

PREVALENȚA VARIANTELOR ALELICE *GLU298ASP* ALE GENEI *NOS3* LA PACIENȚII CU INFARCT MIOCARDIC

THE PREVALENCE OF ALLELIC VARIANTS *GLU298ASP* OF *NOS3* GENE IN PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION

Rezumat

Introducere. Sunt bine studiate funcțiile vasodilatatoare și antiaterosclerotică ale monoxidului de azot (NO). În ultimul deceniu gena sintetazei NO tip 3 (*NOS3*, endotelială) este cercetată în calitate de posibilă genă-candidată pentru bolile cardiovasculare. Câteva lucrări științifice au publicat date despre asocierea genotipului Asp/Asp-*NOS3* cu un risc mai înalt pentru cardiopatia ischemică și infarctul miocardic [9,10,11,12,13,14].

Obiectivul lucrării l-a constituit evaluarea prevalenței variantelor alelice *Glu298Asp* ale genei *NOS3* la pacienții cu infarct miocardic, pentru stabilirea valorii ei de pronostic.

Material și metode. Lotul de bază l-

au format 164 pacienți cu infarct miocardic vechi, confirmat prin ECG și EcoCG; lotul martor a constat din 80 donatori fără maladii cardiovasculare. **Analizele genetice** au identificat cele trei variante alelice ale genei *NOS3*, utilizând PCR după metoda standard.

Rezultate și discuții. S-a înregistrat o incidență statistic semnificativ mai înaltă a genotipului Asp/Asp la persoanele cu infarct miocardic vechi (16,5%), comparativ cu persoanele fără maladii cardiovasculare (8,75%; $P < .05$; OR=2,02).

Concluzii. Cercetarea prezentă demonstrează o asociere a variantei alelice Asp/Asp a genei *NOS3* cu un risc înalt pentru infarctul miocardic, fapt care cere studii în continuare.

¹Andrei ICHIM***, ¹Valeriu ISTRATI****, ¹Diana MANEA***, ³Nicolae BARBACAR*****, ¹Raisa HOTINEANU***, ²Victor POPESCU**, ⁴Vladimir GURA*

¹Catedra Medicină Internă-Semiologie USMF "N. Testemițanu"

²Laboratorul de Genetică USMF "N. Testemițanu"

³Institutul de Genetică AȘ RM

⁴SCR, secția diagnostic angiografic

*- medic-angiografist

**-doctor în biologie

***- doctor în medicină, conferențiar universitar

****-doctor habilitat în medicină, profesor universitar

*****-doctor habilitat în biologie, profesor universitar

Summary

Background. The vasodilative and antiatherosclerotic functions of nitric oxide (NO) are very good explored. Last decade NO synthase gene type 3 (*NOS3*, endothelial) is explored as a candidate gene for cardiovascular diseases. Some studies have published data concerning the association of Asp/Asp-*NOS3* genotype with an increased risk of ischemic heart disease (IHD) and myocardial infarction (MI). **The aim of this study** was to evaluate the incidence of allelic variants *Glu298 Asp* of *NOS3* gene for establishing its prognostic value.

Material and methods. The main group included 164 patients with old MI confirmed by coronaroangiography, ECG and EcoCG; the control group consisted of 80 donors without cardiovascular diseases. Genetic analyses have identified the three allelic variants of *NOS3* gene, using RCR according to the standard method.

Results and discussions. Was appreciated a statistically significant higher incidence of Asp/Asp genotype among the persons with an old myocardial infarction (16,5%) versus individuals without cardiovascular diseases (8,75%; $P < .05$; OR=2,02).

Conclusions. The present study proved an association of the allelic variant Asp/Asp of *NOS3* gene with a high risk for MI, which requires further explorations.

Introducere

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate și de morbiditate în lumea civilizată. La baza majorității bolilor cardiovasculare stau ateroscleroza și complicațiile sale. Evaluarea funcției și a rolului patului vascular în inițierea și în promovarea acestui proces are o importanță clinică majoră.

În 1980, Furchgott și Zawadzki au demonstrat rolul esențial pe care îl are endotelul în vasodilatarea produsă de acetilcolină, revoluționând fiziologia cardiovasculară [1]. Ulterior, studii diferite privind acest "organ" activ demonstrează, că disfuncția celulelor endoteliale constituie cheia în apariția și în progresarea bolilor cardiovasculare, iar ameliorarea acesteia reprezintă o țintă terapeutică.

Endotelul normal, un organ autocrin, paracrin și endocrin, reglează homeostaza vasculară prin eliberarea unor substanțe cu rol vasodilatator, cum ar fi oxidul nitric (NO), prostaciclina sau factorul hiperpolarizant derivat din endotelium (EDHF) și a altora

cu rol vasoconstrictor, respectiv endotelina-1, angiotensina II și anionii superoxid, noradrenalina. Cel mai important rol aparține oxidului nitric. NO are proprietăți antiaterogene, inhibând agregarea și adeziunea plachetară, proliferarea celulelor musculare netede, permeabilitatea vasculară și procesele inflamatorii [2].

