



UNIWERSYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

**Rola receptora smaku gorzkiego TAS2R38 w przewlekłym
zapaleniu zatok przynosowych z polipami nosa**

Lek. Joanna Jeruzal-Świątecka

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Wioletta Pietruszewska

Klinika Otolaryngologii, Onkologii Głowy I Szyi

I Katedra Otolaryngologii

Kierownik Katedry i Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Wioletta Pietruszewska

Łódź, 2023

7. STRESZCZENIE

Wstęp: Przewlekłe zapalenie zatok z polipami nosa jest jednostką chorobową o nadal niedostatecznie poznanej etiologii i patogenezie. Jako jedną z przyczyn podkreśla się zaburzenia odporności. Receptorom smaku gorzkiego (T2Rs), a zwłaszcza *TAS2R38* przypisywany jest wpływ na regulację odporności, szczególnie w układzie oddechowym. Ekspresja genu *TAS2R38* i jego warianty polimorficzne mogą przyczyniać się do indywidualnych różnic w podatności na zakażenia układu oddechowego, a w szczególności na przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (PZZP).

Cele: Próba identyfikacji wariantów polimorficznych genu *TAS2R38* w badanej grupie pacjentów z przewlekłym zapaleniem zatok z polipami nosa (PZZPzP) oraz w grupie kontrolnej zdrowych ochotników; określenie związku między rozkładem wariantów polimorficznych genu *TAS2R38* a występowaniem PZZPzP; ocena związku między rozkładem wariantów polimorficznych genu *TAS2R38* a zaawansowaniem choroby u pacjentów z PZZPzP; zbadanie ekspresji receptora *TAS2R38* u pacjentów z PZZPzP oraz w grupie kontrolnej z analizą jej związku z występowaniem PZZPzP; ocena zależności między ekspresją receptora *TAS2R38* a zaawansowaniem przewlekłego zapalenia zatok z polipami nosa

Material i metody: Badania prowadzono w dwóch etapach. W pierwszym etapie badano ekspresję receptora *TAS2R38*. Grupę badaną stanowiło 107 pacjentów z PZZPzP u których wykonywano zabieg funkcjonalnej endoskopowej operacji zatok (FESS) (M=63/K=44) w średnim wieku 46,27 lat, a grupę kontrolną 39 osób poddanych operacji septoplastyki i/lub plastyki małżowin nosowych (M=25/K=14) w średnim wieku 37,9 lat. W drugim etapie badano polimorfizmy genu *TAS2R38*. Grupę badaną stanowiło 106 chorych na PZZPzP (M=62/K=44) w średnim wieku 46,82 lata, a grupę kontrolną 438 ochotników

(M=159/K=277) w średnim wieku 46,33 lata. Dane pacjentów, takie jak: wiek, wzrost, waga, wiek pacjenta w momencie wystąpienia pierwszych objawów, nasilenie objawów klinicznych według wizualnej skali analogowej (VAS) i Sino-Nasal Outcome Test-22 (SNOT-22), dodatkowe informacje na temat astmy oskrzelowej, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) oraz alergii uzyskano za pomocą kwestionariusza. Stopień zaawansowania choroby w badaniu endoskopowym nosa i tomografii komputerowej (TK) zatok przynosowych analizowano według skali Lund-Mackay i Lund-Kennedy. W celu zbadania ekspresji receptora TAS2R38 pobierano tkankę błony śluzowej małżowiny nosowej dolnej (MND) oraz fragment usuniętych podczas zabiegu polipów nosa (PN). W celu wykonania badania polimorfizmów genu *TAS2R38* pobierano próbki krwi w ilości 2,7 ml na EDTA. Izolację DNA przeprowadzono w Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Genotypowano allele genu *TAS2R38* przy użyciu sond do genotypowania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) przy użyciu metody reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) dla rs713598, rs1726866 i rs10246939. Całkowity RNA izolowano z próbek błony śluzowej nosa, a ekspresję receptora mierzono za pomocą testów ekspresji genów TaqMan™ dla genu *TAS2R38* z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR).

