

# EVALUAREA RISCULUI GENETIC PENTRU ASTMUL BRONȘIC LA COPII CU AJUTORUL SOFTULUI GENERALIZED MULTIFACTOR DIMENSIONALITY REDUCTION

Olga Cîrstea<sup>1</sup>, Liubov Vasilos<sup>1,2</sup>, Ala Cojocaru<sup>2</sup>, Dorina Savoschin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamentul Pediatrie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova

<sup>2</sup>Laboratorul Științific de Pediatrie, Institutul Mamei și Copilului, Chișinău, Republica Moldova

## REZUMAT

Astmul bronșic reprezintă o maladie multifactorială, fiind determinată de numeroase interacțiuni intergenice și cu factorii de mediu. Metode statistice tradiționale, utilizate pentru analiza rezultatelor studiilor caz-control, nu permit evaluarea profundă a riscului de dezvoltare a bolii asociat mutațiilor genice. Software-ul GMDR (*Generalized Multifactor Dimensionality Reduction*, versiunea Beta 0.9) a fost aplicat cu succes în studiile genetice la pacienții cu cancer, hipertensiune arterială, diabet ș.a.

**Obiectivul lucrării** a constituit utilizarea programului computerizat GMDR în scopul evaluării rolului interacțiunilor intergenice asupra riscului de dezvoltare a astmului bronșic la copiii moldoveni.

**Material și metodă.** Studiul de tip caz-control a fost realizat pe un lot de 180 de copii: 90 de copii cu astm bronșic și 90 copii sănătoși în lotul de control, fiind comparabili după vârstă și sex. Software-ul GMDR (versiunea Beta 0.9) a fost utilizat pentru ajustarea covariabilelor discrete și cantitative. A fost evaluată asocierea riscului de dezvoltare a astmului bronșic cu un șir de polimorfisme genice: polimorfismul de deleție a genelor GSTT1 și GSTM1; GSTP1 313A > G; NAT2 481 C > T, 590 G > A și 857 G > A; IL-4 -590 C > T; IL-4Ra Arg551Gln; TNFA -308 G > A; repetitivitățile AAT ale genei NOS1 în intronul 20; CC16 38 G > A.

**Rezultate.** Analiza datelor în studiu cu ajutorul software-ului GMDR a permis identificarea combinației de polimorfisme ale genelor-candidate pentru astmul bronșic (GSTT1+, NAT2 \*5-\*7/\*5-\*7, NOS1 <12/>12 și IL-4 -590 C/C) care majorează de 3,6 ori riscul de dezvoltare a maladiei (OR = 3,61; CI 95% 1,45-8,99; p < 0,01).

**Concluzii.** Rezultatele studiului demonstrează faptul că interacțiunile genice interferează la diferite niveluri ale mecanismelor fiziopatologice de dezvoltare ale astmului bronșic la copii. Analiza modelelor de interacțiune prin aplicarea software-ului GMDR în grupul de studiu indică asocierea riscului de dezvoltare a maladiei în special cu polimorfismul genelor de metabolizare a xenobioticelor și a genei implicate în producerea oxidului nitric la nivelul mucoasei căilor respiratorii.

**Cuvinte cheie:** astm bronșic, copil, factor de risc, polimorfism genic, software-ul GMDR

## INTRODUCERE

Astmul bronșic (AB) este o maladie caracterizată prin simptomatologie paroxistică sau persistentă și care include dispnee, senzație de constricție toracică, respirație șuierătoare, producție de spută și tuse, limitarea fluxului de aer și un grad variabil de hiperreactivitate bronșică la stimulii endo- sau exogeni. Predispoziția genetică, expunerea la alergenii și poluarea aerului atmosferic, nivelul socio-

economic de viață, stresul și accesul la serviciile de asistență medicală calitativă sunt factori care cu o mare probabilitate contribuie la povara disproporționată a astmului bronșic. Și în Republica Moldova prevalența astmului bronșic este în continuă creștere, maladia fiind de multe ori hipodiagnosticată sau tardiv depistată. Procesul inflamator dezvoltat la nivelul căilor respiratorii este o caracteristică importantă în dezvoltarea și progresarea maladiei, însă mecanismele care stau la bază nu sunt pe de-

Adresa de corespondență:

Asist. Univ. Dr. Olga Cîrstea, Departamentul Pediatrie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Str. Burebista nr. 93, MD-2060, Chișinău, Republica Moldova  
E-mail: olga.cirstea@usmf.md

plin elucidate. O abordare multilaterală este necesară pentru a releva factorii de risc numeroși, implicați în debutul maladiei la vârsta de copil.

