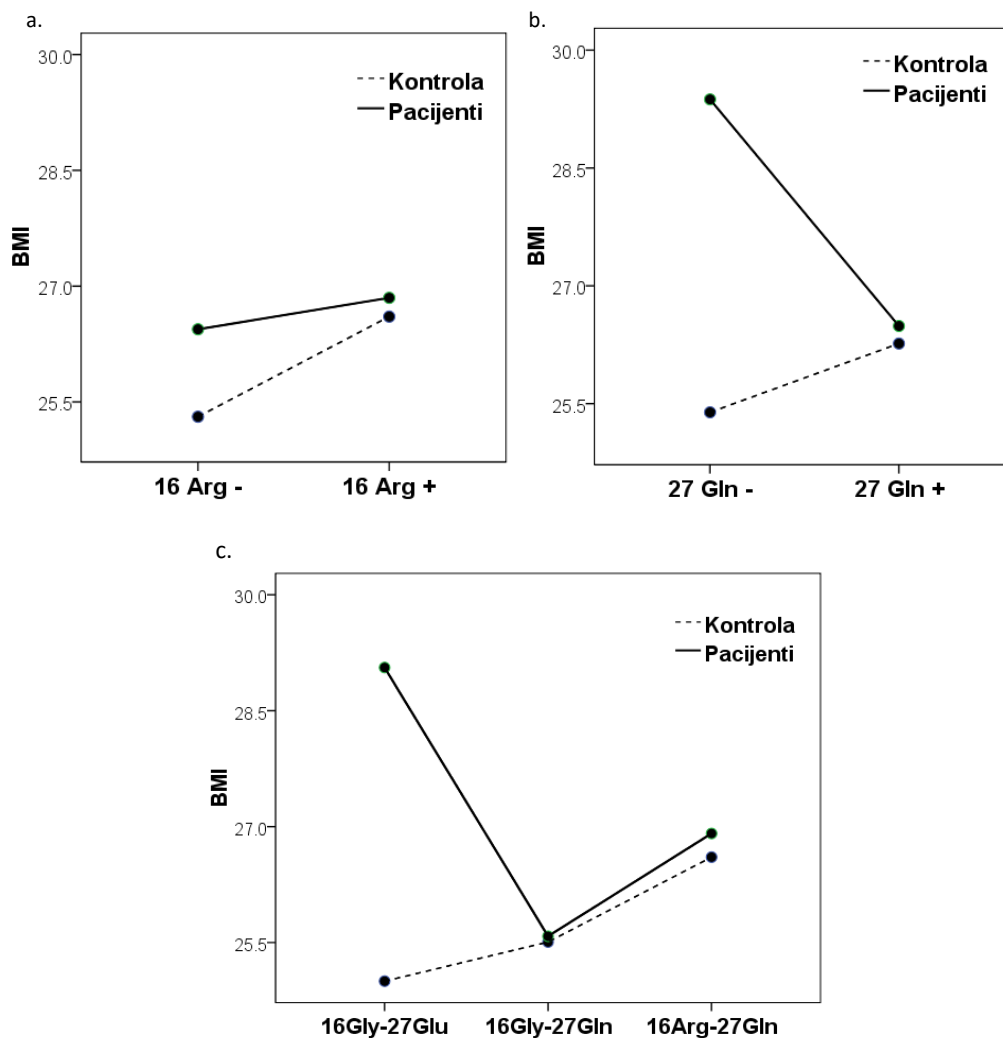
4.6.3. Povezanost između BMI-a, ispitivanih polimorfizama ADRB2 i astme

Ispitan je uticaj polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu na vrednosti BMI-a kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati deskriptivne statističke analize su prikazani u Tabeli 4.19. i grafički na Slici 4.13.

Nije utvrđen zajednički uticaj astme i ispitivanih polimorfizama na BMI (za 16Arg alel $p=0,544$, za 27Gln alel $p=0,083$, za kombinaciju alela $p=0,214$).

Tabela 4.19. Podaci deskriptivne statistike o uticaju astme i polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu na vrednosti BMI-a (kg/m²)

Zavisna promenljiva: BMI				
Ispitanici	Polimorfizam	\bar{x}	SD	N
Kontrola	16 Arg -	25,30	3,449	23
	16 Arg +	26,60	4,506	39
Pacijenti	16 Arg -	26,44	4,812	54
	16 Arg +	26,84	4,884	95
Kontrola	27 Gln -	25,39	3,790	10
	27 Gln +	26,26	4,251	52
Pacijenti	27 Gln -	29,37	5,525	11
	27 Gln +	26,48	4,745	138
Kontrola	16Gly-27Glu	25,00	3,801	9
	16Gly-27Gln	25,50	3,336	14
	16Arg-27Gln	26,60	4,506	39
Pacijenti	16Gly-27Glu	29,05	5,379	12
	16Gly-27Gln	25,58	4,434	43
	16Arg-27Gln	26,91	4,871	94



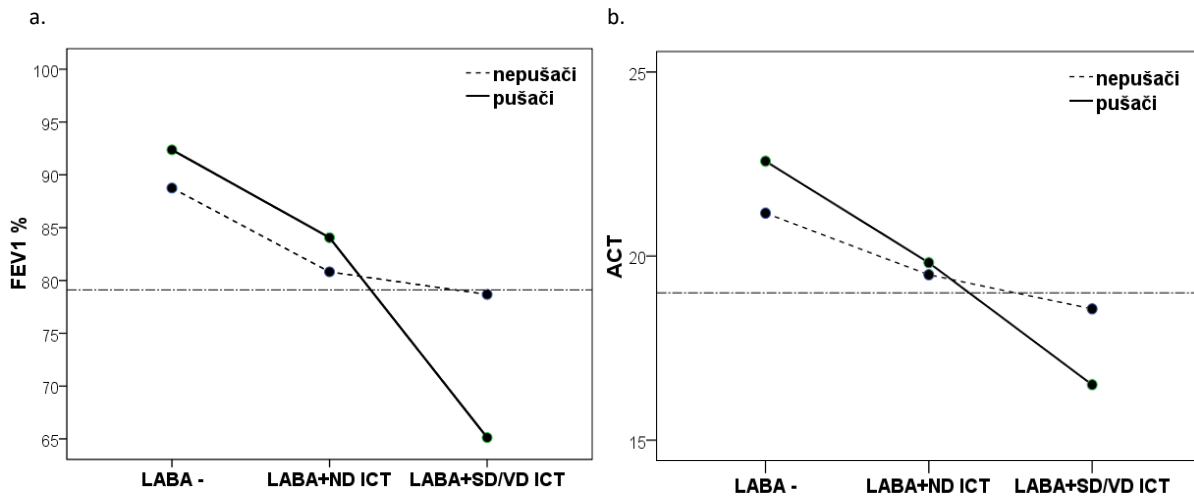
Slika 4.13. Promene vrednosti za BMI (kg/m²) u zavisnosti od ispitivanog polimorfizma kod pacijenata sa astmom i u kontrolnoj grupi

4.6.4. Uticaj pušenja na efikasnost terapije procenjena na osnovu parametara funkcije pluća u trećoj poseti posle uklanjanja uticaja funkcije pluća u prvoj poseti

Ako se posmatra uticaj pušenja na efikasnost terapije sa lekovima LABA (sa niskom ili sa srednjom/visokom dozom ICT) i drugih lekova, dobijena je granična statistička značajnost za FEV1 ($p=0,078$), dok za ACT nije dobijena značajna razlika ($p=0,209$). U Tabeli 4.20. prikazani su rezultati deskriptivne statističke analize. Pušači koji su bili na terapiji LABA sa srednjim i visokim dozama inhalacionih kortikosterida su pokazali najveći pad plućne funkcije u trećoj poseti u odnosu na prvu posetu (Slika 4.20. a. i b.).

Tabela 4.20. Rezultati deskriptivne statistike o uticaju pušenja na efikasnost terapije (LABA sa niskom i srednjom/visokom dozom ICT) i drugim lekovima

Pušenje	Terapija	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	N
		Zavisna promenljiva: FEV1		Zavisna promenljiva: ACT		
Nepušači	LABA -	95,20	17,041	22,02	3,267	41
	LABA+ND ICT	79,03	17,731	19,39	3,856	33
	LABA+SD/VD ICT	76,26	22,745	18,10	4,657	31
Pušači	LABA -	97,40	11,908	22,80	1,095	5
	LABA+ND ICT	68,60	17,271	18,00	3,742	5
	LABA+SD/VD ICT	56,44	19,034	15,44	2,455	9



Slika 17. Uticaj pušenja na efikasnost terapije sa lekovima LABA (sa niskom i srednjom/visokom dozom ICT) i drugim lekovima procenjena na osnovu vrednosti za: a. FEV1% (----- srednja vrednost za FEV1 u prvoj poseti 79,1 %); b. ACT. (----- srednja vrednost za ACT u prvoj poseti 19,03).

5. DISKUSIJA

Analizom osnovnih karakteristika grupa ispitanika, statistički značajna razlika između dve grupe zapažena je u kategoriji životne dobi i pušačkog statusa ($p < 0,01$). Pacijenti sa astmom bili su nešto mlađi ($43,7 \pm 15,0$) u odnosu na kontrolnu grupu ($48,2 \pm 11,0$). Učestalost pušača i bivših pušača bila je značajno niža u grupi pacijenata (12%) u odnosu na kontrolnu grupu (44%), što je očekivan podatak podržan i u literaturi [149]. Nije bilo razlike u vrednostima BMI između grupe pacijenata ($26,5 \pm 4,8$) i kontrolne grupe ($26,1 \pm 4,2$). Prema literaturi, neki autori nalaze rizik za pojavu težih oblika astme raste sa porastom BMI, ali tek u grupi pacijenata sa BMI većim od 28 [150], ali u našoj kohorti takvih pacijenata nije bilo dovoljno da bi se izvršila statistički valjana analiza. To se slaže i sa mišljenjima da su rezultati do sada objavljenih israživanja malobrojni i nekonzistentni, te da zahtevaju dodatnu evaluaciju [151].

