

# **Uticaj 4a4b polimorfizma gena za eNOS na memorijske sposobnosti studenata**

**Institut za humanu genetiku  
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu  
2015.**

## SAŽETAK

**Uvod:** Memorija je fundamentalna kognitivna sposobnost koja ljudskom životu daje smisao, kontinuitet i kontekst. Jedan od neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu, koji ima važnu ulogu u memorijskim procesima jeste i azot oksid (*NO*). *NO* nastaje delovanjem enzima azot oksid sintaze (*NOS*). Studije na životinjama pokazale su da inhibicija endotelne forme azot oksid sintaze (*eNOS*) specifičnim azot oksid sintaznim inhibitorima može usporiti učenje i pamćenje.

**Cilj:** Cilj naše studije je da se analizira da li postoji statistički značajna povezanost 4a4b polimorfizma u genu za *eNOS* sa rezultatima koje studenti postižu na testovima memorijskih sposobnosti.

**Materijal i metode:** Ispitivanjem je obuhvaćeno 144 studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu starosti 20,52 $\pm$  0,89 god. 4a4b polimorfizam je detektovan lančanom reakcijom polimerizacije (*PCR*). Neuropsihološka baterija testova obuhvatila je: test radne memorije - test ređanja cifara (*TRC*), i testove epizodičke memorije - Rey-ov auditivno verbalni test učenja (*RAVLT*) i Wechsler-ovu revidiranu skalu pamćenja, subtest logičke memorije (*WMS-R*).

**Rezultati:** 4b4b genotip je detektovan kod 98 (68,10%) ispitanika, 4a4b genotip kod 41 (28,50%) dok je 4a4a genotip detektovan kod njih 5 (3,50%). Učestalost 4b alela bila je 82,29% a 4a alela 17,71%. Analiza rezultata testova memorijskih sposobnosti studenata u zavisnosti od njihovog genotipa pokazala je da nosioci 4a alela postižu statistički značajno lošije rezultate na testu *RAVLT* ( $p=0.045$ ). Rezultati koje su studenti postigli na drugim testovima memorijskih sposobnosti nisu se statistički značajno razlikovali u zavisnosti od analiziranog genotipa.

***Zaključak:*** Rezultati naše studije ukazuju da 4a4b polimorfizam gena za eNOS može imati važan uticaj na epizodičku memoriju mladih zdravih osoba.

***Ključne reči:*** eNOS, 4a4b polimorfizam, radna memorija, epizodička memorija

## ABSTRACT

**Introduction:** Memory is a fundamental cognitive ability which gives our lives purpose, continuity and context. One of the neurotransmitters which has an important role in memory functioning is nitric oxide (*NO*). *NO* is formed by the enzyme nitric oxide synthase (*NOS*). Animal studies have shown that inhibition of the endothelial form of nitric oxide synthase (*eNOS*) by specific inhibitors may impair learning and memory formation.

**Aim:** The aim of our study was to analyze the influence of 4a4b polymorphism of the eNOS gene on the results of memory performance tests in the population of students.

**Material and methods:** The study involved 144 students of the Faculty of Medicine, University of Belgrade, aged 20.52 +/- 0.89 years. eNOS 4a4b polymorphism was detected by polymerase chain reaction (*PCR*). A battery of neuropsychological tests included a test of working memory – digit span test (*TRC*) and tests of episodic memory - Rey Auditory Verbal Learning test (*RAVLT*) and Wechsler Memory Scale-Revised test, subtest for logical memory (*WMS-R*).

**Results:** The frequency of genotypes in the population of students is 68.10% for 4b4b, 28.50% for 4a4b and 3.50% for 4a4a genotype and allele frequency: 4b-82.29% and 4a-17.71%. Analysis of the results obtained on memory tests depending on the students 4a4b genotype showed that carriers of the 4a allele achieved lower scores on *RAVLT* test in comparison with carriers of 4b4b genotype ( $p = 0.045$ ). Results achieved on other memory tests were not statistically different depending on the students genotype.

**Conclusion:** The results of our study have shown that eNOS 4a4b might have an important influence on episodic memory performance of young healthy adults.

