

*Opšti pregledi/  
General reviews*

SKLONOST KA AKUTNOJ UPALI SREDNJEG  
UHA KOD DECE - UDRUŽENOST SA  
POLIMORFIZMIMA GENA

OTITIS MEDIA PRONE CHILDREN - ASSOCI-  
ATION WITH GENE POLYMORPHISMS

**Correspondence to:**

Prim. dr Olivera Miljanović, mr sci. med.  
Specijalista pedijatrije i medicinske i  
kliničke genetike

Centar za medicinsku genetiku i  
imunologiju - Klinički Centar Crne Gore,  
Podgorica, Ljubljanska bb, Podgorica,  
Crna Gora

Mob. tel: + 382 69 990 980

Telefon: + 382 20 243 726

Faks: + 382 20 225 284

E-mail (posao): olja.miljanovic@kccg.me

E-mail (kuca): oljam@t-com.me

Olivera Miljanović<sup>1</sup>, Danilo Vojvodić<sup>2</sup>, Dragan Likić<sup>3</sup>,  
Zvonko Magić<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centar za medicinsku genetiku i imunologiju, Klinički Centar Crne  
Gore, Podgorica, Crna Gora,

<sup>2</sup> Institut za medicinska istraživanja Vojnomedicinska Akademija,  
Beograd, Srbija

<sup>3</sup> Institut za bolesti djece, Klinički Centar Crne Gore, Podgorica, Crna  
Gora

*Abstract*

*Ključne reči*

akutni otitis medija, deca, citokini,  
polimorfizam gena

*Key words*

acute otitis media, children,  
cytokines, gene polymorphism

Due to high percent of children (up to 19%) susceptible to recurrent acute otitis media (AOM), it present serious health problem, especially having in mind long-term sequelae. Susceptibility to AOM is multifactorial and includes environmental, microbial, host factors, and because AOM susceptibility occurs in families it is presumed that genetic factors of host could play a major role. Immune response of the host have important role on the course of disease and that is one of the reasons why the most studied genes in the AOM prone children are cytokine genes. Beside expression of these genes, single nucleotide polymorphisms draws a great attention because they can significantly influence gene activity. Until now, different populations were studied and obtained results have shown association between frequencies of certain cytokine gene polymorphisms and susceptibility to AOM. Further research of influence of genetic factors on the AOM should enable early detection of children susceptible to AOM and proper treatment in order to prevent long-term sequelae and early childhood development derangements.

*UVOD*

Sekvenciranje humanog genoma koje je završeno 2003 godine i zvanično je označilo početak nove ere u medicini, često nazivane postgenomska medicina ili praktičnije molekularna medicina (1). Projekat sekvenciranja humanog genoma dao je odgovor na neka osnovna pitanja u vezi sa brojem i redosledom nukleotida i približno je uspeo da odredi broj gena (skoro 24 hiljade) u humanom genomu. Otkriće relativno malog broja gena predstavljao je jedan od neočekivanih rezultata ovog projekta. Naime, samo desetak godina ranije procenjavano je da taj broj iznosi između 40 i 60 hiljada gena. Podatak o broju gena u našem genomu je još jedanput pokazao da je kompleksnost organizma uslovljena ne samo brojem gena, već i različitim mehanizmima njihove regulacije (transkripcioni faktori, obrada RNK, alternativno isecanje RNK transkripta, nekodirajuće male RNK, epigenetski mehanizmi, postranslaciona modifikacija) i sinhronizacijom njihove aktivnosti u ćeliji i organizmu o čemu se u ovom trenutku malo zna (2).

Jedan od neočekivanih rezultata ovog projekta odnosi se na broj polimorfizama u humanom genomu (alelska forma koja se nalazi kod više od 1% populacije). Umesto očekivanih nekoliko desetina hiljada, uočeno je postojanje 3 do 4 miliona polimorfizama. Veliki broj SNP je nametnuo pitanje da li postoji i kakav je značaj ovako velikog broja polimorfizama? Neka od osnovnih pitanja su: da li su povezani sa sklonošću ka određenim monogenским i poligenским bolestima, u kojoj meri mogu da utiču na odgovor na primenjenu terapiju? Utisak je bio da će se odgovor na ova pitanja teško dati zbog velikog broja polimorfizama i njihovog rasporeda u intronima, egzonima, regulatornim sekvencama gena, ali često i u delovima genoma koji nisu povezani sa funkcijom gena (3). Međutim, poznavanje molekularne patogeneze mnogobrojnih bolesti usmerilo je pažnju istraživača na određene gene čiji su produkti povezani sa nastankom i razvojem bolesti. Tako naprimer, prilikom izučavanja polimorfizma gena kod malignih tumora izučavani su geni čiji produkti učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa, proliferacije, programirane ćelijske smrti i popravci oštećene

DNK (4). U sepsi su izučavani polimorfizmi gena čiji produkti učestvuju u regulaciji zapaljenskog odgovora (5); u farmakogenetici izučavaju se geni enzima koji učestvuju u metabolizmu leka ili su target leka, dok se u AOM najviše izučavaju polimorfizmi gena za citokine (6).

