Genové polymorfismy pro syntázu oxidu dusnatého dárce a koronární nemoc srdečního štěpu

Miroslav Kocík^{*,**}, Jaroslav Hubáček^{***}, Ivan Málek^{**}, Bronislav Janek^{**}, Michael Želízko^{**},
Antonij Slavčev^{****}, Libor Kolesár^{****}, Věra Lánská^{*****}, Jan Pirk^{*****}

^{*4.} interní klinika, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, ^{**}Klinika kardiologie,
^{***}Centrum experimentální medicíny, ^{****}Oddělení imunologie, ^{*****}Oddělení statistiky, ^{*****}Klinika kardiovaskulární chirurgie,
Institut klinické a experimentální medicíny, Praha, Česká republika

Kocík M, Hubáček J, Málek I, et al. **Genové polymorfismy pro syntázu oxidu dusnatého dárce a koronární nemoc srdečního štěpu.** *Cor Vasa* 2009;51(3):202–209.

Úvod: Koronární nemoc srdečního štěpu (KNSŠ) představuje jednu z nejzávažnějších komplikací transplantace srdce (TS). Za základní patofyziologický moment v rozvoji KNSŠ je považována endoteliální dysfunkce, způsobená množstvím faktorů imunologické i ne-imunologické povahy. Klíčovou úlohu v regulaci řady procesů na úrovni cévní stěny hraje oxid dusnatý (NO), produkováný endoteliální syntázou oxidu dusnatého (eNOS). Polymorfismy genu pro eNOS, ovlivňující dostupnost a aktivitu tohoto enzymu, mohou ovlivňovat dostupnost NO na úrovni cévní stěny, a vzhledem k významným ochranným vlastnostem NO i náchylnost věnčitých tepen srdečního štěpu k rozvoji KNSŠ.

Cíl: Cílem práce je posoudit vliv genových polymorfismů pro eNOS (intron 4, T786C, G894T) na rozvoj morfologických známek a výskyt klinických manifestací (výskyt akutního koronárního syndromu, maligní poruchy rytmu, náhlé smrti, srdečního selhání při vyloučení ostatních příčin) KNSŠ u příjemců TS.

Studovaná populace a metody: Studovaná populace byla tvořena příjemci TS, u nichž bylo časně v jednom roce po TS provedeno intravaskulární ultrazvukové vyšetření věnčitých tepen srdečního štěpu. Současně byla u jejich korespondujících dárců provedena genotypizace eNOS ve výše uvedených oblastech.

Výsledky: Byl nalezen statisticky významný vztah mezi alelou 4b a genotypem 4b4b (intron 4) na straně jedné a výskytem jak časně, tak v jednom roce po TS detekovaných morfologických známek KNSŠ na straně druhé. Alela 4b a genotyp 4b4b byly shledány nezávislými rizikovými faktory pro přítomnost morfologických známek KNSŠ časně po TS. Dále byl nalezen statisticky významný vztah mezi alelou C a genotypem CC (T786C) a výskytem klinických manifestací KNSŠ.

Závěr: Byla nalezena pozitivní korelace mezi genovým polymorfismem pro eNOS v oblasti intron 4 a přítomností morfologických známek KNSŠ jak časně, tak v jednom roce po TS. Genotyp 4b4b a alela 4b intron-4 genového polymorfismu pro eNOS byly shledány rizikovými faktory pro přítomnost morfologických známek časně detekované KNSŠ. Rovněž tak byla nalezena pozitivní korelace mezi genovým polymorfismem T785C pro eNOS a výskytem klinických manifestací KNSŠ.

Klíčová slova: Transplantace srdce – Koronární nemoc – Genové polymorfismy – Syntáza oxidu dusnatého

Kocík M, Hubáček J, Málek I, et al. **Oxide synthase donor gene polymorphisms and cardiac graft coronary artery disease.** *Cor Vasa* 2009;51(3): 202–209.

Introduction: Cardiac graft coronary artery disease (CGCAD) constitutes of the most serious complications of heart transplantation (HTx). The principal pathophysiological trigger in the development of CGCAD is believed to be endothelial dysfunction due to a number of immunological and non-immunological factors. The key role in the regulation of a variety of processes at the level of the vessel wall is played by nitric oxide (NO), produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS). eNOS gene polymorphisms, affecting the availability and activity of this enzyme, may modulate NO availability at the level of the vessel wall and, given the significant protective properties of NO, also the susceptibility of the coronary arteries of the cardiac graft to develop CGCAD.

Aim: The aim of the study was to assess the effect of eNOS gene polymorphisms (intron 4, T786C, G894T) on the development of morphological traits and occurrence of clinical presentations (incidence of acute coronary syndrome, malignant arrhythmias, sudden death, heart failure after exclusion of other causes) of CGCAD in HTx recipients.

Study population and methods: The study population was made up by HTx recipients having intravascular ultrasound of the cardiac graft coronary vessels early and at 1 year post-HTx. At the same time, matched donors had eNOS genotyping in the above regions.

Podpořeno grantem uděleným Českou kardiologickou společností v roce 2005 a výzkumným záměrem MSM0021620820.

Results: A significant correlation was found between the *4b* allele and *4b4b* genotype (intron 4) on the one hand and the incidence of morphological traits of CGCAD, detected both early and at 1 year post-HTx on the other. The *4b* allele and the *4b4b* genotype were identified as independent risk factors for the presence of morphological traits of CGCAD early post-HTx. A significant correlation was also demonstrated between the C allele and the CC genotype (T786C) on the one hand, and the incidence of clinical presentations of CGCAD on the other.

