

SESJA IX

SOBOTA 22.10, 11.20–12.50

MARKERY GENETYCZNE, POLIMORFIZMY

48

Chlamydiae pneumoniae – izolacja przez identyfikację materiału genetycznego z krwi w grupie pacjentów poddanych planowej koronarografii

Paweł Burchardt¹, Anna Goździcka-Józefiak²,
Michał Wierchowicki³, Jan Wachowiak⁴,
Tomasz Siminiak¹

¹ Akademia Medyczna, Oddział Kardiologii, Szpital Wojewódzki, Poznań

² Zakład Wirusologii Molekularnej, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

³ II Klinika Kardiologii Akademii Medycznej, Poznań

⁴ Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Wprowadzenie: Aktywacja lokalnego stanu zapalnego w śródbrzońku może być spowodowana reakcją autoimmunologiczną. Przyczyną tego zjawiska jest wysoka homologia sekwencji aminokwasowych białek bakteryjnych i białek ustrojowych, które są błędnie rozpoznawane przez komórki immunokompetentne. W związku z tą hipotezą wzrost liczby zakażeń może przełamywać naturalną barierę immunologiczną.

Jest bardzo niewiele danych o wczesnej (przed wystąpieniem zmian obstrukcyjnych widocznych w obrazie koronarograficznym) molekularnej diagnostyce wykrywania patogenów infekcyjnych. Te, które istnieją, opierają się raczej na wykrywaniu specyficznych przeciwciał niż na identyfikacji patogenów przez izolację ich DNA.

Cel: Celem naszej pracy było wykrywanie bakterii *Chlamydiae pneumoniae* (HP), które mogą być uznane za wczesne markery miażdżycy i potencjalny aktywator lokalnego stanu zapalnego, przez izolację specyficznego DNA z krwi, przed wystąpieniem zmian obstrukcyjnych w naczyniach wieńcowych.

Materiał i metody: Badano 53 osoby w średnim wieku 55,7±25 lat, 12 kobiet, 41 mężczyzn, zakwalifikowanych do planowej koronarografii na podstawie dodatniego testu wysiłkowego lub nasilenia zmian wysiłkowych w ostatnich dwóch miesiącach.

Od wszystkich pacjentów DNA było izolowane z krwi, następnie przeprowadzana była amplifikacja specyficznych rejonów przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), celem ich identyfikacji. Następnie przeprowadzono obliczenia statystyczne.

Wyniki: U 30 pacjentów spośród 53 stwierdzono istotne zmiany w naczyniach wieńcowych. DNA HP wykryto u 6 pacjentów spośród grupy 23 osób bez zmian obstrukcyjnych. Obserwowany był związek pomiędzy infekcją HP a liczbą czynników ryzyka wieńcowego, choć statystycznie znamienne był związek infekcji HP i palenia papierosów ($p=0,03$). DNA HP nie obserwowano w grupie pacjentów z istotnymi zmianami w naczyniach wieńcowych.

Wnioski: W grupie pacjentów, wśród których przeprowadzono planową koronarografię, DNA HP wyizolowano u pacjentów bez obstrukcyjnych zmian w naczyniach wieńcowych. Do wyjaśnienia możliwej roli patogenów w powstawaniu płytki miażdżycowej wymagane są dalsze badania oparte na technice izolacji ich DNA.

49

Relations between endothelial nitric oxide gene and angiotensin-converting gene polymorphisms and some biochemical parameters in patients with cardiological syndrome X

A. Jabrocka¹, W. Kolasińska-Kloch², B. Kieć-Wilk¹,
M. Kloch¹, A. Dembińska-Kieć¹

¹Zakład Biochemii Klinicznej, Katedra Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²II Klinika Kardiologii, Instytut Kardiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Cardiological syndrome X (CSX) is defined as effort anginal pain, positive exercise tolerance test and absence of angiographically documented stenosis in the coronary arteries. Some genetic predispositions and metabolic disturbances can influence the development of this syndrome. The aim of our study was to assess the associations between some biochemical parameters (the blood nitric oxide metabolites (NOx), levels of endothelin-1 (ET-1), insulin levels after the oral glucose tolerance test - OGTT as well as insulin, free fatty acids, triglycerides and leptin levels after the oral lipid tolerance test - OLTT) and polymorphism of ACE and eNOS (VNTR and Glu298Asp) genes in patients with CSX.

36 normotensive patients with CSX and a control group - 30 healthy volunteers were included into the study. The genotypes were determined by the polymerase chain reaction.