Cercetările axate pe interacțiunea factorilor genetici cu cei de mediu sunt promițătoare în vederea identificării tratamentului optimal, precum și a metodelor eficiente de prevenție a maladiei. Aceasta se datorează faptului că individul predispus genetic, în urma expunerii la factorii agresivi și/sau inductori de mediu cum ar fi alergeni, virusuri, xenobioticele, ș.a. dezvoltă ulterior inflamația persistentă la nivelul căilor respiratorii și simptomatologia caracteristică astmului bronșic. Numeroase studii indică la faptul că maladia este determinată în mare parte de un model poligenic (1). Șirul de gene implicate în patogenia astmului bronșic include mai mult de 100 de loci. Studiile GWAS de asociere la nivel genomic (*Genome-Wide Association Studies*) au identificat un număr de regiuni cromosomale (5q23-31, 6p, 11q, 12q, 17q21, ș.a.) asociate cu mecanismele patogenetice ale astmului (2).

În mod general, totalitatea genelor implicate în mecanismele patogenetice ale unei maladiei formează „fondalul genetic“, care se realizează fenotipic prin simptomatologia caracteristică bolii. Totodată, cercetările genetice aduc dovezi care vin să confirme interrelațiile între gene, care într-un final influențează expresivitatea funcțională a lor, așa numitul fenomen de *epistazie*, care reprezintă o formă de interacțiune între gene nealele, în care o genă maschează exprimarea fenotipică a altei gene situată pe un alt locus și pe un alt cromozom. Prin urmare, *gena epistatică (supresoare)* suprimă exprimarea unei gene dominante cu care nu este alelă, iar *gena hipostatică* este gena a cărei exprimare este suprimată (3). În acest mod este bine înțeleasă complexitatea dezvoltării fenotipului atopic, în special atunci când în relația de epistazie sunt implicați trei sau mai mulți loci. Acest fenomen este unul din cei care asigură baza heterogenității și a diferențelor depistate la populații diferite de subiecți cu astm sau atopie.

Analiza statistică tradițională utilizată pentru evaluarea riscului de asociere a mutațiilor genice cu manifestările fenotipice în maladiile multifactoriale se reduce, adeseori, la analiza statistică comparativă a frecvenței genelor la pacienți și copiii sănătoși cu ajutorul testului  $\chi^2$  și a raportului probabilităților (*Odds Ratio, OR*) cu interval de încredere de 95%. Totodată, ne confruntăm cu faptul că cel mai plauzibil model de moștenire a acestor boli este cel poligenic, în care efectul general este determinat de suma însușirilor variantelor genice individuale a pacientului. În cazul astmului bronșic, un număr relativ mic de asocieri pozitive a marke-

rilor genetici cu manifestările maladiei se datorează în parte omiterii verificării sinergismului efectelor polimorfismelor studiate (4). Estimarea aportului factorilor genetici individuali, în acest context, devine o problemă complexă în aspectul metodelor statistice parametrice tradiționale (5,6).

În această ordine de idei vine să ne ajute metoda inovatoare de reducere multifactorială a dimensionalității (*Multifactor Dimensionality Reduction*), ea având posibilități mai mari de ajustare a parametrilor calitativi și cantitativi ai fenotipurilor studiate, ceea ce oferă o flexibilitate mai mare pentru designul propus al cercetării (5). Utilizarea acestei metode în studiile genetice la pacienții cu cancer (7,8), fibrilație atrială (9), autism (10), hipertensiune arterială (11), diabetul zaharat de tip II (12), a demonstrat că ea sporește substanțial acuratețea de predicție a riscului de dezvoltare a bolii inclusiv în modelele cu o complexitate înaltă.

## OBIECTIVUL LUCRĂRII

Ne-am propus drept obiectiv o analiză aprofundată a rolului factorilor genetici și a interacțiunii lor în dezvoltarea astmului bronșic la copii prin utilizarea aplicației computerizate GMDR (*Generalized Multifactor Dimensionality Reduction*, software Beta 0.9).