Conclusion: A correlation was found between the eNOS gene polymorphism in the region of intron 4 and the presence of morphological traits of CGCAD both early and at 1 year post-HTx. The *4b4b* genotype and the *4b* allele of the eNOS gene polymorphism were identified as risk factors for the presence of morphological traits of CGCAD detected early. Likewise, a correlation was found between the eNOS T786C gene polymorphism and the incidence of clinical presentations of CGCAD.

Key words: Heart transplantation – Coronary artery disease – Gene polymorphisms – Nitric oxide synthase

Adresa: MUDr. Miroslav Kocík, Ph.D., 4. interní klinika, VFN a 1. LF UK, U nemocnice 2, 128 08 Praha 2, Česká republika, e-mail: miroslav.kocik@seznam.cz

Úvod

Koronární nemoc srdečního štěpu (KNSŠ) představuje jednu z nejvýznamnějších komplikací transplantace srdce (TS).⁽¹⁾ Za základní příčinu rozvoje KNSŠ je v současné době považována přítomnost endoteliální dysfunkce. Příčiny vzniku endoteliální dysfunkce v případě tepen srdečního štěpu se dělí na dvě velké skupiny. První skupinu představují imunologické důvody – chronická (popř. akutně exacerbovaná ve formě akutní rejekce) imunitní reakce příjemce proti imunologicky nekompatibilnímu štěpu. Druhou skupinu představuje řada rizikových faktorů neimunologické povahy – diabetes mellitus, hypertenze, obezita, hyperlipidemie, doba ischemie, léčba steroidy, věk dárce, příčina smrti dárce, doba mozkové smrti a celá řada dalších.⁽²⁾

Pochody na úrovni endotelu a cévní stěny jsou ovlivňovány velkým množstvím působků. Jedním z nejdůležitějších z nich je oxid dusnatý, který se vyznačuje významným ochranným účinkem na endotel i na cévní stěnu. Oxid dusnatý (NO) je za bazálních podmínek na úrovni endotelu produkován endoteliální syntázou oxidu dusnatého (eNOS, NOS III), která představuje konstitutivní formu NO syntázy. Gen pro eNOS je lokalizován do oblastí 7q35-36. Pro eNOS bylo nalezeno několik genových polymorfismů. Z množství známých genových polymorfismů pro eNOS předpokládáme u tří z nich (intron 4, T786C, G894T), že ovlivňují produkci NO.⁽³⁾ Funkční genové polymorfismy pro eNOS, tedy takové, které ovlivňují dostupnost či funkci tohoto genového produktu, tak mohou ovlivnit úroveň bazální produkce NO. Vzhledem k výraznému pleiotropnímu protektivnímu účinku NO na endotel a cévní stěnu může snížená bazální produkce vést u nositele ke zvýšené náchylnosti věnčitých tepen k rozvoji endoteliální dysfunkce a od ní se odvíjejících patologických procesů.⁽⁴⁾

Tato závislost byla sledována ve vztahu k nejpálčivějšímu problému současné medicíny – ateroskleróze. Řada studií se snažila nalézt korelaci mezi třemi nejvýznamnějšími genovými polymorfismy pro eNOS (intron 4, T786C, G894T) a přítomností karotické či koronární aterosklerózy v běžné populaci.⁽⁵⁾ Analogicky s běžnou populací lze očekávat i u transplantované populace, že dostupnost NO, daná rozličnými genovými polymorfismy pro eNOS dárce, může ovlivňovat citlivost věnčitých tepen srdečního štěpu k působení škodlivých nox (imunitní i neimunitní povahy).

Lze se tak domnívat, že rozličné genové polymorfismy pro eNOS dárce mohou ovlivňovat rozvoj jak morfologických známek, tak klinických manifestací KNSŠ. Uvedená hypotéza nebyla doposud, podle našich vědomostí u nemocných po transplantaci srdce, zkoumána.

Cíle práce

Cílem práce bylo posoudit vztah mezi nejvýznamnějšími genovými polymorfismy pro eNOS dárce a přítomností morfologických známek KNSŠ detekovaných časně (tj. čtvrtý týden) a jeden rok po TS. Rovněž jsme se pokusili posoudit vztah mezi těmito polymorfismy a výskytem klinických manifestací KNSŠ (kombinovaný sledovaný ukazatel: výskyt akutního koronárního syndromu, maligní poruchy rytmu, náhlé smrti, srdečního selhání při vyloučení ostatních příčin).

Soubor pacientů

Soubor pacientů představuje 68 příjemců TS (průměrný věk 50 ± 11 let, 50 mužů, 18 žen), u nichž bylo provedeno časně ($29,8 \pm 12,5$ dní) po transplantaci, a u většiny z nich (49 příjemců, průměrný věk $49,3 \pm 11,2$ let, 38 mužů, 11 žen) i v prvním roce po TS, intravaskulární ultrazvukové vyšetření věnčitých tepen (IVUS). Současně u korespondujících dárců bylo možné provést genotypizaci pro eNOS v níže popsaných genových oblastech.

Sledovaný soubor pacientů byl získán z celkového počtu 164 dospělých příjemců TS (průměrný věk $49,7 \pm 11,4$ let, 128 mužů, 36 žen) provedených v Kardiocentru Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v období od 10. 2. 1999 do 8. 7. 2003.

Důvody k nezařazení zbývajících příjemců TS (96 jedinců) do sledovaného souboru představovaly: dvakrát časné přeložení do jiného transplantačního centra (Brno, Bratislava), v patnácti případech úmrtí příjemce do čtyř týdnů po TS, jednou kombinovaná transplantace srdce a ledviny, dvakrát komplikovaný pooperační průběh, ve 34 případech nedostupnost IVUS, v 22 případech nesouhlas nemocného s vyšetřením IVUS, pětkrát průkaz koronární nemoci štěpu před orgánovým odběrem a v 15 případech nemožnost typizace DNA pro eNOS u korespondujícího dárce.

