

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wstęp: W regionie europejskim choroba wieńcowa (*Coronary artery disease*, CAD) jest najczęstszą przyczyną śmiertelności. CAD jest wywołana współistniejącymi czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Udział genetycznie uwarunkowanych czynników dziedzicznych szacuje się na 40-60%. Pomimo postępu w diagnostyce oraz leczeniu CAD nadal poszukuje się genotypowych i fenotypowych markerów CAD. Typowanie genów kandydatów koncentruje się na powiązaniu pomiędzy zmiennością genetyczną w ramach określonych z góry genów będących przedmiotem zainteresowania, a fenotypem. Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego będąca etapem inicjującym rozwój miażdżycy tętnic wieńcowych jest związana m.in. z zaburzeniami metabolizmu folianów. Obecność polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genie kodującym reduktazę metyltetrahydrofolianową (MTHFR) powoduje zaburzenia metylacji, mające związek z rozwojem CAD. MTHFR katalizuje reakcję redukcji 5,10-metylenotetrahydrofolianu do aktywnej postaci kwasu foliowego (metyltetrahydrofolianu, 5-MTHF). Dostępność 5-MTHF odgrywa kluczową rolę w ilości krążącego tlenu azotu. Opisano wiele wariantów polimorfizmu genu MTHFR, jednak najwięcej uwagi poświęca się polimorfizmom c.665C>T (rs1801133) oraz c.1286A>C (rs1801131). Według bazy danych Genome Aggregation Database (gnomAD) w populacji ogólnej allel polimorficzny c.665C>T dotyczy 30.85% populacji, zaś allel c.1286A>C dotyczy 28.58% populacji. Obecność polimorfizmu MTHFR powoduje utratę od 40 do 70% funkcji enzymu w przypadku wariantu c. 665C>T oraz od 30 do 50% w przypadku wariantu c. 1298A>C.

Cel: Ocena wpływu zaburzeń metylacji uwarunkowanych polimorfizmem genu MTHFR na metabolizm folianów (kwas foliowy, 5-MTHF) u pacjentów z CAD. Ponadto badano wpływ zaburzeń metylacji na stężenie endogennych tioli - cząsteczek zawierających grupę sulfohydriową: homocysteiny (Hcy), cysteiny (Cys), zredukowanego glutationu (GSH), cysteinyloglicyny (CysGlyc).

Material: Badanie zaplanowano na grupie 250 pacjentów z rozpoznaną na podstawie koronarografii CAD. Łącznie pobrano materiał biologiczny (krew pełna żylna) od 213 pacjentów zakwalifikowanych i włączonych do badania od lutego 2020 do października 2022 (projekt realizowano w trakcie trwania pandemii koronawirusa SARS-CoV-2). Uzyskane wyniki pozwoliły na analizę grupy 42 pacjentów oraz 16 badanych w grupie kontrolnej. Grupa badana: 42 pacjentów (CAD+); 38 mężczyzn; 4 kobiety; śr. wiek 53.1 lat; śr. wiek w chwili rozpoznania CAD 47.1 lat, którzy mieli wykonaną koronarografię w trybie planowym lub z powodu ostrego zespołu wieńcowego. Grupa kontrolna: 16 pacjentów (CAD-); 12 mężczyzn; 4 kobiety, bez objawów klinicznych, u których nie stwierdzono przewężeń w tętnicach wieńcowych na podstawie koronarografii lub nie stwierdzono identyfikowalnej blaszki miażdżycowej w badaniu metodą wielorzędowej tomografii komputerowej mięśnia sercowego z oceną wskaźnika uwapnienia tętnic wieńcowych (CAC Scoring). Objętą badaniem populację podzielono ze względu na obecność choroby wieńcowej (CAD+) oraz od obecności wariantów polimorficznych genu MTHFR warunkujących występowanie zaburzeń metylacji (IM+).

Metody: Oznaczenie polimorfizmów genu MTHFR z krwi pełnej żylną metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR) z zastosowaniem sond TaqMan™. Identyfikowano następujące genotypy: c.[665C=];[665C=] (oba allele typu „dzikiego”); c.[665C>T];[665C=] (heterozygota, jeden allel z polimorfizmem); c.[665C>T];[665C>T] (homozygota, oba allele z polimorfizmem) oraz c.[1286A=];[1286A=] (oba allele typu „dzikiego”); c.[1286A>C];[1286A=] (heterozygota, jeden allel z polimorfizmem); c.[1286A>C];[1286A>C] (homozygota, oba allele z polimorfizmem).

