

Molekularna dijagnostika kronične opstruktivske plućne bolesti

LADA RUMORA

Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Kronična opstruktivska plućna bolest (KOPB)

GOLD definicija, 2015:

KOPB karakterizirana je trajnim ograničenjem protoka zraka koje je najčešće progresivno i povezano je s pojačanim kroničnim upalnim odgovorom u dišnim putovima i plućima na štetne čestice i plinove. Egzacerbacije i komorbiditeti doprinose težini bolesti.

- pogađa ~150 milijuna ljudi u svijetu
- ~3 milijuna ljudi umire godišnje; predviđa se da će 2030. godine KOPB postati 4. najučestaliji uzročnik smrtnosti
- prevalencija u svijetu u osoba starijih od 40 g. je ~10 %
- često nije dijagnosticirana i terapijski liječena

Spirometrijska klasifikacija KOPB-a

FEV1 = forced expiratory volume in 1 second
FVC = forced vital capacity

- **I. stadij (blaga KOPB)**
blago smanjenje protoka zraka: $FEV1/FVC < 0,70$
 $FEV1 \geq 80$ % od predviđenog
 - **II. stadij (umjerena KOPB)**
umjereno smanjenje protoka zraka: $FEV1/FVC < 0,70$
 $50\% \leq FEV1 < 80$ % od predviđenog
 - **III. stadij (teška KOPB)**
veliko smanjenje protoka zraka: $FEV1/FVC < 0,70$
 $30\% \leq FEV1 < 50$ % od predviđenog
 - **IV. stadij (vrlo teška KOPB)**
vrlo veliko smanjenje protoka zraka: $FEV1/FVC < 0,70$
 $FEV1 < 30$ % od predviđenog
- ireverzibilno ograničenje protoka zraka **FEV1/FVC** $< 0,70$
 - stupanj ograničenja protoka zraka (**FEV1**) koristi se i za dijagnosticiranje bolesti i za odabir terapijskog pristupa u bolesnika s KOPB-om
 - FEV1 je slabo povezan s drugim klinički značajnim karakteristikama bolesti (simptomi, zdravstveni status, fizička sposobnost, učestalost egzacerbacija, prisutnost komorbiditeta, uzrok smrti)

KOPB - pušenje i geni

- pušenje je glavni rizični okolišni čimbenik u etiologiji bolesti
- genska podloga ima važnu ulogu u razvoju bolesti:
 - samo 10-20 % pušača razvije KOPB
 - različiti izražaj bolesti (plućna funkcija i simptomi) za SLIČNU izloženost cigaretnom dimu
 - braća i sestre osoba s teškim KOPB-om: značajno ↑ rizik od opstrukcije protoka zraka (OR=4,7) u odnosu na opću populaciju
 - istraživanja na blizancima: postoji ↑ rizik da će oba jednojajčana blizanca razviti opstrukciju protoka zraka
- kompleksna genetika KOPB-a - brojni geni i okolišni čimbenici te interakcije između gena i okoliša

Dizajn istraživanja - identifikacija genskih čimbenika

- **obiteljska** istraživanja ("family based") - snažnija korelacija između roditelja i djece ILI između braće i sestara nego između bračnih partnera
- istraživanja koja nisu obiteljska ("non-family based"): bolesnici i zdrave osobe ("case - control") ILI populacijska istraživanja - **geni kandidati** koji imaju potencijalnu ulogu u patofiziologiji bolesti; povezanost s bolesti
- "genome-wide association studies" (**GWAS**) - istraživanja **cijeloga genoma** kako bi se utvrdila povezanost genskih varijanti s bolesti

Geni kandidati u KOPB-u

- identificiraju se u patofiziološkim istraživanjima
- istraživanja gena kandidata temeljena na **HIPOTEZI**
- povezani s **RAZVOJEM** ILI sa **ZAŠTITOM** od bolesti
- geni kandidati povezani s glavnim mehanizmima **KOPB-a**:
 - **proteazno-antiproteazna Neravnoteža**
 - **upala**
 - **oksidacijski stres**

1. Proteazno-antiproteazna NERavnoteža

- **AAT** (α -1 antitripsin)

AAT (α -1 antitripsin)