Vzhledem k tomu, že předkládaný studijní soubor se v základních demografických údajích nikterak nelišil od skupiny pacientů, kteří do studie zařazeni nebyli (viz *tabulka 1*), považujeme námi prezentovaný soubor za reprezentativní vzorek populace pacientů – příjemců TS ve výše uvedeném období.

Metodika

Intravaskulární vyšetření věnčitých tepen srdečního štěpu

U všech vyšetřovaných příjemců bylo nejprve provedeno rutinní selektivní koronarografické vyšetření. V případě nálezu angiograficky významné stenózy na věnčitých tepnách (angiograficky významné zúžení věnčité tepny bylo definováno jako angiograficky patrné zúžení lumina cévy o více než 50 %, v porovnání s předcházejícím zdravým segmentem vyšetřované cévy) se dále nepokračovalo v ultrazvukovém vyšetření (dva pacienti) a byla stanovena diagnóza koronární nemoci srdečního štěpu. U ostatních nemocných byla následně 30MHz, 2,9 F ultrazvuková sonda (Jomed/Endosonic Avanar F/X, Jomed Inc, Rancho Cordova, CA, USA, cat. No REF 85700) zavedena přes angioplastický zaváděcí katetr postupně co možná do nejvzdálenějšího místa ramus interventricularis anterior a arteria coronaria dextra či ramus circumflexus (v závislosti na rozsahu věnčitého povodí). Záznam ultrazvukového obrazu věnčité tepny byl nahráván na CD-ROM v průběhu pomalého manuálního zpětného stahování ultrazvukového katetru do ústí vyšetřované věnčité tepny. Takto získané záznamy ultrazvukového obrazu věnčitých tepen srdečního štěpu byly později analyzovány pomocí počítačového softwaru Endosonic/Jomed, in vision gold V 4.0.1. (Endosonics Corp/Jomed Inc, nyní Volcano Therapeutics, Rancho Cordova, CA, USA). Pomocí uvedeného programu byly nejprve manuálně ohraničeny hranice lumina cévy a zevní elastické membrány. Následně tak byla zjištěna – manuálně změřena – maximální tloušťka takto označené vrstvy, představující tloušťku plátu. Jakékoli fokální zesílení arteriální stěny v ultrazvukovém obraze $\geq 0,5$ mm bylo v souladu s dříve publikovanými studiemi považováno za patologickou lézi.⁽⁶⁾ Pomocí časné po TS provedeného

intravaskulárního ultrazvukového vyšetření (IVUS) věnčitých tepen byl určen výskyt časné po TS detekované KNSŠ. Stejným způsobem byl určen výskyt KNSŠ v jednom roce po TS.

Izolace DNA

DNA byla izolována z 350 μ l nesrážlivé plné krve dárce, která byla odebrána v době orgánového odběru. K izolaci byla použita komerční souprava GenoPrep Cartridge B 350 s využitím automatického izolátoru EZ1 BioRobot (Qiagen Vertriebs GmbH, Rakousko) přesně podle pokynů výrobce. Kvalita a koncentrace DNA byla standardně stanovena spektrofotometricky změřením absorbance při 260 a 280 nm.

Stanovení genových polymorfismů pro eNOS

Pro analýzu jednotlivých variant v genu pro eNOS byla použita metoda PCR-RFLP. Směs PCR sestávala vždy z (celkový objem 25 μ l): 1 $\times$ PCR pufr, 0,2 mmol/l každého dNTP, 1,5 mmol/l $MgCl_2$, 0,1 U Taq DNA polymerázy, 1 pmol/l adekvátních oligonukleotidů a ~ 1 μ l DNA. DNA byla amplifikována na přístroji PCR Dyad (Peltier) za následujících podmínek: počáteční denaturace 96 °C (3 min); následujících 35 cyklů -95 °C (15 s), 60 °C (varianta 4a4b) nebo 70 °C (varianty v pozicích 786 a 894) (30 s) a 72 °C (30 s). PCR byla ukončena amplifikačním krokem 72 °C (3 min). Pro amplifikaci byly použity následující oligonukleotidy – 5' AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT a 5' TCT CTT AGT GCT GTG CTC AC (varianta 4a4b, inzerční/deleční polymorfismus, bez nutnosti štěpení restrikčním enzymem); 5' ATG CTC CCA GGG CAT CA a 5' GTC CTT GAC TCT GAC ATT AGG G (varianta v pozici -786, restrikční enzym MboI) a konečně 5' CAT GAG GCT CAG CCC CAG AA a 5' AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C (varianta v pozici 894, restrikční enzym MboI). Restrikční fragmenty byly analyzovány elektroforézou v 2% agaróze a 0,5 $\times$ TBE pufru.

