

ZNAČAJ GENETSKIH I FAKTORA SREDINE U NASTANKU IDIOPATSKIH BRONHIEKTAZIJA KOD DECE

UVOD

Bronhiektazije su po definiciji sva stanja u kojima dolazi do permanentne abnormalne dilatacije bronhijalnog stabla. Patofiziološki mehanizam u bronhiektazijama obuhvata poremećaj regulacije imunog odgovora i rekurentne bakterijske infekcije, što rezultuje progresivnim oštećenjem plućnog tkiva i ireverzibilnom dilatacijom bronhija. Ranije su bronhiektazije bile veoma česte, ali je nekontrolisana primena antibiotika poslednjih godina smanjila njihovu učestalost, za koju se trenutno procenjuje da iznosi između 1 i 100 na 10,000 (1). Uprkos smanjenju učestalosti ove bolesti i razvoju tehnike skenera visoke rezolucije, koja je omogućila njeno lakše i brže dijagnostikovanje, bronhiektazije kod dece i dalje predstavljaju značajan klinički problem i čest uzrok respiratornog morbiditeta, naročito u zemljama u razvoju. Poznati uzročnici bronhiektazija su cistična fibroza, deficijencija alfa 1-antitripsina, cilijarna diskinezija, tuberkuloza kod imunodeficijencija i mehanička obstrukcija disajnih puteva (2). Međutim, u više od 50% slučajeva bronhiektazija je isključeno prisustvo nekog od poznatih uzročnika i oni se smatraju idiopatskim. Pretpostavlja se da su idiopatske bronhiektazije zapravo multifaktorijalna bolest i da ulogu u njihovoj patogenezi može imati više različitih genetskih faktora, kao i brojni faktori spoljašnje sredine (3).

Gen CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* - transmembranski regulator provodljivosti u cističnoj fibrozi) kodira hloridni kanal u membrani ćelija plućnog epitela i ima značajnu ulogu u normalnoj funkciji pluća (4, 5). Poremećaji u strukturi i funkciji gena CFTR mogu dovesti do promena u strukturi i funkciji plućnog epitela, usled čega pluća mogu postati podložna infekciji i inflamaciji (6, 7). Mutacije u genu CFTR su takođe povezane sa drugim plućnim bolestima, ali njihova uloga u idiopatskim bronhiektazijama kod dece još uvek nije jasna i intenzivno se istražuje (8-15). Distribucija mutacija u genu CFTR je uglavnom populaciono-specifična, a u našoj populaciji kod pacijenata obolelih od bolesti pluća mutacije su najčešće prisutne u egzonima 3, 4, 10 i 11 i intronu 8 (13-16).

Gen ELANE (*elastase, neutrophil expressed* - neutrofilna elastaza) kodira enzim čija je osnovna uloga degradacija komponenti ekstraćelijskog matriksa na mestima intenzivne inflamacije (17). Prisustvo polimorfizama u regulatorom regionu gena za neutrofilnu elastazu može dovesti do povišene ekspresije ovog enzima, što dalje može da dovode do patoloških promena u strukturi plućnog tkiva usled preterane degradacije ekstraćelijskog matriksa (18-21). Pretpostavlja se da mutacije u regulatornom regionu gena ELANE mogu imati ulogu u patofiziologiji plućnih bolesti, ali njihovo prisustvo do sada nije proučavano u idiopatskim bronhiektazijama kod dece. Kako na neutrofilnu elastazu direktno deluju makrolidni antibiotici koji se koriste u terapiji infekcija koje se često javljaju u bronhiektazijama pretpostavlja se da mutacije u genu ELANE mogu da utiču i na terapijski odgovor (22).

Faktori spoljašnje sredine mogu predstavljati faktore rizika za nastanak i razvoj bronhiektazija, ali se smatra da nijedan od njih sam po sebi ne dovodi do razvoja bolesti, već da se njihova uloga ostvaruje kroz interakciju sa genetskim faktorima i drugim faktorima sredine (2, 3). Najčešćim faktorom rizika smatra se ozbiljnija bakterijska infekcija koja je prethodila razvoju bolesti. Nizak socioekonomski status takođe može biti značajan faktor rizika, posebno u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Uslovi života, ishrana i izloženost potencijalno toksičnim supstancama mogu da dovedu do slabljenja imunog sistema i time posredno utiču na razvoj bolesti.