Što se tiče spirometrijskih parametara težine opstrukcije [152] [1], najveći broj ispitanika imao je vrednost FEV1 > 80% (61,7%), laku i srednje tešku opstrukciju imalo je 34,9%, a tešku opstrukciju 3,4% pacijenata. Nasuprot tome, terapiju samo sa lekovima iz grupe SABA (20%) ili drugim kontrolerom imalo je samo 28,2% pacijenata. Na terapiji niskim, srednjim visokim dozama ICS bilo je 41,6%, 22,8% i 7,4% pacijenata, respektivno, što je u značajnoj disproporciji sa stepenom težine oboljenja. Tendencija terapije većim dozama ICS od, prema smernicama preporučenih, (bilo samostalno, bilo u fiksnoj kombinaciji) i koje su, prema smernicama, u određenoj diskrepanci sa stepenom težine astme gledano merom

opstrukcije disajnih puteva, dobro je poznata i u literaturi [153] i donekle je očekivan rezultat.

U analizi korelacije između parametara plućne funkcije FEV1, FEV1/FVC i rezultata ACT, u prvoj, drugoj i trećoj poseti pacijenata sa astmom, dobijene su statistički visoko značajne ($p < 0.001$) vrednosti pozitivne korelacije, što je još jednom potkrepilo tvrdnje da se stepen kontrole astme može adekvatno proceniti i ovim upitnikom u nedostatku spirometrijske opreme [143,145,146]. To može biti od koristi u studijama u okviru širih populacionih analiza koja obuhvataju veliki broj ispitanika, ali isto tako i za svakodnevni ambulantni rad u sredinama u kojima nije dostupna sofisticirana oprema.

Analiza povezanosti ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i pojave astme: Farmakoterapija određena prema genotipu pacijenta trebalo bi da rezultira klinički značajnom povećanju efikasnosti i da igra značajnu ulogu u redukciji neželjenih efekata lekova i pozitivno uticati na težinu oboljenja [154]. Polimorfizmi ADRB2 gena imaju ulogu u ekspresiji, funkciji i regulaciji ADRB2 receptora. Ovi oblici genetskih razlika su odgovorni za različit odgovor na terapiju ADRB2 agonistima i mogu doprineti stepenu težine oboljenja.

Mnoge studije su ispitivale ADRB2 gene kao faktor rizika za izmenjen bronhodilatacijski odgovor [154,155,156], ali studija koje analiziraju ADRB2 polimorfizam kao faktor rizika povezan sa prevalencom astme u populaciji ima u mnogo manjem broju.

Što se tiče analize genetskog istraživanja, mora se apostrofirati da prema literaturi, frekvencija alela Arg16Gly i Gln27Glu varira među različitim etničkim

grupama [157,158], kao i da Arg16Gly i Gln27Glu polimorfizmi izazivaju različit stepen agonistima izazvane nishodne regulacije receptora [159].

U ovoj studiji, polimorfizmi Arg16Gly i Gln27Glu ADRB2 gena su ispitivani u srpskoj populaciji po prvi put [160]. Frekvencije u 16Gli i 27Glu alela u kontrolnoj grupi su iznosile 53,0 i 27,7%, respektivno, što se značajno ne razlikuje od drugih nalaza u studijama koje su obrađivale populaciju belaca (Gly16 alela 60,7% i 27Glu alela 36,1%) [131]. Oba istražena SNP značajno odstupaju od HWE i u kontrolnoj i u studijskoj grupi, jer je dobijeno više homozigotnih varijanti nego što se očekivalo. Značajna odstupanja od HWE za ADRB2 genotipove takođe je prijavljeno u nekoliko različitih studija odrasle populacije [161]. Međutim, otkrili smo da populacija zdravih muškaraca u ovoj studiji pokazuje HWE kod oba ADRB2 polimorfizma. Ova razlika među polovima u vezi u testiranom HWE u našoj zdravoj populaciji može se objasniti i analizom različitih evropskih populacija [161], kojom je utvrđeno da Arg16Gly i Gln27Glu haplotipovi odstupaju od HWE kod žena, ali ne i kod muškaraca.

Utvrđena je statistički značajna razlika frekvencije genotipova i alela između pacijenata i kontrolne grupe, kako u grupi svih pacijenata, tako i u grupama posmatranim po polu:

- Osobe koje su nosioci 27Gln alela, naročito homozigoti sa Gln27Gln i imaju značajan rizik za pojavu astme [OR(95%CI)za Gln27Gln 3,0 (1,7-5,3) i za 27Gln alel 2,5 (1,6-3,8)]. Ovaj rizik je utvrđen i kod oba pola, s tim što je kod muškaraca prisustvo ovog genotipa i alela bilo povezano sa nešto većim rizikom [OR(95%CI)za Gln27Gln 4,0 (1,6-10,0) i za 27Gln alel 3,7 (1,5-6,4)] u odnosu na žene [OR(95%CI)za Gln27Gln 2,8 (1,4-5,6) i za 27Gln alel 2,5 (1,4-4,4)].

- Nosioци Glu27Gln genotipa i 27Glu alela su imali smanjen rizik od pojave astme [OR(95%CI) za Gln27Glu 0,3 (0,1-0,7) i za 27Glu alel 0,4 (0,3-0,6)]. Ovakav protektivni efekat 27Glu alela utvrđen je i kod oba pola.
- Polimorfizam na Arg16 nije bio povezan sa nastankom oboljenja u našoj populaciji, tj za polimorfizam 16Arg/Gly nisu uočene razlike u frekvencijama genotipova i alela između pacijenata sa astmom i kontrolne grupe. Prethodne studije [115, 137,162] su ukazale na težu kliničku sliku i veći broj egzacerbacija, više izraženo u pedijatrijskoj nego u adultnoj populaciji, ali nije jasno da li ovaj polimorfizam utiče na pojavu same bolesti.
- Kada je analizirana distribucija kombinacije genotipa, pokazano je da osobe sa 16Arg/Gly-27Gln/Gln i 16Gly/Gly-27Gln/Gln imaju dvostruko veći rizik od nastanka astme, dok rizik za nosioce 16Arg/Gly-27Gln/Glu kombinacije iznosi oko trećinu u odnosu na ostale subjekte; ovi su nalazi konzistentni sa meta analizom o povezanosti ADRB2 polimorfizma i astme, u kojoj je takođe primećen niži rizik od oboljevanja od astme kod 27Gln/Glu heterozigota u poređenju sa drugim genotipovima, dok nije opisan uticaj Arg16Gly [132]. Ti se podaci uklapaju i sa studijom kineske populacije u kojoj Arg16Gly polimorfizam nije povezan sa genetskom sklonošću za nastanak dečije astme [154]. U studiji o populaciji meksičkih Mestizosa, primećena je povećana učestalost 27Gln/Gln homozigota kod astmatičara, dok je 27Glu alel značajno povezan sa smanjenom rasprostranjenošću dijagnoze astme kod tih nosilaca [163]. Slično navedenom nalazu, značajno viša vrednost PD20 metaholinskog testa i sledstveno niži stepen bronhijalne hiperreaktivnosti primećen je kod 27Glu u odnosu na 27Gln homozigote [164].

Analiza ADRB2 kombinacija pokazala je da je rizik od astme kod osoba sa kombinacijom Arg16Gln-Gln27Glu približno jednak jednoj trećini rizika u odnosu

na ispitanike sa drugim kombinacijama. Tako su osobe sa 16Arg/Gli-27Gln/Glu kombinacijama genotipova "zaštićene" od astme, verovatno zbog dominantne uloge 27Glu alela u zaštiti od nishodne regulacije receptora [165].

Poznato je iz kliničke prakse da bronhodilatatorni odgovor na ADRB2-agoniste veoma varira kod astmatičara i zavisi od starosti, pola, etničke pripadnosti, težine bolesti, i doziranja ADRB2-agonista [166].

U našoj populaciji nije pokazana povezanost između Arg16Gly genotipa i astme. Ipak, statistički značajna razlika uočena je u saudijskoj studiji [167] posmatrajući frekvenciju Arg16Gly genotipova između noćnih astmatičara i zdrave populacije. Osim toga, rezultati istraživanja provedenih na glatkim mišićima bronha potvrdili su da 16Gly alel ADRB2 receptora pospešuje ADRB2 agonistom izazvanu nishodnu regulaciju, [168] dok su 27Glu receptori rezistentni na ovaj efekat [169].

Nadalje, u našoj studiji pojedinci koji nose 27Gln/Gln genotip u kombinaciji sa 16Arg/Gli ili 16Gly/Gli su genotipovi sa značajnim rizikom za nastanak astme, najverovatnije zbog sinergističkog uticaja na pomenutu nishodnu regulaciju [166].