Patients with syndrome X had lower levels of fasting concentration of NOx compared with controls. The fasting NOx/ET-1 ratio was lower in patients with syndrome X. The higher insulin concentration in patients with syndrome X was

observed in the 60-th minute of the OGTT and higher levels of triglycerides and free fatty acids during the OLTT. Patients with genotype T/T Glu298Asp of eNOS and 4/4 VNTR of eNOS of CSX group revealed lower levels of NOx compared to patients with genotypes G/G and 5/5, respectively.

In our study we confirm the existence of some genetic and metabolic disturbances in patients with CSX. Some of them are common for metabolic and cardiological syndrome X.

50

Haplotyp H2 genu P2Y12 jest związany z opornością biochemiczną na kłopidogrel – doniesienie wstępne

Ł. A. Małek¹, M. Śpiewak¹, B. Kisiel², R. Głównyńska¹, M. Szpotańska¹, M. Rosiak¹, G. Kostrzewa², K. J. Filipiak¹, M. Byśko-Zawadzka¹, M. Grabowski¹, R. Płoski³, G. Opolski¹

¹Katedra i Klinika Kardiologii, Akademia Medyczna, Warszawa

²Oddział Diabetologii, Patologii Noworodka i Wad Wrodzonych, Katedra Pediatrii, Akademia Medyczna, Warszawa

³Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Zakład Genetyki Medycznej, Akademia Medyczna, Warszawa

Wstęp: Odpowiedź biochemiczna lub kliniczna na kłopidogrel może być osłabiona ze względu na występowanie oporności na lek dotyczącej nawet 25% populacji. W występowaniu oporności mogą odgrywać rolę czynniki genetyczne, w tym m. in. geny zaangażowane w funkcjonowanie leku.

Cel: Ocena wpływu haplotypów genu dla receptora płytkowego P2Y12 dla aktywnej postaci kłopidogrelu na występowanie oporności biochemicznej na lek.

Materiał i metody: Do badania włączono dotychczas 51 pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrego zespołu wieńcowego, leczonych kłopidogrelem w dawce inicjującej 300 lub 600 mg oraz dawce podtrzymującej 75 mg. U każdego pacjenta wykonano między 5. a 9. dobą leczenia oznaczenie funkcji płytek w teście z ADP przy pomocy urządzenia PFA-100. Jednocześnie określono częstość występowania haplotypów H1 i H2 genu dla receptora P2Y12 dzięki oznaczeniu polimorfizmu i-T744C.

Wyniki: Badana grupa liczyła 32 mężczyzn i 19 kobiet w wieku 35–85 lat. U 10 pacjentów (19,6%) zaobserwowano biochemiczną oporność na lek mierzoną czasem do powstania czopu pierwotnego (*closure time*, CT) – CADP-CT < 133 s. Genotyp H1/H2 występował u 15 pacjentów (29,4%), a genotyp H2/H2 u jednego chorego (1,96%). U osób z przynajmniej jednym haplotypem H2 obserwowano trend w kierunku częstszego występowania oporności na kłopidogrel w porównaniu z osobami z haplotypem H1 (37,5% vs 12,9%, p=0.0537). Analiza wieloczynnikowa, do której włączono parametry kli-

niczne i biochemiczne, które w analizie jednoczynnikowej wykazały trend w kierunku częstszego występowania kłopidogrel-oporności (p<0,1), haplotyp H2 okazał się najsilniejszym niezależnym czynnikiem związanym z brakiem odpowiedzi na lek (*odds ratio* [OR]=28,75, 95% *confidence interval* [95%CI] 2,1-390,4; p=0,013).

Wnioski: Pomiar funkcji płytek przy pomocy urządzenia PFA-100 pozwala wyodrębnić osoby z opornością biochemiczną na kłopidogrel. Haplotyp H2 receptora dla aktywnej formy leku jest związany z występowaniem zjawiska oporności. Włączenie kolejnych pacjentów do badania umożliwi dokładniejsze określenie powyższej zależności oraz ocenę aspektu klinicznego zjawiska.