RADNA HIPOTEZA

Osnovna hipoteza ovog istraživanja je da se mutacije u CFTR genu javljaju sa većom učestalošću u idiopatskim bronhiektazijama kod dece nego u opštoj populaciji. Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da kod nosilaca polimorfizama u CFTR genu postoji poremećaj u funkciji jonskog kanala koji doprinosi nastanku i razvoju bolesti pluća, na osnovu čega se pretpostavlja da u određenom broju slučajeva mutacije u CFTR genu imaju ulogu u etiologiji idiopatskih bronhiektazija kod dece.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi prevalenciju mutacija u CFTR genu u populaciji dece sa idiopatskim bronhiektazijama
2. Utvrditi prevalenciju mutacija u ELANE genu u populaciji dece sa idiopatskim bronhiektazijama
3. Ispitati uticaj faktora spoljašnje sredine (bakterijske infekcije, sekundarno pušenje, izloženost aerozagađenju, dojenje, socioekonomski status) na razvoj idiopatskih bronhiektazija kod dece.

MATERIJAL I METODE

Ispitanici

Dovoljan broj jedinica posmatranja – dece sa idiopatskim bronhiektazijama za procenu prevalencije mutacija u CFTR genu u ispitivanoj populaciji, izračunat na osnovu pretpostavke o njihovoj zastupljenosti od 0,15 (na osnovu iskustvenih podataka), uz alfa grešku od 0,05 i preciznost od 0,1 je 49 ispitanika. Uzimajući u obzir mogućnost od 10% nedostajućih podataka, uključen broj ispitanika će biti 54.

Istraživanje će biti sprovedeno na Univerzitetској dečјој klinici u Beogradu i predstavljaće studiju preseka u koju će biti uključena deca životnog

doba od 6 do 16 godina kod kojih je postavljena dijagnoza idiopatskih bronhiektazija.

Svim ispitanicima će, u cilju postavljanja dijagnoze, biti analizirani sledeći anamnestički podaci: vremenski period od pojave prvih simptoma do postavljanja dijagnoze i prvi simptomi bolesti (kašalj, iskašljavanje sputuma, pojava hemoptizija, febrilnost, vizing, prisustvo maljičastih prstiju). Takođe će biti analizirani anamnestički podaci o broju bakterijskih infekcija, sekundarnom pušenju, izloženosti aerozagađenju, dužini dojenja i socioekonomskom statusu ispitanika.

Svim ispitanicima biće učinjen fizikalni pregled, auskultacija pluća., skener pluća visoke rezolucije, bronhoskopija radi dobijanja bronhoalveolarne lavaže i indukovani sputum. Bronhoalveolarna lavaža i indukovani sputum biće bakteriološki i citološki obrađeni.

Za sve ispitanike biće urađene sledeće laboratorijske analize: krvna slika, brzina sedimentacije eritrocita i C reaktivni protein.

Merenje plućnih funkcija kod svih ispitanika biće učinjeno spirometrom marke Schiller (Ganshorn).

Stepen inflamacije u disajnim putevima biće meren izdahnutim azot monoksidom pomoću aparata Niox mini.

Genetska analiza

Za analizu gena CFTR i ELANE će se koristiti DNK izolovana iz uzoraka venske krvi, a analiza će se vršiti metodologijom zasnovanom na PCR (*polymerase chain reaction*) tehnici. Prisustvo promena u odabranim segmentima gena CFTR i ELANE će se vršiti direktnim sekvenciranjem DNK. Kod svih ispitanika će biti analizirano prisustvo mutacija u pet segmenata gena CFTR (egzoni 3, 4 10 i 11 i intron 8) i regulatornom regionu gena ELANE. Genetsko ispitivanje će se vršiti u Laboratoriji za molekularnu biologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Statistička metodologija

Statistička analiza

U radu će se od metoda deskriptivne statistike koristiti: mere centralne tendencije (aritmetička sredina i medijana), mere varijabiliteta (interval varijacije, standardna devijacija i interkvartilni rang) i relativni brojevi. Od metoda analitičke statistike koristiće se: a) metode identifikacije empirijskih raspodela, b) metode za procenu značajnosti razlike i to: Student-ov t test i test sume rangova za numeričke varijable u zavisnosti od normalnosti raspodele i Hi-kvadrat i Fišer-ov test za kategorijalne varijable. Za utvrđivanje prediktora terapijskog odgovora biće korišćena univarijantna i multivarijantna logistička regresiona analiza.

PROCENA KANDIDATA O POTENCIJALNOM NAUČNOM DOPRINISU

Očekuje se da ovo istraživanje značajno unapredi poznavanje genetskih i sredinskih faktora koji leže u osnovi idiopatskih bronhiektazija kod dece, o čijim molekularnim mehanizmima nastanka i razvoja se relativno malo zna. Studija će doprineti rasvetljavanju uloge koju mutacije u genu CFTR mogu imati u ovoj bolesti, dok uloga mutacija u genu ELANE u bronhiektazijama uopšte nije proučavana i ovo je prva studija koja se time bavi. Pretpostavlja se da će, na osnovu ovog istraživanja, moći da se uoči prediktivni značaj određenih genetskih i sredinskih parametara za procenu rizika za nastanak idiopatskih bronhiektazija kod dece, njihovo rano otkrivanje i lečenje.