Rizikové faktory vývoje KNSŠ

Také řada možných rizikových faktorů, které se týkají příjemce (věk, pohlaví, diagnóza vedoucí k transplantaci, body

Tabulka 1 Základní demografické údaje studovaných souborů a skupin příjemců TS, kteří nebyli zařazeni do studijních souborů

	Soubor časné detekované KNSŠ	Nezařazení do souboru časné detekované KNSŠ	Soubor v jednom roce detekované KNSŠ	Nezařazení do souboru v jednom roce detekované KNSŠ
Počet	68	96	49	115
Věk (roky)	50,0 $\pm$ 11,0	49,4 $\pm$ 11,7	49,3 $\pm$ 11,2	49,8 $\pm$ 11,5
Pohlaví (muž/žena)	50/18	78/18	38/11	90/25
Základní diagnóza DKMP/ICHS/ostatní	32/25/11	41/41/14	24/18/7	46/51/18

DMKP – dilatační kardiomyopatie, ICHS – ischemická choroba srdeční, ostatní – ostatní diagnózy vedoucí k indikaci transplantace srdce (hypertrofická kardiomyopatie, restrikční kardiomyopatie, vrozené vývojové vady, chlopenní vady)

mass index [BMI], cholesterolemie, triglycidemie, urgentní pořadí na čekací listině, předtransplantační nefarmakologická podpora oběhu), dárce (věk, pohlaví, váha, BMI, status CMV – cytomegalovirus, příčina smrti, anamnéza kouření, hypertenze v anamnéze, diabetes v anamnéze, hyperlipidemie v anamnéze, neznámá anamnéza), imunologických parametrů (předtransplantační panel protilátek, nesoulad dárce – příjemce v HLA [hlavní tkáňové antigeny], nesoulad dárce – příjemce v pohlaví), transplantačního období (doba studené ischemie, nesoulad dárce – příjemce v statusu CMV), časného (tj. do čtyř týdnů po TS) a dalšího (více než čtvrtý týden po TS) potransplantačního období (výskyt akutních rejekcí > 1B [Banffské klasifikace], incidence klinicky manifestních akutních rejekcí, rejekční skóre, dysfunkce štěpu, výskyt infekcí, výskyt CMV infekcí, výskyt hypertenze, diabetu či dyslipidemie) byla testována ve vztahu k přítomnosti koronárním IVUS prokázané KNSŠ (časné či detekované v jednom roce).

Výskyt klinických manifestací KNSŠ (časné detekované i jednorocní)

Klinická manifestace KNSŠ představovala kombinovaný sledovaný ukazatel čítající výskyt akutního koronárního syndromu, maligní poruchy rytmu, náhlé smrti či srdečního selhání (při vyloučení ostatních příčin, jako např. akutní rejekce).

Statistické metody

Kontinuální proměnné (údaje) jsou vyjadřovány jako průměr ± směrodatná odchylka (SD). Test χ^2 (s korekcí podle Yatese v případě potřeby) byl použit k posouzení rozdílů dvou souborů v případě kategorických proměnných. T-test či Mannův-Whitneyův test byly použity k porovnávání rozdílů dvou souborů v případě kontinuálních proměnných. Kaplanova-Meierova metoda byla využita k sestavení křivek přežití bez výskytu jednotlivých klinických událostí. Ke srovnání odlišností průběhu křivek jednotlivých souborů bylo využito Mantelova-Coxova testu (kategorické proměnné). Mnohorozměrná analýza (logistická regrese) byla použita k určení rizikových faktorů výskytu časné detekované KNSŠ a ke konstrukci předpovědního modelu jejího výskytu. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou. K provedení statistických analýz byl použit software SYSTAT 10, 2000, SPSS Inc. Chicago II (ISBN 1-13-040429-2).

Výsledky

Výskyt morfologických známek KNSŠ

Morfologické známky časné detekované KNSŠ byly pomocí vyšetření IVUS prokázány v 28 případech, tj. u 41 % příjemců TS. KNSŠ detekovaná v jednom roce po TS pomocí IVUS byla nalezena v 26 případech, tj. u 53 % příjemců TS.

Výskyt jednotlivých alel a genotypů ve sledovaných souborech

Frekvenci výskytu jednotlivých alel a genotypů v jednotlivých souborech (soubor pro časné detekovanou KNSŠ, jednoletá KNSŠ) ukazují obrázky 1 a 2. Výskyt jednotlivých genotypů se v případě intron 4 a genových polymorfismů T786C nelišil od předpokládaného rozložení podle Hardyho-Weinbergovy rovnováhy [uvedeny hodnoty p pro oba soubory (p_{68}/p_{49}): intron 4: $p_{68} = 0,46$, $p_{49} = 0,49$; T786C: $p_{68} = 0,47$, $p_{49} = 0,18$]. V případě polymorfismu G894T byl u souboru s časné detekovanou KNSŠ nalezen statisticky významný rozdíl frekvence genotypů v neprospěch homozygotů TT ($p_{68} = 0,01$) oproti předpokládanému, který byl vypočten na základě Hardyho-Weinbergovy rovnováhy. U stejného polymorfismu sledovaného na souboru pro studium v jednom roce detekované KNSŠ se obdobný rozdíl, ve srovnání s předpokládaným rozložením, vypočteným na základě Hardyho-Weinbergovy rovnováhy, nacházel na hranici statistické významnosti ($p_{49} = 0,06$).

Vliv genových polymorfismů pro eNOS na výskyt KNSŠ

Pomocí jednorozměrné analýzy byl nalezen vztah mezi genotypem 4b4b pro eNOS a výskytem jak časné (OR 4,2; 95% CI: 1,0–16,5; $p < 0,05$), tak v jednom roce po TS detekované KNSŠ (OR 5,3; 95% CI: 1,2–23,2; $p < 0,05$). Naopak žádný vztah nebyl nalezen mezi genovými polymorfismy T786C a G894T pro eNOS a výskytem známek KNSŠ ať již časné, či jeden rok po TS (viz tabulky 2 a 3).

Obdobně pak byl pomocí jednorozměrné analýzy nalezen statisticky významný vztah mezi přítomností alely 4b a výsky-

Obrázek 1 Výskyt jednotlivých alel sledovaných genových polymorfismů pro eNOS ve sledovaných souborech

Obrázek 2 Výskyt jednotlivých sledovaných genotypů pro eNOS ve sledovaných souborech

tem jak časně (OR 3,6; 95% CI 1,0–13,2; $p < 0,05$), tak v jednom roce (OR 4,2; 95% CI: 1,1–6,6; $p < 0,05$) detekované KNSŠ. Pro žádnou jinou z testovaných alel studovaných genových polymorfismů eNOS obdobný vztah nalezen nebyl.