## MATERIAL ȘI METODĂ

Datele pentru analiza matematică complexă au fost primite în cadrul studiului analitic observațional de tip caz-control care a inclus un grup de 180 de copii. Lotul de bază a constituit 90 de copii cu vârstă de 5-18 ani (vârsta medie  $10,9 \pm 0,4$  ani), diagnosticați cu astm bronșic și spitalizați în secția alergologie a IMSP (Institutul Mamei și Copilului). Lotul-martor a inclus 90 de copii sănătoși cu media de vârstă egală cu  $13,5 \pm 0,2$  ani, care nu prezentau semne de maladii alergice. Copiii din acest grup erau comparabili după vârstă și sex cu cazurile studiate. Selectarea participanților în studiu a fost făcută prin metoda aleatorie în baza listelor și a consimțământului informat al părinților.

Pentru examenul molecular genetic din limfocitele sîngelui periferic a fost extras ADN-ul genomic, cu utilizarea cardurilor pentru prelevarea mostrelor de sînge care au fost transportate la laboratorul de testare<sup>1</sup>. Testele de genetică moleculară cu apli-

<sup>1</sup> Testele molecular-genetice au fost realizate în colaborare cu Laboratorul de Diagnostic Prenatal al Maladiilor Ereditare și Congenitale al ICȘ Obstetrică și Ginecologie „D. Otto“ al AȘ a Federației Ruse (Sankt Petersburg).

carea reacției de polimerizare în lanț (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), folosind polimeraza termo-stabilă recombinantă Taq („Promega“, SUA) și analiza polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), au avut drept scop studiul polimorfismelor genelor candidate pentru astm bronșic: polimorfismele de deleție ale genelor *GSTT1* și *GSTM1*; polimorfismele *313 A > G* și *341 C > T* ale genei *GSTP1*; polimorfismele *481 C > T*, *590 G > A* și *857 G > A* ale genei *NAT2*; numărul repetițiilor (*AAT*)<sub>n</sub> în intronul 20 al genei *NOS1*; polimorfismul *-590 C > T* al genei *IL-4*; *Arg551Gln* al genei *IL-4Rα*; polimorfismul *-308 G > A* al genei *TNFα*; polimorfismul *38 G > A* al genei *CC16*.

**Metoda de calcul la baza aplicației GMDR<sup>2</sup>** este destinată analizei asocierii caracterelor dihoto-mice și a combinațiilor de factori predictivi, care pot fi genetici sau exogeni. Software-ul este pus la dispoziția cercetătorilor cointeresați în mod gratuit și poate fi descărcat de pe site-ul oficial [www.ssg.uab.edu/gmdr/](http://www.ssg.uab.edu/gmdr/) (13). Analiza poate include un număr arbitrar de factori. În cadrul studiului nostru am urmărit identificarea combinației de markeri genetici cu valoare predictivă pentru riscul de dezvoltare a astmului bronșic la copii. Pentru realizarea ei se introduc rezultatele investigațiilor genetice la pa-

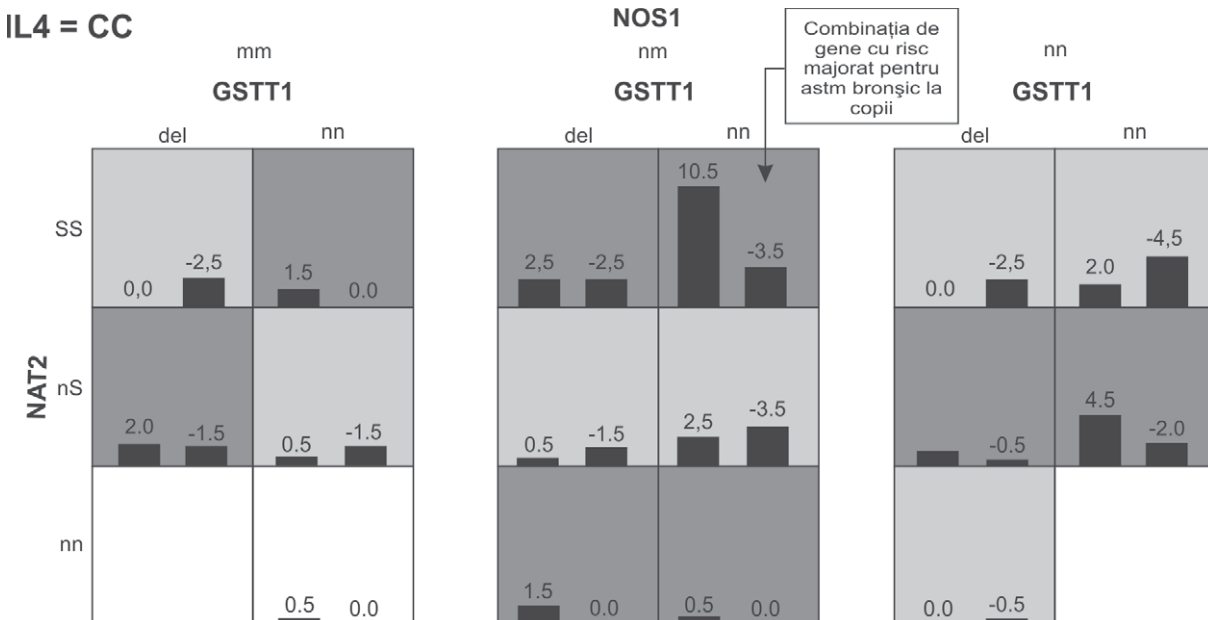
cienții cu astm bronșic și la copiii din lotul de control.

