



ROLUL POLIMORFISMULUI GENELOR SINTAZELOR OXIDULUI NITRIC ÎN BOALA DE REFLUX GASTROESOFAGIAN

THE ROLE OF NITRIC OXIDE SYNTHASES GENE POLYMORPHISM IN GASTROESOPHAGEAL REFLUX DISEASE

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА СИНТАЗ ОКСИДА АЗОТА В РАЗВИТИИ ГАСТРОЭЗОФАГЕАЛЬНОЙ РЕФЛЮКСНОЙ БОЛЕЗНИ

Alina Scurtu¹, V. Istrati¹, A. Scorpan¹, Svetlana Gavriluc¹

¹ –Departamentul Medicina Internă, Disciplina Medicină Internă Semiologie, USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

Research is focused on the study of the polymorphism of NOS1 and NOS2 gene, encoding nitric oxide synthases, in patients with gastroesophageal reflux disease (GERD). The study was conducted on 106 patients with GERD and 106 healthy individuals (case-control). It was found that carriers of genotype T/T C/T of the gene NOS1 in patients with GERD and duration of disease more than 10 years have an association with an increased risk of development of erosive esophagitis 3 times greater than C/C and C/T. According to available data, we find that genotype C/C of the gene NOS1 manifest a protective function in the development of severe gastroesophageal reflux disease. Allelic variant C/C of NOS2 gene is more common in patients with GERD, compared with controls. Carriers genotype C/C polymorphism of the gene G954C NOS2 in patients with GERD and duration of the disease more than 10 years have an association with an increased risk for the development of erosive esophagitis 3,9 times greater than the G/G and G/C.

Keywords: gastroesophageal reflux disease, polymorphism

Резюме

Исследование было посвящено изучению полиморфизма генов, кодирующих синтаз оксид азота, NOS1 и NOS2 у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ). Исследование было проведено у 106 пациентов с ГЭРБ и 106 здоровых людей. Было обнаружено, что носители генотипа Т/Т полиморфизма С/Т гены NOS1 у пациентов с ГЭРБ с длительностью заболевания более 10 лет имеют риск развития эрозивного эзофагита в 3 раза выше, чем у носителей генотипа С/С и С/Т. Наши результаты показывают, что генотип С/С гены NOS1 проявляет защитную функцию в развитии тяжелых форм гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. Аллельный вариант С/С гены NOS2 чаще встречается у пациентов с ГЭРБ, по сравнению с контрольной группой. Носители генотипа С/С полиморфизма G954C гены NOS2 у пациентов с ГЭРБ, длительностью заболевания более 10 лет, имеют связь с риском развития эрозивного эзофагита в 3,9 раза больше, чем носители генотипов G/G и G/C.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, оксид азота, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь

Introducere

Numeroși factori (exogeni și endogeni) joacă un anumit rol în patogeneza bolii de reflux gastroesofagian (BRGE). În literatura de specialitate este dezvăluită legătura între boala de reflux gastroesofagian și factorii genetici. Există multiple studii consacrate polimorfismului genetic, ce influențează asupra reacțiilor inflamatorii, metabolismului substanțelor medicamentoase și mutațiilor genetice, dar și genele legate de riscul dezvoltării bolii de reflux gastroesofagian, esofagului Barret și adenocarcinomului esofagian.

În ultimul timp s-au efectuat câteva cercetări în diferite țări, care arată legătura dintre mulțimea factorilor genetici și BRGE, complicațiile ei, esofagul Barret și adenocarcinomul. Factorii genetici includ rolul polimorfismului unor gene care codează citokinele pro- și antiinflamatorii, gena COX-2, care este enzima principală în sinteza prostaglandinei, gena care reglează proteinele ciclului celular, genele factorului de creștere epidermal, etc.

Se presupune, că unul din cele mai importante verigi

în mecanismul de producere și de evoluție a bolii de reflux gastroesofagian (BRGE), afecțiune cu o patogenie complexă multifactorială, este dereglarea metabolismului NO. Relaxările spontane ale sfincterului esofagian inferior (SEI) sunt determinate de colecistochinină, care stimulează sinteza NO, de dereglările acțiunii colinergice sau de creșterea acțiunii de inhibiție a neurotransmițătorului NO. În plus, NO endogen este implicat, cel puțin parțial, în reglementarea fiziologică a motilității porțiunii distale a esofagului și SEI, dereglează motilitatea esofagiană, reducând frecvența și amplitudinea peristaltismului primar.