**Key words:** eNOS, 4a4b polymorphism, working memory, episodic memory

## UVOD

Memorija je fundamentalna kognitivna sposobnost koja ljudskom životu daje smisao, kontinuitet i kontekst. Memorijske sposobnosti ljudi imaju poligensku tj. multifaktorsku osnovu. Na osnovu dosadašnjih studija procenjeno je da heritabilnost memorijskih sposobnosti iznosi oko 50% što ukazuje na značajan uticaj genetske osnove na individualnu varijabilnost u memorijskim sposobnostima (1).

Jedan od neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu, koji ima važnu ulogu u memorijskim procesima je azot oksid (*NO*). Azot oksid nastaje konverzijom L-arginina u L-citrulin delovanjem enzima azot oksid sintaze (*nitric oxide synthase-NOS*). Razlikuju se tri izoforme ovog enzima: moždana ili neuronska forma (*nNOS*) koja se eksprimira u neuronima centralnog nervnog sistema (*CNS*), endotelna forma (*eNOS*) koja se u najvećoj meri eksprimira u endotelnim ćelijama ali je prisutna i u CA1 piramidnim ćelijama hipokampusa (2), i inducibilna forma (*iNOS*). Smatra se da neuronska i endotelijalna azot oksid sintaza igraju važnu ulogu u procesima učenja i memorije (3). Elektrofiziološke studije pokazale su da odnos NO/cGMP igra važnu ulogu u međućelijskoj transdukciji signala u dugotrajnoj potencijaciji (*LTP*) i dugotrajnoj depresiji (*LTD*), koje se smatraju molekularnom osnovom memorijskih procesa (4). Studije na životinjama pokazale su da inhibicija eNOS nespecifičnim azot oksid sintaznim inhibitorima može usporiti učenje i pamćenje (5). Gen za eNOS nalazi se na sedmom hromozomu u regionu 7q35 (6). U okviru ovog gena, u intronu 4, prisutan je polimorfizam broja uzastopnih ponovaka VNTR (engl. *Variable number tandem repeat*) dužine 27bp. Prisustvo 5 puta ponovljenog niza od 27bp označava se kao 4b a 4 puta ponovljenog niza kao 4a (7). Do sada je utvrđena asocijacija 4a alela sa nižim nivoom NO u krvi (8) i rizikom od pojave esecijalne hipertenzije (9).

Cilj ispitivanja je da se u populaciji studenata analizira da li postoji statistički značajna povezanost 4a4b polimorfizma u genu za eNOS sa rezultatima koje studenti postižu na testovima memorijskih sposobnosti.

## **MATERIJAL I METODE**

U ispitivanje je uključeno 144 studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Za sprovedeno ispitivanje dobijena je saglasnost Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, br. 29/VI-14.

Za sve studente putem upitnika su prikupljeni podaci o godinama, polu, obrazovanju, akademskim dostignućima. Studenti su takođe testirani primenom baterije neuropsiholoških testova koja je obuhvatila test pažnje i radne memorije - Test ponavljanja cifara (*TRC*) kao i testove epizodičke memorije – Rey-ov auditivno verbalni test (*RAVLT*) i Wechsler-ovu skalu pamćenja, subtest logičke memorije (*WMS-R*).

Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su: postojanje neuroloških ili psihijatrijskih stanja koja utiču na strukturu ili funkciju mozga, traume glave, anamnestički podatak o gubitku svesti dužem od 5 min, korišćenje antidepresiva, anksiolitika, sedativa, antikonvulzanata, opijatnih analgetika u prethodnih 6 meseci, dijabetes, hipertenzija i zloupotreba psihoaktivnih supstanci.

### ***Molekularno-genetička analiza***

Molekularno-genetičke analize su obavljene na Institutu za Humanu genetiku Medicinskog fakulteta u Beogradu.