**Metodologia utilizării programului GMDR**

Primul rând al fișierului este linia de antet, care include denumirile mutațiilor (polimorfismelor) genice și afilierea individului la fiecare grup de studiu, fiind delimitate de spații egale. Grupul codificat prin zero („0“) reprezintă lotul de control, iar grupul codificat prin cifra unu („1“) reprezintă pacienții cu AB. Dacă fiecare marcator este reprezentat de o pereche de alele, fișierul trebuie să arate în felul următor:

Polimorfism 1	Polimorfism 2	Polimorfism 3	Grup
1	2	1	0
0	2	1	0
...			
2	2	1	1

Fișierele cu rezultatele codificate după acest model sunt procesate de programul GMDR, după care începe procesul de analiză statistică prin divizarea datelor în două subseturi egale, dintre care unul este utilizat ca set de verificare. După ce programul verifică toate combinațiile de variante genice posibile, este generat modelul cu cea mai înaltă valoare predictivă, care este selectat în baza esti-



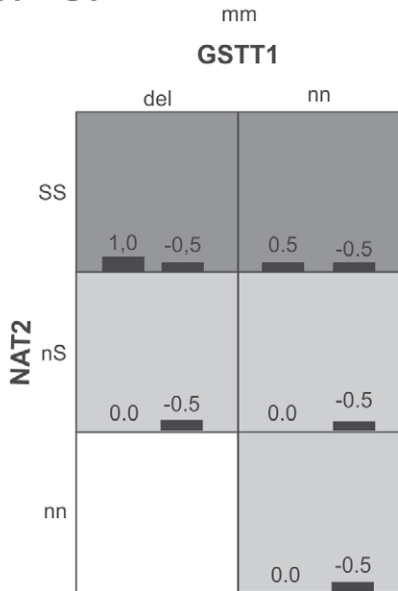
**FIGURA 1.** Asocierea genotipurilor variantelor polimorfe ale genelor *GSTT1*, *NAT2*, *NOS1* și a genotipului homozigot normal *IL-4 -590 C/C*

<sup>2</sup>Programul computerizat GMDR a fost utilizat pentru prelucrarea bazei de date în cadrul proiectului instituțional „Studiul unor factori genotipici cu impact în dezvoltarea și răspândirea maladiilor atopice la copii în funcție de determinanții ecologici“ (2009-2010) al Laboratorului științific de Pediatrie al IMSP Institutul Mamei și Copilului (Chișinău, Republica Moldova).

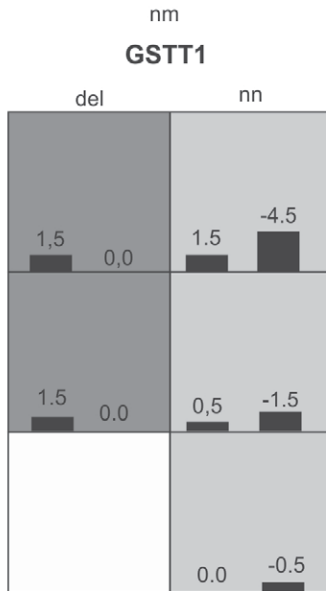
mării statistice a reproductibilității tuturor modelelor testate (*Cross-Validation Consistency – CVC*). Dintre toate variantele posibile de combinații de gene, programul selectează modelul cu nivel veridic de semnificație statistică, cu exactitate maximal echilibrată și eroare predictivă minimală. Exactitatea echilibrată (*Balanced Accuracy, Bal. Acc.*) a modelului corelează cu sensibilitatea și specificitatea metodei (5).