Wyniki: Haplotypy PAV i AVI były jedynymi wykrytymi w badaniu. Haplotyp AVI znacznie częściej występował u pacjentów z PZZPzP w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,0204$; $OR=1,42$, $Fi=0,07$). U homozygot PAV/PAV stwierdzono mniejsze zmiany zapalne w TK zatok przynosowych ($p=0,0158$) w porównaniu z pacjentami o diplotypach PAV/AVI i AVI/AVI. Ekspresję receptora TAS2R38 wykazano w 43 (50,00%) próbkach MND w grupie badanej, w 28 (71,79%) w grupie kontrolnej ($p=0,037$) oraz w 43 (46,24%) próbkach PN. Nie stwierdzono różnic w poziomach ekspresji we wszystkich analizowanych tkankach. Pacjenci, którzy ocenili swoje objawy na 0-3 w skali VAS wykazali wyższą

ekspresję TAS2R38 w tkance MND w porównaniu do pacjentów z 8-10 punktami ($p=0,020$). U pacjentów z niższą punktacją w skali Lund-Mackay wskazującej na mniejsze zaawansowanie zmian w tomografii komputerowej ($p=0,068$; $R= -0,28$) wykazano bliską istotności statystycznej ujemną korelację z ekspresją TAS2R38 w MND. Pacjenci ze współistniejącą astmą oskrzelową mieli istotnie wyższą ekspresję receptora w tkance PN ($p=0,012$).

Wnioski: Potwierdzono występowanie wariantów polimorficznych genu *TAS2R38* u pacjentów z PZZPzP oraz w grupie kontrolnej w populacji polskiej. Wykryto trzy najczęściej występujące diplotypy tego genu: PAV/PAV, AVI/AVI, PAV/AVI. Haplotyp AVI występował istotnie częściej w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej co wskazuje, że jego nosicielstwo może predysponować do rozwoju przewlekłego zapalenia zatok z polipami nosa. Diplotyp PAV/PAV stwierdzono u osób z mniejszym zaawansowaniem rozrostu polipowatego nosa i zatok przynosowych co może wskazywać na jego charakter ochronny. Ekspresja receptora smaku gorzkiego TAS2R38 była znamienne częściej wykrywana u osób z grupy kontrolnej w porównaniu do pacjentów z PZZPzP. Nie obserwowano różnic w poziomie ekspresji w poszczególnych tkankach w przypadku jej stwierdzenia. Badania określające czy obecność ekspresji receptora TAS2R38 może być czynnikiem predykcyjnym zachorowania na PZZPzP wymagają więc rozszerzenia i kontynuacji. Istotnie wyższą ekspresję receptora smaku gorzkiego TAS2R38 w błonie śluzowej nosa i zatok przynosowych stwierdzono u pacjentów z łagodniejszymi objawami oraz mniejszym nasileniem zmian polipowatych co może wskazywać na protekcyjne właściwości tego receptora.

8. ABSTRACT

Introduction: Chronic rhinosinusitis with nasal polyps is a disease with still insufficiently understood etiology and pathogenesis. Immune disorders are highlighted as one of the probable etiological factors. The role of bitter taste receptors (T2Rs), especially TAS2R38, in immune regulation has been underlined, particularly in the respiratory system. Expression of the *TAS2R38* gene and its polymorphic variants may contribute to individual differences in susceptibility to respiratory infections and development of chronic rhinosinusitis (CRS).

Objectives: The attempt to identify polymorphic variants of the *TAS2R38* gene in a study group of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) and control group of healthy volunteers; determination of the association between the distribution of polymorphic variants of the *TAS2R38* gene and the incidence of CRSwNP; evaluation of the relationship between the distribution of polymorphic variants of the *TAS2R38* gene and the severity of the disease in CRSwNP patients; examination of the expression of the TAS2R38 receptor in patients with CRSwNP and in control group with analysis of its association with the incidence of this disease; analysis of the relationship between the expression of the TAS2R38 receptor and the severity of CRSwNP.