51

Polimorfizm genów ATP2A2 oraz angiotensynogenu u pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym powikłanym lub nie i przerostem lewej komory serca

Beata Kieć-Wilk¹, Katarzyna Stolarz², Agnieszka Olszanecka², Marek Bodzioch¹, Kalina Kawecka-Jaszcz², Aldona Dembińska-Kieć¹

¹Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

²Klinika Kardiologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Wyniki badań nad związkiem polimorfizmu M235T genu angiotensynogenu (AGT) z przerostem lewej komory serca (LVH) w nadciśnieniu tętniczym są niejednoznaczne. Gen ATP2A2 koduje białko SERCA2 (*sarco (endo) plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*), przez-błonowy transporter jonowy, regulujący stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego w kardiomiocytach.

Cel pracy: Ocena występowania polimorfizmów M235T genu AGT i ATP2A2 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i LVH.

Badaniem objęto 107 pacjentów z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, których na podstawie badania echokardiograficznego M-mode i 2-D (Sonos 5500) podzielono na grupę bez LVH (53 os.) oraz z LVH (54 os.). Grupę kontrolną stanowiło 50 zdrowych ochotników. U wszystkich wykonano całodobowy automatyczny pomiar ciśnienia tętniczego ABPM (SpaceLabs 90207). Do oznaczeń genetycznych użyto DNA wyizolowanego z leukocytów krwi obwodowej (kit Qiagen). Analizę wybranych eksonów 15., 16. i 18. genu ATP2A2, kodujących domeny bezpośrednio związane z transportem wapnia, wykonano za pomocą analizy sekwencji (Kits BioRad, Qiagen). Polimorfizm genu AGT M235T oznaczono metodą *real-time* PCR przy użyciu sond TaqMan.

Wyniki: Badane grupy były porównywalne pod względem wieku ($51,56 \pm 20$ lat), masy ciała ($82,5 \pm 15,45$ kg) oraz płci (M/K 48%/52%). W genie ATP2A2 wykryto nowy, nieopisywany wcześniej polimorfizm G723A, w eksonie 15. Substytucja G→A była stwierdzana u 18% grupy kontrolnej, 6% pacjentów z LVH i 5,2% pacjentów bez LVH. Częstość allelu A była istotnie wyższa w grupie kontrolnej niż u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, niezależnie od obecności LVH ($p=0,017$). Nie stwierdzono różnic w rozmieszczeniu genotypów SERCA2 pomiędzy grupą z LVH a bez LVH ($p=0,06$). Nie stwierdzono również różnic wartości skurczowego (SBP) i rozkurczowego (DBP) ciśnienia tętniczego ($p=0,66$ dla SBP i $p=0,83$ dla DBP). Częstość genotypów (MM 35,4%, MT 41,6%, TT 23%) dla AGT była zgodna z przewidywaną wg prawa Hardy-Weinberga. U homozygot TT w grupie z nadciśnieniem tętniczym obserwowano najwyższe wartości SBP w stosunku do pozostałych genotypów ($p=0,06$). W grupie kontrolnej nie wykazano podobnej tendencji. Rozkład genotypów wśród pacjentów z nadciśnieniem tętniczym nie różnił się w zależności od obecności LVH (przerost MM 41%, MT 41%, TT 18%, vs bez przerostu MM 31,5%, MT 41,4%, TT 28,1%, $p=0,43$).

Obserwowana zmniejszona częstość występowania allelu A polimorfizmu G/A genu ATP2A2 w grupie z nadciśnieniem tętniczym może sugerować protekcyjną rolę polimorfizmu eksonu 15 genu ATP2A2. Tendencja do wyższych wartości SBP u homozygot TT, wydaje się wskazywać na udział polimorfizmu M235T genu AGT w rozwoju nadciśnienia tętniczego.

Badanie finansowane przez MNiL, grant nr P05B14727

ślenie wpływu indywidualnej zmienności genetycznej i skłonności do rozwoju zespołu metabolicznego dla indywidualnego człowieka wymaga narzędzi biostatystycznych stosujących wielowymiarowe techniki eksploracyjne.

Powszechnie wykorzystywana do analizy wyników mikro-macierzy ekspresyjnych analiza składowych głównych może służyć do redukcji ilości zmiennych i do wizualizacji grup genów o zbliżonym działaniu. W niniejszej pracy podjęto próbę wykorzystania analizy składowych głównych i analizy skupień do określenia wpływu powszechnych polimorfizmów dwu czynników transkrypcyjnych PPAR ≥ 2 12Pro \geq Ala C>G i FoxC2-512 C>T oraz polimorfizmów genów uczestniczących w regulacji gospodarki lipidowej [LPL-H (In8T \geq G), LPL-P (In6C \geq T)], *scavenger receptor* klasy B typ I [SR-BI silent (419Arg) C \geq T] oraz białka *cholesterol ester transfer protein* [CETP (G \geq A 279)]. Cechy fenotypowe określone były przez 74 zmienne charakteryzujące cechy antropometryczne, kliniczne i biochemiczne osób będących członkami wielopokoleniowych rodzin otyłych z regionu Małopolski.