### AKUTNA UPALA SREDNJEG UHA

Akutna upala srednjeg uha (akutni otitis medija-AOM) jedna je od najučestalijih infekcija kod dece (7). Među decom koja imaju akutnu infekciju srednjeg uha izdvaja se grupa dece koja do sedme godine života ima ponavljane epizode AOM (tri ili više epizoda AOM u periodu od 6 meseci, četiri ili više AOM periodu od 12 meseci, šest ili više AOM u toku 6 godina života, plasirane ventilacione cevčice). Ova deca se svrstavaju u grupu dece sklone AOM (8) i predstavljaju značajan medicinski problem, kako sa aspekta lečenja ponavljanih infekcija tako i zbog verovatnoće poremećaja razvoja u ranom detinjstvu i razvoja komplikacija sa oštećenjem sluha. U zavisnosti od populacije moguće je da čak do 19% dece ima četiri i više epizoda AOM godišnje, ili šest i više epizoda AOM do navršene sedme godine života (9).

AOM se javlja kao rezultat interakcije naslednih faktora deteta, izloženosti mikroorganizmima i provokirajućim faktorima iz životne sredine. U etiologiji ovog oboljenja do sada su dobro definisani uzročnici infekcije i prvocirajući faktori sredine, kao što su: pasivna izloženost duvanskom dimu, izostanak ili nedovoljna dužina dojenja, boravak u kolektivnom smještaju - vrtiću, prisustvo atopijskih manifestacija. Porodično opterećenje AOM, takođe je važan predisponirajući faktor za razvoj ovog oboljenja kod dece.

Na tok i ishod AOM, osim primenjene terapije, kritično utiče adekvatan imunski odgovor organizma (9, 10). Protektivni imunski odgovor na virusnu i bakterijsku infekciju rezultat je sinhronizovane i uravnotežene aktivnosti ćelijskih i humoralnih činilaca imunskog sistema. Medijatori imunске reakcije-citokini, ključni su faktori regulacije imunskog odgovora na infekciju. Inflammatory odgovor domaćina može u značajnoj meri da utiče na kliničke znake i simptome tokom infekcije srednjeg uha (11, 12).

Bakterije i virusi indukuju produkciju citokina i drugih medijatora zapaljenja na mestu infekcije (13, 14). Brojni inflamatorni medijatori, interleukini, faktor nekroze tumora, histamini, leukotrieni, prostaglandini detektovani su u uzorcima tečnosti srednjeg uha i nazalnog sekreta kod dece sa AOM (15, 16, 17). Lokalno produkovani ili oslobođeni bakterijski i virusni produkti vezujući se za brojne Toll receptore domaćinovitih ćelija, pokreću produkciju proinflammatory citokina (IL1, IL6) i hemokina (IL8), koja korelira sa težinom simptoma tokom infekcije (18, 19). Ovi produkti pokreću dalje efektorske mehanizme lokalnog imunskog odgovora. Njihova neadekvatna produkcija sa jedne strane, može biti uzrok i niza neželjenih reakcija, kao što je povećan kontraktilni odgovor na bronspastične agense. Sa druge strane, neadekvatna citokinska regulacija može značajno izmeniti sledstveni specifični imunski odgovor. Naime, kontrola lokalne infekcije virusima zavisna je od aktivacije specifičnih citotoksičnih CD8 T limfocita (20). Izmijenjena ravnoteža između TH1 i TH2 T limfocita važan je faktor u regulaciji specifičnog imunskog odgovora na infekciju rinovirusima. Slab, nedovoljno lokalno ispoljen odgovor posredovan TH1 T limfocitima udružen je sa dužim

lokalnim preživljavanjem virusa i težom kliničkom slikom. Ukoliko postoji predominacija TH2 lokalnog imunskog odgovora ispoljava se preosetljivost sluznice gornjih respiratornih puteva, praćena povećanom kontraktilnošću glatkih mišića bronhija, često udruženih sa astmom (20).