Analizom povezanosti ispitivanih polimorfizama ADRB2 receptora i stepena težine astme u odnosu na pol i godine starosti može se zaključiti da, što se tiče stepena težine bolesti, odnosno kontrole astme, 27Gln/Glu heterozigoti pokazuju tendenciju za manje noćnih simptoma i smanjenje broja hitnih poseta i hospitalizacija u odnosu na pacijente sa 27Gln/Gln genotipom, kao i na zaštitnu ulogu u slučaju prisustva 27Glu alela u fenotipu teške astme kod Tajlandžana [122]. Rezultati tog istraživanja su ukazala na Gln27 alel i Gly16/Gln27 kombinaciju kao faktore rizika u stepenu težine astme. Protektivna uloga 27Gln/Glu heterozigotnosti i 27Glu alela otkrivena u našoj studiji i drugim epidemiološkim

analizama [173] verovatno se odnosi na značajnu negativnu povezanost heterozigotnosti na poziciji 27 [174].

Produžena primena ADRB2-agonista dovodi do tolerancije receptora zbog gubitka signala transdukcije i/ili njihove desenzitizacije. Uticaj starenja na odgovor na ADRB2 agoniste i druge bronhodilatatore takođe je klinički značajan kod astme [169]. Smanjenje reaktivnosti na SABA - albuterol - salbutamol je povezano sa životnim dobom i izraženije je u starijih pacijenata [171,172]. Od kliničkog je interesa da se istraži uticaj ADRB2 polimorfizama na terapiju LABA u kombinaciji sa ICS, koji poboljšavaju simptome u teškoj astmi.

U analizi ADRB2 polimorfizma i pola, a na osnovu binarnog regresionog modela za predikciju astme kod odraslih, nezavisni prediktori pojave astme u našoj populaciji bili su: prisustvo Gln alela, muški pol i mlađi uzrast. Taj se podatak donekle kosi sa činjenicom da je prevalenca astme medju polovima približno jednaka nakon pubereta [175].

U analizi ADRB2 polimorfizma i godina, pacijenti sa astmom - homozigoti 27Gln/Gln bili su statistički značajno mlađi [godine, medijana (25.-75.percentil): 42,5 (31,0-54,0), $p=0,036$] u odnosu na pacijente sa genotipovima 27Gln/Glu [55,5 (45,7-58,0)] i 27Glu/Glu [52,0 (33,0-69,0)]. Ovaj uticaj nije uočen za polimorfizam 16Arg/Gly.

Međutim, uočeno je da su pacijenti koji su imali kombinaciju alela 16Gly-27Gln bili značajno mlađi [godine, medijana (25.-75.percentil): 38,0 (26,0-55,0) godine, $p=0,043$] u odnosu na pacijente sa kombinacijama alela 16Gly-27Glu [53,5 (34,7-70,5)] i 16Arg-27Gln: 45,0 (34,7-56,0)].

Primenom neparametarskog χ^2 testa ispitan je uticaj genotipova i kombinacije alela ispitivanih polimorfizama na pogoršanje astme u ispitivanoj populaciji pacijenata. Nijedan genotip ili kombinacija alela nije bila povezana sa

učestalošću pogoršanja astme u ispitivanoj populaciji pacijenata u našoj studiji. Drugi autori su dokazali povezanost prisustva Arg16 alela sa češćom pojavom astme u pedijatrijskoj populaciji, dok su podaci za adultnu populaciju nekonzistentni [115,137,162].

Analiza je pokazala zajednički uticaj polimorfizma Arg16Gly i starosti pacijenta na parametre ventilacije pri prvoj poseti (FEV1: $p=0,043$; ACT: $p=0,024$). Kod astmatičara mlađih od 50 godina utvrđena je statistički značajna razlika između različitih Arg16Gly genotipova (FEV1: $p=0,016$; ACT: $p=0,021$), primenom metode jednofaktorska ANOVA a primenom post-hoc testa za poređenje između grupa (LSD metoda-least significant difference) u istoj starosnoj grupi utvrđena je najpovoljnija funkcija pluća kod heterozigota Arg16Gly u odnosu na homozigote Gly16Gly (FEV1: $p=0,006$; ACT: $p=0,009$), kao i u odnosu na genotip Arg16Arg (FEV1: $p=0,015$; ACT: $p=0,015$). U populaciji pacijenata sa astmom starijih od 50 godina nije pokazan udruženi uticaj godina i polimorfizma Arg16Gly na funkciju pluća koja je ispitana prilikom prve posete (FEV1: $p=0,465$; ACT: $p=0,325$).

Rezultati analize uticaja primenjene terapije (LABA sa različitim dozama inhalacionih kortikosteroida i drugi lekovi) na kontrolu astme u zavisnosti od polimorfizma ispitivanih gena pokazali su sve lošiju kontrolu astme sa stepenom povećanja terapije (sledstveno, sa težinom kliničke sluke) kod pacijenata nosioca 16Arg alela, 27Gln alela i kombinacije alela 16Arg-27Gln, dok su pacijenti koji su primali druge lekove, imali bolju kontrolu astme, nezavisno od genotipa ili kombinacije alela.

Nevezano za relativno malu veličinu uzorka, najinteresantniji je rezultat uticaja životne dobi i odgovora na LABA+ICS u odnosu na ADRB2 polimorfizam. Prema našim rezultatima, [176] prisustvo 27Gln alela kod astmatičara mlađih od 50 god. dovodi do boljeg odgovora na LABA+ICS od nosilaca 27Glu alela, gledano

kroz poboljšanje vrednosti FEV1 i ACT skora. Suprotno, stariji nosioci 27Glu alela imaju bolji odgovor na LABA+ICS terapiju nego 27Gln nosioci istih godina. Prema dosadašnjim saznanjima, nalaz povezanosti godina starosti i odgovora na LABA+ICS terapiju u odnosu na ADRB2 polimorfizam do sada nije publikovan. Otkriveno je da je kombinacija 16Gly-27Glu povezana sa značajno većom kratko- i dugotrajnom desenzitizacijom, dok je kombinacija 16Gly-27Gln nasuprot tome asocirana sa značajno nižom kratko- i dugotrajnom desenzitizacijom [176,177]. Ovi nalazi mogu objasniti zapažanje u našoj studiji da nosioci 27Gln imaju bolji odgovor na terapiju ADRB2 agonista. S druge strane, stariji nosioci 27Glu alela su verovatno manje osetljivi na kratko- i dugotrajnu desenzitizaciju ADRB2, što može objasniti njihov bolji odgovor na LABA+ICS terapiju. Ovo poređenje se mora interpretirati sa rezervom, jer su korišćeni različiti ADRB2 agonisti.

Ako se posmatra uticaj pušenja na efikasnost terapije sa LABA (sa niskom ili sa srednjom/visokom dozom ICT) i drugih lekova, dobijena je granična statistička značajnost za FEV1 ($p=0,078$), dok za ACT nije dobijena značajna razlika ($p=0,209$). Pušači koji su bili na terapiji LABA sa srednjim i visokim dozama inhalacionih kortikosterida su pokazali najveći pad plućne funkcije u trećoj poseti u odnosu na prvu posetu. Vrlo slične nalaze su imale i najnovije objavljene studije [178,179,180] koje se bave povezanošću navike pušenja i astme.

U zaključku, utvrđeno je da 27Gln alela povećava rizik za nastanak astme u našoj odrasloj populaciji. Takođe, pokazan je uticaj životne dobi na efikasnost LABA+ICS u odnosu na ADRB2 polimorfizam. Tako, nosioci 27Gln alela mlađi od 50 god imaju bolji odgovor na LABA+ICS terapiju, dok u starijih pacijenata 27Glu alel dovodi do bolje kontrole astme.

Prema dosadašnjim podacima, nije postignut konsenzus o odnosu identifikovanih ADRB2 genetskih varijacija i astme. Aleli zajednički za različite

etničke grupe mogu da imaju različite uticaje zbog interakcije sa faktorima sredine ili drugim genetskim varijantama specifičnim za određenu etničku grupu. Interpretaciju nalaza dodatno otežava neadekvatna procena uticaja sredine, razlike u rasprostranjenosti alela i haplotipova - kombinacija u različitim populacijama. Ovo ispitivanje ima određena ograničenja: veličina uzorka je relativno mala, nisu mogli biti razmatrani uticaji spoljašnjih faktora, analizirana su samo dva polimorfizma, nedostatak prilagođene kontrolne grupe.

Kontradiktorni nalazi u literaturi mogu se pripisati nizu različitih faktora: različitom terapijskom pristupu, različitim dijagnostičkim kriterijumima, različitim kriterijumima za uključanje, etničkim razlikama koje mogu menjati frekvencu genotipova i njihovih polimorfizama, različitim instrumentima merenja, postojanju neprepoznatih komorbiditeta koji mogu uticati na klinički odgovor, i, na kraju, različitim laboratorijskim tehnikama za evaluaciju polimorfizama.

Zbog kliničkog značaja ispitivanja efikasnosti ADRB2 agonista u terapiji astme u odnosu na životnu dob i ADRB2 genotip, potrebno je sprovesti ispitivanja sa većim brojem ispitanika. Procena odgovora na terapiju ADRB2-agonista sa starenjem zahteva duži period praćenja i postojanje većeg broja pacijenata i definisanih starosnih grupa.