Radi genetičke analize od svakog ispitanika je uzeto 5ml periferne krvi iz koje je izolovana genomska DNK metodom isoljavanja (10). Koncentracija i kvalitet izolovane DNK su proveravane spektrofotometrijski. eNOS 4a/4b polimorfizam je detektovan lančanom reakcijom polimerizacije (*PCR*). Reakciona smeša za PCR volumena 25μl imala je sastav: 10xPCR pufer 2,5 μl; 10mM dNTPs 0,5 μl; prajmeri (300mg/μl) po 0,5 μl; 25mM MgCl<sub>2</sub> 1,5 μl; Taq polimeraza (5U/μl) 0,2 μl; genomska DNK (300mg/μl) 1 μl; HO 17,3 μl. Za amplifikaciju ciljnog fragmenta gena koji obuhvata polimorfno mesto, upotrebljeni su prajmeri čije su sekvence: Fw:5'-ACC GCC CAG GGA ACT CCG CT-3' i Rv:5'-CTA TGG TAG TGC CTT GGC TGG AGG-3'. Uslovi PCR reakcije su bili: početna denaturacija 95°C/5 min, zatim 35 ciklusa sa 3 koraka: denaturacija 95°C/1min, hibridizacija prajmera 60°C/1min i elongacija 72°C/1min i na kraju završna elongacija 72°C/7 min. Uspešnost PCR reakcije je proveravana gel elektroforezom na 8% poliakrilamidnom gelu (PAA). Elektroforeza je vršena u 1xTBE puferu pri naponu od 230V. Gel je obojen SYBR Safe bojom i prosvetljavao na UV transluminatoru. Kod ispitanika 4b/4b genotipa na gelu su detektovani fragmenti dužine 210 bp dok su kod ispitanika 4a/4a genotipa detektovani fragmenti dužine 193 bp. Genotip ispitanika očitavan je prema priloženoj šemi (Slika 1.).

### ***Neuropsihološka baterija testova***

#### **Testovi epizodičke memorije**

**Rey-ov test audio-verbalnog učenja (Rey AVLT)** je mera neposrednog pamćenja verbalnog materijala. Sastoji se od liste od 15 reči koja se ispitaniku čita 5 puta. Nakon svakog čitanja ispitanik treba da ponovi što veći broj reči sa liste. Rezultat u svakom pokušaju je broj tačno

reprodukovanih reči na osnovu čega se izračunava ukupan broj ponovljenih reči kroz 5 pokušaja (REYcum). Na ovaj način se dobija skor neposrednog upamćivanja. Nakon 30 min ispitanici još jednom ponavljaju reči. Broj ponovljenih reči predstavlja skor odloženog slobodnog pamćenja (REYdel).

### **Wechsler-ova skala pamćenja, revidirana forma (WMS-R) subtest logičke memorije**

Standardizaciju za našu populaciju su izvršili 1992.god Berger, Mirković i Matić. Subtest se sastoji iz dve kratke priče (A i B) koje ispitanik čita a kojima se meri neposredno pamćenje logički povezanog materijala. Nakon čitanja jedne priče ispitanik ponavlja sve pojmove kojih se može setiti. Izračunava se zajednički skor za obe priče neposredno nakon čitanja (ABimm) i zajednički skor odloženog prisećanja pojmova nakon 30 min (ABdel).

### **Test pažnje/radne memorije**

**Test merenja raspona cifara (TRC)** – Ispitaniku se prezentuju nizovi cifara koje on treba da poreda po rastućem redosledu. Nizovi cifara koji treba da se zapamte povećavaju se za jednu cifru od 2 do 8. Za svaku dužinu niza cifara postoje dva pokušaja. Ispitivanje se prekida kada ispitanik ne reprodukuje ispravno niz iz dva pokušaja iz bilo koje serije. Pokušaj pri određenoj dužini niza ocenjen je sa 1 za jedan uspešno ponovljen niz odnosno sa 2 za dva ponovljena niza određene dužine. Broj poena koje ispitanik postigne tretira se kao njegova mera raspona za cifre (*TRC*).

### ***Statističke metode***

Atributivne varijable prikazane su brojevima i procentima a kontinualne varijable srednjim vrednostima i standardnim devijacijama. Fisher-ov test korišćen je za procenu razlika u učestalosti genotipova među polovima. Studentov t-test ili Mann-Whitney U test; one way ANOVA ili Kruskal-Wallis test su korišćeni za procenu razlike u rezultatima testova kognitivnih sposobnosti u zavisnosti od genotipova. P vrednosti  $<0,05$  smatrane su statistički značajnim.