Un rol foarte important în organism posedă gena NOS2, care codifică sintază inductibilă a oxidului nitric (iNOS). Aceasta izoformă a sintazei NO, este inductibilă și produce oxid nitric în cantități mari, fiind indusă de citochinele proinflamatorii. Deoarece oxidul nitric, produs excesiv, participă în procesele inflamatorii ale esofagului, astfel poate reflecta procesul patologic al esofagului, poate servi ca marker inflamator al bolii. Însă, date despre rolul polimorfismului genelor NOS1 și NOS2

în declanșarea și evoluția BRGE în literatura de specialitate nu am găsit.

Scopul lucrării. Studiarea polimorfismului genelor, care codifică sintazele oxidului nitric: NOS1 și NOS2 la pacienții cu boala de reflux gastroesofagian.

Material și metode. Studiul a fost efectuat la 106 pacienți cu BRGE și 106 persoane sănătoase (caz-control), care au alcătuit lotul martor în vârstă de 17-79 ani. Lotul martor a inclus 44 (41,5%) bărbați și 62 (58,5%) femei. Lotul de bază a fost divizat în 2 subloturi: lotul de bază 1 format din 45 (42,5%) pacienți cu boala de reflux gastroesofagian, forma non-erozivă și lotul de bază 2, format din 61 (57,5%) pacienți cu forma erozivă. Polimorfismul genelor candidate (C/T al genei NOS1 și G954C al genei NOS2-promotor) s-a identificat prin metoda de analiză a lungimii fragmentelor amplificate și a fragmentelor polimorfe de restricție (restriction fragment length polymorfism, RFLP). ADN-ul genomic a fost extras din probele de sânge prin metode standard. Identificarea genotipurilor genei NOS1 și NOS2 la persoanele investigate s-a efectuat prin amplificarea porțiunilor corespunzătoare a genomului genelor NOS1 și NOS2, utilizând metoda PCR cu primerii specifici. Au fost calculate odds ratio (OR) și intervale de încredere (95% CI) – stabilirea asocierii între polimorfisme și complicații BRGE.

Rezultate și discuții. Distribuția genotipurilor genelor NOS1 și NOS2 în lotul martor și pacienții cu boala de reflux gastroesofagian. Analizând frecvența polimorfismului C/T al genei NOS1, constatăm că în lotul de bază, variantele alelice C/C și T/T se întâlnesc cu o frecvență identică (26,4% și 25,5%), dar predomină varianta alelică C/T cu frecvență de 48,1%. Această diferență este semnificativă ($p < 0,05$). Comparativ cu lotul martor, constatăm, de asemenea predominarea variantei alelice C/T 47,2%, dar variantele C/C și T/T se întâlnesc cu o frecvență diferită față de lotul de bază: C/C=35,8%; T/T=17,0%. Această diferență a frecvenței variantelor alelice C/C și T/T au o semnificație statistică veridică ($p < 0,05$). De menționat, că comparând frecvența variantelor alelice a polimorfismului genei NOS1, în lotul de bază și lotul martor, constatăm că nu există diferență a frecvenței variantei alelice C/T în ambele loturi, respectiv LB=48,1%; LM=47,2%. Varianta alelică C/C este mai frecventă în lotul martor (35,8%), comparativ cu LB-26,4%, iar varianta alelică T/T mai des se întâlnește în lotul de bază (25,5%), iar în lotul martor are o frecvență de numai 17,0%. Dar, și această diferență nu este semnificativă ($p = 0,057$). De menționat, că la persoanele sănătoase predomină purtătorii alelei C, diferența statistic semnificativă ($p < 0,05$). Astfel s-a stabilit că persoanele sănătoase a lotului martor sunt purtători al alelei C, comparativ cu lotul de bază, unde alelele C și T au o distribuție egală.

A fost cercetată distribuția genotipurilor **genei NOS2** în lotul martor și pacienții cu boala de reflux gastroesofagian. Genotipurile polimorfismului G/C a genei NOS2 au o distribuție neuniformă atât în lotul de bază, cât și în lotul martor. Variantele alelice G/G și C/C se întâlnesc cu o frecvență egală în lotul de bază (27,4% și 25,5%). În același timp menționăm, că este diferită distribuția acestor variante alelice în lotul martor. Constatăm că, evident predomină varianta alelică G/G=44,3%, asupra variantei C/C=12,3%. Această diferență este statistic semnificativă ($p < 0,01$).

