

В.Є. Досенко, В.Ю. Загорій, Я.М. Лутай, О.М. Пархоменко, О.О. Мойбенко

Алельний поліморфізм промотору гена ендотеліальної NO-синтази (T⁻⁷⁸⁶ → C) як фактор ризику гострого коронарного синдрому

Используя полимеразную цепную реакцию с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов (RFLP-PCR), определена частота аллельного полиморфизма промотора гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) у 221 больного с острым коронарным синдромом (ОКС) и у 83 практически здоровых людей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что частота различных аллельных вариантов промотора существенно отличается у больных с ОКС и у доноров аналогичного возраста. Так, соотношение нормальных гомозигот (T/T), гетерозигот (T/C) и патологических гомозигот (C/C) составляло у больных 48, 36 и 16 % соответственно, тогда как в контроле – 48, 46, 6 % (P<0,05 по χ^2 -критерию). Таким образом, в украинской популяции у больных с ОКС патологический C/C-вариант промотора гена eNOS встречается в 2,7 раза чаще, чем в контрольной группе, что позволяет рассматривать этот аллельный полиморфизм в качестве одного из генетических факторов риска развития данного заболевания.

ВСТУП

Пошук у геномі людини нових варіантів поліморфізму поодиноких нуклеотидів (SNP) та з'ясування їх клінічного значення – важливе завдання сучасної медичної генетики. Нині описано більше ніж 5 млн SNP, однак зв'язок між наявністю певного поліморфізму та ризиком виникнення захворювання, його прогнозом чи ефективністю терапії з'ясовано для порівняно невеликої їх кількості [1, 14]. Ситуація ускладнюється тим, що частота та, відповідно, значення SNP може суттєво відрізнятись залежно від популяції, що досліджувалася. Наприклад, алельний поліморфізм промотору гена ендотеліальної NO-синтази – eNOS (трансверсія із заміною T на C у положенні –786) в азіатських популяціях зустрічається нечасто – кількість патологічних гомозигот не перевищує 1–2 % [2, 3, 10–14]. Проте саме японськими дослідниками доведено асоціацію між цим SNP і

розвитком артеріальної гіпертензії, коронарного спазму та інфаркту міокарда, бо в контрольній групі зазначені патологічні алелі майже не зустрічаються [9–11]. У дослідженні Tanus-Santos та співавт. [14] було вивчено частоту алельних варіантів гена eNOS при застосуванні ДНК із чіткими етнічними ознаками. З'ясувалося, що варіант промотору C⁻⁷⁸⁶ (сумарна кількість алелей в гомо- та гетерозиготному стані) значно частіше (P<0,0001) спостерігається у європеоїдів (42,0 %), ніж у афро-американців (17,5 %) чи азіатів (13,8 %). У деяких дослідженнях, проведених в європейських країнах, було доведено клінічне значення поліморфізму промотору, однак опубліковані в березні 2004 р. результати мета-аналізу досліджень, здійснених у 26 генетичних центрах, дозволили англійським ученим зробити висновок про те, що значними факторами ризику ішемічної хвороби серця є заміна G⁸⁹⁴ → T у 7-му

© В.Є. Досенко, В.Ю. Загорій, Я.М. Лутай, О.М. Пархоменко, О.О. Мойбенко

екзоні та мікросателітний поліморфізм 4-го інтрону, а T⁻⁸⁹⁴→C поліморфізм зустрічався у хворих не частіше, ніж у практично здорових осіб [6]. Однак саме для цього варіанта поліморфізму гена eNOS доведено його вплив на рівень експресії [10]. Зважаючи на цей факт і виняткове значення NO в механізмах ангіо- та кардіопротекції, ми поставили за мету дослідити частоту алельного поліморфізму промотору гена в українській популяції.

МЕТОДИКА

Обстежено 221 хворого на гострий коронарний синдром (81,7 % чоловіків і 18,3 % жінок) віком від 40 до 83 років (середній вік $58,5 \pm 0,7$ років), що були госпіталізовані у відділення реанімації та інтенсивної терапії Інституту кардіології ім. М.Д. Стражеска АМН України. Заключний діагноз – нестабільна стенокардія було поставлено 33,5 % хворих, гострий інфаркт міокарда – 66,5 % пацієнтів. Ці діагнози встановлювали на підставі клінічних, електрокардіографічних і біохімічних обстежень, відповідно до рекомендацій експертів ВООЗ, а також європейського та американського товариств кардіологів [4, 5, 16]. У обстеженні не брали участь хворі зі спадковими та уродженими захворюваннями, важкими порушеннями обміну речовин, у тому числі важкою формою цукрового діабету, вираженою печінковою та нирковою недостатністю, гострими порушеннями мозкового кровообігу, онкологічними та системними захворюваннями, хронічною серцевою недостатністю ІБ – ІІІ ступеня, кардіогенним шоком. Контрольну групу склали 83 практично здорових донорів, відсутність серцево-судинної патології у них підтверджували за допомогою збору анамнестичних даних, показників електрокардіограми та вимірювання артеріального тиску. Контрольна група та група хворих не відрізнялися за віком і кількістю чоловіків і жінок ($P > 0,05$ за χ^2 -критерієм). Для генотипу-

