

Bibliografie

1. Adams Leon A, Keith Paul A, Lindor D. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*. 2005;29:172.
2. Dumbrovă V-T. Hepatologie bazată pe dovezi. Ghid practic național. Chișinău, 2005;334.
3. Patton HM, Sirlin C, Behling C, et al. Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a critical appraisal of current data and implications for future research. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2006;43(4):413-427.
4. Бугверов АО, Маевская МВ. Некоторые патогенетические и клинические вопросы неалкогольного стеатогепатита. *Клин. перспек. гастроэнтер., гепатол.* 2003;3:2-7.
5. Павлов ЧС, Бакулин ИГ. Неалкогольный стеатогепатит: клинические особенности и принципы лечения. *Врач.* 2007;3:24-28.

Polimorfismul genei TNF- α în diferite forme evolutive ale astmului bronșic la copiii din Republica Moldova

O. Cîrstea

Scientific Department of Pediatrics, Research Institute for Maternal and Child Healthcare
 93, Burebista Street, Chisinau, Republic of Moldova

Corresponding author: +37369038523. E-mail: olgacirstea78@gmail.com

Manuscript received: November 11, 2011; revised: December 05, 2011

Association of the TNF- α gene polymorphism with different asthma phenotypes in moldavian children population

TNF- α gene polymorphism (-308 G>A) was studied in 180 Moldavian children, half with asthma and half in a control group, to assess the prevalence of the allelic variants of the gene. All patients underwent complex clinical and functional examination (spirometry with bronchodilational test) and laboratory evaluation (molecular genetics, immunological and general tests). The following genotypes of the TNF- α gene were identified - TNF- α -308 G/G, TNF- α -308 G/A and TNF- α -308 A/A. The study showed that the homozygous genotype TNF- α -308 G/G has protective role, found significantly more frequently in children with the solitary form of asthma compared with those with allergic triad (86,2% versus 56,4%, respectively; OR = 4,83, 95% CI: 1,41 to 16,54, p<0,05). However, the functionally compromised genotype TNF- α -308 G/A was found more frequently in children with asthma associated with other allergic symptoms (i.e., 38,5% compared with 13,8% in cases with asthma alone, p<0,05) and was observed twice as frequently in boys with mild asthma with no associated atopic symptoms, compared to those with moderate to severe evolution of the disease (40,9% versus 20,7%, respectively; p> 0,05). Noticeably, the homozygous genotype TNF- α -308 A/A group was found only in children with the allergic triad in 5,1% of the cases. Study results demonstrate the association of the functionally compromised genotypes of the TNF- α -308 gene with different phenotypes of asthma in Moldavian children.

Key words: asthma, child, TNF- α gene, polymorphism, phenotype.

Полиморфизм гена TNF- α при различных формах течения бронхиальной астмы у детей молдавской популяции

Было обследовано 180 детей с целью определения особенностей распространения аллельных вариантов полиморфизма -308G > A гена TNF- α в молдавской популяции. Исследование было проведено у 90 детей с различными вариантами течения бронхиальной астмы и 90 здоровых детей, составивших контрольную группу. У обследованных пациентов были проведены комплексные клинические осмотры, инструментальные методы исследования (спирография с проведением бронходилатационного теста), а также были применены лабораторные методы (общие, иммунологические, а также молекулярно-генетические). Были определены следующие генотипы полиморфизма гена TNF- α (-308 G > A) – G/G („дикий” тип), G/A и A/A. Из приведенных данных следует, что «функционально благоприятный» гомозиготный генотип TNF- α -308 G/G был выявлен достоверно чаще в группе детей с астмой без сопутствующих проявлений атопии (86,2%) по сравнению с детьми с атопической триадой (астма, аллергический ринит и дерматит) – 56,4% соответственно (OR = 4,83; 95% CI: 1,41-16,54; p < 0,05), указывая на его защитную роль. «Функционально неблагоприятный» гетерозиготный генотип TNF- α -308 G/A был обнаружен достоверно чаще у детей с астмой ассоциированной с другими аллергическими проявлениями (38,5%) по сравнению с 13,8% детей с астмой без других атопических симптомов (p < 0,05) и в 2 раза чаще у мальчиков с легкой формой астмы (40,9%) по сравнению с пациентами со средне-тяжелой формой болезни (p > 0,05). Сочетание неблагоприятных аллелей – гомозиготный генотип TNF- α -308 A/A было выявлено только у детей с атопической триадой в 5,1% случаев. Таким образом, анализ ассоциации полиморфизма -308 G/A гена TNF- α с клинически и патогенетически значимыми фенотипами показал, что определенные аллельные варианты исследуемого гена играют модифицирующую роль в изменчивости комплекса параметров, которые определяют течение и прогрессирование заболевания в молдавской популяции детей с бронхиальной астмой.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, ген TNF- α , полиморфизм, фенотип.

