

ROLUL POLIMORFISMULUI GENELOR SINTAZELOR OXIDULUI NITRIC ÎN PROGNOZAREA DEZVOLTĂRII ESOFAGULUI BARRETT

THE ROLE OF NITRIC OXIDE SYNTHASE POLYMORPHISM GENES IN THE PROGNOSIS OF BARRETT'S ESOPHAGUS

Alina Scurtu¹ dr.șt.med., **Anatolie Scorpan**¹ dr.șt.med., conf.universitar², **Valeriu Istrati**² dr.hab.șt.med., prof. universitar, **Natalia Nazaria**¹, **Ghenadie Calin**², asistent universitar

1 – CSF Galaxia

2 – USMF "N.Testemițanu"

Rezumat

A fost cercetat polimorfismul genelor NOS1 și NOS2 la pacienții cu boala de reflux gastroesofagian. Gena NOS1 codifică sintaza neuronală a oxidului nitric (nNOS), care produce NO și este implicată în reglarea motilității esofagului. Gena NOS2 codifică sintaza inductibilă a oxidului nitric (iNOS), care produce cantitatea excesivă de oxid nitric, datorate proceselor inflamatorii. S-a constatat, că în funcție de genotipul polimorfismului G954C al genei NOS2 se poate calcula riscul severității esofagitei de reflux. A fost demonstrat, că purtătorii genotipului C/C polimorfismului G954C al genei NOS2 la pacienții cu BRGE au un risc sporit de dezvoltare a esofagului Barrett.

Cuvinte-cheie: boala de reflux gastroesofagian, oxid nitric, sintazele oxidului nitric, polimorfism genetic.

Summary

The polymorphism of NOS1 and NOS2 genes has been investigated in patients with gastroesophageal reflux disease. The NOS1 gene encodes nitric oxide synthase (nNOS), which produces NO and is involved in regulation of esophageal motility. The NOS2 gene encodes the inducible synthase of nitric oxide (iNOS), which produces excessive amounts of nitric oxide due to inflammatory processes. It was found that depending on the genotype of G954C polymorphism of the NOS2 gene, the risk of severe reflux esophagitis can be calculated. It has been demonstrated that carriers of the G954C C/C genotype of the NOS2 gene in patients with Gastroesophageal Reflux Disease (GERD) are at increased risk of developing the Barrett esophagus.

Introducere

Numeroși factori (exogeni și endogeni) joacă un anumit rol în patogenia bolii de reflux gastroesofagian (BRGE). În ultimul timp s-au efectuat câteva cercetări în diferite țări, care arată legătura dintre multitudinea factorilor genetici și BRGE, complicațiile ei, esofagul Barrett și adenocarcinomul [2]. Factorii genetici includ rolul polimorfismului unor gene care codează citokinele pro- și antiinflamatorii, gena COX-2, gena care reglează proteinele ciclului celular, genele factorului de creștere epidermal, etc [1,5]. Scopul cercetării: examenul genetic prin determinarea polimorfismului genelor NOS1 și NOS2. Gena NOS1 codifică sintaza neuronală a oxidului nitric (nNOS), care produce NO și este implicată în reglarea motilității esofagului. Gena NOS2 codifică sintaza inductibilă a oxidului nitric (iNOS), care produce cantitatea excesivă de oxid nitric, provocând procese inflamatorii. Sintaza oxidului nitric (iNOS) este localizată în macrofage, neutrofile, limfocite, hepatocite și

în mare măsură este dependentă de factorii endogeni (TNF-alpha, interleukine) [3,5].