## **REZULTATI**

Analizom je obuhvaćeno 144 studenata, 89 (61,8%) mladića i 55 (38,2%) devojaka prosečne starosti  $20,52 \pm 0,89$  godina. Nakon molekularno-genetičkih analiza (Slika 2.) utvrđena je sledeća učestalost genotipova: 4b4b genotip je detektovan kod 98 (68,10%) ispitanika, 4a4b genotip kod 41 (28,50%) dok je 4a4a genotip detektovan kod njih 5 (3,50%); Učestalost 4b alela bila je 82,29% a 4a alela 17,71% (Grafikon 1.). Dobijene vrednosti genotipova odvojeno po polovima prikazane su na grafikonu 2. Razlika učestalosti genotipova između mladića i devojaka nije bila statistički značajna ( $p=0.653$ ). Ispitanici su na osnovu prisustva 4a alela podeljeni u dve grupe: 4b4b i 4a4b+4a4a. Analiza rezultata testova memorijskih sposobnosti studenata u zavisnosti od njihovog genotipa pokazala je da postoji statistički značajna razlika u rezultatima koje studenti postižu na testu epizodičke memorije REYcum, testu neposrednog upamćivanja. Studenti nosioci 4b4b genotipa postigli su statistički značajno bolje rezultate u poređenju sa nosiocima a alela ( $p=0.045$ ) (tabela 1.). Razlika u rezultatima ostalih testova koje su studenti postigli u zavisnosti od njihovog genotipa nije dostigla statističku značajnost.

## **DISKUSIJA**

U svetu kao i kod nas, mali broj istraživanja usmeren je na ispitivanje asocijacije polimorfizama sa memorijskim sposobnostima zdravih osoba mlađe životne dobi. Praktični cilj proučavanja gena koji utiču na naše memorijske sposobnosti jeste otkrivanje novih strategija za

terapiju različitih kognitivnih poremećaja kako tokom normalnog procesa starenja tako i kod bolesti kao što su Alchajmerova bolest i drugi tipovi demencija. Rano otkrivanje genotipa sa predispozicijom za neki od kognitivnih poremećaja omogućilo bi blagovremenu primenu preventivnih mera kojima se utiče na promenljive faktore rizika.

Bez obzira na nomenklaturu pokazano je da se eNOS eksprimira i u nervnom tkivu sisara a posebno u CA1 piramidalnim neuronima (11). 4a4b polimorfizam u genu za eNOS asociran je sa promenama u nivou NO i smatra se da utiče na produkciju samog eNOS enzima kao i na produkciju NO (7). S obzirom da se analizirani polimorfizam nalazi u intronu postoji mogućnost da je zapravo u neravnoteži vezanosti (engl. *linkage disequilibrium*) sa nekim drugim, još uvek nepoznatim, funkcionalnim polimorfizmom. Smatra se da NO-posredovana vazodilatacija u mozgu može imati značajnu ulogu u memorijskim procesima. Delovanjem NO dolazi do povećanja cerebralne vazodilatacija nakon aktivnosti neurona (12). Posledično povećanje protoka krvi može da obezbedi neuronima dodatni izvor neophodnih komponenti kao što su glukoza i kiseonik. Eksperimenti sprovedeni na životinjama pokazali su da eNOS ima važnu ulogu u procesima formiranja memorije. Primećeno je da kod eNOS knockout miševa dolazi do značajnog narušavanja LTP-a i LDP-a i smanjenja memorijskih sposobnosti (13). Takođe, istraživanja sprovedena na pilićima pokazala su da specifična inhibicija eNOS umanjuje njihove memorijske sposobnosti (3, 14).