Factorii de risc cardiovasculari tradiționali promovează ateroscleroza prin inducerea *disfuncției endoteliale*. Disfuncția endotelială reprezintă scăderea sintezei de NO și un dezechilibru între factorii de relaxare și cei de contracție endotelială. S-a observat că acest fenomen, privit ca disfuncție vasomotorică, apare înaintea constituirii structurale a aterosclerozei și este un factor esențial în progresia acesteia. Fenomenul este explicat prin creșterea permeabilității celulelor endoteliale disfuncționale pentru particulele de LDL-colesterol, urmat de oxidarea acestora în intima arterială. În consecință, sunt eliberate o serie de fosfolipide care activează procesele inflamatorii și trombogenice, ca și eliberarea factorilor de creștere, stimulându-se astfel proliferarea celulelor

musculare netede și a producerii de colagen în exces, cu progresia plăcii de aterosclerose^[3].

Diverse studii demonstrează rolul esențial jucat de disfuncția endotelială în fiziopatologia bolilor cardiovasculare. Astfel, în stadiul I al hipertensiunii arteriale esențiale, aproximativ 60% dintre pacienți prezintă la biopsia subcutană gluteală vasodilatare inadecvată^[4]. Același fenomen a fost descris și în cazul DZ tip 1 sau 2, în boala coronariană, în boala arterială periferică sau în insuficiența renală^[5,6]. Disfuncția endotelială poate fi relevantă la subiecții asimptomatici, dar cu risc pentru boala cardiovasculară, demonstrându-se astfel rolul acesteia în diagnosticul aterosclerozei subclinice, în evaluarea pronosticului cardiovascular pe termen mediu sau lung și în alegerea unei conduite terapeutice optime^[7,8].

Sunt bine cunoscuți în ziua de azi factorii de risc pentru bolile cardiovasculare: *vârsta, stresul, sexul bărbătesc, fumatul, sedentarismul, colesterolul total sporit, LDL-colesterol crescut, HDL-colesterol scăzut, boala ischemică în anamneză familială, hipertensiunea arterială, diabetul zaharat, sindromul metabolic, obezitatea, homocisteina mărită.*

În ultimul deceniu s-a completat lista lor cu factori de risc genetici, printre care sunt în proces de studiu unele variante genetice ale monoxidului de azot (NO). Este binecunoscută funcția vasodilatatoare și antiaterosclerotică a NO. Dintre cele trei forme de NO sintetizate, care produc NO - NOS1 (neuronală), NOS2 (inducibilă) și NOS3 (endotelială), ultima este implicată în reglarea tonusului vascular. Gena NOS3 este considerată gena-candidată pentru bolile cardiovasculare. Sunt descrise 10 variante alelice ale genei NOS3; prevalența lor variază în diferite grupuri etnice, de aceea sunt necesare studii în acest domeniu în mai multe țări. Este raportat că genotipul Glu298 Asp se asociază cu nivelul crescut de NO în organism^[13]. Câteva lucrări științifice au publicat date despre asocierea genotipului Glu298Asp-NOS3 cu bolile cardiovasculare^[9,10,11,12,13,14].

Obiectivul prezentei lucrări l-a constituit evaluarea incidenței variantelor alelice Glu298Asp ale genei NOS3 la pacienții cu infarct miocardic pentru stabilirea valorii ei de pronostic.

Material și metode

Lotul investigat l-a constituit 164 pacienți cu istoric de infarct miocardic (141 bărbați și 23 femei) cu o vârstă medie de 59,31±0,98 ani, care s-au aflat sub observație în secțiile Spitalului Clinic Militar Central, ale Spitalului Clinic Feroviar Central st. Chișinău, ale Spitalului „Sfânta Treime”, dintre care la 90 s-a efectuat coronaroangiografie în condițiile Spitalului Clinic Republican. Lotul martor a fost format din 80 donatori (60 bărbați, 20 femei) fără maladii cardiovasculare, diabet zaharat sau hipertensiune arterială, cu o vârstă medie de 56,30 ± 1,37 ani. Vârsta medie în loturile investigate nu varia semnificativ. Toate persoanele incluse în studiu au semnat un acord informativ de colaborare.

Pacienții cu infarct miocardic vechi (IMV) și persoanele din lotul martor au fost supuși examenului medical complex: interview-ere cu completarea unei anchete, analogice chestionarului CINDI, elaborat de OMS; examinare clinică și investigații paraclinice: electrocardiografie, ecocardiografie, teste de laborator biochimice și generale.