Material și metode de cercetare

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 de ani. Lotul martor a inclus 44 (41,5%) de bărbați și 62 (58,5%) de femei. Lotul de bază a fost divizat în 2 subloturi: lotul de bază 1 format din 45 (42,5%) de pacienți cu boala de reflux gastroesofagian, forma non-erozivă și lotul de bază 2, format din 61 (57,5%) de pacienți cu forma erozivă. Analizând structura ambelor subloturi după apartenența de sex, constatăm că în lotul de bază 1 (forma non-erozivă) au fost incluși 20 (44,4%) de bărbați și 25 (55,6%) de femei. Lotul de bază 2 (forma erozivă) a fost alcătuit din 24 (39,3%) de bărbați și 37 (60,7%) de femei. În ambele loturi predomină persoanele de gen feminin (LB1-55,6%, LB2-60,7%), comparativ cu cel masculin

(LB1-44,4%, LB2-39,3%). Diferența statistică între loturi, referitor la sex nu este semnificativă ($p > 0,05$). În lotul martor de asemenea predomină persoanele de gen feminin-62 (58,5%). Analiza statistică confirmă, că diferența între loturi (martor și de bază) după apartenența de sex nu este semnificativă ($p > 0,05$).

Metoda de identificare a genotipurilor genei NOS1 și NOS2. Determinarea genelor NOS a fost efectuată după metodă caz-control: la 106 de pacienți cu BRGE erozivă și non-erozivă și la 106 de persoane practic sănătoase asimptomatice. 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 ale genelor NOS1 și NOS2, utilizând metoda PCR cu primerii specifici [4].

Metode de procesare statistică a rezultatelor. Au fost calculat odds ratio (OR) și intervale de încredere (95% CI) – stabilirea asocierii între polimorfisme și complicații BRGE.

Frecvența comparativă a genotipurilor **genei NOS1 a fost studiată** la pacienții cu boala de reflux gastroesofagian și persoanele sănătoase, care au alcătuit lotul martor. Comparând frecvența variantelor alelice a polimorfismului genei NOS1, în lotul de bază și lotul martor, constatăm că nu există diferența a frecvenței variantei alelice în ambele loturi.

A fost cercetată distribuția genotipurilor **genei NOS2** în lotul martor și pacienții cu boala de reflux gastroesofagian. 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%), $p < 0,05$. Gena NOS1 la pacienți cu diferite forme de BRGE nu determină diferențe statistice în ambele loturi. Am putea spune că aceasta variantă nu influențează posibilitatea genetică de declanșare a patologiei.

Analizând gena NOS2 la pacienți cu BRGE forma erozivă și forma non erozivă, constatăm, că varianta alelică C/C la pacienții din LB2 predomină (27,9%), comparativ cu LM (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.

Analizând genotipurile polimorfismului C/T al genei NOS1 la pacienții cu diferite forme ale BRGE (non-erozivă și erozivă) nu am stabilit nici o asociere între polimorfismele genei NOS1 și cele două forme de BRGE, când am comparat un genotip cu altul. Analiza statistică nu a depistat nici o asociere cu un risc crescut de esofagită de reflux la pacienții cu BRGE, atât pentru forma erozivă, cât și cea non-erozivă.

Rezultatele noastre arată că purtătorii genotipului C/C polimorfismului G954C al genei NOS2-promotor la pacienții cu BRGE, forma erozivă, au o asociere de risc crescut de 2,7 mai mare decât purtătorii genotipurile G/G și G/C (OR 2,72; (95%CI: 1,03- 4,99, respectiv OR 0,77; 95% CI: 0,42-1,41 și OR 0,86; 95% CI: 0,48-1,57). Diferențele au fost ne semnificative statistic pentru purtătorii alelei G (G/C +G/G versus C/C).

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 mare de 10 ani, respectiv 10,8% și 35,8% din lotul martor ($p < 0,05$) (tab.6). 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 distribuire a diferitor variantei alelice a polimorfismul C/T al genei NOS1, a fost calculat riscul dezvoltării diferitor forme de esofagită în dependență de durata maladiei. Rezultatele noastre arată că purtătorii genotipului T/T polimorfismului genei NOS1 la pacienții cu BRGE și cu durata maladiei mai mult de 10 ani au o asocierea cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei erozive de 3 ori mai mare decât C/C și C/T (OR 3,0; (95%CI: (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).