Zarówno analiza skupień, jak i analiza składowych głównych pokazała skupienia polimorfizmów genetycznych o zbliżonym wpływie na fenotyp. Wyniki obu analiz są podobne, choć nie identyczne. Wskazują one jednoznacznie na wzajemny wpływ czynników transkrypcyjnych regulujących geny biorące udział w szlakach związanych z regulacją poziomu lipidów i kształtujących indywidualną insulinooporność. Interakcje międzygenowe zmieniają w sposób istotny obraz wpływu pojedynczego polimorfizmu. Kompleksowa analiza interakcji wielu genów za pomocą wielowymiarowych technik eksploracyjnych przybliżyła możliwość użycia markerów genetycznych dla zindywidualizowanej prewencji zespołu metabolicznego.

52

Interakcje genowe czynników transkrypcyjnych a indywidualizacja prewencji zespołu metabolicznego

I. Wybrańska, M. Malczewska-Malec, K. Kosno, A. Dembińska-Kieć

Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Zespół metaboliczny i inne powszechnie występujące choroby złożone następczą wielu trudności interpretacyjnych ze względu na udział czynników środowiskowych, które nakładają się na podłoże wielogenowe. Interakcje środowiskowe i genomowe wpływają na ukształtowanie predyspozycji do rozwoju chorób złożonych. Markery genetyczne (w tym pojedyncze układy polimorficzne) nie są jeszcze stosowane w określeniu ryzyka w praktyce klinicznej. Trwają wielośrodkowe badania dla określenia zależności pomiędzy polimorfizmami wielu genów i czynników środowiskowych, które poprzez mechanizmy epigenetyczne ostatecznie kształtują fenotyp. Okre-

53

Nutrigenomika – nowa dziedzina badań medycyny prewencyjnej w kardiologii

A. Dembińska-Kieć

Katedra Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Nutrient – różnorodny pod względem jakości chemicznej, ale i ilości składnik pożywienia – działa w ustroju jako molekula sygnalizacyjna, kofaktor lub determinant funkcji i struktury różnych molekuł i/lub czynników utrzymujących homeostazę komórki, tkanek i organów. To nutrient w całym życiu organizmu katalizuje reakcje i reguluje transkrypcję, translację, metaboliczne procesy postranslacyjne komórki. Interakcja nutrient – genom przebiega w różny sposób w zależności od okresu życia organizmu i jego *gamituru* genowego. Składniki pożywienia odgrywają zatem znaczącą rolę w organogenezie, są istotnym elementem utrzymania zdrowia i prewencji scho-

rzeń. Nutrigenomika jest młodą, dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki tzw. *ery badań po poznaniu genomu człowieka*, koncentrującą się na badaniu interakcji pomiędzy składnikami pożywienia, czynnikami genetycznymi (polimorfizmem/mutacjami) a stanem zdrowia. Celem badań prowadzonych w zakresie nutrigenomiki jest ustalenie strategii wczesnego, zindywidualizowanego żywienia w celu prewencji chorób, poprawy jakości życia i uzyskania zdrowszego przebiegu procesu starzenia się organizmu. Nutrigenomika, obok zwyczajowych uwarunkowań, jest już świadomie stosowana od lat w odniesieniu do niektórych rzadkich schorzeń jednogenowych, takich jak np. fenylketonuria. Założeniem nutrigenomiki jest stworzenie podstawy do zindywidualizowanych zaleceń bazujących na materiale genetycznym poszczególnych organizmów (m.in. ustalenie narzędzia diagnostycznego – mikromacierzy ekspresyjnej) w celu zapobiegania chorobom wieloczynnikowym (takim jak np. nadciśnienie, zespół metaboliczny, miażdżyca, starzenie się organizmu, demencja, ale i choroby nowotworowe, choroby o podłożu immunologiczno-zapalnym itd.) na wiele lat przed ich wystąpieniem.