Chestionarul OMS CINDI include ancheta Rose, datele generale personale, evaluarea factorilor de risc pentru cardiopatia ischemică. CINDI (Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention) este un program, elaborat de OMS și

promovat de Oficiul Regional European al OMS în vederea prevenirii maladiilor cronice.

Diagnosticul de cardiopatie ischemică cu IMV a fost confirmat prin aortocoronarografie, prin prezența undei Q patologice în mai mult de 2 derivații pe traseul ECG și prin Ecocardiografie.

Analizele genetice au permis identificarea celor trei variante alelice Glu298Asp (genotipurii) ale genei NOS3 - Glu/Glu; Asp/Asp; Glu/Asp.

ADN genomic a fost extras din probele de sânge prin metode standart^[16].

Identificarea genotipurilor genei NOS3 la persoanele investigate s-a efectuat prin amplificarea exonului 7 al genei NOS3, utilizând metoda PCR, cu primerii 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3'(sense) și 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3'(antisense), urmată de digestie cu restrictaza *MboI* pentru 16 ore la t-37°C. În prezența T-ului la nivelul nucleotidului 894, care corespunde cu Asp298, produsul PCR de 206-bp este separat în două fragmente - de 119 bp și 87 bp. Produsele procesului de digestie au fost separate prin electroforeză în gel de agaroză 1,5% și vizualizate prin fixarea cu etidium bromide.

Prelucrarea statistică a rezultatelor studiului a fost efectuată cu utilizarea pachetului informatic SPSS. Testarea diferenței comparative dintre diferite valori s-a realizat prin determinarea criteriilor χ^2 , t, și a riscului relativ (OR).

Rezultate și discuții

În cercetarea noastră s-a stabilit o înaltă incidență a variantei alelice Glu/Glu în ambele loturi de studiu (la pacienții cu IMV - 50,6%, la persoanele sănătoase - 62,5%). O prevalență similară înaltă a acestui genotip s-a înregistrat în majoritatea publicațiilor de peste hotare^[15,14,13], deși în unele lucrări științifice repartizarea genotipurilor a fost diferită, diferențele fiind statistic ne semnificative^[17]. Incidența variantelor alelice cercetate a variat statistic ne semnificativ între bărbați și femei.

În studiul nostru în mediul pacienților care au suferit infarct miocardic variantele alelice ale genei NOS3 (Glu298Asp) s-au repartizat astfel: *Asp/Asp - 27(16,5%); Glu/Asp - 54 (33%); Glu/Glu - 83(50,5%)*.

În lotul martor s-a înregistrat următorul tablou: *A/A - 7(8,75%), A/G-23(28,75%), G/G-50(62,5%)* (Tab.1).

Tabelul 1

Varianta alelică	Pacienți cu IMV	Lotul martor
Asp/Asp	16,5%	8,75%
Glu/Asp	33%	28,75%
Glu/Glu	50,5%	62,5%

Incidența variantelor alelice ale genei NOS3 după polimorfismul Glu298Asp în loturile studiate

Prevalența factorilor de risc în loturile de studiu în majoritate a variat ne semnificativ; doar că numărul fumătorilor a fost mai înalt în mediul persoanelor din lotul martor (Tab.2).

Caracteristicile persoanelor incluse în studiu

Reieșind din rezultatele obținute poate fi observată o incidență aproximativ de 2 ori mai înaltă a infarctului miocardic la persoanele cu varianta alelică Asp/Asp (16,5%) comparativ cu persoanele purtătoare de variantă alelică Glu/Glu (8,75%; $P < .05$). Astfel, riscul relativ (OR) pentru infarctul miocardic al purtătorilor de genotip Asp/Asp a constituit 2.02 (95% CI 1.66-3.77)(Fig.1).

Tabelul 2

	Pacienții cu IMV	Lotul martor	P
N	164	80	.699
Vârstă	59,31±0,98	56,30 ± 1,37	.601
Bărbați/femei	141/23	60/20	.600
BMI, kg/m ²	24.2±0.8	23.9±0.3	.578
Cholesterol, mmol/L	5.07 ±0.11	4.97±0.24	.525
Fumător/nefumător	75/89	43/37	.043
Istoric familial,+/-	85/79	32/48	.080

Riscul relativ pentru infarct miocardic pentru purtătorii alelei A (variantele alelice Asp/Asp și Glu/Asp) a constituit 1.65 (95% confidence interval 1.19–2.27) versus persoanele cu genotip Glu/