Ovo je prvi put da se objavljuju podaci o frekvenciji polimorfizama (Gly16Arg) i (Gln27Glu) u našoj populaciji, kako među zdravim osobama, tako i među pacijentima obolelim od bronhijalne astme. Ova saznanja bi u budućnosti potencijalno mogla doprineti razvoju personalizovane terapije astme [183-187]. Zajednički imenitelj dosadašnjih, pa i najnovijih populacionih genomskih ispitivanja je nedostatak adekvatno reprezentovanih kohorti ispitanika; s obzirom da se neke populacijske grupe mnogo češće javljaju kako u pojedinim oboljenjima (gde je genetska struktura faktor rizika za njihovo ispoljavanje), tako i zbog

paramedicinskih socijalnih aspekata, gde određene grupe nemaju pristup medicinskoj zaštiti, a pogotovo kliničkim ispitivanjima [188]. Nije bez značaja ni činjenica da je mnogo veća verovatnoća da se publikacija objavi i postane dostupna medicinskoj javnosti ukoliko prikazuje rezultate koji se već uklapaju u dosadašnja iskustva, što se naročito odnosi na autore iz medicinski manje razvijenih zemalja gde ne postoji mogućnost finansiranja istraživanja koja bi obuhvatila dovoljan broj ispitanika. Dodatni problem u multikulturalnim sredinama je sve učestalije mešovito etničko poreklo pojedinaca koji ulaze u ovakva ispitivanja [189].

Eventualni širi doprinos uvođenja metoda genetske analize ADRB2 polimorfizma u širu kliničku praksu, kod selektovanih pacijenata, je činjenica da visoki procenat osoba u opštoj populaciji, kao i pulmoloških bolesnika, boluje od kardioloških oboljenja i stanja koja zahtevaju dugogodišnju upotrebu lekova iz grupe beta-blokatora, što bi omogućilo da se predvidi na koji način treba modulirati terapiju u cilju efikasnijeg lečenja i unapređenja kvaliteta života ovih pacijenata. U budućnosti, na osnovu dobijenih rezultata moći će da se predvidi kakav će kod pacijenata biti tok bolesti i odgovor na terapiju u zavisnosti od prisustva određenih genetičkih markera.

Ukratko, broj gena identifikovanih za različite fenotipove astme i odgovora na terapiju i dalje je mali. Pored toga, postoji i dalje veliki broj prepreka za uvođenje personalizovane terapije astme [190]. Najvažnije od njih uvek su ekonomske prirode – za ovakve vidove neophodno je postojanje elektronskih baza podataka, formiranje nacionalnih smernica za terapiju. Verovatno će u bliskoj budućnosti biti otkriven još veći broj gena identifikovanih kao faktori rizika za pojavu astme i/ili modulatori terapijskog odgovora. Već su pomenuti određeni metodološki faktori koji stoje na putu značajnijeg napretka - mali broj uzoraka u kliničkim ispitivanjima, fenotipska i genotipska heterogenost astme i teškoće u

određivanju funkcionalnih efekata do sada već potvrđenih genetskih polimorfizama[191]. Uprkos ovim izazovima, čini se da će se u vrlo bliskoj budućnosti definisati mnogo veći broj gena uključenih u sve kategorije – od faktora rizika, do determinacije terapijskog odgovora. Pomenućemo samo otkriće potencijalne uloge vitamina D [192] u modulaciji odgovora na ICS što može da bude izuzetno značajan nalaz ako bude potvrđen budućim kliničkim ispitivanjima. Iako predviđanje terapijskog odgovora na terapiju astme na osnovu genetskih testova i dalje izgleda kao daleka fikcija, kada se to jednom neminovno bude dogodilo, za našeg radnog veka, ili kasnije, od interesa će svakako najpre biti pacijenti sa teškim za lečenje oblicima astme. Dok su stari lekari, naši učitelji, govorili da se medicina 19. veka bavila spasavanjem života po svaku cenu, medicina 20. veka je donela posvećenost kvalitetu života, na medicini 21. veka je da pronade načine da sprovede individualizovani pristup terapiji prilagođen svakom pojedincu.

U zaključku, smernice za lečenje različitih bolesti predstavljaju samo grubi okvir, kraj, po kome se oblikuje model terapije nalik uniformi, dok je na svakom praktičaru izazov da svojim umećem od tog opšteg kroja stvori unikatnu kreaciju koja će našem pacijentu stajati “kao salivena”.

6. ZAKLJUČCI

- prisustvo 27Gln alela i 27Gln homozigotne varijante povećava rizik za razvoj astme kod odraslih osoba u Srbiji;
- genotip 16Arg/Gly-27Gln/Glu značajno je zastupljeniji u zdravoj kontroli kao zaštitni faktor u odnosu na pojavu astme;
- nosioci alela 27Gln mlađi od 50 godina imaju bolji terapijski odgovor na LABA+ICS od pacijenata sa alelom 27Glu istih godina;
- nezavisni prediktori pojave astme u našoj populaciji su: prisustvo Gln alela, muški pol i mlađi uzrast;
- kombinacija Arg16Gly je u populaciji pacijenata mlađih od 50 godina najpovoljnija sa stanovišta disajne funkcije u odnosu na homozigote Gly16Gly, koji imaju najlošiju funkciju;
- nije pokazan udruženi uticaj godina i polimorfizma Arg16Gly na disajnu funkciju u populaciji pacijenata starijih od 50 godina;
- pacijenti mlađi od 50 godina sa kombinacijom alela 16Gly-27Gln imaju značajno nižu vrednost za FEV1;
- promene vrednosti FEV1 i ACT od prve do treće posete statistički se značajno razlikuju u zavisnosti od prisustva/odsustva 27Gln alela i starosnih grupa pacijenata;
- polimorfizam 16Arg nije pokazao udruženi efekat sa starosnim grupama na promene FEV1 i ACT u tri uzastopne posete;

- utvrđeno je postojanje trenda da mlađi pacijenti bolje reaguju na lekove koji nisu iz grupe agonista ADRB2 receptora bez obzira na ispitani polimorfizam ADRB2 receptora;
- stariji pacijenti koji su nosioci 16Gly-27Glu alela pokazuju bolji odgovor na terapiju sa agonistima ADRB2 receptora, u odnosu na mlađe pacijente koji imaju istu kombinaciju alela;
- utvrđen je udruženi negativni uticaj 27Gln alela i starosti kod primene LABA na FEV1, i ACT;
- nije dokazan povezan uticaj 16Arg alela i starosti kod primene LABA niti na FEV1), niti na ACT;
- analiza uticaja kombinacije alela i starosti kod primene LABA, pokazala je značajan udruženi efekat na FEV1, dok je efekat na ACT bio na granici statističke značajnosti;
- potvrđena je visoko statistički značajna pozitivna korelacija spirometrijskih parametara ventilacije (FEV1, FEV1/FVC) i rezultata ACT skora ;
- prisustvo polimorfizama Arg16Gly i Gln27Glu ne pokazuje udruženi uticaj sa astmom na BMI

7. LITERATURA

1. Global strategy for asthma management and prevention. Global Initiative for Asthma (GINA) 2015.
2. Bleeker ER, Postma DS, Lawrance RM, et al. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet* 2007; 370: 2118-25.
3. Bleeker ER, Nelson HS, Kraft M, Corren J, Meyers DA, Yancey SW et al. B2-receptor polymorphisms in patients receiving salmeterol with or without fluticasone propionate. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:7, 676-687.
4. Wjst M. Beta2-adrenoreceptor polymorphisms and asthma. *Lancet* 2006; 368: 710-711.
5. Taylor R, Hall IP. ADRB2 polymorphisms and beta2 agonists. *Lancet* 2007; 370: 2075-76.
6. Liggett SB. Update on current concepts of the molecular basis of beta2-adrenergic receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110: S223-7.
7. Johnson M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:18-24.
8. Litonjua AA, Gong L, Duan QL, Shin J, Moore MJ, Weiss ST, et al. Very important pharmacogene summary ADRB2. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20:64-9.
9. IP Hall. Beta 2 adrenoceptor polymorphisms: are they clinically important? *Thorax.* 1996;51: 351-353.

10. Slager RE, Hawkins GA, Li X, et al. Genetics of asthma susceptibility and severity. *Clin Chest Med* 2012; 33(3): 431-443.
11. Bleecker ER, Meyers DA, Bailey WC, et al. ADRB2 polymorphisms and budesonide/formoterol responses in COPD. *Chest* 2012; 142 (2): 320-328.
12. Thomsen M, Nordestgaard BG, Sethi AA, et al. Beta 2-adrenergic receptor polymorphisms, asthma and COPD: two large population-based studies. *Eur Resp J* 2012; 39(3): 558-566.
13. Wachter B, Gilbert E. Beta-adrenergic receptors, from their discovery and characterization through their manipulation to beneficial clinical application. *Cardiol* 2012;122:104-112.
14. Maehle AH: 'Receptive substances': John Newport Langley (1852-1925) and his path to a receptor theory of drug action. *Med Hist* 2004;48:153-174.
15. Grzybowski A, Pietrzak K. Napoleon Cybulski (1854-1919). *J Neurol.* 2013; 260:2942-2943.
16. Swain HH, Geiling EM, Heingartner A. John Jacob ABEL at Michigan. The introduction of pharmacology into the medical curriculum. *Medical Bulletin* 1963; 29: 1-14.
17. Miller W. A brief history of adrenal research. Steroidogenesis - The soul of the adrenal. *Mol Cell Endocr* 2013; 371: 5-14.
18. Ehrlich P. A general review of the recent work in immunity. *Collected studies on immunity.* 1906; 577-586.
19. Ahlquist RP: A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948;153:586-600.
20. Barisione G, Baroffio M, Crimi E, Brusasco V. Beta-adrenergic agonists. *Pharmaceuticals* 2010; 3: 1016-1044.