U našoj studiji učestalosti genotip 4b4b je detektovan kod 98 (68,10%) ispitanika, 4a4b genotip kod 41 (28,50%) dok je 4a4a genotip detektovan kod njih 5 (3,50%). Ovakvi rezultati u saglasnosti su sa rezultatima drugih studija u kojima se učestalost 4a4a genotipa kreće između 1% i 10% (15). Naši rezultati pokazali su da nosioci 4a alela postižu statistički značajno lošije rezultate na REYcum testu epizodičke memorije u odnosu na ispitanike 4b4b genotipa ( $p=0.045$ ). Nažalost,

koliko je nama poznato, nema objavljenih studija u kojima je ispitivana uloga 4a4b polimorfizma eNOS gena u memorijskim sposobnostima ljudi. Ipak, naši rezultati su u saglasnosti sa studijama na životinjama po kojima smanjenje nivoa NO delovanjem na eNOS umanjuje memorijske sposobnosti. U studiji Sole-Padulles i sar. ispitivan je uticaj polimorfizma Glu298Asp u genu za eNOS na memorijske sposobnosti kod starijih osoba sa umerenim kognitivnim poremećajem. Pokazano je da analizirani polimorfizam ne povećava rizik od pojave demencije ali da nosioci T alela (Asp varijante) imaju lošije memorijske sposobnosti (6).

## **ZAKLJUČAK**

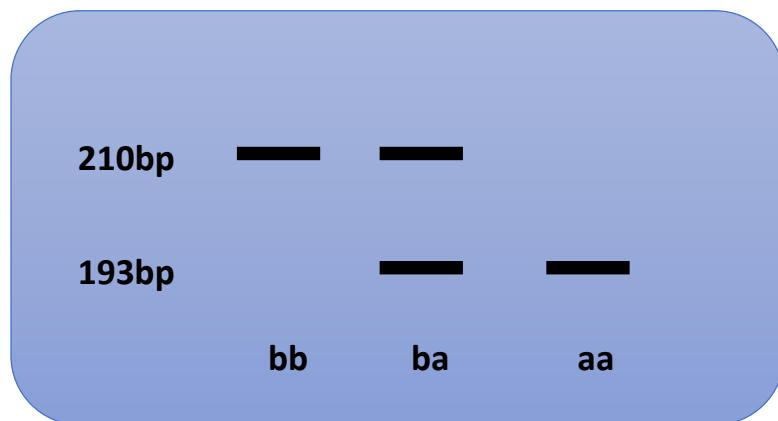
Iako mehanizmi kojima NO utiče na memoriju još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, dosadašnja saznanja ukazuju na mogućnost da eNOS ima važnu ulogu u formiranju epizodičke memorije. Dobijeni rezultati ukazuju da u ispitivanje uloge NO u memorijskim procesima treba uključiti i analizu funkcije eNOS i njegovih polimorfizama.

## LITERATURA

1. Bouchard TJ, Et al. Genetic and environmental influences on special mental abilities in a sample of twins reared apart. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*. 1990; 39:193-206.
2. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ et al. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implication for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:4214-4218.
3. Rickard NS, Gibbs ME, Ng KT. Inhibition of the Endothelial Isoform of Nitric Oxide Synthase Impairs Long-Term Memory Formation in the Chick. *Learning and memory*. 1999; 6:458-466.
4. Hawkins RD, Son , Arancio O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res*. 1998; 118:155-172.
5. Hawkins RD. NO honey, I don't remember. *Neuron*. 1996; 16:465-467.
6. Sole-Padullés C, Bartres-Faz D, Junque C et al. Poorer cognitive performance in humans with mild cognitive impairment carrying the T variant of the Glu/Asp NOS3 polymorphism. *Neuroscience Letters*. 2004; 358:5-8.
7. Jemaa R, Ben Ali S, Kallel A, et al. Association of a 27-bp repeat polymorphism in intron 4 of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene with hypertension in a Tunisian population. *Clinical Biochemistry*. 2009; 42:852-856.
8. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite concentrations in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245:190-193.
9. Forte P, Copland M, Smith LM, et al. Basal nitric oxide synthase in essential hypertension. *Lancet*. 1997; 349:837-842.
10. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215.