Introducere

Astmul bronșic este o boală pulmonară cronică caracterizată prin obstrucția variabilă și reversibilă a căilor respiratorii, inflamația căilor respiratorii și hiperreactivitatea bronșică [3]. Această maladie este una dintre cele mai comune stări de morbiditate în populația generală, cu o prevalență în creștere în ciuda dezvoltării tehnicilor de investigare și a arsenalului terapeutic. În Republica Moldova prevalența astmului bronșic urmează trendul ascendent mondial, studiile proprii epidemiologice, efectuate cu aplicarea metodologiei ISAAC, a arătat că $7,2 \pm 1,2\%$ dintre copii prezintă, cel puțin o dată în viață, simptome de astm bronșic și un număr impunător de copii (mai mult de 300) cu diferit grad de invaliditate, cauzată de această maladie. Totodată, printre țările europene, statisticile oficiale din Moldova raportează cea mai mică prevalență a astmului bronșic, deoarece de multe ori, boala este hipodagnosticată sau tardiv depistată. Deși medicina modernă încearcă să definească astmul bronșic și să-l încadreze în diferite forme și stadii cât mai standardizate, el rămâne și astăzi un fenomen complex, încă neelucidat și plin de paradoxuri. Cele mai multe probleme sunt legate de fiziopatogenia bolii astmatice, de conexiunile care există între antigene, natura și amplitudinea modificărilor histopatologice și particularitățile genetice ale gazdei.

Un subiect de interes recent este implicarea factorului genetic în patogenia astmului bronșic. Predispoziția pentru această afecțiune este condiționată genetic în mod clar și de aceea se încearcă identificarea genelor implicate. Studii familiale recente arată că nu o singură genă e responsabilă pentru o mare parte din expresia bolii, însă este vorba despre un model poligenic [2]. Deși calea apariției obstrucției bronșice recurente este comună, la toți pacienții cu astm există o variabilitate fenotipică marcată, care sugerează heterogenitate etiologică și puternice influențe ale mediului. Apariția astmului bronșic este determinată de o interacțiune complexă între factori genetici și factori de mediu [6], dar mecanismele responsabile de transmitere nu sunt încă elucidate. Rezultatele analizei de segregare dovedesc că mai multe gene sunt implicate în patogenia astmului, dar nici una dintre aceste gene nu are un efect suficient de puternic asupra susceptibilității de a dezvolta astm bronșic. Studiile de scanare ale genomului uman (cu markeri ADN polimorfici) și analiza genelor candidat au identificat câteva regiuni cromozomice (5q 23-31, 6p, 11q, 12q) ce conțin genele implicate în patogenia astmului: pe 5q genele pentru citokine (IL-4, IL-9) și receptorii lor, adrenoreceptorul 2; receptorul pentru IgE pe 11q; unele gene ale complexului HLA și TNF pe cromozomul 6p21, ș. a.

Obiectivul prezentei lucrări l-a constituit evaluarea particularităților incidenței variantelor alelice ale genei TNF- α la copiii moldoveni cu diferite forme clinice și evolutive de astm.

Material și metode

Lotul de studiu l-au constituit 90 de copii cu astm bronșic, cu vârsta cuprinsă între 5 și 51 ani (vârsta medie \pm DS a constituit $10,93 \pm 3,6$ ani), care au fost spitalizați în secția de alergologie a IMSP Institutul de Cercetări Științifice în Dome-

niul Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului. Printre subiecți au prevalat băieții (raportul dintre băieți și fete – 1,3:1), ceea ce se explică prin incidența comparativ mai înaltă a maladiei printre persoanele de sex masculin, până la vârsta de 15 ani. Pacienții au fost regrupați în: copii ce manifestau astm bronșic solitar (AB); copii la care astmul era asociat cu rinită alergică (RA) cu/sau fără conjunctivită alergică (CA) – AB + RA \pm CA; în conformitate cu clasificarea ARIA-2007 [1]) și pacienți, la care maladia se asocia cu dermatită atopică (DA) cu/sau fără conjunctivită (triada atopică, AB + DA \pm RA \pm CA). Grupul de control (n = 90) a fost selectat în timpul anchetării după metodologia standardizată ISAAC a copiilor din regiunile rurale incluse în studiu, din cei care au răspuns negativ la toate întrebările referitor la prezența semnelor de patologie atopică și la care examinarea clinică complexă nu a evidențiat semne de atopie sau alte maladii acute și cronice, fiind comparabili după vârstă și sex cu cazurile studiate („copii condiționat sănătoși”).

