

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

**IMPLICAREA POLIMORFISMELOR UNOR CITOKINE
ÎN OSTEOARTRITĂ**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF.UNIV.DR. MIHAI CRUCE**

**STUDENT-DOCTORAND:
EMILIAN ȘTEFAN**

**Craiova
2014**

Introducere

Osteoartrita (OA), cea mai întâlnită afecțiune muculo-scheletală, se definește ca o boală progresivă și invalidantă, fiind o boală cronică de lungă durată, care produce subțierea cartilajului în articulații, pacienții acuzând rigiditate, durere, și apariția deficiențelor de mișcare. (1)

Sunt două tipuri de osteoartrită: primară și secundară.

Osteoartrita primară este o boală cronică degenerativă care este influențată, dar nu cauzată de, îmbătrânire. Există indicii clare că factorul genetic este implicat în aproximativ 60% din toate cazurile de OA. (2, 3)

Osteoartrita secundară tinde să apară destul de devreme în viață, având o cauză specifică, de obicei o injurie, diabet sau obezitate. Deși are etiologie diferită față de forma primară, atât simptomele cât și patologia în sine sunt identice. (2, 3)

Osteoartrita ca și bolile musculo-scheletale este foarte des întâlnită în populația generală. (4)

În total 10-15% din populația de peste 60 de ani prezintă într-un grad variabil, osteoartrită (5). Printre statele membre ale uniunii europene prevalența osteoartritei variază de la 2,8% în România, până la 18,3% în Ungaria. (6)

În contextul actual studiul nostru își propune să evalueze asocierea dintre susceptibilitatea sau rezistența la osteoartrită și frecvența cu care apar polimorfismele unor gene ce codifică citokine.

Cuvinte cheie: osteoartrită, citokine, polimorfism mononucleotidic, genotip, susceptibilitate.

I. STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. Epidemiologie și factori de risc.

În acest capitol se prezintă date recente legate de incidența și prevalența OA atât la nivel european cât și la nivelul țării noastre. Mai mult chiar se face o prognoză de viitor asupra evoluției acestei afecțiuni, astfel, creșterea procentului de persoane vârstnice în populația totală va determina o creștere semnificativă a prevalenței bolilor cronice, iar dintre bolile musculo-scheletale a osteoartritei (7). Conform unor studii recente, numărul persoanelor de peste 60 de ani se va tripla în următorii 40 de ani, ceea ce înseamnă că până în anul 2050 se va depăși procentul de 20% (aproximativ 130 milioane) din populația totală. Se estimează că din acest procent, 15% (însemnând 40 de milioane) din indivizi vor prezenta osteoartrită simptomatică, iar o treime din aceștia vor prezenta invaliditate accentuată. (5)

Tot în acest capitol sunt prezentați factori de risc asociați cu această afecțiune și anume: vârsta, obezitatea, deformările articulare, sexul.

CAPITOLUL 2. HOMEOSTAZIA CARTILAJULUI ARTICULAR LA SUBIECȚII SĂNĂTOȘI ȘI LA PACIENȚII CU OSTEOARTRITĂ

Cartilajul articular adult este un țesut avascular compus în special dintr-o matrice specializată formată din colagen, proteoglicani și proteine noncolagenice, matrice în care condrocitele reprezintă o componentă celulară unică.

Numeroasele studii efectuate *in vivo* sau *in vitro* de-a lungul ultimelor două decenii au confirmat faptul că aceste condrocite articulare sunt apte să răspundă la leziunea mecanică, instabilitatea articulară datorată factorilor genetici precum și la stimuli biologici precum citokinele și factorii de creștere și diferențiere, care la rândul lor contribuie la modificările structurale la nivelul matricei cartilajinoase înconjurătoare. (8)

Apariția semnalizării intacelulare indusă de stres, a citokinelor catabolice și a factorului de necroză tumorală alpha (TNF- α), dar și alți mediatori ai inflamației produși de celule sinoviale și condrocite, induc activarea enzimelor de degradare, metaloproteinazele matriceale (MMPs) și familiile de ADAMTS. Producții de degradare ai matricei pot regla prin mecanisme de feedback aceste evenimente celulare. (9)

Studiul nostru se bazează pe studiul unuia dintre factorii de risc pentru osteoartrită și anume factorul genetic. În acest sens am evaluat gradul de asociere între prezența polymorfismelor unor citokine, cum ar fi IL-1B, IL-1RN, IL-4R, IL-8, IL-10, dar și a factorului de necroză tumorală alpha (TNF- α), și susceptibilitatea sau, dimpotrivă, rezistența la apariția osteoartritei.

II. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Capitolul 3. MATERIALE ȘI METODE

Includerea pacienților în studiu

Pentru realizarea acestui proiect s-au luat în studiu 2 loturi de pacienți de la Spitalul CF2 din București: un lot de subiecți diagnosticați cu osteoartrită și un lot control. Toți subiecții au fost informații despre scopul studiului și au semnat un consimțământ informat înainte de includerea în studiu.

Recoltarea probelor și a materialului biologic

Atât în cazul pacienților din lotul cu osteoartrită, cât și a celor din lotul control materialul biologic a fost reprezentat de probe de sânge (3 ml de sânge venos recoltat pe EDTA și menținut la 4°C până în momentul extracției de ADN).

Extracție ADN

Pentru izolarea ADN-ului genomic din probele de sânge recoltate pe EDTA și menținut la 4°C am utilizat kit-ul Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI).

Această metodă urmărește patru etape principale pentru a obține rezultatul final. Protocolul începe cu liza celulelor și a nucleilor acestora (aceasta presupune în primă fază liza hematiilor, urmată de cea a leucocitelor și a nucleilor acestora). Următoarea etapă este opțională și presupune digestia ARN-ului cu ajutorul enzimelor numite RN-aze. În continuare, proteinele eliberate din celule sunt îndepărtate prin precipitare cu ajutorul unei soluții saline, acestea precipită proteinele, în timp ce în soluția rămâne ADN-ul genomic. Ulterior prin precipitare în izopropanol ADN-ul este concentrat și desalzinat. Ultima etapă este una de spălare și deshidratare în etanol, urmând ca la final ADN-ul să fie rehidratat.

Depistarea polimorfismelor genetice folosind tehnica Real – Time PCR

Analizele genetice pentru identificarea polimorfismelor genelor luate în studiu au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Genetică Moleculară al UMF Craiova ce dispune de echipamentul necesar efectuării acestor teste.

Real time PCR cu sonde Taqman este o tehnică modernă în care spre deosebire de metoda convențională, fragmentul amplificat (ampliconul) este vizualizat pe măsură ce procesul de amplificare înaintază. Această urmărire în “timp real” a

procesului de amplificare este posibilă prin marcarea cu molecule fluorescente a primerilor, probelor sau ampliconului.

Prelucrarea statistică a datelor

Cu ajutorul programelor Microsoft®Office Excel® 2007 și Genex Pro 4.4.2.308© vom realiza corelații și asocieri între parametrii studiați și rezultatele obținute în urma reacțiilor Real-Time PCR.

Pentru analiza descriptivă a datelor s-a utilizat programul Microsoft Access 2007. Cu ajutorul acestui program s-a realizat baza de date din care s-au extras parametrii ce au fost prelucrați statistic.

Pentru caracterizarea seriilor de valori din studiu s-au utilizat indicatori statistici, între care media, deviația standard, etc.

Capitolul 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

În acest studiu au fost implicați 392 de subiecți, dintre care 90 au fost diagnosticați cu osteoartrită (OA), iar restul de 302 au reprezentat lotul de control cu subiecți sănătoși.