21. Glover WE, Greenfield AD, Shanks RD. Effect of dichloroisoprenaline on the peripheral vascular responses to adrenaline in man. *Br J Pharmacol Chemother* 1962; 19: 235–244.
22. Quirke, V. Putting theory into practice: James Black, receptor theory and the development of the beta-blockers at ICI, 1958–1978". *Medical History* 2006; 50: 69–92.
23. von Euler US: Hormones of the sympathetic nervous system and the adrenal medulla. *Br Med J* 1951;1:105–108.
24. Limbird LE: The receptor concept: a continuing evolution. *Mol Interv* 2004;4:326–336.
25. Solomon Solis-Cohen. The use of adrenal substance in the treatment of asthma. *JAMA*. 1900;19:1164-1166.
26. Chen K, Schmidt C. Ephedrine and related substances. *Medicine (Baltimore)* 1930; 9: 1–117.
27. Cazzola M, Matera M. Emerging inhaled bronchodilators: an update. *Eur Respir J* 2009;34: 757–769.
28. Aundhia C, Raval A, Patel M, Shah N, Chauhan S, Sailor G et al. Spray drying in the pharmaceutical industry – a review. *IAJPR*, 2011; 1 (6): 125-138.
29. Lands A, Arnold A, McAuliff J, Luduena F, Brown T Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 1967; 214: 597–598.
30. Furchgott R. The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1967; 139: 553–570.
31. Vogelmeier CF, Bateman ED, Pallante J et al. Efficacy and safety of once-daily QVA149 compared with twice-daily salmeterol–fluticasone in

- patients with chronic obstructive pulmonary disease (ILLUMINATE): a randomised, double-blind, parallel group study. *The Lancet Respiratory Medicine* 2012; 1: 51–60.
32. Wedzicha JA, Decramer M, Ficker JH et al. Analysis of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations with the dual bronchodilator QVA149 compared with glycopyrronium and tiotropium (SPARK): a randomised, double-blind, parallel-group study. *Lancet Respir Med.* 2013; 1: 199–209.
33. Hanania NA, Feldman G, Zachgo W, Shim JJ, Crim C, Sanford L, et al. The efficacy and safety of the novel long-acting beta2 agonist vilanterol in patients with COPD: a randomized placebo-controlled trial. *Chest.* 2012; 142:119-27.
34. Barnes P. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol.* 1996; 42: 3–10.
35. Satchell D. Adenosine deaminase antagonizes inhibitory responses to adenosine and non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory nerve stimulation in isolated preparations of guinea-pig trachea *Br. J. Pharmac.* 1984; 83, 323-325.
36. Doidge J, Satchell D. Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways. *J Auton Nerv Syst.* 1982; 5, 83–99.
37. Barnes P. Neural control of human airways in health and disease. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134: 1289–1314.
38. Belvisi M. Overview of the innervation of the lung. *Curr Opin Pharmacol.* 2002; 2: 211–215.
39. Barnes P. Neural control of airway function: new perspectives. *Mol Aspects Med.* 1990; 11: 351–423.
40. Barnes P. Modulation of neurotransmission in airways. *Physiol Rev.* 1992; 72: 699–729.

41. Lees G. A hitch-hiker's guide to the galaxy of adrenoceptors. *Br J Med.* 1981; 283: 173-178.
42. Barnes P, Ind P, Brown J. Plasma histamine and catecholamines in stable asthmatic subjects. *Clin Sci.* 1982; 62: 661-665.
43. Barnes P. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1989; 83: 1013-1026.
44. Lewis M, Short A, Lewis K. Review: Autonomic nervous system control of the cardiovascular and respiratory systems in asthma. *Resp Med.* 2006; 100: 1688-1705.
45. Bricchetto L, Song P, Crimi E, Rehder K, Brusasco V. Modulation of cholinergic responsiveness through the β -adrenoceptor signal transmission pathway in bovine trachealis. *J Appl Physiol.* 2003; 95: 735-741.
46. Pelaia G, Renda T, Gallelli L, Vatrella A, Busceti M, Agati S et al. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. *Resp Med.* 2008; 102: 1173-1181.
47. Tattersfield A. Current issues with beta2 -adrenoceptor agonists. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2006; 31: 107-117.
48. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994; 46: 121-136.
49. Bond RA, Clarke DE. Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoceptor with distinct pharmacological properties from the alpha- and beta-subtypes. *Br J Pharmacol.* 1988; 95: 723-734.

50. Bylund DB. Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metabol.* 2007; 293 (6): 1479-1481.
51. Bylund DB. Adrenergic receptors: historical perspectives from the 20th century. In: *The Adrenergic Receptors in the 21st Century*, edited by Perez DM. Totowa: Humana, 2005, p. 3-21.
52. Berki T, Boldizsár F, Szabó M, Talabér G, Varcza Z. G-protein-linked receptors (epinephrine, serotonin, glucagon). In: Berki T, Boldizsár F, Bognár R, editors. *Signal Transduction (Medical Biotechnology)*. Pécsi Tudományegyetem. 2011: 62.
53. Bylund DB. Alpha-1 adrenoceptor subtypes: are more better?. *Br J Pharmacol.* 2005; 144: 159-160.
54. Martin D, Lluell P, Guillot E, Coste A, Jammes D, Angel I. Comparative alpha-1 adrenoceptor subtype selectivity and functional uroselectivity of alpha-1 adrenoceptor antagonists. *JPET*. 1997; 282(1): 228-235.
55. Chang DJ, Chang TK, Yamanishi SS, Salazar FH, Kosaka AH, Khare R et al. Molecular cloning, genomic characterization and expression of novel human alpha1A-adrenoceptor isoforms. *FEBS Lett.*, 1998; 422 (2): 279-283.
56. Bylund DB. Subtypes of alfa1- and alfa2- adrenergic receptors. *FASEB J.* 1992; 6: 832-839.
57. Anderson K, Faber J. Differential sensitivity of arteriolar a1-and a2-adrenoceptor constriction to metabolic inhibition during rat skeletal muscle contraction. *Circ Res.* 1991; 69: 174-184.
58. Lands A, Arnold A, McAuliff J, Luduena F, Brown T Jr. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 1967, 214, 597-598.],

59. Carstairs J, Nimmo A, Barnes PJ. Autoradiographic visualization of beta-adrenoceptor subtype in human lung. *Am Rev Respir Dis.* 1985; 132: 541-547.
60. Bossuyt J, Chang CW, Helmstadter K, et al. Spatiotemporally distinct protein kinase D activation in adult cardiomyocytes in response to phenylephrine and endothelin. *J Biol Chem.* 2011;286(38):33390-33400.
61. Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, et al. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2008; 454: 486-491.
62. Li G, Wang Y. Review. Protein kinase D: a new player among the signaling proteins that regulate functions in the nervous system. *Neurosci Bull.* 2014; 30(3): 497-504.
63. Zhao T, Sakata I, Li RL, Liang G, Richardson JA, Brown MS et al. Ghrelin secretion stimulated by {beta}1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36): 868-873.
64. Michel AD, Loury DN, Whiting RL. Differences between the alfa2 adrenoceptor in rat submaxillary gland and the alfa2A and alfa2B adrenoceptor subtypes. *Br J Pharmacol.* 1998; 98: 890-897.
65. Hegde A, Strachan RT, Walker JK. Quantification of Beta Adrenergic Receptor Subtypes in Beta-Arrestin Knockout Mouse Airways. *PLoS ONE* 2015; 10(2): e0116458
66. Johnson M. Molecular mechanisms of β 2-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunology.* 2008; 117(1): 18 - 24.
67. Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, et al. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature.* 1984; 309 (5964): 163-165.

68. Summers RJ. Atypical pharmacologies at beta-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.*2008; 155: 285-287.
69. Martin C, Advenier C. Beta3-adrenoceptors and airways. *Fundam Clin Pharm.* 1995; (9): 114-118.
70. Molenaar P, Sarsero D, Kaumann A. Proposal for the interaction of non-conventional partial agonists and catecholamines with the 'putative (β -adrenoceptor' in mammalian heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*1997; (24): 647-656.
71. Kaumann AJ, Preisner F, Sarsero D, Molenaar P, Revelli JP, Giacobino J. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta4-adrenoceptors in both wild-type and beta3-adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol.* 1998; 53: 670-675.
72. Kompa AR, Summers RJ. Desensitization and resensitization of beta1- and putative beta4-adrenoceptor mediated responses occur in parallel in a rat model of cardiac failure. *Br J Pharmacol.* 1999; 128: 1399-1406.
73. Konkar AA, Zhai Y, Granneman JG. Beta1-adrenergic receptors mediate beta3-adrenergic-independent effects of CGP 12177 in Brown Adipose Tissue. *Mol Pharmacol.* 2000; 57: 252-258.
74. Goldie R, Paterson J, Spina D, Wale J. Classification of beta2-adrenoceptors in human isolated bronchus. *Br J Pharmacol.* 1984; 81: 611-615.
75. Nials A, Coleman R, Johnson M, Magnussen H, Rabe K, Vardey C. Effects of beta-adrenoceptor agonists in human bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1993; 110: 1112-1116.
76. Löfdahl CG, Svedmyr N. Effects of xamoterol in asthmatic patients. *Br J Clin Pharmacol.*1984; 18: 597-601.