Pentru fiecare copil a fost completat un chestionar special, elaborat cu scopul delimitării factorilor medico-biologici, sociali, ereditari ș.a., și a devierilor de sănătate, în special de origine alergică, a copiilor. Pacienții au fost supuși examinării clinice complexe, investigațiilor instrumentale (spirografia cu executarea testului bronhodilatațional) și examinărilor de laborator (molecular-genetice, imunologice și generale). Toți participanții în studiu au semnat consimțământul informativ de colaborare. Au fost identificate următoarele genotipuri ale genei TNF- α (308 G > A) – TNF- α -308 G/G (tipul „sălbatic” sau normal), TNF- α -308 G/A și TNF- α -308 A/A. ADN genomic a fost extras din limfocitele sângelui periferic prin metoda standard și aplicarea metodei de polimerizare în lanț (RPL) în colaborare cu Laboratorul de Diagnostic Prenatal al Maladiilor Ereditare și Congenitale al ICȘ Obstetrică și Ginecologie „D. Otto” al AȘM a Federației Ruse (or. Sankt-Petersburg). Prelucrarea statistică a rezultatelor studiului a fost efectuată cu aplicarea setului de programe statistice Statistica 6.0 (StatSoft®), GraphPad InStat versiunea 2.0 pentru Windows, SPSS Statistics. Dependența statistică dintre parametrii calitativi s-a apreciat prin calcularea criteriului Chi pătrat (χ^2) și ratei de șansă (OR).

Rezultate și discuții

Expresia genei TNF- α este majorată în astmul bronșic, ceea ce este demonstrat de secreția mărită a acestei citokine în căile respiratorii și conținutul sporit al ei în lichidul lavajului bronheoalveolar la pacienții simptomatici [4, 6, 7]. Citokina proinflamatoare TNF- α este produsă de numeroase linii celulare: macrofage, monocite, limfocite, mastocite, neutrofile, ș.a. Legarea TNF- α de receptor determină modificări conformaționale în structura receptorului, care conduc la activarea în cascadă a altor proteine implicate în proliferarea celulară, răspunsul inflamator și apoptoza celulară. Datorită prezenței receptorilor săi în majoritatea țesuturilor, TNF- α exercită o varietate largă de efecte biologice: efect chemotactic asupra neutrofilelor, crește permeabilitatea la nivelul celulelor endoteliale din regiunea cu inflamație, la nivelul macrofagelor

Tabelul 1

Genotipurile și frecvența alelelor polimorfismului TNF-α -308 în loturile de bază, n (%)

Fenotip	Genotipurile și alelele identificate				
	AA	GA	GG	A	G
Lot de bază, AB (n = 29)	0 (0)	4 (13,8)*	25 (86,2)*	4 (6,9) **	54 (93,1) **
Lot de bază, AB + RA ± CA (n = 22)	0 (0)	7 (31,8)	15 (68,2)	7 (15,9)	37 (84,1)
Lot de bază, AB + DA ± RA ± CA (n = 39)	2 (5,1)	15 (38,5)*	22 (56,4)*	19 (24,4) **	59 (75,6) **
Lot de control (n = 90)	3 (3,3)	29 (32,3)	58 (64,4)	35 (19,4)	145 (80,6)

Notă: AB, astm bronșic; RA, rinită alergică; CA, conjunctivită alergică; DA, dermatită atopică. * - p < 0,05; ** - p < 0,01.