Polimorfismul IL-1B -31T>C

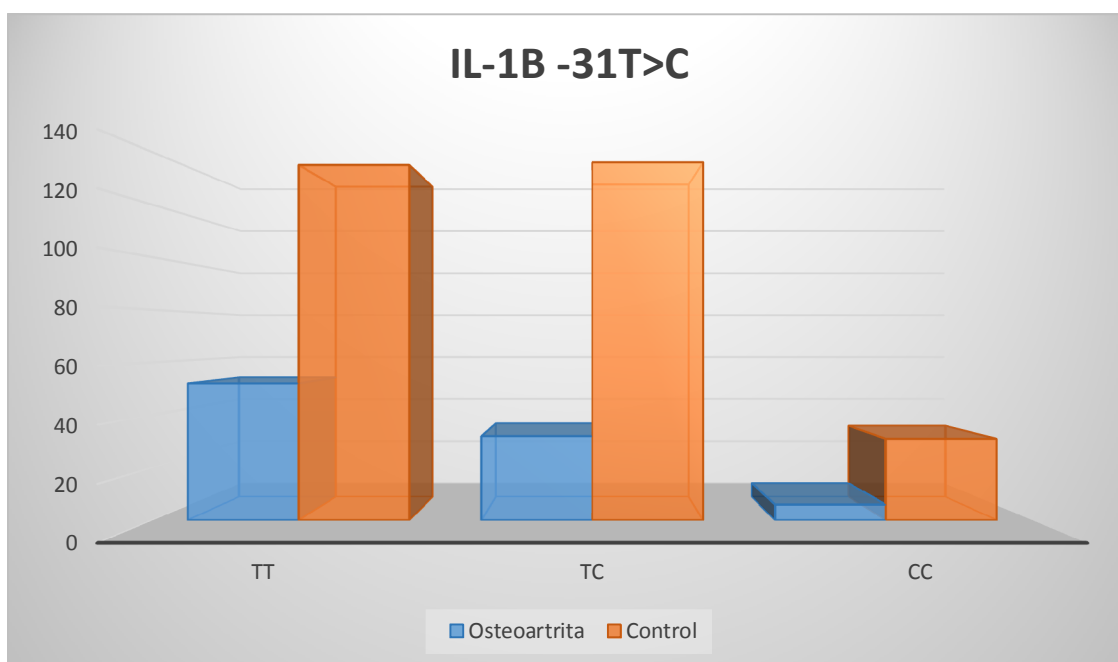


Figura. 1: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul IL-1B -31T>C

În acest studiu am constatat că polimorfismul IL-1B -31T>C, a cărui distribuție pe loturi și genotipuri este radată în Figura. 1, nu este asociat cu un risc crescut de osteoartrită, nici pentru analiza statistică pentru lotul general al pacienților cu osteoartrită, dar nici în urma analizei stratificate pe baza localizării afecțiunii. De asemenea, se mai observă că genotipurile TT și TC reprezintă aproape 90% din variante pentru lotul de control, în timp ce în lotul cu osteoartrită se apropie de 94%. Pe de altă parte am observat că, purtătorii alelei C reprezintă aproximativ

40% din pacienții afectați de osteoartrită, în timp ce pentru lotul control acest procent trece de 50%.

Polimorfismul IL1-RN +2018T>C

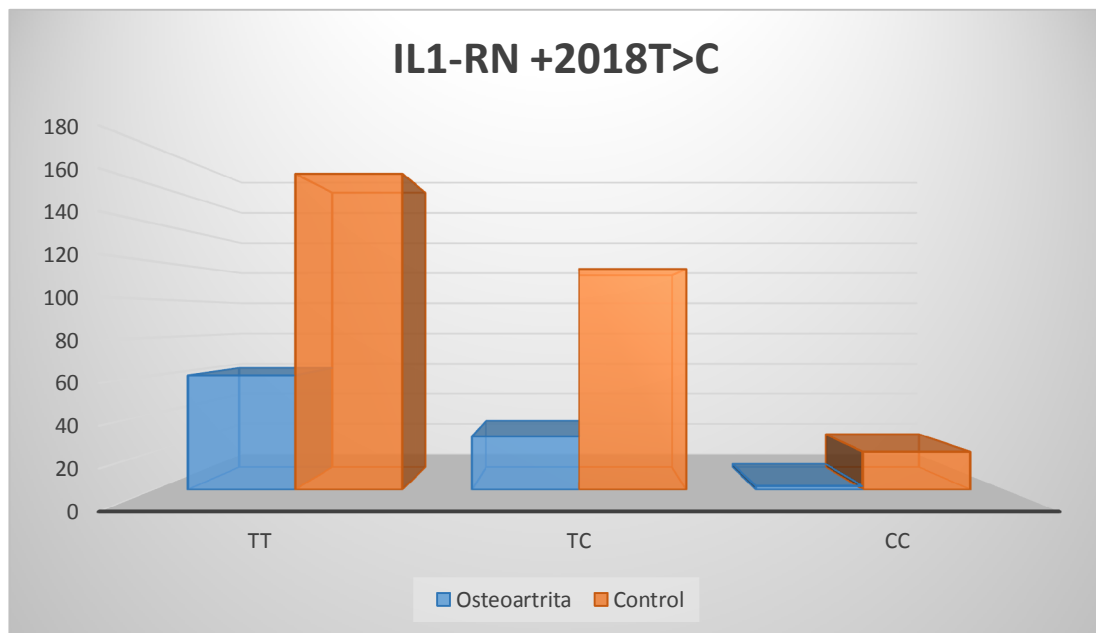


Figura. 2: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul IL1-RN +2018T>C

În figura 2 sunt expuse sugestiv rezultatele obținute comparând distribuția pe genotipuri atât a persoanelor cu osteoartrită, cât și a celor din lotul control.