- AAT = **proteazni inhibitor (Pi) = SERPINA1**
(inhibitor serinskih proteaza, skupina A, 1. član)
- >80 % se sintetizira u **jetri** i izlučuje u krv
- AAT osigurava >90 % **protu-proteazne aktivnosti** u krvi čovjeka
(specifičan supstrat: elastaza)
- **novootkrivene uloge**: protu-upalna, protu-infektivna, imunomodulirajuća te tkivno obnavljanje i zaštita (npr. od apoptoze)
- konc. u krvi: ~1-3 g/L; **protein akutne faze** - ↑ konc. i do 4x
- **PAZI**: pod upalnim uvjetima (npr. pušenje) djelotvornost AAT-a može biti umanjena jer ga **oksidansi** i **MMP** inaktiviraju oksidacijski ILI kidanjem omče s aktivnim mjestom
- 80-ih g. sekvenciran **gen** za AAT (kromosom **14q32.1**)
- primjenom suvremenih tehnika **molekularne dijagnostike**:
>120 alelnih varijanti, uključujući >40 rijetkih i "null" varijanti

Dijagnostika nasljednog nedostatka AAT-a

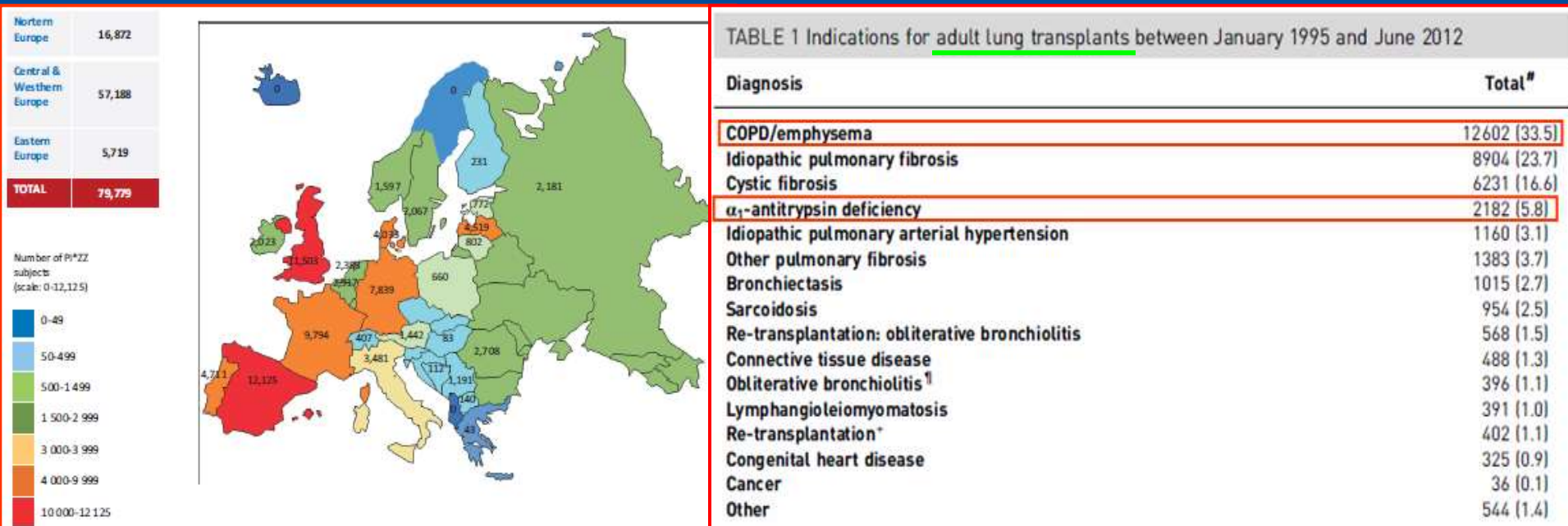
- mjerenje koncentracije AAT-a u krvi
- ukoliko je **snižena** koncentracija AAT-a u krvi:
 - određivanje **fenotipa** - fenotipizacija je trenutno "**zlatni standard**" za detekciju rijetkih varijanti (**OSIM "null"** varijanti!)
 - izoelektrično fokusiranje (IEF)
 - **normalni** AAT se označava s "**M**" (npr. PiMM)
 - druge varijante su manje funkcionalne i označavaju se s A-L i N-Z, ovisno da li su **proksimalno** ili **distalno** od M vrpce
 - određivanje **genotipa** - genotipizacija je efikasnija (npr. kod SS i ZZ fenotipova da se isključi mogućnost "**null**" mutacije)