Tabelul 2

Răspândirea genotipurilor eventual responsabile de dezvoltarea astmului la pacienții cu diferite forme de severitate a maladiei în dependență de sex (%)

Genotip	Pacienți cu astm bronșic ușor, n = 33		Pacienți cu astm bronșic moderat-sever, n = 57	
	Băieți, n = 22	Fete, n = 11	Băieți, n = 29	Fete, n = 28
TNF-α -308 G/G	54,5#	72,7	79,3#	67,9
TNF-α -308 G/A	40,9	27,3	20,7	28,6
TNF-α -308 A/A	4,5	0,0	0,0	3,6

- 0.1 > p ≥ 05

stimulează fagocitoza și producerea de prostaglandină E2, este factor de creștere pentru fibroblaști și stimulează sinteza de colagenază, intensifică proliferarea limfocitelor T după stimularea cu interleukina 2, ș.a. Polimorfismul dialelic al genei TNF-α, condiționat de substituția guaninei prin adenozină în poziția -308 a promotorului genei, este considerat a fi factor ce influențează rata transcripției și a sintezei proteice. Unele studii demonstrează că polimorfismul promotorului -308G/A alterează funcția genei, este asociat creșterii de 6-7 ori a nivelului de transcripție a TNF-α și prezintă un factor de risc pentru dezvoltarea și evoluția astmului bronșic [8].

Studiul nostru, având drept scop analiza comparativă a

tabloului genotipic la copiii cu diferite forme clinice de astm (astm solitar sau asociat cu alte forme de atopie), a determinat că repartizarea diferitelor genotipuri variază în funcție de manifestările clinico-evolutive ale maladiei. Astfel, genotipul heterozigot TNF-α -308 G/A s-a depistat de 2,3 ori mai frecvent la copiii cu astm asociat cu rinită și/sau conjunctivită alergică față de cei cu astm solitar (31,8% contra 13,8%, p > 0,05), iar genotipul homozigot cu ambele alele nefuncționale TNF-α -308 A/A a fost identificat doar în grupul copiilor cu întregul spectru de manifestări alergice (AB + DA ± RA ± CA) în 5,1% din cazuri (tab. 1).

Totodată, genotipul homozigot funcțional TNF-α -308

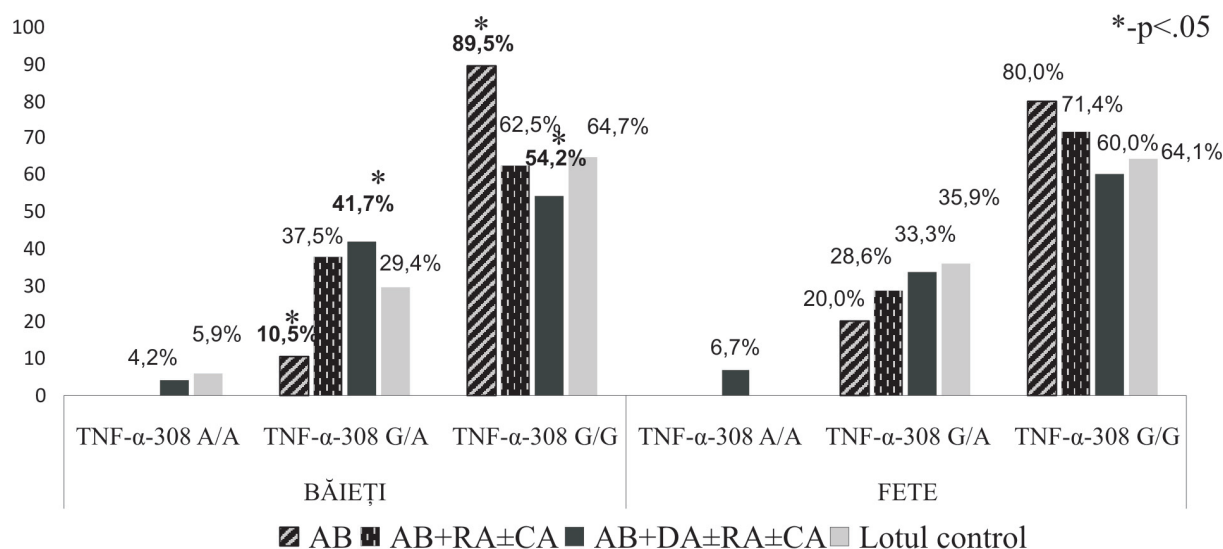


Fig. 1. Repartizarea genotipurilor genei TNF-α -308 în grupurile de studiu în funcție de sexul copiilor și formele evolutive ale astmului bronșic (%).