După introducerea datelor despre markerii genetici identificați în grupurile de studiu, poate fi realizată analiza reducerii dimensionalității multifactoriale prin apăsarea butonului de executare „*Run Analysis*“. În studiul nostru am aplicat metoda căutării exhaustive a combinațiilor de genotipuri ale polimorfismelor studiate pentru a identifica asocierile de gene care majorează riscul de dezvoltare al astmului bronșic.

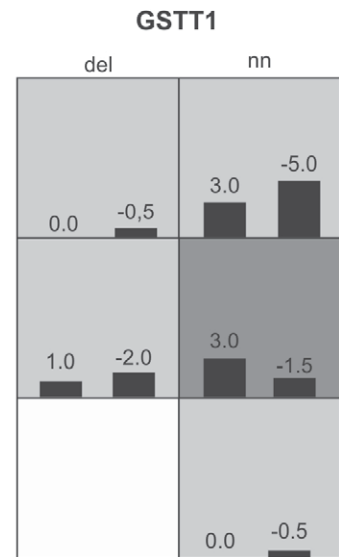
**II4 = CT**



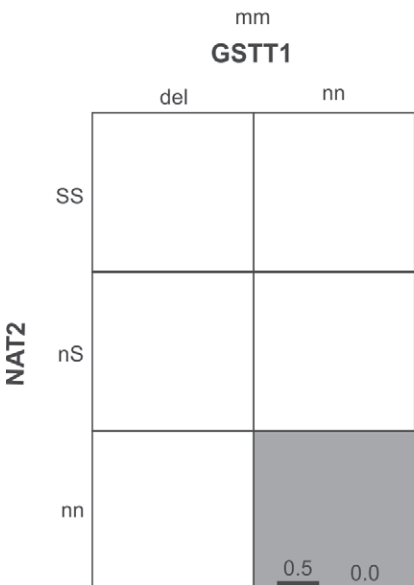
**NOS1**



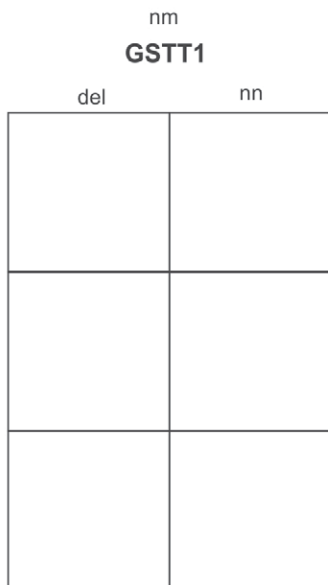
**nn**



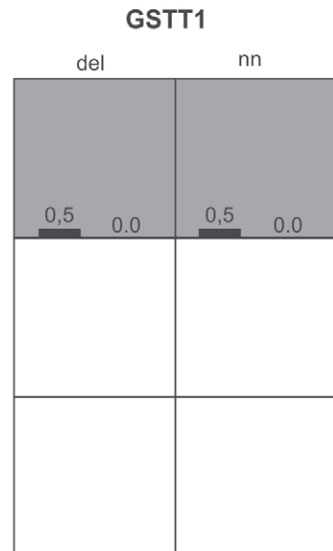
**II4 = TT**



**NOS1**



**nn**



**FIGURA 2.** Asocierea genotipurilor variantelor polimorfe ale genelor *GSTT1*, *NAT2*, *NOS1* cu genotipurile heterozigot *IL-4 -590 C/T* și homozigot mutațional *IL-4 -590 T/T*

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

În studiul relațiilor intergenice au fost incluse polimorfisme ale genelor de metabolizare a xenobioticelor, genelor mediatorilor inflamației imune și a genelor reglatoare a răspunsului inflamator în căile respiratorii. Analiza încărcăturii genetice cu ajutorul programului GMDR a identificat 34 de combinații de genotipuri ale polimorfismelor studiate. Unele din ele sunt asociate riscului majorat de dezvoltare a astmului bronșic (marcate în culoarea gri intensă), altele, marcate de un gri deschis, sunt deopotrivă asociate unui risc scăzut (Fig. 1 și 2).