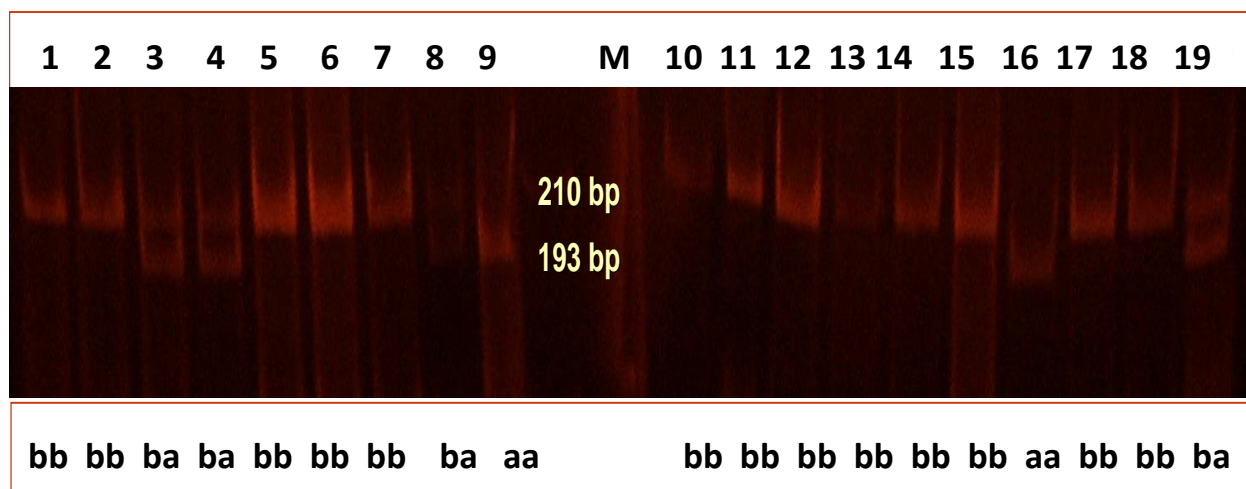
11. O'Dell TJ, Huang TM, Dawson JL, et al. Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS. *Science*. 1994; 265:542-546.
12. Faraci FM, Breese KR. Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain. *Circ Res*. 1993; 72:477-480.
13. Haul S, Godecke J, Schrader HL, et al. Impairment of neocortical long-term potentiation in mice deficient of endothelial nitric oxide synthase. *J Neurophysiol*. 1999; 81:494-497.
14. Holsher C. 7-Nitro indazole, a neuron specific nitric oxide synthase inhibitor, produces amnesia in the chick. *Learn and Mem*. 1994; 1:213-216.
15. Kunnas TA, Ilveskoski E, Niskakangas T, et al. Association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with risk of coronary artery disease and myocardial infarction in middle aged men. *J Mol Med*. 2002; 80:65-69.

## Prilog I



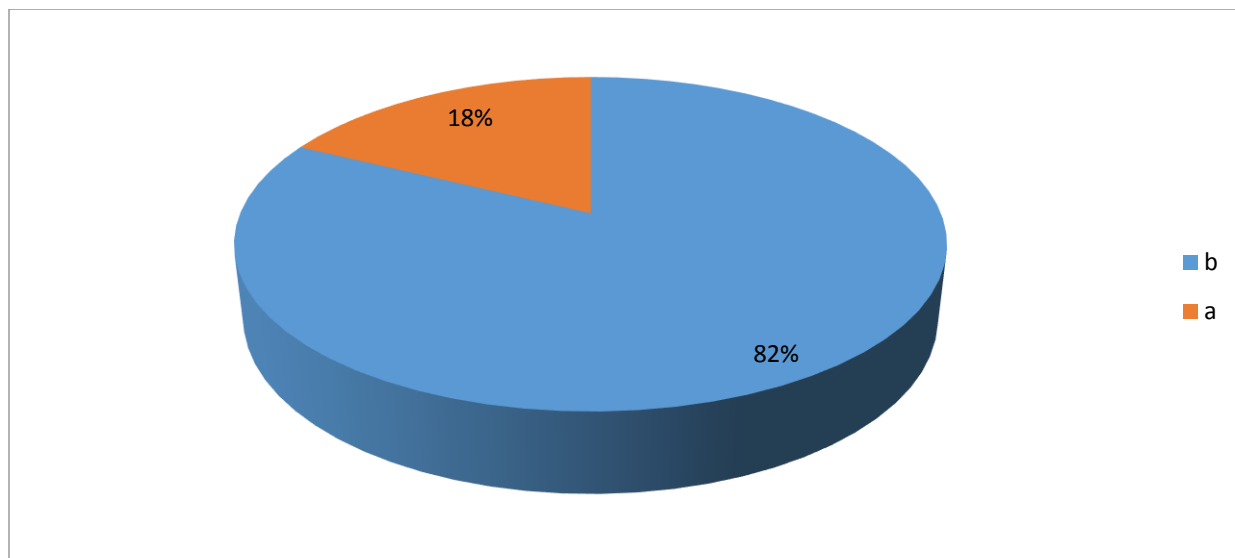
Slika 1. Šematski prikaz analize genotipova eNOS 4a/4b polimorfizma na poliakrilamidnom gelu