G/G a fost identificat semnificativ mai frecvent la copiii cu forma solitară de astm în comparație cu cei cu triada atopică (86,2% contra 56,4%, respectiv; OR = 4,83; 95% IC: 1,41-16,54; $p < 0,05$), fapt observat și la analiza comparativă în funcție de sexul copiilor incluși în studiu (fig. 1).

Astfel, genotipul TNF- α -308 G/G s-a regăsit predominant la băieții cu astm solitar în comparație cu băieții cu triada atopică (89,5 % contra 54,2%, respectiv; OR = 7,19; 95% IC: 1,352-38,251; $p < 0,05$). Totodată, analiza rezultatelor a fost efectuată și ținând cont de gravitatea manifestării astmului bronșic (evoluție ușoară sau moderată până la sever persistentă) în conformitate cu clasificarea GINA-2008, aceasta fiind echivalentă treptelor de tratament actuale ale pacienților pentru menținerea controlului bolii (tab. 2).

Reieșind din rezultatele obținute, poate fi observată o incidență aproximativ de 2 ori mai înaltă a genotipului heterozigot TNF- α -308 G/A la băieții cu astm bronșic solitar cu evoluție ușoară, comparativ cu cei cu evoluția moderată sau severă a maladiei (40,9% contra 20,7%, respectiv; $p > 0,05$). Ultimii, însă, semnificativ mai frecvent manifestau triada atopică în comparație cu forma solitară de astm (41,7% contra 10,5%, respectiv; OR = 0,17; 95% IC: 0,03-0,88; $p < 0,05$) (fig. 1).

Concluzionând cele relatate, studiul a constatat că fiecare dintre formele clinice ale astmului bronșic (forma solitară sau asociată cu alte manifestări alergice – rinită, dermatită, etc.) are un substrat genotipic determinant caracteristic. Astfel, cunoașterea tabloului genotipic al individului permite o incursiune în pronosticul evoluției fenotipice a maladiei și întreprinderea unor măsuri preventive eficiente încă până la dezvoltarea tabloului clinic, sau la etape incipiente ale maladiei, ceea ce va asigura un succes mai mare în lupta cu boala.

Concluzii

1. Genotipul funcțional compromis TNF- α -308 G/A se regăsește mai frecvent la copiii cu forme de astm bronșic,

asociat cu alte maladii alergice (respectiv 38,5% comparativ cu 13,8% în astm solitar, $p < 0,05$), iar genotipul homozigot TNF- α -308 A/A a fost identificat doar în grupul copiilor cu triadă atopică (5,1% din cazuri).

2. Rezultatele studiului sugerează o prevalență de 2 ori mai înaltă a genotipului heterozigot TNF- α -308 G/A la băieții cu astm bronșic solitar cu evoluție ușoară al astmului bronșic, comparativ cu cei cu evoluția moderată sau severă a maladiei (40,9% contra 20,7%, respectiv; $p > 0,05$).

3. Datele obținute demonstrează importanța explorării în continuare a polimorfismului -308 G/A al genei TNF- α cu scop de identificare a indivizilor susceptibili pentru dezvoltarea și evoluția complicată a astmului bronșic și delimitarea grupurilor de risc major pentru această maladie în rândurile copiilor din Moldova.

Bibliografie

1. Brožek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 Revision. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;126(3):466-476.
2. Carroll W. Asthma genetics: pitfalls and triumphs. *Paed. Respir. Reviews*. 2005;6:68-74.
3. Global strategy for asthma management and prevention (GINA). National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute. GINA, NHLBI/WHO, 1996;2002;2006.
4. Halasz A, Cserhati E, Magyar P, et al. Role of TNF- α and its 55 and 75 kDa receptors in bronchial hyperreactivity. *Respir. Med*. 2002;96:262-7.
5. Kabesch M. Gene by environment interactions and the development of asthma and allergy. *Toxicol Lett*. 2006;162:43-48.
6. Kamali-Sarvestani E, Ghayomi MA, Nekoe A. Association of TNF- α -308 G/A and IL-4 -589 C/T Gene Promoter Polymorphisms With Asthma Susceptibility in the South of Iran. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol*. 2007;17(6):361-366.
7. Thomas PS. Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol. Cell. Biol*. 2001;79:132-40.
8. Shin HD, Park BL, Kim LH, et al. Association of tumor necrosis factor polymorphisms with asthma and serum total IgE. *Hum. Mol. Genet*. 2004;13:397-403.