Prin analiza statistică comparativă a genotipului de referință (TT), cu celelalte două genotipuri (TC, CC), a rezultat faptul că polimorfismul IL1-RN +2018T>C nu este asociat cu un risc crescut de osteoartrită. De asemenea, se mai observă că genotipurile TT și TC reprezintă peste 90% din variante pentru lotul de control, în timp ce în lotul cu osteoartrită se apropie de 98%. Pe de altă parte, purtătorii alelei C reprezintă aproximativ 33% dintre pacienții afectați de osteoartrită, în timp ce pentru lotul control acest procent trece de 45%. În model dominant, purtătorii alelei C (genotipurile TC+CC) par a fi mai protejați pentru dezvoltarea osteoartritei

Polimorfismul IL-1B -511C>T

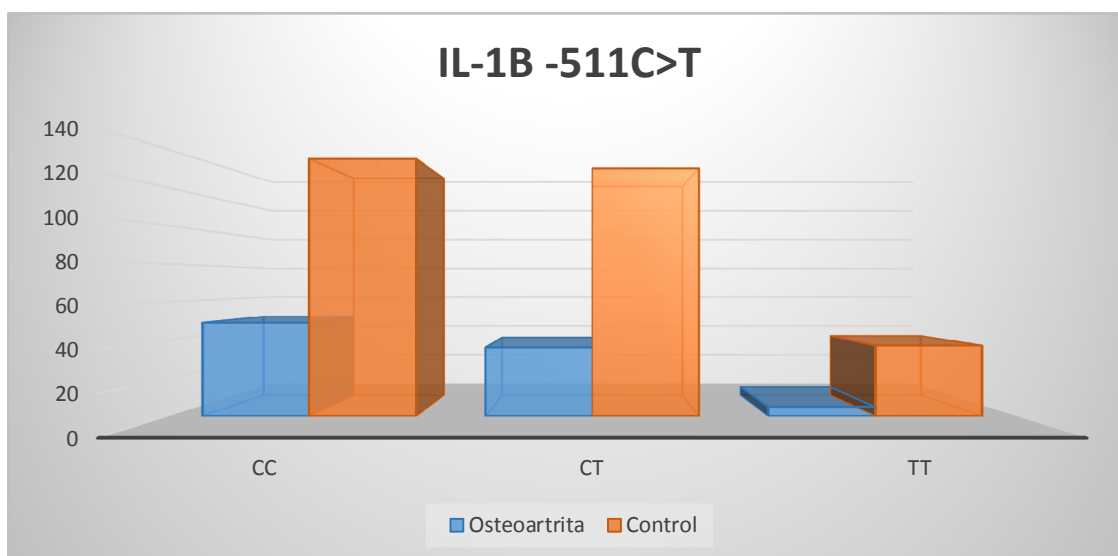


Figura. 3: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul IL-1B -511C>T

Prin analiza comparativă a genotipurilor (consultând bazele de date internaționale a fost luat ca referință genotipul -CC) și a datelor statistice obținute, a rezultat faptul că polimorfismul IL-1B -511C>T (a cărui distribuție pe genotipuri și loturi este prezentată în figura 3) nu este asociat cu un risc crescut de osteoartrită. De asemenea se mai observă că genotipurile TT și CT reprezintă aproape 90% din variante pentru lotul de control, în timp ce în lotul cu osteoartrită depășește 90%. Pe de altă parte, purtătorii alelei T reprezintă aproximativ 45% dintre subiecții afectați de osteoartrită, în timp ce pentru lotul de control acest procent trece de 55%.

La analiza stratificată pe baza localizării, se observă faptul că deși pentru polimorfismul IL-1B -511C>T nu există nici o asociere cu creșterea susceptibilității sau a rezistenței la osteoartrită, în model dominant purtătorii alelei T (genotipurile CT+TT), par a fi mai protejați pentru dezvoltarea osteoartritei cu această localizare .