Oznaczanie stężeń kwasu foliowego i 5-MTHF w surowicy krwi wykonywano metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, LC-MS). Oznaczanie stężeń endogennych tioli w surowicy krwi (Hcy, Cys, CysGly, GSH) wykonywano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Analiza statystyczna wykonana była przy użyciu programu Statistica v. 12.5 oraz „nakładki” do programu Excel: Resampling Stats Add-in for Excel v.4.

Wyniki: Wykazano, że polimorfizm c.[1286A>C];[1286A>C] genu MTHFR (homozygota c.1286 A>C) występował *istotnie statystycznie częściej* u pacjentów z chorobą wieńcową (CAD+) w porównaniu do pacjentów bez choroby wieńcowej (CAD-). Polimorfizm ten występuje *istotnie statystycznie* częściej u pacjentów z grupy (CAD+) w porównaniu do populacji europejskiej HapMap – CEU wybranej do porównania statystycznego z bazy danych NCBI. Zaobserwowano również częstsze występowanie allelu C (polimorficznego, występującego w homozygotie c.[1286A>C];[1286A>C] i w heterozygotie c.[1286A>C];[1286A=]) w grupie pacjentów (CAD+).

Stężenie 5-MTHF w grupie pacjentów z zaburzeniami metylacji uwarunkowanymi polimorfizmem c.[1286A>C];[1286A>C] (homozygota c.1286 A>C) oraz (CAD+) było niższe w porównaniu do grupy pacjentów (CAD-) z tym genotypem. Zaobserwowana różnica pomiędzy grupami nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej. Odnotowano niższe stężenie kwasu foliowego w grupie pacjentów z zaburzeniami metylacji uwarunkowanymi polimorfizmem c.[1286A>C];[1286A=] (heterozygota c.1286A>C) oraz (CAD+) w porównaniu do grupy pacjentów (CAD-) z tym genotypem. Zaobserwowana różnica pomiędzy grupami nie osiągnęła poziomu istotności statystycznej.

Stężenia Hcy i Cys w surowicy krwi nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupą pacjentów (CAD +) w porównaniu do grupy pacjentów (CAD-) oraz w grupie pacjentów (CAD+/IM+) w porównaniu do grupy pacjentów (CAD-). Stężenie GSH we krwi w grupie u pacjentów (CAD +) było niższe niż w grupie pacjentów (CAD). Różnica między grupami była bliska wartości krytycznej. Stwierdzono *istotnie niższe* stężenia CysGly w surowicy krwi w grupie pacjentów (CAD+) w porównaniu do grupy (CAD-). Ta zależność była również *istotna statystycznie* dla grupy i zaburzeniami metylacji uwarunkowanymi polimorfizmem genu *MTHFR* (CAD+/IM+).

Wnioski: Jest to dotychczas jedyna praca oceniająca stężenie aktywnej postaci kwasu foliowego, metyltertahydrofolianu (5-MTHF) w surowicy krwi w zależności od genotypu uwarunkowanego polimorfizmami genu MTHFR u pacjentów z chorobą wieńcową. Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykazały, że u pacjentów z angiograficznie potwierdzoną CAD polimorfizm c.[1286A>C];[1286A>C] genu MTHFR (homozygota c.1286 A>C) występował istotnie częściej u pacjentów z CAD. Pomimo stosunkowo nielicznej grupy poddanej badaniu, związek jaki zaobserwowano cechowała znamienność statystyczna i wskazuje to na potencjalne znaczenie tego polimorfizmu w etiologii CAD jako markera genetycznego. Predyspozycja genetyczna (homozygota c.1286 A>C) przyczyniła się do obserwowanych niższych stężeń 5-MTHF w tej grupie pacjentów z (CAD +). Zasadne są badania na większej grupie, aby stwierdzić istotność korelacji stężenia 5-MTHF z polimorfizmami genu MTHFR. Znajomość podłoża genetycznego CAD połączona z oceną fenotypu na podstawie nowych biomarkerów może przyczynić się do poprawy oceny ryzyka sercowo-naczyniowego oraz rozwoju farmakogenomiki, koncentrującej się na indywidualnym doborze leków w zależności od polimorfizmów genetycznych oraz mutacji konkretnego pacjenta. Pomoże to uzasadnić stosowanie aktywnej (metylowanej) formy kwasu foliowego (5-MTHF) u pacjentów z zaburzeniami metylacji uwarunkowanych polimorfizmami genu MTHFR.