De asemenea se constată, că purtătorii genotipului C/C polimorfismului C/T al genei NOS1 la pacienții cu BRGE și durata maladiei mai mare de 10 ani au o asociere cu un risc scăzut și s-a manifestat protectiv 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 al 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 al 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 este statistic ne semnificativă ($p > 0,05$).

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 al genei NOS2-promotor la pacienții cu durata maladiei < 10 ani au fost ne semnificative statistic pentru asocierea cu un risc de esofagită erozivă. Conform datelor obținute, referitor la polimorfismul G/G al genei NOS2, constatăm, că asocierea cu un risc de dezvoltarea esofagitei în funcție de genotip pentru polimorfismului G954C al 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).

Distribuția genotipurilor polimorfismului G954C al genei NOS2 la pacienții cu forma erozivă a BRGE cu modificări histopatologice severe. Istoricul natural al bolii de reflux gastroesofagian determină, că forma non-erozivă în 3-5% evoluează în esofagul Barrett, iar forma erozivă – în 10-15% cazuri. Cercetarea noastră a depistat esofagul Barrett la 23 pacienți, ce constituie 15,9%. Esofagul Barrett presupune un risc

sporit de dezvoltare a adenocarcinomului esofagian. Studiul a inclus studierea riscului de dezvoltare a metaplaziei epitelului esofagian. Analiză separată în funcție de tipul modificărilor histopatologice a evidențiat, că purtătorii genotipului C/C polimorfismului G954C al genei NOS2 au un risc crescut de 3,9 ori pentru metaplazia epitelului esofagian. Analizând variantele alelice al genei NOS2, se constată, că varianta alelică C/C se întâlnește cel mai frecvent (47,8%), comparativ cu alte variante: G/G-30,4% și G/C -21,8%. De menționat, că varianta alelică C/C la pacienții cu metaplazie are o frecvență mult mai mare în lotul de bază (47,8), comparativ cu lotul martor (12,3%). Analiza riscului (OR) confirmă, că purtătorii genotipului C/C au un risc sporit de dezvoltare a esofagului Barrett (OR 3,9; 95% CI: 1,55-9,8), $p < 0,01$).

Pentru celelalte genotipuri subclasate în funcție de modificările histomorfopatologice nu au arătat nici o asociere cu un risc crescut de metaplazie a epitelului esofagului.

Concluzii

Purtătorii genotipului C/C, polimorfismului C/T al genei NOS1 la pacienții cu BRGE și durata maladiei mai mare de 10 ani au o asociere cu un risc scăzut și s-a manifestat protectiv împotriva dezvoltării esofagitei erozive (OR 0,30; 95% CI: 0,10-1,90), $p < 0,05$.

Purtătorii genotipului T/T polimorfismului genei NOS1 la pacienții cu BRGE cu durata maladiei mai mult de 10 ani au o asociere cu un risc crescut de dezvoltare a esofagitei erozive (OR 3,0; (95%CL: (1,43- 6,37), $p < 0,01$).

Purtătorii genotipului C/C al polimorfismului G954C al genei NOS2, asociat cu factorul de durată a maladiei peste 10 ani și a modificărilor histomorfologice a epitelului esofagului denotă un risc de dezvoltare a esofagului Barrett de 3,9 ori mai mare, comparativ cu alte genotipuri (OR 3,9; 95% CI: 1,55-9,8), $p < 0,01$).

Bibliografie

1. 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.
 2. Goto Y., Ando T., Naito M. et al. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with the increased risk of differentiated gastric cancer in a Japanese population. World. J. Gastroenterol. 2006, vol. 12, no. 39, p. 6361-6365.
 3. Ghoshal U., Chourasia D. Genetic factors in the pathogenesis of gastroesophageal reflux disease. Indian. J. Gastroenterol. 2011, vol. 30, no. 2, p. 55-62.
 4. 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.
 5. Scurtu A. Rolul polimorfismului genetic în geneza bolii de reflux gastroesofagian. În: Arta Medica. Chișinău, 2015, nr.2(55), p.33-35
-