77. Shore s, Drazen J. Beta-agonists and asthma: too much of a good thing? *J Clin Invest.* 2003;112(4):495-497.
78. Sun HJ, Zhao MX1, Liu TY, Ren XS, Chen Q, Li YH. Salusin- β induces foam cell formation and monocyte adhesion in human vascular smooth muscle cells via miR155/NOX2/NF κ B pathway. *Sci Rep.* 2016; 6: 23596.
79. Ozier A, Allard B, Bara I, Girodet P, Trian T, Marthan R et al. The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology. *J Allergy.* 2011: Article ID 742710
80. Wu Q, Xing Y, Zhou X, Wang D. Meta-analysis of the efficacy and safety of bronchial thermoplasty in patients with moderate-to-severe persistent asthma. *J Inter Med Res* 2011; 39: 10 – 22.
81. Chen YL, Huang HY, Lee CC, Chiang BL. Small interfering RNA targeting nerve growth factor alleviates allergic airway hyperresponsiveness. *Mol Ther Nuc Ac.* 2014; (3): e158.
82. Robinson D. The role of the mast cell in asthma: Induction of airway hyperresponsiveness by interaction with smooth muscle? *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114: 58-65.
83. Kaur M, Holden N, Wilson, S, Sukkar M, Chung, Barnes P et al. Effect of beta2-adrenoceptor agonists and other cAMP-elevating agents on inflammatory gene expression in human ASM cells: a role for protein kinase A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295: 505–514.
84. Mundell S, Luty J, Willets J, Benovic J, Kelly E. Enhanced expression of G protein-coupled receptor kinase 2 selectively increases the sensitivity of A2A adenosine receptors to agonist-induced desensitization, *Br J Pharmac.* 1998; 125 (2): 347–356.

85. Billington C, Penn R. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res* 2003, 4:2 (Available online <http://respiratory-research.com/content/4/1/2>)
86. Brusasco V, Crimi E, Baroffio M. Allergic airway inflammation and beta-adrenoceptor dysfunction. *Cell Biochem Biophys*. 2006; 44: 129-138.
87. Trian T, Ge Q, Moir L, Burgess J, Kuo C, King N et al. Rhinovirus-induced exacerbations of asthma - how is the beta2-adrenoceptor implicated? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; 43: 227-233 .
88. Laporte J, Moore P, Panettieri R, Moeller W, Heyder J, Shore S. Prostanoids mediate IL-1 β -induced β -adrenergic hyporesponsiveness in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998; 275: 491-501.
89. Zastrow M. Regulation of G protein coupled receptors by phosphorylation and endocytosis. In: Davis K, Charney D, Coyle J, Nemeroff C, editors: *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. American College of Neuropsychopharmacology. 2002: 59-70.
90. Benovic J, Bouvier M, Caron M, Lefkowitz R. Regulation of adenylyl cyclase-coupled 1-adrenergic receptors. *Ann Rev Cell Biol*. 1988; 4: 405-428.
91. Hadcock JR, Wang HY, Malbon CC. Agonist-induced destabilization of beta-adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of beta-adrenergic receptors. *J Biol Chem*. 1989; 264: 19928-19933.
92. Grunsven P, Schayck C, Molema J, Akkermans R, Weelavan C, Schayck C et al. Effect of inhaled corticosteroids on bronchial responsiveness in patients with "corticosteroid naive" mild asthma: a meta-analysis. *Thorax* 1999; 54 : 316-322.

93. Jokic R, Swystun V, Davis B, Cockcroft D. Regular inhaled salbutamol effect on airway responsiveness to methacholine and adenosine 5-monophosphate and tolerance to bronchoprotection. *Chest* 2001; 119:370–375.
94. Cheung D, Timmers M, Zwinderman A, Bel E, Dijkman J, Sterk P. Long-term effects of a long-acting beta2-adrenoceptor agonist, salmeterol, on airway hyperresponsiveness in patients with mild asthma. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1198–1203.
95. McGraw D, Almoosa K, Paul R, Kobilka B, Liggett S. Antithetic regulation by β -adrenergic receptors of Gq receptor signaling via phospholipase C underlies the airway β -agonist paradox. *J Clin Invest.* 2003; 112: 619–626.
96. Barnes P. Scientific rationale for using a single inhaler for asthma control. *Eur Respir J.* 2007; 29: 587–595.
97. Callaerts-Vegh Z, Evans K, Dudekula N, Cuba D, Knoll B, Callaerts P et al. Effects of acute and chronic administration of beta-adrenoceptor ligands on airway function in a murine model of asthma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 4948–4953.
98. Nguyen L, Omoluabi O, Parra S, Frieske J, Clement C, Ammar-Aouchiche Z et al. Chronic exposure to beta-blockers attenuates inflammation and mucin content in a murine asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 38: 256–262.
99. Hanania N, Singh S, El-Wali R, Flashner M, Franklin A, Garner W et al. The safety and effects of the beta-blocker, nadolol, in mild asthma: an open-label pilot study. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008; 21: 134–141.
100. Lipworth B, Williamson P. Beta blockers for asthma: a double-edged sword. *Lancet* 2009; 373: 104–105.

101. Hanania N, Dickey B, Bond R. Clinical implications of the intrinsic efficacy of beta-adrenoceptor drugs in asthma: full, partial and inverse agonism. *Curr Opin Pulm Med.* 2010; 16: 1-5.
102. Davies A, Lefkowitz R. In vitro desensitization of beta-adrenergic receptors in human neutrophils- attenuation by corticosteroids. *J Clin Invest.* 1983; 71: 565-571.
103. Bricchetto L, Milanese M, Song P, Patrone M, Crimi E, Rehder K et al. Beclomethasone rapidly ablates allergen-induced beta2-adrenoceptor pathway dysfunction in human isolated bronchi. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 284: 133-139.
104. Liggett S. Genetics of beta2-adrenergic receptor variants in asthma. *Clin Exp Allergy* 1995; (2): 89-94.
105. Kazani S, Wechsler M, Israel E. The role of pharmacogenomics in improving the management of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125: 295-302.
106. Israel E, Drazen J, Liggett S, Boushey H, Cherniack R, Chinchilli V et al. The effect of polymorphisms of the beta(2)-adrenergic receptor on the response to regular use of albuterol in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162: 75-80.
107. Piazza B, Craig T. Lessons learned from the asthma clinical research network. *J Am Osteopath Assoc* 2011; (111):18-26.
108. Salpeter SR, Buckley NS, Ormiston TM, Salpeter EE. Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Ann Intern Med.* 2006;144:904-12.
- 109.

- Donohue JF. Therapeutic responses in asthma and COPD bronchodilators. *Chest*. 2004;126:125S-37S.
110. Pereira S, Gava I, Giro C, Mesquita E. Adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: what can genetics explain? *Arq Bras Cardiol*. 2010; 6(94): 789-797.
111. Small K, McGraw D, Liggett S. Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43: 381-411.
112. Leineweber K, Büscher R, Bruck H, Brodde OE. Beta-adrenoceptor polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004; 369 (1): 1-22.
113. C. Hesse, Eisenach J. Genetic variation in the β 2-adrenergic receptor: Impact on intermediate cardiovascular phenotypes. *Curr Pharmacogenomics Person Med*. 2008 ; 6(3): 160-170.
114. Taylor D, Drazen J, Herbison G, Yandava C, Hancox R, Town G. Asthma exacerbations during long term beta-agonist use: influence of beta2-adrenoceptor polymorphism. *Thorax* 2000; 55: 762-767.
115. Basu K, Palmer C, Tavendale R, Lipworth B, Mukhopadhyay S. Beta2-receptor genotype predisposes to exacerbations in steroid-treated asthmatic patients taking frequent albuterol or salmeterol. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 124: 1188-1194.
116. Wechsler M, Kunselman S, Chinchilli V, Bleecker E, Boushey H, Calhoun W et al. Effect of beta2-adrenergic receptor polymorphism on response to long-acting beta2-agonist in asthma (LARGE trial): A genotype-stratified, randomised, placebo-controlled, crossover trial. *Lancet* 2009; 374: 1754-1764.

117. Wang W, Mihlbachler K, Bleecker E, Weiss S, Liggett S. A polymorphism of G-protein coupled receptor kinase 5 alters agonist-promoted desensitization of beta2-adrenergic receptors. *Pharmacogenet. Genomics*. 2008; 18: 729–732.
118. Johnson M. Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(1):18-24.
119. Litonjua A, Lasky-Su, J, Schneiter K, Tantisira K, Lazarus R, Klanderman B et al. ARG1 is a novel bronchodilator response gene: screening and replication in four asthma cohorts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: 688–694.
120. Wu P, Larkin E, Reiss S, Carroll K, Summar M, Minton P et al. β 2-Adrenergic receptor promoter haplotype influences the severity of acute viral respiratory tract infection during infancy: a prospective cohort study. *BMC Med Gen* 2015; 16: article 82
121. Claudio-Campos K, Orengo-Mercado K, Renta J, Peguero M, García R, Hernández G et al. Pharmacogenetics of healthy volunteers in Puerto Rico. *Drug Metabol Personal Ther*. 2015; 30(4): 239–249.
122. Limsuwan T, Thakkinstian A, Verasertniyom O, Vanichapuntu M, Attia J, Janwityanujit S et al. Possible protective effects of the Glu27 allele of β 2-Adrenergic receptor polymorphism in Thai asthmatic patients. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2010;28:107-14.
123. Salama M, Ashaa N, Hamad A. Genetic association between common beta-2 adrenoreceptor polymorphism and asthma severity in school-age children. *Egypt J Med Hum Genet*. 2011; 12: 151–156.