### POLIMORFIZAM GENA ZA CITOKINE I AOM

Značajni rezultati ipitivanja povezanosti genetskih faktora sa AOM dobijeni su u različitim studijama na blizancima (21). Pokazano je da su nasledni faktori prisutni kod 57% akutnih infekcija uha i čak kod 72% hroničnih infekcija uha (22, 23). Korelacija naslednih faktora sa rekurentnim AOM je izraženija kod jednojajčanih blizanaca i iznosi 65% do 71%, dok je ona kod dvojajčanih blizanaca između 25% i 34%. U vezi sa ovim nalazima pažnja istraživača prvobitno je bila usmerena na izučavanje gena za citokine, zbog saznanja da bi polimorfizam gena za odgovarajuće citokine, koji pospešuju upalu ili deluju antiinflamatorno, mogao da ima poseban značaj u lokalnom imunskom odgovoru. Ovakvo izmenjena regulacija protektivnog odgovora na infekciju mogla bi značajno da utiče na tok i ishod AOM.

Različiti genotipovi citokinskih gena mogu da se manifestuju kroz izmenjenu ekspresiju gena (smanjena ili povećana ekspresija gena) ili pak kroz produkciju izmenjenog genskog produkta zbog zamene jedne amino kiseline. Pokazano je da su varijacije u imunskom odgovoru povezane sa ekspresijom gena za IL4, IL6 i IL10 uzrokovane polimorfizmima u ovim genima (24, 25). Izmijenjena funkcija uzrokovana zamenu jedne amino-kiseline utvrđena je za polimorfizam gena za TLR4 i poli-(ADP-riboza) polimerazu (PARP). Alel PARP 762A je udružen sa smanjenom aktivnošću enzima nakon izlaganja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koja se inače dešava tokom inflamacije (26).

TNF- spada u grupu citokina koji indukuju inflamatorni odgovor i stimuliše produkciju imunoglobulina i mucina u nazofaringealnom sekretu, što je važan odbrambeni mehanizam tokom infekcija. U različitim studijama izučavana je povezanost polimorfizma gena za TNF- sa njegovom produkcijom tokom inflamacije i infekcije (uključujući AOM) i dobijeni su kontradiktorni rezultati (27). TNF-308 AA/GG polimorfizam povezan je sa teškom bakterijskom sepsom kod novorođenčadi (28). Predpostavlja se da ekspresija TNF- nije regulisana samo jednim polimorfizmom, već da je verovatnije regulisana i drugim polimorfizmima u ovom genu kao i sa polimorfizmima gena koji su povezani sa TNF-. Različiti patogeni dovode do različite produkcije citokina tako da je teško precizno odgovoriti u kojoj meri je pojedinačni polimorfizam u jednom genu povezan sa odgovorom na infekciju.

Genotip prozapaljenskog citokina IL6 -174G/G u promotorskoj sekvenci povezan je sa povećanom produkcijom IL6 u odnosu na C/C genotip. Homozigoti za IL6-174C alel, ređe su podložni respiratornim infekcijama, dok su nosioci IL6-174G alela podložniji AOM (29). Ipak, ne može se očekivati da je ova udruženost uvek prisutna, zbog toga što je regulacija ekspresije IL6 kompleksnija i zavisi i od drugih polimorfizama u promotoru gena. Takođe, na ekspresiju IL6 utiče TNF- i interakcija polimorfizama ova dva i ostalih gena kodeterminiše fenotip. Genotip IL10-1082A/A, antizapaljenskog citokina dovodi do smanjene produkcije IL10.

Sličan trend je uočen i za IL10-819 C/C genotip koji pripada istom haplotipu (30). Povećana ekspresija gena za TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6 i IL10 utvrđena je na eksperimentalnom modelu AOM kod pacova (31).

Grupa autora iz Finske (6) upoređivala je polimorfizme gena za TNF -308, IL1 -889, IL1 -511, IL1 -3953 i IL1 receptor antagonist kod 20 finških familija sa sklonošću AOM (63 pojedinca) prema 400 nasumično odabranih zdravih dobrovoljnih davalaca krvi. Oni nisu pronašli udruženost polimorfizma ispitivanih gena sa rekurentnim AOM za razliku od drugih studija. Ovakav nalaz moguće je delimično objasniti dominantnom naslednom komponentom u grupi ispitanika (članovi porodica) sa AOM koji je multifaktorsko oboljenje te je teško očekivati da će se naći Mendelov tip nasleđivanja. Takođe, kontrolna grupa sastojala se od odraslih osoba među kojima se verovatno nalaze i oni koji su imali sklonoost ka AOM u dečjem uzrastu, a potrebno je imati u vidu i činjenicu da postoje razlike između populacija. Rezultati ove i drugih studija ukazuju na potrebu da se prilikom istraživanja uticaja genetskih polimorfizama na sklonoost ka AOM mora voditi računa o razlikama između populacija, a takođe je istraživanjem potrebno obuhvatiti veći broj gena za citokine i druge gene čiji produkti učestvuju u odgovoru organizma na inflamaciju (32). Na kraju dobijene rezultate trebalo bi tumačiti u korelaciji sa poznatim predisponirajućim (hereditet, atopijske manifestacije) i provocirajućim faktorima (ponavljane respiratorne infekcije, izostanak ili nedovoljna dužina dojenja, boravak u kolektivu, izloženost duvanskom dimu) ka AOM.