- **normalni M aleli** prisutni su u 85-90 % osoba
- najrasprostranjeniji deficitni aleli su **S** i **Z**;
rasprostranjenost u bijelaca: 5-10 % za **S** te 1-3 % za **Z**
- serumske koncentracije AAT-a za neke od najučestalijih genotipova (kombinacije M, S i Z alela):
 - Pi***MM**: **100 %** (normalne koncentracije AAT-a u krvi)
 - 5 deficitnih genotipova:
 - Pi*MS: 80 % od normalnog
 - Pi*SS: 60 % od normalnog
 - Pi*MZ: 55-60 % od normalnog
 - Pi*SZ: 40 % od normalnog
 - Pi***ZZ**: 10-15 % - teški manjak AAT-a → 60 % ih razvije **emfizem pluća!**

- visok je udio osoba s nedostatkom AAT-a koje razvijaju **KOPB** ili cirozu (manjina: panikulitis, sistemski vaskulitis i neke druge bolesti)
- ipak, >1/3 ima tek neke blage simptome ili uopće nema nikakvih simptoma tijekom života
- ova **varijabilnost** ukazuje da **nedostatak AAT-a** sam po sebi ne predstavlja bolest, već **MONO**genski poremećaj koji može dovesti do razvoja različitih patoloških stanja ukoliko su prisutni i drugi čimbenici: **okolišni** (npr. pušenje, zagađenje, infekcije respiracijskog sustava) i/ili **genski** (neki drugi geni tj. geni kandidati za KOPB)
- ~1-3 % **bolesnika s KOPB-om** nasljeđuje ovaj nedostatak AAT-a;
preuranjen početak bolesti: **EMFIZEM** pluća se javlja ~**35-45 g.** (najčešće **Pi*ZZ** genotip, rjeđe **Pi*SZ** i **Pi*MZ** te **rijetki** ili "null" genotipovi) → povećani rizik za **KOPB!**

Preporuke za određivanje AAT-a u krvi

- **ATS i ERS:** određivanje AAT-a u krvi za **SVE bolesnike s KOPB-om**
- **GOLD** citira **WHO:** određivanje AAT-a u krvi za bolesnike s KOPB-om koji žive u **područjima s vrlo visokom prevalencijom** nedostatka AAT-a, kao i za **članove njihovih obitelji**
- teški manjak AAT-a uglavnom pogađa **bijelce**, a najveću prevalenciju (1:2000 - 1:4000) ima u nekim dijelovima Europe
- vrlo često je nedostatak AAT-a **NE**dijagnosticiran! (<10 %)



1. Proteazno-antiproteazna NĚravnoteža

- **MMP9** (metaloproteinaza matriksa 9)

Učestalosti genotipova i alela za polimorfizme *mmp9* gena u zdravih osoba (n = 48) i u bolesnika s KOPB-om (n = 137)

	zdravi n (%)	KOPB n (%)	P
<i>mmp9</i> -1562C>T			
CC	36 (75)	106 (77)	0,862
CT	11 (23)	27 (20)	
TT	1 (2)	4 (3)	
C alel	83 (87)	239 (87)	0,987
T alel	13 (14)	35 (13)	
<i>mmp9</i> Q279R			
AA	20 (42)	61 (45)	0,933
AG	21 (44)	58 (42)	
GG	7 (15)	18 (13)	
A alel	61 (64)	180 (66)	0,798
G alel	35 (37)	94 (34)	
<i>mmp9</i> (CA)_n ponavljanja			
SS	16 (33)	43 (31)	0,751
SL	21 (44)	68 (50)	
LL	11 (23)	26 (19)	
S alel	53 (55)	154 (56)	0,960
L alel	43 (45)	120 (44)	

Podatci su prikazani kao broj (n) i udio (%) osoba koje imaju određeni genotip ili alel; statistički testirano pomoću Chi-kvadratnog testa.

• **MMP-9 concentration and *mmp9* gene polymorphisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease (neobjavljeni rezultati)**

Anita Somborac-Bačura, Maja Križanović, Sanja Popović-Grle, Tihana Žanić-Grubišić, Lada Rumora

2. Upala

- **TNF- α** (čimbenik tumorske nekroze α)

Učestalost genotipova i alela za polimorfizam $TNF-\alpha$ gena u zdravih osoba (n = 95) i u bolesnika s KOPB-om (n = 130)

	zdravi n (%)	KOPB n (%)	P
$TNF-\alpha$ +489G/A			
GG	53 (56)	87 (67)	0,182
GA	39 (41)	38 (29)	
AA	3 (3)	5 (4)	
G alel	145 (76)	212 (82)	0,217
A alel	45 (24)	48 (18)	

Podatci su prikazani kao broj (n) i udio (%) osoba koje imaju određeni genotip ili alel; statistički testirano pomoću Chi-kvadratnog testa.