## Prilog II



Slika 2. Analiza eNOS 4a/4b polimorfizma na 8% poliakrilamidnom gelu

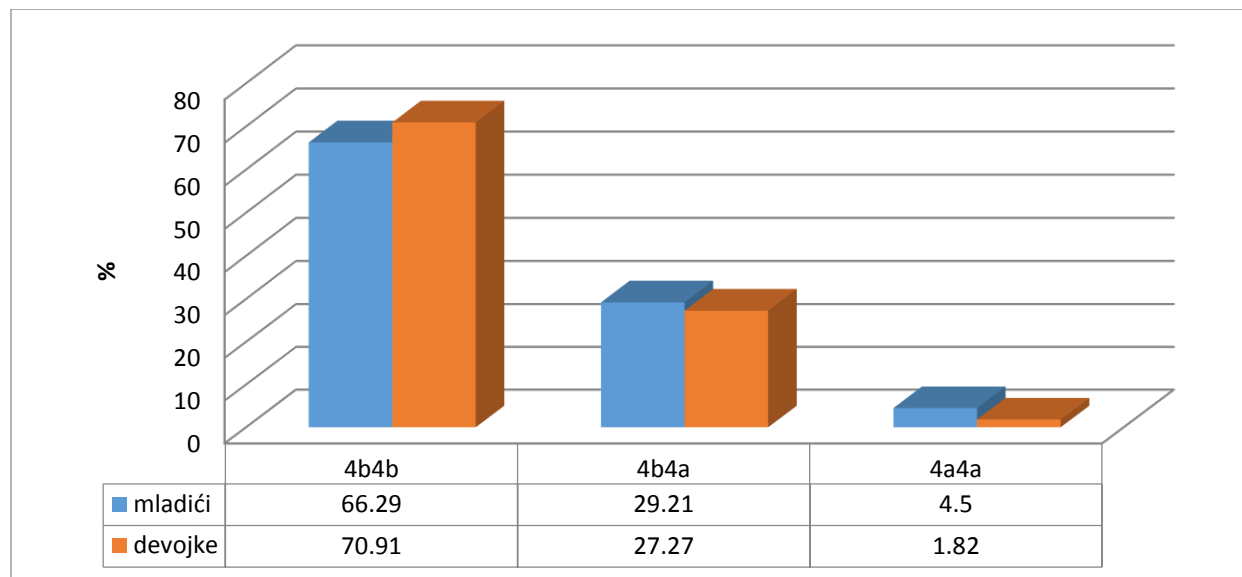
### Prilog III



Grafikon 1. Učestalosti 4b i 4a alela u populaciji studenata



## Prilog IV



Grafikon 2. Učestalosti genotipova 4a4b polimorfizma u populaciji studenata

## Prilog V

Tabela 1. Rezultati testova memorijskih sposobnosti u zavisnosti od genotipa studenata

genotip	broj	TRC	REYcum	REYdel	ABimm	Abdel
bb	98	9,91±1,69	60,56±6,63	13,37±1,56	36,41±5,88	33,0619±6,9878
ba+aa	46	9.96±2,34	57,67±10,29	12,80±1,86	36,22±7,93	33,9250±5,6722
p		0.888	0.045	0.112	0.868	0.637