Material and methods: The study was conducted in two stages. In the first stage, the expression of TAS2R38 receptor was studied. The study group consisted of 107 CRSwNP patients who underwent functional endoscopic sinus surgery (FESS) (M=63/F=44) with a mean age of 46.27 years, and the control group consisted of 39 patients undergoing septoplasty and/or conchoplasty (M=25/F=14) with a mean age of 37.9 years. In the second stage, polymorphisms of the *TAS2R38* gene were studied. The study group consisted of 106 CRSwNP patients (M=62/F=44) with a mean age of 46.82 years, and the control group

consisted of 438 volunteers (M=159/F=277) with a mean age of 46.33 years. Patient data, such as age, height, weight, patient's age at the onset of first symptoms, severity of clinical symptoms according to Visual Analog Scale (VAS) and Sino-Nasal Outcome Test-22 (SNOT-22), additional information on bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and allergies were obtained by questionnaire. Disease severity on nasal endoscopy and computed tomography (CT) scan of the paranasal sinuses was analyzed according to the Lund-Mackay and Lund-Kennedy scales. To examine the expression of the TAS2R38 receptor, tissue samples were collected from inferior turbinate mucosa (ITM) and a fragment of nasal polyps (NP) removed during surgery. For testing of *TAS2R38* gene polymorphisms, 2.7 ml of blood samples were collected on EDTA. DNA isolation was performed in the Department of Clinical Genetics at the Medical University of Lodz. *TAS2R38* gene alleles were genotyped using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping assays using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for rs713598, rs1726866 and rs10246939. Total RNA was isolated from nasal mucosa samples and receptor expression was measured using TaqManTM gene expression assays for the *TAS2R38* gene using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).

Results: The PAV and AVI haplotypes were the only ones detected in the study. The AVI haplotype was significantly more common in CRSwNP patients compared to controls ($p=0,0204$; OR=1,42, Fi=0,07). PAV/PAV homozygotes showed less inflammatory changes on CT of the paranasal sinuses ($p=0.0158$) compared to patients with PAV/AVI and AVI/AVI diplotypes. *TAS2R38* receptor expression was demonstrated in 43 (50.00%) samples of ITM in the study group, 28 (71.79%) in the control group ($p=0.037$), and 43 (46.24%) samples of nasal polyps. There were no differences in expression levels in all analyzed tissues. Patients who rated their symptoms 0-3 on the VAS scale showed higher expression of *TAS2R38* in ITM tissue compared to patients with 8-10 scores ($p=0.020$).

There was a close to statistically significant negative correlation between *TAS2R38*

expression in the ITM and computed tomography (CT) Lund-Mackay score ($p=0.068$; $R= -0.28$). Patients with coexisting bronchial asthma had significantly higher receptor expression in NP tissue ($p=0.012$).

Conclusions: Polymorphic variants of the *TAS2R38* gene were confirmed in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and in controls in the Polish population. The three most common diplotypes of this gene were detected: PAV/PAV, AVI/AVI, PAV/AVI. The AVI haplotype was significantly more frequent in the study group compared to the control group, indicating that its carrier may be more predisposed to the development of CRSwNP. PAV/PAV diplotype was found in subjects with less severe nasal polyposis what may indicate its protective properties. Expression of the bitter taste receptor *TAS2R38* was significantly more frequently detected in control subjects compared to patients with CRSwNP. No differences in expression levels were observed between tissues when it was detected. Thus, studies determining whether the presence of *TAS2R38* receptor expression may be a predictive factor for the development of CRSwNP need to be continued and expanded. Significantly higher expression of the bitter taste receptor *TAS2R38* in the nasal mucosa was found in patients with milder symptoms and less severe nasal polyposis which may indicate possible protective properties of this receptor.