Totodată, modelul de interacțiune intergenică care a atins semnificație statistică ( $p < 0,05$ ), include polimorfismele doar a patru gene-candidate pentru astmul bronșic: GSTT1, NAT2, NOS1 și IL-4 (Fig. 1). Exactitatea testată a modelului (Bal.Acc.) a constituit 0,67, senzitivitatea (Se) – 0,68, specificitatea (Sp) – 0,65, reproductibilitatea rezultatelor (CV Consistency) – 10/10. Această combinație de genotipuri majorează riscul de dezvoltare al astmului bronșic la copii 3,6 ori (OR = 3,61; CI 1,45-8,99;  $p < 0,01$ ) și include următoarele genotipuri:

- **GSTT1** (GSTT1<sup>+</sup>, genotip funcțional normal);
- **NAT2** (NAT2 \*5-\*/\*5-\*, genotipuri homozigote cu ambele alele funcțional compromise, așa numiți „acetilatori lenți”);
- **NOS1** (NOS1 <12/>12, genotip heterozigot);
- **IL-4** (IL-4 -590 C/C, genotip funcțional normal).

De menționat faptul că din ele, doar două – polimorfismul GSTT1 și IL-4, sunt reprezentate de variantele funcțional normale, iar genotipurile polimorfismului genei NAT2 și NOS1 includ alelele cu funcționalitate redusă.

Aceste rezultate sunt importante, având în vedere rolul funcțional al acestor gene. Astfel, enzima hepatică aril-amin N acetiltransferaza 2 este implicată în detoxifierea unor medicamente și xenobiotice arilamine, inclusiv a diizocianatilor și acizilor utilizați pentru producerea vopselelor, lacurilor, adezivilor, a produselor laminate ș.a. Unele studii indică la faptul că procesul de acetilare poate influența mecanismele de inactivare a excesului de amine biologice, inclusiv histamina, care este responsabilă de simptomatologia reacțiilor alergice (14). Prezența în populație a acetilatorilor rapizi și lenți reflectă variabilitatea determinată genetic a genei NAT2 și în jur de 50% din populațiile albi caucazieni manifestă scăderea activității acestei

enzime (15). Totuși, rolul acestei gene este mult mai complexă, extinzându-se și în dereglarea mecanismelor imune. Astfel, Batra și colab. (16) au studiat asocierea polimorfismelor genei NAT2 și susceptibilitatea la astmul atopic, precum și nivelul IgE serice și a eozinofiliei (16). Autorii au arătat că variantele genice NAT2 sunt implicate în modularea nivelului de IgE și eozinofile, și astfel poate influența evoluția AB. Totodată, N acetiltransferaza 2 convertește serotonina în melatonină, ambii fiind mediatori importanți în patogeneza AB, având efect proinflamator (17). Unele studii arată că pacienții cu AB manifestă niveluri majorate ale serotoninei, care corelează cu severitatea maladiei și, în același timp, ea reduce producerea de citochine Th1 și majorează eliberarea de acetilcolină, recunoscută pentru efectul ei potențial bronhoconstrictor (18). Melatonina, la rândul ei, induce sinteza de citochine proinflamatorii cum sunt IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 și TNF $\alpha$ , iar inducerea proliferării limfocitelor T sensibilizate de antigeni specifici și a răspunsului imun de tip Th2 stimulează în final secreția de IL-4 (19). Gena NOS1, identificată în combinația de gene cu impact nefavorabil în studiul nostru, are la rândul său un rol aparte în mecanismele patogenetice ale astmului bronșic. Astfel, gena NOS1 are abilitatea de a regla expresia genei NOS2, produsul acesteia din urmă fiind oxidul de azot care influențează echilibrul imunologic Th1/Th2 și favorizează răspunsul limfocitar de tip Th2 (20).

## CONCLUZII

1. Metoda descrisă a permis identificarea combinației de polimorfisme genice care au impact în dezvoltarea astmului bronșic la copii și este un suport metodologic important pentru descifrarea mecanismelor moleculare de producere a bolilor multifactoriale.

2. Rezultatele studiului demonstrează faptul că interacțiunile genice interferează la diferite niveluri ale mecanismelor fiziopatologice de dezvoltare ale astmului bronșic la copii. Identificarea asocierii riscului de dezvoltare a maladiei în special cu polimorfismul genelor de metabolizare a xenobioticelor și a genei implicate în producerea oxidului nitric la nivelul mucoasei căilor respiratorii demonstrează faptul că purtătorii genotipurilor funcțional compromise ale acestor gene au o susceptibilitate majorată pentru acțiunea negativă a factorilor mediului ambiant.