Polimorfismul IL-4R -3223C>T

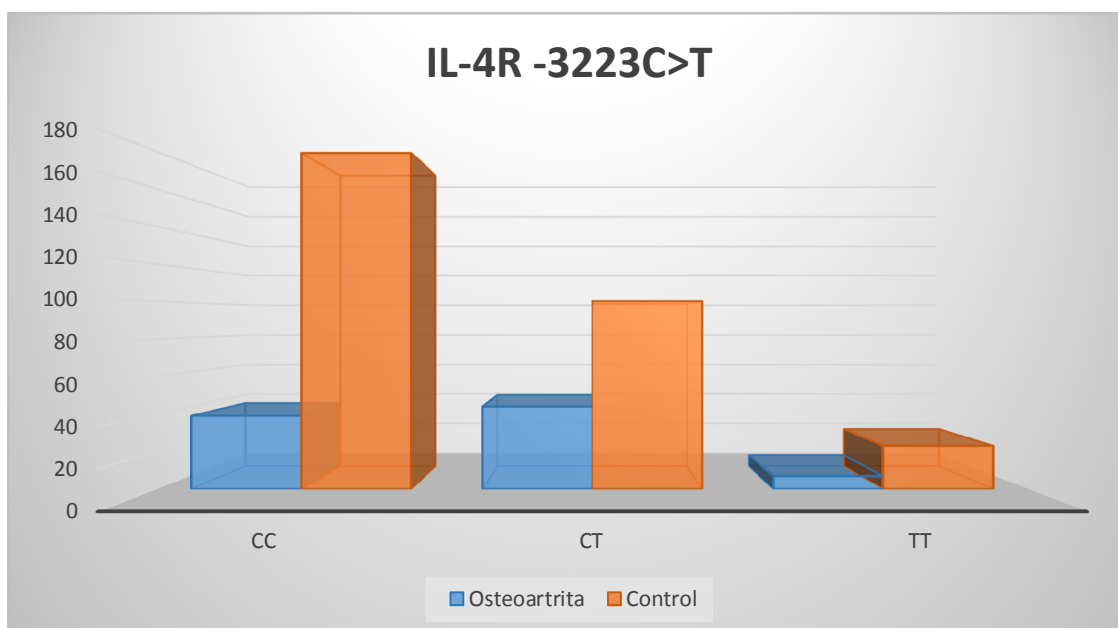


Figura. 4: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul IL-4R -3223C>T

Din analiza comparativă a genotipurilor (prezente în figura 4) și a datelor statistice obținute, a rezultat că **pentru polimorfismul IL-4R -3223C>T există o asociere puternică cu OA pentru purtătorii genotipului CT (heterozigot).**

Comparând frecvența genotipului CT cu frecvența genotipului CC (genotip de referință pentru polimorfismul IL-4R -3223C>T) am constatat că prezența genotipului CT este asociat cu un risc de două ori mai mare de a dezvolta boala. În model dominant purtătorii de alela T (genotipurile CT+TT) au un risc mai crescut, de aproximativ o dată și jumătate de ori mai mare, de a dezvolta osteoartrită.

Prin analiza stratificată a acestui polimorfism am obținut însă rezultate și mai interesante. Astfel **la nivelul articulației femuro – tibiale, pentru polimorfismul IL-4R -3223C>T, există o asociere foarte puternică pentru purtătorii genotipului CT (heterozigot) de a dezvolta osteoartrită, în timp ce acest**

polimorfismul nu este asociat cu apariția afecțiunii pentru localizare la nivelul articulației coxo – femurale.