U dalších sledovaných faktorů byl pomocí jednorozměrné analýzy shledán statisticky významně vyšší výskyt morfologických známek časně detekované KNSŠ v závislosti na přítomnosti hypertenze u dárce ($p < 0,05$), vyšším BMI příjemce ($p < 0,05$) a vyšším věku dárce ($p < 0,01$).

Pomocí mnohorozměrné analýzy byly jako nezávislé rizikové faktory přítomnosti časně detekované KNSŠ prokázány: vyšší věk dárce ($p < 0,01$), vyšší BMI příjemce ($p < 0,05$), genotyp *4b4b* (OR 6,7; 95% CI: 1,1–40, $p < 0,05$) a alela *4b* ($p < 0,05$) intron 4 genového polymorfismu pro eNOS. Znalost věku dárce, BMI příjemce a intron 4 genového polymorfismu pro eNOS umožňují predikci časně detekované KNSŠ se senzitivitou 83 % a specifitou 84 % pomocí logistické regrese.

V případě KNSŠ detekované v jednom roce od TS neumožnil malý počet pacientů provedení mnohorozměrné analýzy. Pomocí jednorozměrné analýzy byl v případě ostatních sledovaných možných rizikových faktorů shledán vyšší výskyt morfologických známek KNSŠ detekované v jednom roce po TS v závislosti na přítomnosti hypertenze dárce ($p < 0,05$), výskytu diabetes mellitus u příjemce ve 4. týdnu od TS ($p < 0,05$), BMI příjemce ($p < 0,05$) a věku dárce ($p < 0,05$).

Výskyt klinických manifestací KNSŠ

Klinická manifestace KNSŠ byla ve sledovaném období (do 31. 12. 2006) zaznamenána u sedmi příjemců, tj. kumulativně u 10,3 % sledovaných příjemců. Výskyt klinických manifestací KNSŠ v čase od TS ukazuje *obrázek 3*.

Vliv genových polymorfismů pro eNOS na výskyt KNSŠ

Vliv jednotlivých námi studovaných genových polymorfismů na výskyt klinických manifestací KNSŠ ukazuje *tabulka 3*.

Tabulka 3 Výskyt jednotlivých genotypů pro eNOS u skupin příjemců TS s výskytem klinické manifestace KNSŠ a bez výskytu klinické manifestace KNSŠ

Genotypy		Klinická manifestace přítomna	Klinická manifestace nepřítomna	<i>p</i>
Intron 4	aa	*	*	NS
	ab	13,3 %	86,7 %	
	bb	10 %	90 %	
T786C	TT	3,7 %	96,3 %	$p < 0,05$
	TC	10,8 %	89,2 %	
	CC	50 %	50 %	
G894T	GG	3 %	97 %	NS
	GT	17,1 %	82,9 %	
	TT	*	*	

*Tento genotyp se ve sledovaném souboru nevyskytoval (viz *obrázek 2*)

Byla nalezena statisticky významná korelace (test χ^2 , metoda Kaplanova-Meierova, Mantelův-Coxův test) mezi genovým polymorfismem T786C (alela C, genotyp CC) a výskytem klinické manifestace KNSŠ (viz *tabulka 3* a *obrázky 4* a *5*).

V případě ostatních sledovaných možných rizikových faktorů byl nalezen pomocí jednorozměrné analýzy statisticky významně vyšší výskyt klinických manifestací KNSŠ v závislosti na přítomnosti anamnézy hypertenze dárce ($p < 0,05$), věku příjemce ($p < 0,05$) a věku dárce ($p < 0,01$).

Diskuse

Naše studie prokazuje, že genový polymorfismus *4b4b* (intron 4) pro eNOS a alela *4b* (intron 4) genu pro eNOS korelují s přítomností IVUS prokázaných morfologických známek jak časně, tak v prvním roce po TS detekované KNSŠ. Naše studie taktéž prokazuje, že alela *4b* a genotyp *4b4b* (intron 4) představují nezávislé rizikové faktory pro přítomnost morfologických známek časně po TS detekované KNSŠ. Současně naše práce prokazuje, že další studova-

Tabulka 2 Výskyt jednotlivých genotypů pro eNOS ve sledovaných skupinách příjemců TS s KNSŠ/bez KNSŠ

Genotypy		Časně detekovaná KNSŠ		<i>p</i>	V jednom roce detekovaná KNSŠ		<i>p</i>
		Přítomna	Nepřítomna		Přítomna	Nepřítomna	
Intron 4	aa	*	*	< 0,05	*	*	< 0,05
	ab	20 %	80 %		25 %	75 %	
	bb	51 %	49 %		64 %	36 %	
T786C	CC	50 %	50 %	NS	100 %	0 %	NS
	CT	51 %	49 %		59 %	41 %	
	TT	30 %	70 %		61 %	39 %	
G894T	GG	50 %	50 %	NS	59 %	41 %	NS
	GT	37 %	63 %		52 %	48 %	
	TT	*	*		*	*	

*Tento genotyp se ve sledovaném souboru nevyskytoval (viz *obrázek 2*)

Obrázek 3 Zastoupení příjemců TS bez výskytu klinických manifestací KNSŠ v jednotlivých časových obdobích od TS

Obrázek 4 Vliv genového polymorfismu T786C na výskyt klinických manifestací koronární nemoci srdečního štěpu – vliv jednotlivých genotypů

Obrázek 5 Vliv genového polymorfismu T786C na výskyt klinických manifestací koronární nemoci srdečního štěpu – vliv jednotlivých alel

né genové polymorfismy eNOS (T786C, G894T) nejsou rizikovými faktory pro přítomnost morfologických známek KNSŠ, ať již časně či v jednom roce detekované. Dále naše práce prokazuje, že přítomnost alely C a genotypu CC (T786C) pro eNOS koreluje s výskytem klinické manifestace KNSŠ.