124. Martinez F. Trends in asthma prevalence, admission rates, and asthma deaths. *Respir Care*. 2008;53(5):561-5.
125. Al-Rubaish A. Association of beta2-adrenergic receptor gene polymorphisms and nocturnal asthma in Saudi patients. *Ann Thorac Med* 2011; 6(2): 66-69.
126. Turki J, Pak J, Green S, Martin R, Liggett S. Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *J Clin Invest*. 1995; 95(4): 1635-1641.
127. Ober C, Yao TC. The genetics of asthma and allergic disease: A 21st century perspective. *Immunol Rev* 2011; 242(1):10-30.
128. Karam RA, Sabbah NA, Zidan HE, Rahman HM. Association between genetic polymorphism of beta2 adrenergic receptors and nocturnal asthma in Egyptian children. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2013;23:262-6.
129. Ginsberg D. An unidentified monster in the bed - assessing nocturnal asthma in children. *McGill J Med*. 2009;12(1):31-38.
130. Turner SW, Khoo SK, Laing IA, Palmer LJ, Gibson NA, Rye P et al. Beta2 adrenoceptor Arg16Gly polymorphism, airway responsiveness, lung function and asthma in infants and children. *Clin Exp Allergy*. 2004 Jul;34(7):1043-1048.
131. Contopoulos-Ioannidis DG, Manoli EN, Ioannidis JP. Meta-analysis of the association of beta2-adrenergic receptor polymorphisms with asthma phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:963-72.
132. Thakkestian A, McEvoy M, Minelli C, Gibson P, Hancox B, Duffy D, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between

- {beta}2-adrenoceptor polymorphisms and asthma: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2005;162:201-11.
133. Zivkovic Z, Vukasinovic Z, Cerovic S, Radulovic S, Zivanovic S, Panic E et al. Prevalence of childhood asthma and allergies in Serbia and Montenegro. *World J Pediatr.* 2010;6:331-6.
134. Pesut D, Bulajic M, Nagorni-Obradovic Lj, Grgurevic A, Gledovic Z, Ponomarev D et al. Asthma mortality in Serbia : a 30-year analysis. *Resp Med* 2011;105(51):550-553.
135. Lian S, Chen X, Deng J, Wei X, Gong C, Chen Z et al. Beta-2 adrenergic receptor (adrb2) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies. *PLoS One.* 2014; 9(8): e104488.
136. Xie H, Cheng Y, Huo Y, Huang G, Su J. Association between β 2-adrenoceptor gene polymorphisms and asthma risk: an updated meta-analysis. *PLoS ONE.*2014; 9(7): e101861.
137. Lipworth B, Basu K, Donald H, Tavendale R. Tailored second-line therapy in asthmatic children with the Arg16 genotype. *Clin Sci.* 2013; 124: 521-528.
138. Green S, Cole G, Jacinto M, Innis M, Liggett S. Polymorphism of the human fls-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem.*1993; 31: 116-121.
139. D'amato M, Ricci Vitiani L, Petrelli G, Ferrigno L, Di Pietro A, Trezza R et al. Association of persistent bronchial hyperresponsiveness with b2-adrenoceptor (adrb2) haplotypes. A population study. *Am J Resp Crit Care Med.* 1998; 158(6): 1968-1973.

140. Johnson M. The β -Adrenoceptor. *Am J Resp Crit Care Med.* 1998; 158(2): S146-S153.
141. Parola AL, Kobilka BK. The peptide product of a 5' leader cistron in the beta 2 adrenergic receptor mRNA inhibits receptor synthesis. *J Biol Chem* 1994;269: 4497-4505.
142. Woszczek G, Borowiec M, Ptasinska A, Kosinski S, Pawliczak R, Kowalski ML. Beta2-ADR haplotypes/polymorphisms associate with bronchodilator response and total IgE in grass allergy. *Allergy.* 2005;60(11):1412-17.
143. Schatz M, Sorkness CA, Li JT et al. Asthma Control Test: Reliability, validity, and responsiveness in patients not previously followed by asthma specialists. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117(3):549-56.
144. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2012.
145. Jia C, Zhang H, Lv Y, Liang R, Jiang Y, Powell H. The asthma control test and asthma control questionnaire for assessing asthma control: Systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;131:695-703.
146. Alzahrani, Y, Becker, E. Asthma control assessment tools. *Respiratory Care.* 2016;61:106-11. *Abstract*
147. Gauderman W, Morrison J. Quanto 1.2: a computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies. 2007. Available at <http://hydra.Usc.Edu/gxe>. Accessed 26 June 2014
148. Kelly HW. Comparison of inhaled corticosteroids: an update. *Ann Pharmacother* 2009;43:519-27.
149. Augusto A. Litonjua, MD, MPH,* Vincent J. Carey, PhD, Scott T. Weiss, MD, MS, and Diane R. Gold, MD, MPH Race, Socioeconomic Factors,

- and Area of Residence Are Associated With Asthma Prevalence *Pediatric Pulmonology* 1999;28:394-401.
150. Stefano Guerra, MD, MPH; Duane L. Sherrill, PhD; Arnel Bobadilla, MD; Fernando D. Martinez, MD; and Robert A. Barbee, MD, FCCP The Relation of Body Mass Index to Asthma, Chronic Bronchitis, and Emphysema* *CHEST / 122/4/ OCTOBER, 2002*1256-1263.
151. Danielewicz H. *Pediatr.* What the genetic background of individuals with asthma and obesity can reveal: is β 2-adrenergic receptor gene polymorphism important? *Allergy Immunol Pulmonol.* 2014; 27(3): 104-110.
152. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, Crapo R, Burgos F, Casaburi R et al. Interpretative strategies for lung function tests. *Eur Respir J* 2005; 26: 948-968.
153. P.M. O'Byrne. How much is too much? The treatment of mild asthma. *Eur Respir J* 2007; 30: 403-406.
154. Birbian N, Singh J, Jindal SK, Singla N: Association of β (2)-adrenergic receptor polymorphisms with asthma in a North Indian population. *Lung.* 2012, 190 (5): 497-504.
155. Zheng BQ, Wang GL, Yang S, Lu YQ, Liu RJ, Li Y: Study of genetic susceptibility in 198 children with asthma. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2012, 14 (11): 811-814.
156. Karam RA, Sabbah NA, Zidan HE, Rahman HM: Association between genetic polymorphisms of beta2 adrenergic receptors and nocturnal asthma in Egyptian children. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013, 23 (4): 262-266.

157. Weir TD, Mallek N, Sandford AJ, Bai TR, Awadh N, Fitzgerald JM, Cockcroft D, James A, Liggett SB, Paré PD: Beta 2-adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, 158 (3): 787-791. 10.1164
158. Xie HG, Stein CM, Kim RB, Xiao ZS, He N, Zhou HH, Gainer JV, Brown NJ, Haines JL, Wood AJ: Frequency of functionally important beta-2 adrenoceptor polymorphisms varies markedly among African-American, Caucasian and Chinese individuals. *Pharmacogenetics.* 1999, 9 (4): 511-516.
159. Moore PE, Laporte JD, Abraham JH, Schwartzman IN, Yandava CN, Silverman ES, Drazen JM, Wand MP, Panettieri RA, Shore SA: Polymorphism of the beta(2)-adrenergic receptor gene and desensitization in human airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 162 (6): 2117-2124.
160. Petrovic-Stanojevic N, Topic A, Nikolic A, Stankovic M, Dopudja-Pantic V, Milenkovic B, Radojkovic D. Polymorphisms of beta2-adrenergic receptor gene in Serbian asthmatic adults: effects on response to beta-agonists, *Mol Diag Ther* 2014; 18 (6): 639-646.
161. De Paiva AC, Marson FA, Ribeiro JD, Bertuzzo CS. Asthma: Gln27Glu and Arg16Gly polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor gene as risk factors. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2014;10:8.
162. Cagliani R, Fumagalli M, Pozzoli U, Riva S, Comi GP, Torri F, et al. Diverse evolutionary histories for beta-adrenoreceptor genes in humans. *Am J Hum Genet.* 2009;85:64-75.
163. Vijverberg S, Raaijmakers J, Maitland-van der Zee A. ADRB2 Arg16 and the need for collaboration in childhood asthma pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.* 2013;14(16): 1937-39.

164. Santillan AA, Camargo CA, Ramirez-Rivera A, Delgado-Enciso I, Rojas-Martinez A, Cantu-Diaz F, et al. Association between beta2-adrenoceptor polymorphisms and asthma diagnosis among Mexican adults. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;112:1095-100.
165. Hall IP, Wheatley A, Wilding P, Liggett SB. Association of Glu 27 beta 2-adrenoceptor polymorphism with lower airway reactivity in asthmatic subjects. *Lancet* 1995;345:1213-14.
166. Green SA, Turki J, Innis M, Liggett SB. Amino-terminal polymorphisms of the human beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry.* 1994;33:9414-19.
167. Binaei S, Rashed SM, Christensen ML. b2-Adrenoreceptor polymorphisms in asthmatic patients. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2003;8:22-28.
168. Al-Rubaish AM. Association of beta(2)-adrenergic receptor gene polymorphisms and nocturnal asthma in Saudi patients. *Ann Thorac Med* 2011;6:66-69.
169. Green SA, Turki J, Bejarano P, Hall IP, Liggett SB. Influence of beta 2-adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:25-33.
170. Green SA, Cole G, Jacinto M, Innis M, Liggett SB. A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *J Biol Chem* 1993;268:23116-21.
171. Santulli G, Iaccarino G. Pinpointing beta adrenergic receptor in ageing pathophysiology: victim or executioner? Evidence from crime scenes. *Immun Ageing.* 2013;10:10.