Polimorfismul IL-8 -251T>A

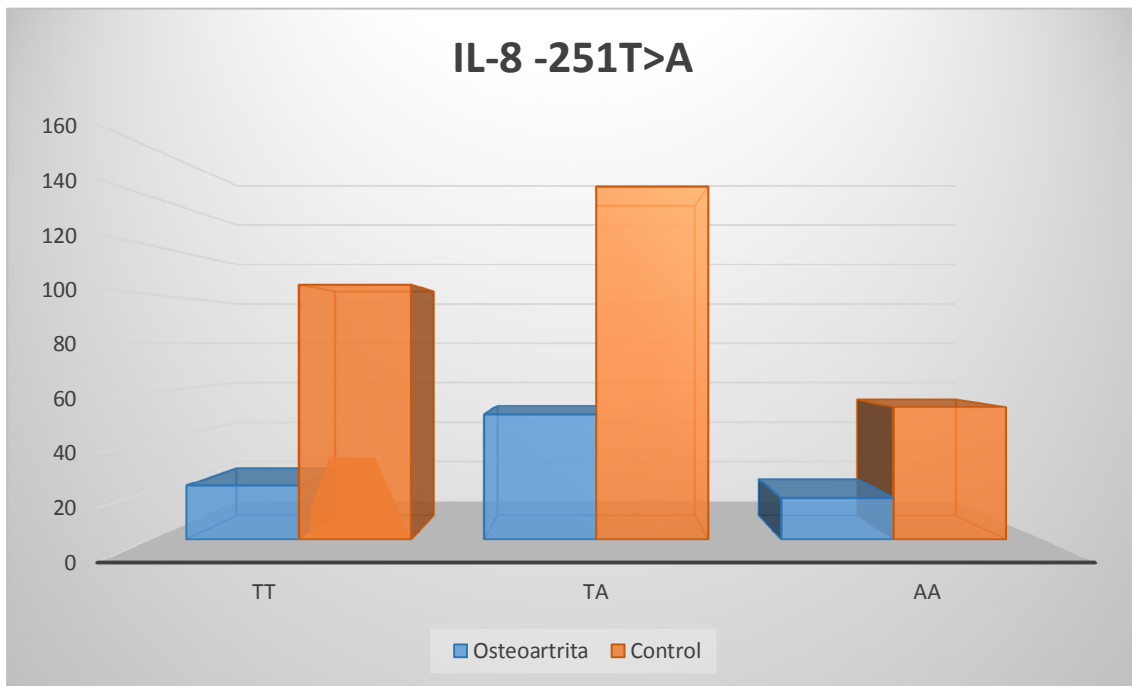


Figura. 5: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul IL-8 -251T>A

În studiul nostru după cum se poate vedea și în figura 5 care ilustrează repartizarea pe genotipuri și loturi am observat că polimorfismul IL-8 -251T>A nu este asociat cu un risc crescut de osteoartrită. De asemenea se mai observă că genotipurile TT și TA reprezintă aproape 82% din variante pentru lotul de control, având o valoare apropiată și pentru lotul cu osteoartrită. În altă ordine de idei purtătorii alelei A reprezintă aproximativ 76% dintre subiecții afectați de osteoartrită, în timp ce pentru lotul control acest procent se apropie de 66%.