Această analiză ne permite să constatăm, că varianta alelică C/C a polimorfismului G954C a genei NOS2-promotor se întâlnește cu o frecvență mai mică în ambele loturi, dar statistic semnificativ în lotul martor ($p < 0,01$).

În același timp, analizând gena NOS2 la pacienții cu BRGE și lotul martor, constatăm, că varianta alelică C/C la pacienții cu BRGE predomină (25,5%), comparativ cu lotul martor (12,3%), $p < 0,05$.

Distribuția genotipurilor genelor NOS1 și NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE în raport cu durata maladiei. A fost efectuată analiza distribuției variantelor alelice a polimorfismului genei NOS1 în raport cu durata maladiei. S-a constatat că varianta alelică C/C se întâlnește cu o frecvență de 27,5% la pacienții cu durata maladiei sub 10 ani, comparativ cu 35,8% din lotul martor ($p > 0,05$).

În același timp se constată o frecvență joasă a acestei variante alelice (C/C) la pacienții cu o durată a maladiei mai mult de 10 ani, respectiv 10,8% și 35,8% din lotul martor ($p < 0,05$). Referitor la varianta alelica T/T se constată o frecvență mai mare la pacienții cu durata maladiei mai mare de 10 ani (51,1%), comparativ cu lotul martor (17,0%), ($p < 0,01$). Reieșind din diferența de distribuție a diferitor variante alelice a polimorfismului C/T al genei NOS1, a fost calculat riscul dezvoltării diferitor forme de esofagită în dependență de durata maladiei.

Tabelul 1

Riscul de esofagită în funcție de genotip pentru polimorfismul C/T al genei NOS1 cu durata maladiei > 10 ani

Varianta alelică	> 10 ani		Lotul martor		OR (95%CI)	p
	abs.	%	abs.	%		
C/C	4	10,8	38	35,8	0,30 (0,10-0,90)	<0,05
C/T	14	37,8	50	47,2	0,80 (0,39-1,61)	>0,05
T/T	19	51,4	18	17,0	3,0 (1,43-6,37)	<0,01
Total	37		106			

Rezultatele noastre arată că purtătorii genotipului T/T a polimorfismului C/T a genei NOS1 la pacienții cu BRGE și cu durata maladiei mai mult de 10 ani au o asociere cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei erozive de 3 ori mai mare decât C/C și C/T (OR 3,0; (95%CL: (1,43- 6,37), $p < 0,01$, respectiv, OR 0,30; 95% CI: 0,10-1,90 și OR 0,80; 95% CI: 0,39-1,61).

Analizând tabelul 1, constatăm, că purtătorii genotipului C/C a polimorfismului C/T a genei NOS1 la pacienții cu BRGE și durata maladiei mai mult de 10 ani au o asociere cu un risc scăzut și a conferit protecție împotriva dezvoltării esofagitei erozive (OR 0,30; 95% CI: 0,10-1,90), $p < 0,05$. Conform datelor obținute, constatăm că genotipul C/C al genei NOS1 poartă o funcție protectivă în dezvoltarea formelor severe a bolii de reflux gastroesofagian.

Frecvența genotipurilor polimorfismului G954C a genei NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE în raport cu durata maladiei.

A fost analizată frecvența genotipurilor polimorfismului G954C a genei NOS2 și asocierea cu riscul de dezvoltare a esofagitei de reflux la pacienții cu diferite forme ale BRGE în dependență de durata maladiei. S-a constatat că varianta alelică

C/C la pacienții cu durata maladiei sub 10 ani, se întâlnește cu o frecvență sporită (24%), comparativ cu 12,3% din lotul martor), dar diferența statistic nesemnificativă ($p > 0,05$).

Tabelul 2

Riscul de esofagită în funcție de genotip pentru polimorfismul G954C a genei NOS2-promotor cu durata maladiei < 10 ani

Varianta alelică	< 10 ani		Lotul martor		OR (95%CI)	p
	abs.	%	abs.	%		
G/G	25	33,3	47	44,3	0,76 (0,43-1,34)	>0,05
G/C	32	42,7	46	43,4	0,99 (0,58-1,71)	>0,05
C/C	18	24	13	12,3	1,87 (0,85-4,09)	>0,05
Total	75		106			

Analizând polimorfismul genei NOS2 la pacienții cu BRGE în dependență de durata maladiei, constatăm că varianta alelică C/C la homozigoți se întâlnește mai frecvent la pacienții cu durata maladiei mai mare de 10 ani: 48,4% comparativ cu 24% la pacienții cu durata până la 10 ani și respectiv 12,3% - lotul martor. Diferențele repartizării genotipurilor polimorfismului G954C a genei NOS2-promotor la pacienții cu durata maladiei < 10 ani au fost nesemnificative statistic pentru asocierea cu un risc de esofagită erozivă.