Naše výsledky naznačují, že vzácná alela 4a (intron 4) by mohla být protektivním faktorem výskytu morfologických známek KNSŠ. Tento nálezy koreluje s výsledky studie Parka a spol., kteří sledovali výskyt koronární aterosklerózy u netransplantované populace.⁽⁷⁾ V rozporu s nálezy naší a citované práce je však celá řada studií, které buď vztah

mezi genovým polymorfismem intron 4 a výskytem koronární aterosklerózy v běžné populaci neprokazují, či naopak identifikují alelu 4a jako rizikový faktor pro výskyt koronární aterosklerózy v běžné populaci.

Při bližší analýze vlivu polymorfismu intron 4 na výskyt ischemické choroby srdeční (ICHS) se v poslední době ukazuje, že v této oblasti přetrvává velké množství nejasností. Již intronická lokalizace tohoto polymorfismu činí jeho funkční významnost méně pravděpodobnou. Navíc patrně není důkazu, a to klinického ani experimentálního, o vlivu tohoto polymorfismu na aktivitu eNOS. Rovněž tak neexistuje v klinické praxi doklad o funkčním vlivu tohoto polymorfismu na koncentrace NO, nálezy jsou kontroverzní. Dokonce se v současné době připouští u tohoto polymorfismu možnost existence vazby na jiný funkční polymorfismus v regulačních oblastech genu pro eNOS. Metaanalýza studií, zkoumajících vliv genových polymorfismů pro eNOS na výskyt ischemické choroby srdeční, považuje genový polymorfismus 4a4a pro eNOS za rizikový faktor (OR 1,12, 95% CI: 1,01–1,24, $p = 0,02$). Podrobnější analýza však ukazuje na vysoké množství malých studií prokazujících pozitivní vztah mezi genotypem 4a4a a výskytem KNSŠ u nekavkazské populace (Asiaté).⁽⁵⁾ Naopak v evropských studiích převažují nálezy, které tento vztah nepotvrzují.^(8–10) Velké populační studie, zkoumající vztah mezi genovým polymorfismem intron 4 pro eNOS a výskytem ICHS, chybějí. Do objasnění těchto základních vztahů zůstávají všechna možná vysvětlení, pokoušející se objasnit rozličnost nálezů zkoumajících v klinické praxi vztah mezi genovým polymorfismem intron 4 pro eNOS a výskytem koronární patologie, spekulacemi.

Překvapivým nálezem je rovněž to, že již nosičství jedné alely 4a vykazuje protektivní vlastnosti k průkazu morfologických známek KNSŠ. Velikost naší studie neumožnila posoudit význam homozygotní kombinace (4a4a) na rozvoj KNSŠ vzhledem k nízkému výskytu alely 4a v naší populaci (0 % homozygotů 4a4a v našem studijním souboru bylo v souladu s očekávaným výskytem podle Hardyho-Weinbergovy rovnováhy).

Uvedený nálezy může být zapříčiněn třemi faktory. Prvním z nich je použitá metoda výběru probandů. V běžné populaci jsou až na velmi vzácné výjimky jako probandi zařazováni pacienti se symptomy ICHS (akutní koronární příhody, stavy po akutních koronárních příhodách, syndrom anginy pectoris s prokázanými morfologickými známkami koronární nemoci pomocí selektivní koronarografie). Jako kontrolní skupiny jsou vybíráni jedinci bez anamnézy ICHS (věkem a pohlavím odpovídající studijní skupině). Prakticky vždy se tak jedná o srovnávací studie. Důsledkem takového postupu je, že do kontrolních skupin musejí být při znalosti asymptomatického výskytu ICHS v běžné populaci zařazováni i jedinci s asymptomatickou koronární aterosklerózou. Uvedený postup tak může vést (podle počtu takto zařazených jedinců) k jistému znevýhodnění studovaného rizikového faktoru. Námi provedená studie u pacientů po TS ve vztahu k vývoji KNSŠ však tyto nedostatky obchází; jedná se o průřezovou studii, která porovnává je-

dince s morfológickými známkami KNSŠ a bez nich. Druhým momentem je věk dárců. Zatímco v běžné populaci je průměrný věk studijních souborů přibližně 57 let, průměrný věk dárců v našem souboru je 33 ± 11 let. Lze předpokládat, že vzhledem k populačnímu významu genových polymorfismů pro eNOS v porovnání s běžnými rizikovými faktory aterosklerózy, výskyt ICHS bude ve vyšší věkové skupině spíše ovlivněn výskytem klasických rizikových faktorů než samotným genovým polymorfismem. Síla takového genového polymorfismu k jeho uplatnění pak musí být větší (homozygot vs. heterozygot). Naopak v nižší věkové skupině (jako jsou dárci srdce v našem studijním souboru), kde výskyt klasických rizikových faktorů je daleko nižší, může dojít ke zřetelnějšímu uplatnění vlivu samotných genových polymorfismů. Třetím faktorem může být právě kumulace rizikových faktorů (ať již imunologické či neimunologické povahy) u nemocných po TS. Vzhledem k jejich velmi častému výskytu (hypertenze, dyslipidemie, abnormality glukózové homeostázy, akutní rejekce, chronická rejekce vůči hostiteli, léčba steroidy apod.) může právě funkční genový polymorfismus kandidátního genu představovat onen významný mechanismus, který ovlivní, zda k rozvoji morfológických známek KNSŠ v daném časovém období dojde, či nikoli.