Polimorfismul IL-10 -1082A>G

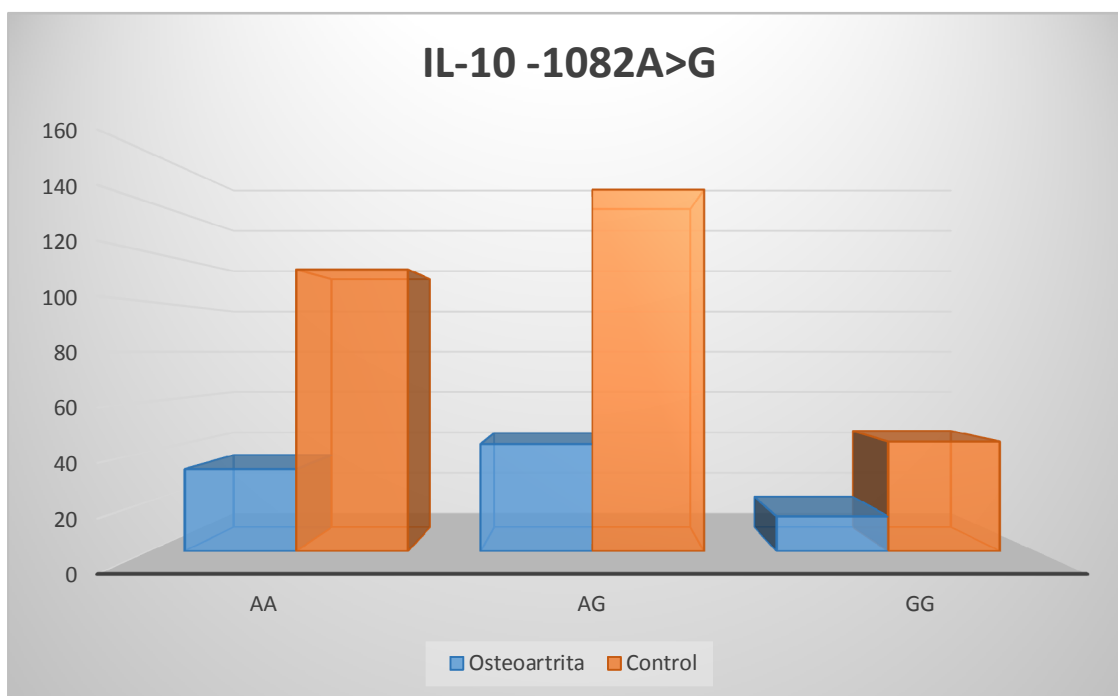


Figura. 6: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul IL-10 -1082A>G

Prin analiza comparativă pe care am realizat-o în acest studiu (figura 6), a rezultat faptul că polimorfismul IL-10 -1082A>G nu este asociat cu un risc crescut de osteoartrită. De asemenea se mai observă că genotipurile AA și AG reprezintă aproximativ 85% din variante pentru lotul de control, având o valoare apropiată și pentru lotul cu osteoartrită. În altă ordine de idei, purtătorii de alela G reprezintă aproximativ 63% pentru cei afectați de osteoartrită, iar pentru lotul control valoarea este de asemenea apropiată.

Polimorfismul TNF-A -308G>A

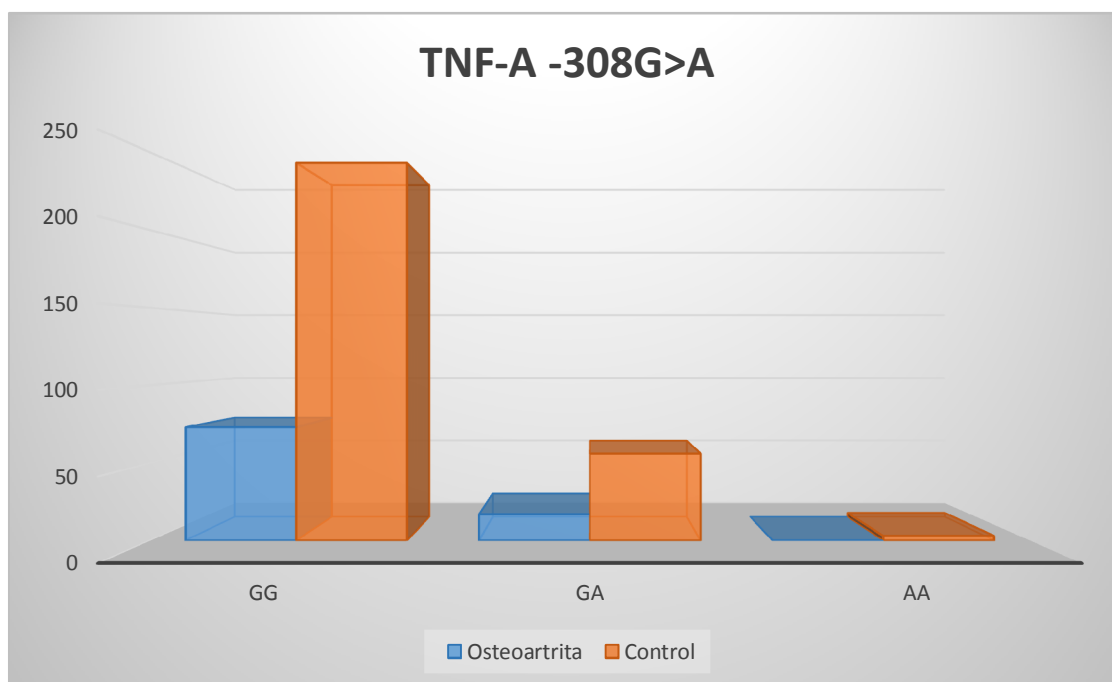


Figura. 7: Frecvența genotipurilor pentru polimorfismul TNF-A -308G>A

Prin analiza comparativă a genotipurilor, după cum se vede și în figura 7, dar și a datelor statistice obținute, a rezultat faptul că polimorfismul TNF-A -308G>A nu este asociat cu un risc crescut de osteoartrită. De asemenea se mai observă că genotipurile AG și AA au valori apropiate pentru ambele loturi, cu mențiunea că nu am găsit nici o persoană cu osteoartrită purtătoare a genotipului AA, și foarte puține persoane (numai 3) în rândul persoanelor din lotul control.