Tabelul 3

Riscul de esofagită în funcție de genotip pentru polimorfismul G954C a genei NOS2-promotor cu durata maladiei > 10 ani

Varianta alelică	>10 ani		Lotul martor		OR (95%CI)	p
	abs.	%	abs.	%		
G/G	9	29,1	47	44,3	0,65 (0,3-1,54)	>0,05
G/C	7	22,5	45	43,4	0,53 (0,22-1,30)	>0,05
C/C	15	48,4	13	12,3	3,9 (1,7-9,17)	<0,01
Total	31		106			

Conform datelor obținute, referitor la polimorfismul G/G al genei NOS2, elucidate în tab.3, constatăm, că asocierea cu un risc de dezvoltare a esofagitei în funcție de genotip pentru polimorfismul G954C a genei NOS2-promotor cu durata maladiei > 10 ani s-a observat, că purtătorii genotipului C/C au o asociere cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei erozive de 3,9 ori mai mare decât G/G și G/C (OR 3,9; 95%CI: (1,7-9,17), $p < 0,01$, respectiv, OR 0,65; 95% CI: 0,3-1,54 și OR 0,53; 95% CI: 0,22-1,30).

Concluzii

1. Examenul polimorfismului genelor NOS1 nu a constatat diferență statistică între lotul de bază și lotul martor la variantele alelice C/C și C/T. Varianta alelică T/T este statistic nesemnificativă mai frecvent în lotul de baza, comparativ cu lotul martor: 25,5% și 17,0%, respectiv ($p = 0,057$).

2. Varianta alelică C/C a genei NOS2 este mai frecventă la pacienții cu BRGE erozivă (27,9%) și la pacienții cu BRGE non-erozivă (20,0%), comparativ cu lotul martor (12,3%), $p < 0,05$.

3. Purtătorii genotipului T/T polimorfismul C/T a genei NOS1 la pacienții cu BRGE și cu durata maladiei mai mult de 10 ani au o asociere cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei erozive de 3 ori mai mare decât C/C și C/T.

4. Purtătorii genotipului C/C polimorfismul C/T a genei NOS1 la pacienții cu BRGE și durata maladiei mai mult de 10 ani au o asociere cu un risc scăzut și a conferit protecție împotriva dezvoltării esofagitei erozive (OR 0,30; 95% CI: 0,10-1,90), $p < 0,05$. Conform datelor obținute, constatăm că genotipul C/C al genei NOS1 poartă o funcție protectivă în dezvoltarea formelor severe a bolii de reflux gastroesofagian.

Bibliografie

1. Ichim A., Istrati V., Manea D. et al. Prevalența variantelor alelice GLU298ASP ale genei NOS3 la pacienții cu infarct miocardic. Arta Medica. 2007, no. 4, p. 34-36.
2. Lupașco I., Dumbravă V-T., Romanciuc I. Boala de reflux gastroesofagiană. Ghid de practică medicală. Chișinău, 2002, 112 p.
3. Lee Y.Y., McColl K.E. Pathophysiology of gastroesophageal reflux disease. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 2013, vol. 27, no. 3, p. 339-351.
4. Scurtu A. Rolul polimorfismului genetic în geneza bolii de reflux gastroesofagian. În: Arta Medica. Chișinău, 2015, nr.2(55), p.33-35
5. Sobhani I. Le reflux gastro- esophagien est-il hereditaire? Hepato-gastro.2004, vol. 11, no1. p. 19-26.
6. Biramijamal F. Chapter 1. Association of COX-2 Promoter Polymorphism with Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) and Gastrointestinal Cancers from Iran: An Application for the Design of Early Detection of Cancer and Providing Prognostic Information to Patients in a Clinical Setting 1. In: Cancer Management. Hashad D. (ed.). InTech, 2012, p. 1-12.
7. Cameron A., Lagergren J., Henriksson C. et al. Gastroesophageal reflux disease in monozygotic and dizygotic twins. Gastroenterology. 2002, vol. 122, no. 1, p. 55-59.
8. Mohammed I., Cherkas L., Riley S. et al. Genetic influences in gastro-oesophageal reflux disease: a twin study. Gut. 2003, vol. 52, no. 8, p. 1085-1089.