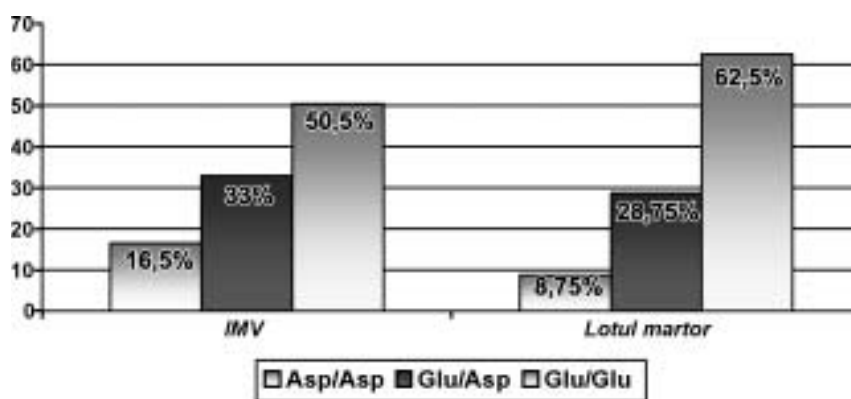


Fig. 1. Distribuția variantelor alelice Glu298Asp ale genei NOS3 în loturile studiate

Concluzii

1. Varianta alelică **Asp/Asp** a genei **NOS3** după polimorfismul Glu298Asp în cercetarea prezentă demonstrează un risc relativ înalt pentru infarctul miocardic.
2. În perspectivă analiza genotipică-moleculară în familie va permite estimarea gradului de risc de instalare a infarctului miocardic.
3. Datele prezentului studiu necesită investigații în continuare pe un lot mai mare de pacienți.

Bibliografie

1. FURCHGOTT R.F., ZAWADZKI J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.
2. MONCADA S., HIGGS A. The L-arginine-NO pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329:2.002-2.012.
3. HANSSON G.K. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1.685-1.695.
4. PARK J.B., SCHIFFRIN E.L. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens* 2001; 19:921-930
5. RIZZONI D., PORTERI E., GUELFI D. et al. Structural alternations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Circulation* 2001;103:1.238-1.244.
6. MONNINK S.H., VAN HAELEST P.L., VAN BOVEN A.J. et al. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: A comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med* 2002; 50: 19-24.
7. CELERMAJER D.C., SORESENSEN K.E., GOOCH V.M. et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340:1.111-1.115.
8. VIRDIS A., GHIADONI L., CARDINALI H. et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting

Glu. Acest indice este mai puțin statistic semnificativ, fapt care sugerează că riscul dezvoltării infarctului miocardic este mai înalt la persoanele homozygote cu varianta alelică Asp/Asp a genei NOS3.

Hingorani A.D. a încercat să le explice bazele patofiziologice ale implicării polimorfismului genetic al genei NOS3 în disfuncția endotelială, indicând în lucrarea sa că cercetările moleculare au demonstrat o activitate enzimatică echivalentă a NOS3 endotelială la purtătorii alelelor Asp298 și Glu298 ale genei NOS3, însă NOS3 produsă de alela Asp298 este supusă proteolizei selective în celulele native și în țesuturi și astfel nivelul permanent al NOS3 active poate fi redus la purtătorii acestei alele^[18]. Astfel, purtătorii alelei Asp298, dacă sunt expuși influențelor nefaste ale mediului înconjurător asupra funcției endoteliale, pot fi supuși unui risc sporit de dezvoltare a aterosclerozei și a infarctului miocardic.

Limitările studiului sunt incidența mică a persoanelor homozygote pentru Asp/Asp în mediul indivizilor incluși în studiu, deși o astfel de prevalență este similară celei observate în mai multe populații (Italia, Japonia).

- hyperhomocysteinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1.106-1.115.
9. CAI H, WILCKEN D.E., WANG X.L. The Glu298Asp (894->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med* 1999;77:511-514.
10. HIBI K, ISHIGAMI T, TAMURA K, MIZUSHIMA S. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32:521-526
11. POIRIER O., MAO C, NICAUD V. et al. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene-No consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest* 1999;29:284-290.
12. SOMA M., NAKAYAMA T. et al. Nitric oxide synthase gene polymorphism and its influence on cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999;8:83-87.
13. WANG XL, MAHANEY MC et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3147-3153.
14. WANG XL, SIM AS et al. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med* 1996;2:41-45.
15. COLOMBO M.G., PARADOSSI U., ANDREASSI M.G., et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry*. 2003; 49:389-395.
16. SAMBROOK J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual 1989; 1 (6):1 -62 Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
17. SCHMOELZER I., RENNER W. et al. Lack of association of the Glu298Asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase of manyfast coronary artery disease, carotid atherosclerosis and forearm vascular reactivity in two Austrian populations. *Eur J Clin Invest* 2003 Mar; 33 (3): 186-8.
18. HINGORANI A.D. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2003 Feb;5(1): 19-25.