## ZAKLJUČAK

Uvođenje najnovijih saznanja i savremenih tehnika molekularne genetike u kliničku praksu jedan je od najvećih izazova moderne medicine. Do sada, najviše podataka u literaturi iz ove oblasti odnosi se na povezanost genetskih alteracija sa nastankom i razvojem kancera, zbog već prihvaćenog stava da je kancer, na molekularnom nivou bolesti gena. Međutim, istraživanja se nisu zaustavila na kanceru, već su se proširila i na druge poligeniski regulisane bolesti kao što je hipertenzija, šećerna bolest, ateroskleroza, reumatoidni artritis, multipla skleroza. Istraživanja su dalje usmerena i na bolesti, kao što je AOM, čiji su se tok i ishod ranije povezivali pre svega za vrstu infektivnog agensa. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju na značajnu povezanost polimorfizma gena za medijatore imunskog odgovora (citokine) sa sklonošću dece u ispitivanim populacijama ka AOM. Bolje razumevanje molekularnih mehanizama regulacije imunskog odgovora na infekciju uha i njihova povezanost sa naslednom predispozicijom omogućice pravovremenu identifikaciju dece sa izrazitom sklonošću AOM. Na taj način biće omogućena primena preventivnih mera prema ponovljenim epizodama AOM, kao i prevencija teških i udaljenih funkcionalnih oštećenja sluha i poremećaja u ranom razvoju deteta, nastalih kao posledica učestalih upala srednjeg uha u detinjstvu. Međutim, imajući u vidu da različiti genotipovi interaguju između sebe i sa mnogobrojnim faktorima spoljašnje sredine i domaćina, neophodna su dodatna funkcionalna i genetska istraživanja da bi se pravilno procenio doprinos pojedinih genotipova na sklonoost ka rekurentnom AOM.

## Apstrakt

Sklonoost ka ponavljanim upalama srednjeg uha (AOM), ima čak do 19% dece, u zavisnosti od ispitivane populacije. Imajući u vidu dugotrajne sekvele, sklonoost ka AOM predstavlja ozbiljan zdravstveni problem. Sklonoost ka AOM je multifaktorski determinisana i javlja se kao rezultat interakcije naslednih faktora deteta, izloženosti mikroorganizmima i provocirajućim faktorima iz životne sredine. Uočena učestala pojava AOM u porodicama ukazuje da genetski faktori mogu imati značajnu ulogu u razvoju sklonoosti ka AOM. Na tok i ishod AOM kritično utiče adekvatan imunski odgovor organizma i to je jedan od razloga zbog čega su najčešće izučavani geni za citokine kod dece sklone AOM. Osim ekspresije ovih gena, polimorfizam gena na nivou jednog nukleotida je takođe izučavan zbog toga što može značajno da utiče na aktivnost gena. Do sada su ispitivane različite populacije dece i dobijeni rezultati pokazali su da postoji udruženost između frekvencije određenih polimorfizama u genima za citokine sa sklonošću ka AOM. Dalja istraživanja uticaja genetskih faktora na AOM, trebalo bi da omoguće ranu detekciju dece sklone ka AOM i adekvatan tretman i prevenciju teških i udaljenih funkcionalnih oštećenja sluha i poremećaja u ranom razvoju deteta.