- Association of *hsp70-2* (+1267A/G), *hsp70-hom* (+2437T/C), *HMOX-1* (number of GT repeats) and *TNF-alpha* (+489G/A) polymorphisms with COPD in Croatian population (*Clinical Biochemistry* 2012;45:770-774)

Mirela Matokanović, Lada Rumora, Sanja Popović-Grle, Ivana Čepelak, Ognjen Čulić, Karmela Barišić

3. Oksidacijski stres

- **PON1** (paraoksonaza 1)

Učestalosti genotipova i alela za polimorfizme *pon1* gena u zdravih osoba (n = 44) i u bolesnika s KOPB-om (n = 105)

	zdravi n (%)	KOPB n (%)	P	OR (95% CI)	P*
<i>pon1</i> Q192R					
QQ	38 (86)	74 (70)	0,066		
QR	3 (7)	27 (26)		4,62 (1,32-16,22)	0,057
RR	3 (7)	4 (4)		0,69 (0,16-3,22)	0,631
Q alel	79 (90)	175 (83)	0,211		
R alel	9 (10)	35 (17)		1,76 (0,81-3,83)	0,157
<i>pon1</i> L55M					
LL	26 (59)	46 (44)	0,128		
LM	16 (36)	47 (45)		1,66 (0,79-3,49)	0,182
MM	2 (5)	12 (11)		3,39 (0,70-16,34)	0,128
L alel	68 (77)	139 (66)	0,079		
M alel	20 (23)	71 (34)		1,74 (0,98-3,09)	0,060
<i>pon1</i> -108C>T					
CC	17 (38)	15 (14)	<0,001		
CT	21 (48)	45 (43)		2,43 (1,02-5,78)	0,045
TT	6 (14)	45 (43)		8,50 (2,83-25,51)	<0,001
C alel	55 (63)	75 (36)	<0,001		
T alel	33 (37)	135 (64)		3,00 (1,79-5,02)	<0,001

Podatci su prikazani kao broj (n) i udio (%) osoba koje imaju određeni genotip ili alel; statistički testirano pomoću Chi-kvadratnog testa.

Razlike u učestalosti ispitane su između genotipa QQ i nositelja R alela (QR i RR genotipovi) za Q192R polimorfizam te između genotipa LL i nositelja M alela (LM i MM genotipovi) za L55M polimorfizam.

• Polymorphisms of paraoxonase 1 and paraoxonase 2 genes in patients with chronic obstructive pulmonary disease (neobjavljeni rezultati)

Lada Rumora, Marija Grdić Rajković, Mirela Beriša, Andrea Volarić, Ivana Čepelak, Tihana Žanić Grubišić

Geni kandidati u KOPB-u

- temelje se na trenutnim spoznajama o patofiziologiji bolesti
- slaba PONOVLJIVOST dobivenih rezultata
- često MALI UZORAK (nedovoljan broj ispitanika)
- važnost etničkog porijekla (rasa, nacionalnost)
- zdravi i bolesnici podudarni po dobi, spolu i pušačkom statusu
- standardizacija svih faza istraživanja kako bi se postigla dobra usporedivost rezultata
- važan utjecaj okolišnih čimbenika i drugih gena na ispitivani gen
- mali učinak POJEDINAČNOG gena kod **kompleksnih** bolesti; bolji učinak pojedinačnog gena kod **FENOTIPOVA** bolesti - nisu jasno standardizirani!

GWAS

- 2009. prvi GWAS za KOPB; 5 GWAS-ova (bolesnici i zdravi; ukupno: 20388 bolesnika s KOPB-om i 40791 zdrava osoba)
- utvrđena područja osjetljivosti ("susceptibility regions / loci") koja su statistički značajno povezana s KOPB-om; također su utvrđeni lokusi povezani s plućnom funkcijom, emfizemom i s drugim fenotipovima KOPB-a
- 7 lokusa povećanog rizika za KOPB - **PONOVLJIVOST:**
 - kromosom 15q25: **CHRNA3/CHRNA5/IREB2**
 - kromosom 4q31: **HHIP**
 - kromosom 4q22: **FAM13A**
 - kromosom 19q13
 - kromosom 14q32: **RIN3**
 - kromosom 11q22: **MMP12**
 - kromosom 1q41: **TGFB2**