172. Connolly MJ, Crowley JJ, Charan NB, Nielson CP, Vestal RE. Impaired bronchodilator response to albuterol in healthy elderly men and women. *Chest*. 1995;108:401-406.
173. Ullah MI, Newman GB, Saunders KB. Influence of age on response to ipratropium and salbutamol in asthma. *Thorax* 1981;36:523-29.
174. Weir T, Mallek N, Sandford A, Bai T, Awadh N, Fitzgerald J et al. B2-adrenergic receptor haplotypes in mild, moderate and fatal/near fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:3, 787-791.
175. Joos L, Weir TD, Connett JE, Anthonisen NR, Woods R, Pare' PD, et al. Polymorphisms in the beta2 adrenergic receptor and bronchodilator response, bronchial hyperresponsiveness, and rate of decline in lung function in smokers. *Thorax*. 2003;58:703-7.
176. Petrovic-Stanojevic N, Topic A, Nikolic A, Stankovic M, Dopudja-Pantic V, Milenkovic B, Radojkovic D. Age-dependent influence of ADRB2 gene polymorphisms on asthma severity in Serbian population. *Eur Respir J* 2014; 44(58): P 3834 (*abstract*)
177. James A, Palmer L, Kicic E, Maxwell P, Lagan S, Ryanet G et al. Decline in lung function in the busselton health study - the effects of asthma and cigarette smoking. *Am Jour Resp Crit Care Med*. 2005; 171(2): 109-114.
178. Townsend E, Miller V, Prakash Y. Sex Differences and Sex Steroids in Lung Health and Disease *Endocr Rev*. 2012; 33(1): 1-47.
179. Moore PE, Laporte JD, Abraham JH, Schwartzman IN, Yandava CN, Silverman ES, et al. Polymorphism of the beta(2)-adrenergic receptor gene and desensitization in human airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2117-24.

180. Dunn R, Lehman E, Chinchilli V, Martin R, Boushey H, Israel E, et al. Impact of age and sex on response to asthma therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(5): 551-558.
181. Perret J, Dharmage S, Matheson M, Johns D, Gurrin L, Burgess J et al. The interplay between the effects of lifetime asthma, smoking, and atopy on fixed airflow obstruction in middle age. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187:37-48.
182. Blake K, Lima, J . Pharmacogenomics of long-acting beta(2)-agonists. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015; 11(11):1733-51.
183. Lima J. Do genetic polymorphisms alter patient response to inhaled bronchodilators? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10(9):1231-40.
184. Ortega V, Meyers D, Bleecker E. Asthma pharmacogenetics and the development of genetic profiles for personalized medicine *Pharmacogenomics Pers Med.* 2015; 8: 9–22
185. Stacey M. Miller & Victor E. Ortega Pharmacogenetics and the Development of Personalized Approaches for Combination Therapy in Asthma *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013; 13:443–452.
186. Ortega V, Hawkins G, Moore W, Hastie A, Ampleford E, Busse W et al. Effect of rare variants in ADRB2 on risk of severe exacerbations and symptom control during longacting β agonist treatment in a multiethnic asthma population: a genetic study. *Lancet Respir Med.* 2014;2(3):204-13.
187. Hall I. Should we use ADRB2 variation to stratify asthma treatment? *Lancet Respir Med.* 2014;2(3):169-71.
188. Ortega V, Hawkins G, Moore W, Hastie A, Ampleford E, Busse W et al. The greatest challenge in performing GWASs in admixed Predictive

- Genetic Profiles for b-Agonist Therapy in Asthma. A Future under Construction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015 ;191(5):494-6.
189. Lipworth B. Adrenoceptor genotype and bronchoprotective Subensitivity with long-acting b-agonists in asthma. *Am J Respir Crit Care* 2013;188(12):1386-87.
190. Ortega V, Meyers D. Pharmacogenetics: Implications of race and ethnicity on defining genetic profiles for personalized medicine. *J Allergy Clin Immunol.* 2014;133(1): 16–26.
191. Weiss S. New approaches to personalized medicine for asthma: Where are we? *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129(2): 327–334.

SKRAĆENICE

AC - adenil ciklaza

ACh - acetilholin

ACT - Asthma Control Test – Test o kontroli astme

ADRB1 - beta-1 adrenergički receptor

ADRB2 - beta-2 adrenergički receptor

ADRB3 - beta-3 adrenergički receptor

ANCOVA - analiza kovarijanse

ANOVA - analiza varijanse

Arg - arginin

ARR - restin beta adrenergičkog receptora

ATP - adenzin trifosfat

BDP-HFA - beklometazon dipropionat

BKCA - Ca²⁺-aktivirani K⁺ kanali

BMI - body mass index – indeks telesne mase

bp - bazni par

BUD - budesonid

cAMP- ciklični 3',5'-adenozin monofosfat

CI - interval poverenja

CIC - ciklesonid

CNS - centralni nervni sistem

COX2 - inhibitor ciklooksigenaze 2

CPI - inhibitor miozin-lakog-lanca- fosfataze (MLCP)

DAG - diacilglicerol

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

ERK- ekstraćelijske signal-regulišuće kinaze

FEV1 - forsirani ekspirijumski volumen u 1 sekundi

FP - flutikazon propionat

FVC - forsirani vitalni kapacitet

Gi - inhibitorna subjedinica G-proteina
GINA - Globalna inicijativa za astmu
Gln - glutamin
Glu - glutaminska kiselina
Gly - glicin
Gq - subjedinica G-proteina, aktivator fosfolipaze C
GRK - G protein receptor kinaza
GRK5-Leu41
Gs - stimulatorna subjedinica G-proteina
HOBP - hronična opstruktivna bolest pluća
HWE - Hardy Weinberg equilibrium - Hardy Weinberg-ov ravnoteža
ICS - inhalacijski kortikosteroidi
Ile - izoleucin
IP3R - inozitol 1,4,5-trifosfatni receptor
KBC - Kliničko - bolnički centar
KOMT - katehol-O-metiltransferaza
LABA+ICS - dugodelujući beta2-agonisti u fiksnoj kombinaciji sa ICS
LSD metoda - least significant difference metoda
LT- leukotrien
LT-R - receptor leukotriena
MAO - monoaminoooksidaza
MDI - metted-dose-inhalatori
MLCP- miozin-laki-lanac- fosfataza
NAEPP - Nacionalni program za obrazovanje i prevenciju astme
OR- odds ratio
PCR - polymerase chain reaction - polimeraza lančana reakcija
PIP2 - fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat
PKA - protein kinaza A
PKA - protein kinaza A
PKC - protein kinaza C

RNK - ribonukleinska kiselina

SABA - kratkodelujući beta2-agonisti

SNP - single-nucleid polymorphism - tačkasti polimorfizam

SR - sarkoplazmatični retikulum

Thr - treonin

UTR - untranslated region neprevedeni region gena

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Nataša Petrović-Stanojević rođena je 29.05.1966. godine u Beogradu. Osnovnu školu i V beogradsku gimnaziju završila je u Beogradu sa odličnim uspehom i kao nosilac diploma „Vuk Karadžić“ i „Mihajlo Petrović-Alas“ za oblasti matematike i biologije.

Medicinski fakultet u Beogradu upisala je školske 1984/1985. godine, a diplomirala je 1990. godine sa srednjom ocenom 9,03. Nakon obaveznog lekarskog staža, stručni ispit za doktore medicine polaže 1991. godine. Od 1992. godine zaposlena je na Kliničkom odeljenju pulmologije i alergologije sa imunologijom KBC „Zvezdara“, Beograd, trenutno na radnom mestu Šef odeljenja - stacionar. Zvanje magistra medicinskih nauka stekla je 1996. god. Specijalistički ispit iz Interne medicine položila je sa odličnom ocenom 1997. god. Aktivno učestvuje od 1997.godine u vođenju praktične nastave, a od 2002.god je zaposlena na Stomatološkom fakultetu kao asistent na predmetu Interna medicina.

Kandidat se bavi istraživanjima iz oblasti respiratorne patologije i posebno genetskim osnovama pojedinih respiratornih oboljenja. Objavila je do sada preko 80 stručnih i naučnih radova, od toga 13 radova in extenso u međunarodnim časopisima na SCI listi, koautor je u dve knjige - 18 poglavlja udžbenika iz Interne medicine za studente stomatologije. Kao organizator i predavač po pozivu učestvovala je na više kurseva kontinuirane medicinske edukacije. Saradnik je na projektu No 173008 "Kompleksne bolesti kao model sistem za proučavanje modulacije fenotipa-strukturna i funkcionalna analiza molekularnih biomarkera" 2011-2016. god koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnologiju RS. Do sada je učestvovala u 14 kliničkih istraživanja, od kojih u 7 u svojstvu glavnog istraživača.

Član je Evropskog respiratornog društva, ACRP - Udruženja profesionalaca u oblasti kliničkih istraživanja, Srpskog lekarskog društva, kao i Udruženja pulmologa Srbije.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Mr sci med Dr Nataša Petrović - Stanojević

Broj indeksa

Studijski program

Naslov rada ISPITIVANJE UČESTALOSTI POLIMORFIZAMA BETA-2
ADRENERGIČNIH RECEPTORA I POVEZANOSTI SA TERAPIJSKIM
ODGOVOROM KOD OSOBA SA BRONHIJALNOM ASTMOM

Mentor Prof Dr Branislava Milenković

Potpisani/a

Mr sci med Dr Nataša Petrović-Stanojević

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 23 May 2016



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

ISPITIVANJE UČESTALOSTI POLIMORFIZAMA BETA-2 ADRENERGIČNIH RECEPTORA I POVEZANOSTI SA TERAPIJSKIM ODGOVOROM KOD OSOBA SA BRONHIJALNOM ASTMOM

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu,

23 May 2018