Na rozdíl od genového polymorfismu intron 4 pro eNOS se u ostatních námi studovaných genových polymorfismů pro eNOS nepodařilo prokázat vztah k přítomnosti KNSŠ. Proč pouze genový polymorfismus intron 4, ze všech ostatních genových polymorfismů pro eNOS, je podle našich nálezů rizikovým faktorem KNSŠ, zůstává na úrovni úvah. Na základě předpokladů o vlivu tohoto genového polymorfismu na dostupnost eNOS (předpokládá se snížená exprese eNOS a v jejím důsledku snížená produkce NO) se v první řadě nabízí vysvětlení, spočívající v úvaze o dostatečné síle účinku tohoto polymorfismu na pochody na úrovni cévní stěny oproti ostatním. Základním problémem na úrovni studia vlivu genových polymorfismů na eNOS se však v současné době jeví ujasnění funkčního významu těchto polymorfismů. Pouze u genového polymorfismu T786C je funkční vliv na dostupnost NO vcelku s určitými výhradami akceptován jako prokázaný, zatímco u zbývajících dvou (intron 44, G894T) jsou nálezy považovány za kontroverzní.⁽⁵⁾ V případě intron 4 se dokonce uvažuje o vazebné nerovnováze mezi touto variantou a jinými funkčními variantami v regulačních oblastech genu eNOS. Neexistují tak žádné všeobecně akceptované závěry o síle vlivu každého jednotlivého genového polymorfismu na dostupnost eNOS (a potažmo NO) v porovnání s druhým. Již vůbec nic pak nevíme o funkčním dopadu jednotlivých genových polymorfismů pro eNOS na koncentraci NO za stresových podmínek (rizikové faktory aterosklerózy, v případě KNSŠ jak imunologické, tak neimunologické faktory). Výsledky uvedené studie pak mohou skutečně prokazovat, že pouze funkční význam genového polymorfismu v intron 4 je na rozdíl od ostatních dostatečně velký k zabezpečení demonstrace vztahu k vývoji KNSŠ. Zda-li se však jedná o důsledek přímého vlivu genového polymor-

fismu intron 4 na dostupnost/aktivitu eNOS, či zda představuje uvedený genový polymorfismus pouze gen asociovaný s nemocí bez kauzálního vztahu (např. díky jeho vztahu k přítomnosti k jinému genovému polymorfismu) ukáže až další výzkum.

Významným nálezem je vztah mezi genovým polymorfismem T786C a výskytem klinických manifestací KNSŠ. Nález vztahu mezi genovým polymorfismem T786C pro eNOS odpovídá při bližším studiu údajům ze studií týkajících se běžné (netransplantované) populace. Při podrobném zkoumání těchto studií je zřetelné, že prakticky všechny klinické studie jsou ve skutečnosti porovnávacími studiemi, zkoumajícími vztah mezi genovými polymorfismy pro eNOS a výskytem klinicky manifestní ICHS. Nejedná se tak o morfológické studie zkoumající vztah mezi genovými polymorfismy pro eNOS a přítomností morfológických známek koronární aterosklerózy, neboť jako probandi studijních skupin jsou prakticky výhradně vybíráni nemocní se symptomatickou koronární aterosklerózou. Navíc ve většině případů se jedná o nemocné s akutním koronárním syndromem. Nelze tak opomenout, že patofyziologie akutního koronárního syndromu se jako komplikace koronární aterosklerózy významným způsobem liší od vzniku morfológických známek (koronární) aterosklerózy. Vzhledem k všeobecně akceptovanému funkčnímu významu genového polymorfismu T786C pro eNOS lze, s přihlédnutím k ohromnému pleiotropnímu účinku NO na pochody na úrovni cévní stěny, vztah mezi genovým polymorfismem T786C a výskytem klinických manifestací KNSŠ chápat. Vysvětlení rozdílů mezi vlivem jednotlivých studovaných genových polymorfismů pro eNOS na výskyt klinických manifestací KNSŠ lze konstruovat, obdobně jako u jejich vztahu k morfológickým známkám KNSŠ.

Pozoruhodným zjištěním je nalezený významový nesoulad mezi některými genovými polymorfismy pro eNOS a vztahem k morfológickým známkám KNSŠ na jedné straně a výskytem klinických manifestací KNSŠ na straně druhé. Námi prezentovaná studie naznačuje, že genový polymorfismus v intron 4 oblasti eNOS koreluje s přítomností morfológických známek KNSŠ (a tak vývojem morfológického podkladu) a nekoreluje s výskytem klinických manifestací KNSŠ. Naopak genový polymorfismus T786C koreluje s výskytem klinických manifestací KNSŠ, a nikoli s výskytem morfológických známek KNSŠ. Vysvětlení tohoto nálezu však činí nemalé obtíže a pohybuje se za hranicí spekulací, předpokládáme-li, že oba zmiňované genové polymorfismy ovlivňují funkční dostupnost stejného genového produktu – konstitutivní endoteliální syntázy oxidu dusnatého. Jak již bylo v předchozím textu řečeno, základním problémem studia vztahu mezi genovými polymorfismy pro eNOS a výskytem aterosklerózy je v případě intron 4 a polymorfismů G894T nedostatek jasných důkazů o jejich klinicky relevantním funkčním vlivu na pochody na úrovni cévní stěny. V současné době nemáme ani důkazy o přímém kauzálním vztahu mezi uvedenými genovými polymorfismy (intron 4, T786C a G894T) pro NOS, dostupností eNOS, koncentracemi NO a vznikem/vývojem

aterosklerózy, včetně jejích klinických manifestací. Všechny doposud prezentované studie pracují s genovými polymorfismy pro eNOS jako s kandidátními geny, a prozatím na základě těchto předpokladů se snaží o prokázání korelace mezi jednotlivými kandidátními genovými polymorfismy a koronární (či jinou) aterosklerózou. Je tak otázkou, zda některé z těchto polymorfismů (zejména intron 4 v našem případě) nejsou asociovány s jinými genovými polymorfismy, u nichž kauzální vztah po ose gen – genový produkt – klinický vliv – onemocnění existuje. Jen tak lze patrně vysvětlit rozdíl mezi jednotlivými sledovanými polymorfismy pro eNOS a výskytem morfologických známek KNSŠ a jejích klinických manifestací.