GWAS = genome-wide association studies

CHRNA3 = nicotinic cholinergic receptor α 3

CHRNA5 = nicotinic cholinergic receptor α 5

IREB2 = iron responsive element binding protein 2

HHIP = hedgehog interacting protein

FAM13A = family with sequence similarity 13, member A

RIN3 = Ras and Rab interactor 3

MMP12 = matrix metalloproteinase 12

TGFB2 = transforming growth factor β 2

GWAS

- nije poznata **FUNKCIJA** svih gena u područjima osjetljivosti
- istraživanja **oslobođena od hipoteze** ("hypothesis-free")
- informacije dobivene ovim tehnikama omogućavaju identifikaciju **MNOGIH UOBIČAJENIH** genskih varijanti te se istražuje njihova povezanost s bolesti ili s nekom fenotipskom značajkom
- uglavnom uključuju varijante s **MAF-om >5%**
- potrebno je razumijevanje njihovih **individualnih i kombiniranih** (**gen i gen** te **gen i okoliš**, npr. pušenje) djelovanja na KOPB i na specifične KOPB fenotipove

SNP = single nucleotide polymorphism

MAF = minor allele frequency

common SNP = MAF >5 %

uncommon SNP = MAF 1-5 %

rare SNP = MAF <1 %

Sekvenciranje

- sve veća dostupnost sekvenciranja cijeloga genoma (DNA), cijeloga transkriptoma (RNA) ili samo cijeloga eksona → usporedba zdravih osoba i bolesnika s KOPB-om; **skupo** - cijene će padati ("next generation sequencing")
- informacije dobivene ovim tehnikama omogućiti će identifikaciju **NEuobičajenih** i **rijetkih** genskih varijanti
- neke od tih **NEuobičajenih** i/ili **rijetkih** genskih varijanti mogu imati važnu ulogu u razvoju bolesti, otpornosti naspram pušenju i dr.

SNP = single nucleotide polymorphism

MAF = minor allele frequency

common SNP = MAF >5 %

uncommon SNP = MAF 1-5 %

rare SNP = MAF <1 %

Istraživanja genske ekspresije cijeloga genoma ("genome-wide")

- ispitivanja genske ekspresije na mikročipovima: procjena transkripcijske aktivnosti cijeloga genoma → pronalazak i proučavanje uloge **aktivnih bioloških putova i mreža** u patogenezi bolesti ("pathway and network based methods")
- korelacija genske ekspresije s plućnom funkcijom (FEV1 i FEV1/FVC) → potencijalni **genski biomarkeri plućne funkcije**
- longitudinalno praćenje promjena genske ekspresije kao posljedice farmakološkog tretiranja bolesti → potencijalno **procjenjivanje djelovanja terapije u KOPB-u**
- za razliku od SNP-ova, važna je **tkivna specifičnost!**
 - parenhim pluća, tkivo dišnih putova i periferna krv - djelomična **USPOREDIVOST** ekspresijskih profila pluća i krvi

Integracija genomskih istraživanja

- tri su generacije genomskih istraživanja:
 - **1. generacija** → istraživanje povezanosti između genskih varijanti i bolesti;
podatci dobiveni korištenjem samo 1 "omics" tehnologije;
većina dosadašnjih istraživanja - **prošlost i sadašnjost**
 - **2. generacija** → istraživanje povezanosti između podataka dobivenih dvjema različitim "omics" tehnologijama i bolesti;
početak ove faze - **sadašnjost i budućnost**
 - **3. generacija** → istraživanje povezanosti između podataka dobivenih brojnim (više od 2!) različitim "omics" tehnologijama i bolesti kao cjeline, ali također uzimajući u obzir **podskupine / fenotipove** bolesti - **budućnost**

Potreban je kontinuirani razvoj statističkih i mrežnih ("network") metoda te novih računalnih alata za analiziranje podataka!

Za kraj ...

- na temelju molekularnih mehanizama patogeneze bolesti trebalo bi napraviti novu klasifikaciju KOPB-a →

specifične i uske molekularne podskupine (fenotipovi) bolesnika u svrhu razvoja novih ciljanih preventivskih, dijagnostičkih i/ili terapijskih pristupa = individualizirana medicina



Hvala!!!