În cea mai mare parte, rezultatele pe care le-am obținut, privind implicarea polimorfismelor unor citokine în osteoartrită, sunt în conformitate cu studiile efectuate de alți cercetători, publicate în reviste internaționale. (10-16)

CAPITOLUL 6. CONCLUZII

1. Am constatat că pentru polimorfismul IL-4R -3223C>T, prezența genotipului CT este asociată cu un risc de două ori mai mare de a dezvolta osteoartrita. În model dominant, purtătorii alelei T (genotipurile CT+TT) au un risc de aproximativ o dată și jumătate de ori mai mare de a dezvolta boala.
2. În urma analizei stratificate a lotului persoanelor afectate de osteoartrită pe baza localizării acestei afecțiuni, am observat ca polimorfismul IL-4R -3223C>T este foarte înalt asociat cu OA, având un risc de două ori și jumătate mai mare de a dezvolta osteoartrită cu localizare la nivelul articulației femuro – tibiale.
3. Pentru prima oară, în literatura de specialitate, am constatat că purtătorii alelei T pentru polimorfismul IL-1B -511C>T prezintă un risc mai scăzut la dezvoltarea osteoartritei. Altfel spus prezența alelei T în acest polimorfism oferă protecție împotriva afecțiunii. Bine înțeles că acest rezultat va trebui confirmat de cercetările viitoare.
4. Cu excepția celor menționate mai sus, rezultatele obținute pentru toate celelalte polimorfisme nu au fost corelate statistic cu riscul pacienților de a dezvolta osteoartrită.
5. O ultimă concluzie ar fi aceea că deși lotul de studiu nu este foarte numeros, el respectă echilibrul statistic Hardy-Weinberg. De asemenea, majoritatea rezultatelor și concluziilor studiului nostru este în concordanță în mare parte cu literatura de specialitate. Bine înțeles că, în perspectivă, aceste rezultate trebuie să fie verificate, confirmate sau corectate, dacă este cazul, prin lărgirea lotului de studiu și prin abordarea de noi metode și tehnici.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Haq I, Murphy E, Dacre J. Osteoarthritis. Postgraduate Medical Journal. 2003;79(933):377-83.
2. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. Lancet. 2011;377(9783):2115-26.
3. Hochberg MC, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J, et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. Arthritis care & research. 2012;64(4):465-74.
4. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. The Lancet. 2013;380(9859):2197-223.
5. Lim K, Lau CS. Perception is everything: OA is exciting. International journal of rheumatic diseases. 2011;14(2):111-2.
6. Organization WH. Chronic Diseases and Health Promotion: Chronic Rheumatic Conditions.(2011). 2012.
7. Fejer R, Ruhe A. What is the prevalence of musculoskeletal problems in the elderly population in developed countries? A systematic critical literature review. Chiropr Man Therap. 2012;20(1):31-.
8. Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. Journal of cellular physiology. 2007;213(3):626-34.
9. Goldring MB, Marcu KB. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. Arthritis Res Ther. 2009;11(3):224.

10. Jotanovic Z, Etokebe GE, Mihelic R, Kaarvatn MH, Mulac-Jericevic B, Tijanac T, et al. IL1B -511(G>A) and IL1RN (VNTR) allelic polymorphisms and susceptibility to knee osteoarthritis in Croatian population. *Rheumatology international*. 2012;32(7):2135-41.
11. Ni H, Shi D, Dai J, Qin J, Xu Y, Zhu L, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-1beta (-511C/T) and interleukin-1 receptor antagonist (86-bpVNTR) in susceptibility to knee osteoarthritis in a Chinese Han population. *Rheumatology international*. 2009;29(11):1301-5.
12. Moxley G, Meulenbelt I, Chapman K, van Duijn CM, Slagboom PE, Neale MC, et al. Interleukin-1 region meta-analysis with osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2010;18(2):200-7.
13. Kerkhof HJ, Doherty M, Arden NK, Abramson SB, Attur M, Bos SD, et al. Large-scale meta-analysis of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms on risk of radiographic hip and knee osteoarthritis and severity of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2011;19(3):265-71.
14. Attur M, Wang HY, Kraus VB, Bukowski JF, Aziz N, Krasnokutsky S, et al. Radiographic severity of knee osteoarthritis is conditional on interleukin 1 receptor antagonist gene variations. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(5):856-61.
15. Lv C, Xu X, Wang J, Zhang Z, Zhang D, Guo C, et al. Combined effect of cytokine gene polymorphisms on end-stage knee osteoarthritis from Chinese Han population. *Rheumatology international*. 2012;32(11):3625-9.

16. Sezgin M, Barlas IO, Ankarali HC, Altintas ZM, Turkmen E, Gokdogan T, et al. Tumour necrosis factor alpha -308G/A gene polymorphism: lack of association with knee osteoarthritis in a Turkish population. *Clinical and experimental rheumatology*. 2008;26(5):763-8.