REFERENCE

1. Callahan CW, Redding GJ. Bronchiectasis in children: orphan disease or persistent problem? *Pediatr Pulmonol* 2002;33(6):492-496.
2. Cohen M, Sahn SA. Bronchiectasis in systemic disease. *Chest* 1999;116:1063-1074.
3. King PT. The pathophysiology of bronchiectasis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2009;4:411-419.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245(4922):1066-1073.
5. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67(2):117-133.
6. Fischer H, Widdicombe JH. Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium. *J Membr Biol.* 2006;211(3):139-150.
7. Pilewski JM, Frizzell RA. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 1999;79(1 Suppl):S215-S255.
8. Luisetti M, Pignatti PF. Genetics of idiopathic disseminated bronchiectasis. *Semin Respir Crit Care Med* 2003;24(2):179-184.
9. Pignatti PF, Bombieri C, Benetazzo M, Casartelli A, Trabetti E, Gile LS, et al. CFTR gene variant IVS8-5T in disseminated bronchiectasis. *Am J Hum Genet* 1996;58(4):889-892.
10. Girodon E, Cazeneuve C, Lebargy F, Chinet T, Costes B, Ghanem N, et al. CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur J Hum Genet* 1997;5(3):149-155.
11. Bombieri C, Benetazzo M, Saccomani A, Belpinati F, Gila LS, Luisetti M, Pignatti PF. Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet* 1998;103(6):718-722.
12. King PT, Freezer NJ, Holmes PW, Holdsworth SR, Forshaw K, Sart DD. Role of CFTR mutations in adult bronchiectasis. *Thorax* 2004;59:357-358.
13. Divac A, Nikolic A, Mitic-Milicic M, Nagorni-Obradovic L, Petrovic-Stanojevic N, Dopudja-Pantic V, et al. CFTR mutations and polymorphisms in adults with disseminated bronchiectasis: a controversial issue. *Thorax* 2005;60(1):85.

14. Divac A, Nikolic A, Mitic-Milikic M, Nagorni-Obradovic Lj, Petrovic-Stanojevic N, Dopudja-Pantic V, et al. High frequency of the R75Q CFTR variation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Cyst Fibros* 2004;3(3):189-191.
15. Stankovic M, Nikolic A, Divac A, Tomovic A, Petrovic-Stanojevic N, Andjelic M, et al. The CFTR M470V gene variant as a potential modifier of COPD severity: study of Serbian population. *Genet Test* 2008;12(3):357-362.
16. Radivojevic D, Djuriscic M, Lalic T, Guc-Scekic M, Savic J, Minic P, et al. Spectrum of cystic fibrosis mutations in Serbia and Montenegro and strategy for prenatal diagnosis. *Genet Test* 2004;8(3):276-280.
17. Takahashi H, Nukiwa T, Yoshimura K, Quick CD, States DJ, Holmes MD, et al. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* 1988;263(29):14739-14747.
18. Amitani R, Wilson R, Rutman A, Read R, Ward C, Burnett D, et al. Effects of human neutrophil elastase and *Pseudomonas aeruginosa* proteinases on human respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;4(1):26-32.
19. Park JY, Chen L, Lee J, Sellers T, Tockman MS. Polymorphisms in the promoter region of neutrophil elastase gene and lung cancer risk. *Lung Cancer* 2005;48(3):315-321.
20. Taniguchi K, Yang P, Jett J, Bass E, Meyer R, Wang Y, et al. Polymorphisms in the promoter region of the neutrophil elastase gene are associated with lung cancer development. *Clin Cancer Res* 2002;8(4):1115-1120.
21. Topic A, Ljujic M, Nikolic A, Petrovic-Stanojevic N, Dopudja-Pantic V, Mitic-Milikic M, Radojkovic D. Alpha-1-antitrypsin Phenotypes and Neutrophil Elastase Gene Promoter Polymorphisms in Lung Cancer. *Pathol Oncol Res* 2010 Jun 3 [Epub ahead of print].
22. Gorrini M, Lupi A, Viglio S, Pamparana F, Cetta G, Iadarola P, Powers JC, Luisetti M. Inhibition of human neutrophil elastase by erythromycin and flurythromycin, two macrolide antibiotics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(4):492-499.
23. Bienvenu T, Sermet-Gaudelus I, Burgel PR, Hubert D, Crestani B, Bassinet L, Dusser D, Fajac I. Cystis Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Channel Dysfunction in NON-Cystis Fibrosis Bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010;181:1078-1084.