Sukces w tym obszarze wymaga współpracy wielu dziedzin nauki (w tym biotechnologii, medycyny, biologii, bioinformatyki, nanotechnologii, ekonomii etc.) oraz szeroko pojętych badań z dziedziny genomiki, transkryptomiki, proteomiki, metabolomiki w poszczególnych grupach etnicznych. Wrażliwość genomu ludzkiego na składniki pożywienia skłania do postawienia hipotezy, że ekspresja genów ludzkich (powstawanie mutacji) była w historii rozwoju człowieka modyfikowana głównie w odpowiedzi na zawarte w diecie składniki pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Było to jedno z dostosowań organizmu do czynników środowiska zewnętrznego. Rozwój schorzeń wielogenowych (w tym cywilizacyjnych) tłumaczy się teorią oszczędnego genotypu (*thrifty genotype*), według której ewolucja promowała warianty genów umożliwiające przeżycie w okresie głodu, zimna. Obecnie, w warunkach łatwego dostępu wysokoenergetycznego pokarmu, nosiciele tych wariantów są predysponowani do rozwoju np. zespołu metabolicznego z jego konsekwencjami. Poszerzana jest pula genów (i ich wariantów polimorficznych) analizowanych w ramach teorii oszczędnego genotypu. Dla przykładu bada się polimorfizmy genomu mitochondrialnego zarówno przy lipotoksyczności/cukrzycy, jak i pod kątem rozwoju choroby Parkinsona czy Alzheimera.

W wykładzie przedstawione zostaną metody badań i przykłady zastosowania tej nowej dziedziny nauki o szerokim zakresie badawczym.

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) dostarczane w diecie z prewencją różnych schorzeń, w tym otyłości, cukrzycy, miażdżycy/choroby niedokrwiennej serca i naczyń, chorób neurologicznych, nowotworów. PUFA działają na komórki głównie poprzez zmianę struktury lipidowej błon, metabolizmu komórki, przewodnictwa sygnałów, regulacji ekspresji genów. Innym przykładem składników pożywienia o istotnym oddziaływaniu na aktywność genomu są karotenoidy, z których β -karoten jest prekursorem witaminy A i kwasu retinowego. We współpracy z kwasami tłuszczowymi pełnią one rolę regulatorów procesów biologicznych (od rozwoju embrionalnego po proces starzenia się organizmu z towarzyszącymi objawami i chorobami nowotworowymi). Wykazano jednakże, że spożycie PUFA wpływa na poziom HDL-C zależnie od polimorfizmu ApoA-1. Nosiciele allelu A (-75

G/A) wykazują znaczący wzrost HDL-C wraz ze wzrostem spożycia PUFA, natomiast homozygoty-nosiciele częstszego allelu G charakteryzują się spadkiem poziomu HDL-C przy zwiększeniu spożycia PUFA. Udowodniona została rola polimorfizmów genów enzymów związanych z metabolizmem kwasu foliowego i rozwojem miażdżycy. Ale wykazano również, że polimorfizm MTHFR C677T determinuje związek pomiędzy spożyciem kwasu foliowego a rozwojem raka piersi. W badaniu ATTICA wykazano, że stosowanie diety śródziemnomorskiej związane było z obniżeniem poziomu homocysteiny, ale tylko u nosicieli allelu T polimorfizmu MTHFR C677T. A stosowanie suplementacji β -karotenem w celu prewencji chorób układu krążenia zwiększało zapadalność na raka płuc u palaczy tytoniu, co może łączyć się z epigenetyczną modyfikacją – hypometylacją eksonu 7 i 8 genu czynnika transkrypcyjnego RAR β 2 i zmniejszeniem jego aktywności w stosunku do RAR α .

Czynnikiem warunkującym znaczny postęp w badaniach z zakresu nutrigenomiki jest prowadzenie wspólnych, międzynarodowych projektów np. pod patronatem Unii Europejskiej (np. *the European Nutrigenomics Organisation* – NUGO czy LIPGENE: *Diet, genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis*).

Docelowo wdrożenie modelu żywienia zindywidualizowanego opierać się będzie na znajomości indywidualnego *garnitu* genetycznego i umiejętnym wykorzystaniu wiedzy o zależnościach pomiędzy poszczególnymi składnikami pożywienia i genami. Jednym z założeń dalszego postępu nutrigenomiki jest także edukacja społeczeństwa w zakresie udziału składników pożywienia w funkcji organizmu i utrzymaniu zdrowia.

NuGO (FP6-2002-FOOD 506360) NuGO European Nutrigenomics Organisation – Linking genomics, nutrition and health research; LIPGENE (FP6 FOOD CT-2003-505944) (*Diet, genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis*)