## LITERATURA

1. Richards EJ, Hawley SR. The Human Genome. 2nd ed. Burlington USA: Elsevier Academic Press; 2005.
2. Satiriou C, Piccart JM. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nature Rev Cancer*. 2007; 7: 545-553
3. Magić Z, Radulović S, Branković-Magić M. cDNA microarrays: identification of gene signatures and their application in clinical practice. *J BUON*. 2007; 12 (Suppl 1): 39-44.
4. Yeatman TJ. The future of cancer management: translation the genome, transcriptome and proteome. *Ann Surg Oncol*. 2003; 10: 7-11.
5. De Maio A, Torres MB, Reeves RH. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation and sepsis. *Shock*. 2005; 23: 11-17.
6. Joki-Erkkilä VP, Puhakka H, Hurme M. Cytokine gene polymorphism in recurrent acute otitis media. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002; 128: 17-20.
7. Rovers MM, Schilder AG, Zielhuis GA, Rosefeld RM. Otitis media. *Lancet*. 2004; 363: 465-473.
8. Alho OP, Koivu M, Sorri M. What is an "otitis prone" child? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1991; 21: 201-209.
9. Patel JA, Nair S, Revai K, Grady J, Saeed K, Matalon R, et al. Association of proinflammatory cytokine gene polymorphism with susceptibility to otitis media. *Pediatrics*. 2006; 118: 2273-2279.
10. Emonts M, Veenhoven RH, Wiertsema SP, Houwing-Duistermaat JJ, Walraven V, de Groot R, et al. Genetic polymorphism in immune response genes TNFA, IL6, IL10, and TLR4 are associated with recurrent acute otitis media. *Pediatrics*. 2007; 120:814-823.
11. Heikken T, Chonmaitree T. Importance of respiratory viruses in acute otitis media. *Clin Microb Rev*. 2003; 16: 230-241.
12. Saez-Llorenz X. Pathogenesis of acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 1994; 13: 1035-1038.
13. Niemela M, Uhari M, Jounio-Ervasti K, Loutonen K, Alho OP, Vierimaa E. Lack of specific symptomatology in children with acute otitis media. *Pediatr Infect Dis J*. 1994; 13: 765-768.
14. Zhu Z, Tang W, Ray A, Wu Y, Einarsson O, Landry RM, et al. Rhino virus stimulation of interleukin 6 in vivo and in vitro. *J Clin Invest*. 1996; 97: 421-430.
15. Barzilai A, Dekel B, Dagan R, Passwell JH, Leibovitch E. Cytokine analysis of middle ear effusions during acute otitis media: Significant reduction in tumor necrosis factor alpha concentrations correlates with bacterial eradication. *Pediatr Infect Dis J*. 1999; 18: 301-303.
16. Leibovitch E, Dagan R, Laver JH, Piglansky L, Raiz S, Abboud MR, et al. Interleukin 8 in middle ear fluid during acute otitis media: correlation with aetiology and bacterial eradication. *Arch Dis Child*. 2000; 82: 165-168.
17. Lindberg KR, Rynnel-DagooB, Sundquist KG. Cytokines in nasopharyngeal secretion: evidence for defective IL-1beta production in children with recurrent episodes of acute otitis media. *Clin Exp Immunol*. 1994; 97: 396-402.
18. Greenberg SB. Respiratory consequences of rhinovirus infection. *Arch Intern Med*. 2003; 163: 278-284.
19. Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PW. Host genetics determinants of neisseria meningitidis infections. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3: 565-577.
20. Gern JE, Busse WW. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12: 9-18.
21. Kvaerner KJ, Tams K, Harris JR, Magnus P. Distribution and heritability of recurrent ear infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997; 106: 624-632
22. Casselbrant ML, Mandel EM. Genetic Susceptibility to otitis media. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005; 5: 1-4
23. Rovers M, Haggard M, Gannon M, Koeppen-Schomerus G, Plomin R. Heritability of symptom domains in otitis media: a longitudinal study of 1373 twin pairs. *Am J Epidemiol*. 2002; 155: 958-964.
24. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. 1997; 24: 1-8.
25. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998; 102: 1369-1376.
26. Lockett KL, Hall MC, Xu J, et al. The ADPRT V762A genetic variant contributes to prostate cancer susceptibility and deficient enzyme function. *Cancer Res*. 2004; 64: 6344-6348.
27. Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? *Genes Immun*. 2004; 5: 315-329.
28. Heidberg CL, Adcock K, Martin J, Loggins J, Kruger TE, Baier RJ. Tumor necrosis factor-308 polymorphism associated with increased sepsis mortality in ventilated very low birth weight infants. *Pediatric Infect Dis*. 2004; 23: 424-428.
29. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000; 275: 18138-18144.
30. Craweley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5'flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42: 1101-1108.
31. Long JP, Tong HH, Shannon PA, DeMaria TF. Differential expression of cytokine genes and inducible nitric oxide synthase induced by opacity phenotype variants of streptococcus pneumoniae during acute otitis media in the rat. *Infect Immun*. 2003; 71: 5531-5540.
32. Waterer GW, Wunderink RG. Science review: Genetic variability in the systemic inflammatory response. *Crit Care*. 2003; 7: 308-314.