Prezentovaná studie svými výsledky zaměřuje pozornost při studiu KNSŠ zpět k dárci. Naše studie ukazuje, že vlastnosti dárce – v tomto případě genové polymorfismy pro eNOS – představují další důležitý faktor ovlivňující výskyt jak morfologických známek, tak klinických manifestací KNSŠ. Nemůže se však jednat o příliš překvapující nálezy, víme-li, že genetické vlivy představují nejvýznamnější rizikový faktor pro výskyt aterosklerózy v běžné populaci. Navíc nelze nevidět, že transplantace srdce představuje z pohledu studia rozvoje koronární patologie ideální a snadno dostupný model, umožňující studium interakce genetických a zevních vlivů (hypertenze, poruchy metabolismu lipidů a glukózy, imunitní reakce, imunosuprese apod.).

Z pohledu TS naše práce ukazuje, že znalost genotypu pro eNOS dárce umožní do jisté míry předvídat rozvoj morfologických známek a klinických manifestací KNSŠ. Tato znalost nám může umožnit identifikovat příjemce TS, který se nachází ve zvýšeném riziku výskytu této závažné komplikace potransplantačního průběhu. V případě znalosti účinných profylaktických opatření nám tak může pomoci v účinné prevenci vývoje, progresu či výskytu klinické manifestace KNSŠ. Potvrzení kauzálního vztahu mezi genovými polymorfismy pro eNOS a rozvojem KNSŠ možná v nedaleké budoucnosti umožní genovou léčbu/prevenci KNSŠ u nemocných s takovým rizikem.

Limitace práce

Autoři si uvědomují limitace prezentované studie. Významnou limitací je počet zařazených pacientů do studie. Přestože, z důvodů uvedených v předchozím textu, považujeme studijní populaci za reprezentativní vzorek populace příjemců TS, nelze zakrýt skutečnost, že získaný počet zařazených pacientů nezabezpečil při frekvenci výskytu jednotlivých alel v naší populaci dostatečný počet homozygotů v oblastech intron 4 a G894T. Při interpretaci výsledků týkajících se vlivu genového polymorfismu G894T nelze opominout skutečnost, že výskyt jednotlivých genotypů se statisticky významně odlišoval od očekávaného výskytu podle Hardyho-Weinergovy rovnováhy. Příčina této

skutečnosti je zcela nejasná, neboť jak jsme ukázali, soubor zařazených pacientů se v základních demografických údajích nelišil od příjemců nezařazených do studie. Navíc rozložení genotypů v případě zbývajících dvou variant (intron 4, T786C) se od očekávaného rozložení nikterak nelišilo. Rovněž tak způsob sběru probandů (zařazování do studie) prakticky zcela znemožňoval případnou selekci na straně dárců, nositelů jednotlivých genotypů.

Závěr

Výsledky představené studie ukazují na vztah mezi genotypem *4b4b* a alelou *4b* (genový polymorfismus intron 4) pro eNOS a výskytem jak časné, tak v jednom roce detekovaných morfologických známek KNSŠ. Ukazuje, že genotyp *4b4b* a alela *4b* (intron 4) představují nezávislé rizikové faktory pro výskyt časné detekovaných morfologických známek KNSŠ po TS. Naše práce rovněž ukazuje na korelaci mezi alelou C a genotypem CC (genový polymorfismus T786C) pro eNOS a výskytem klinických manifestací KNSŠ. Výsledky naší práce tak ukazují na možný vliv genových polymorfismů pro eNOS na vývoj morfologických známek a výskyt klinických manifestací KNSŠ.

Literatura

1. Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, et al. Registry of the International Society for heart and lung transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report-2007. *J Heart Lung Transplant* 2007;26: 769–81.
2. Weis M, von Sheidt W. Cardiac allograft vasculopathy. *Circulation* 1997;96:2069–77.
3. Voetsch B, Jin RC, Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency and atherothrombosis. *Histochem Cell Biol* 2004;122:353–67.
4. Weis M, Cooke JP. Cardiac allograft vasculopathy and dysregulation of the NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23: 567–75.
5. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2006;164:921–35.
6. Kapadia SR, Nissen SE, Tuzcu EM. Impact of intravascular ultrasound in understanding transplant coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 1999;14:140–50.
7. Park KW, You KH, Oh S, et al. Association of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism with acute coronary syndrome in Koreans. *Heart* 2004;90:282–5.
8. Sigush HH, Surber R, Lehmann MH, et al. Lack of association between 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:229–36.
9. Poirier O, Mao C, Mallet C, 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;29:284–90.
10. Via M, Lopez-Alomar A, Valveny N, et al. Lack of association between eNOS gene polymorphisms and ischemic heart disease in the Spanish population. *Am J Med Gen* 2003;116A:243–8.

Došlo do redakce 10. 11. 2008

Přijato po úpravách 29. 1. 2009