вання венозну кров набирали в стерильних умовах у моновети об'ємом 2,7 мл з використанням калієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти як антикоагулянта ("Sarstedt", Німеччина), заморожували при -20°C і зберігали при цій температурі. ДНК виділяли з крові з використанням наборів Ізоген (Росія). T⁻⁸⁹⁴→C поліморфізм промотору визначали методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним аналізом довжини рестрикційних фрагментів за Ghilardi і співавт. [7]. Для цього ампліфікували ділянку промотору за допомогою пари специфічних праймерів: прямий – 5'-CAC CTG CAT TCT GGG AAC TGTA-3' та зворотній – 5'-GCC GCA GTA GCA GAG AGAC-3'. Праймери синтезовано фірмою «Синтол» (Росія). Для ампліфікації брали 30–50 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 ммоль сульфату магнію, 200 мкмоль суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 20 пмоль кожного з праймерів і 0,5 ОД Taq-полімерази ("АмпліСенс", Росія), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері "Applied Biosystems 2700" ("PerkinElmer", США). Ампліфікація фрагмента промотору складалася з 35 циклів: денатурація – 94°C (1 хв), приєднання праймерів – 63°C (50 с) та елонгація – 74°C (1 хв). Надалі 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 18 год з 5 ОД рестриктази PdiI ("Ферментас", Литва) в буфері Y+/Tango наступного складу (моль/л): тріс-ацетату – 33 (рН 7,9), ацетату магнію – 10, ацетату калію – 66, альбуміну – 0,1 мг/мл. За наявності в положенні –786 промотору тимідину рестрикція не відбувається, а при заміні на цитозин PdiI розщеплює ампліфіковану ділянку промотору (розмір 125 пар основ) на два фрагменти – 95 та 30 пар основ (рис. 1).

Ампліфікати після рестрикції розділяли в 2,5%-му агарозному гелі, що містив 10 мкг/мл бромистого етидію. Візуалізацію ДНК після горизонтального електрофору

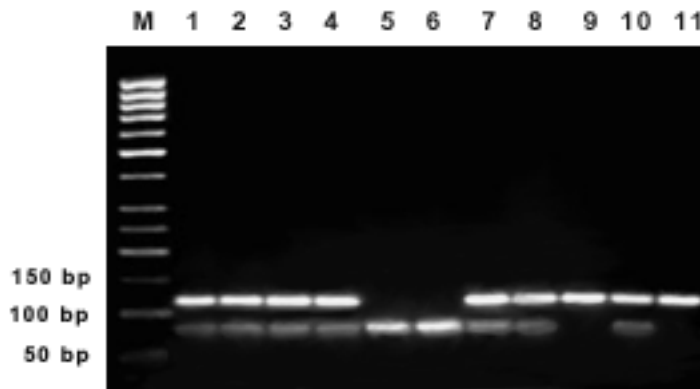


Рис. 1. Результати електрофорезу фрагменту промотору гена ендотеліальної NO-синтази після рестрикції за використання ферменту PstI. М – маркер молекулярної маси (bp – пари нуклеїнових основ), смужки 1–4, 7, 8, 10 відповідають Т/С-генотипу, 5, 6 – патологічному С/С-генотипу, 9 та 11 – нормальному Т/Т-генотипу

(160 В протягом 40 хв) проводили за допомогою транслюмінатора (“Біоком”, Росія) та відеосистеми ViTran (Росія).

Отримані результати обробляли статистично з використанням програми Excel 2000. Вірогідність відмінностей (при значенні $P < 0,05$) визначали за χ^2 -критерієм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати свідчать, що частота різних алельних варіантів промотору гена eNOS суттєво відрізняється у хворих на гострий коронарний синдром та у донорів аналогічного віку. Так, співвідношення нормальних гомозигот (Т/Т), гетерозигот (Т/С) і патологічних гомозигот (С/С) становило у хворих 48, 36 і 16 % відповідно, тоді як у контролі – 48, 46 і 6 % ($P < 0,05$ за χ^2 -критерієм). Отже, у хворих на гострий коронарний синдром патологічний С/С-варіант промотору зустрічався в 2,7 раза частіше, ніж у осіб контрольної групи.

Якщо порівнювати отримані результати з даними генотипування в інших країнах світу, то слід зазначити, що частота різних варіантів промотору у українців відповідає європейському рівню розповсюдження зазначеного алельного поліморфізму, а за значенням у патогенезі ішемічної хвороби серця – азіатським популяціям (рис. 2).

Частота С-алелей у контрольній групі становить 58 %, а у хворих – 72 %. Звісно ми усвідомлюємо, що для надання більш точної характеристики української популяції за поліморфізмом цього гена необхідне проведення широкомасштабних досліджень.

Механізми патогенного впливу дослідженого поліморфізму досить добре вивчено. Основну інформацію про функціональну активність промотору гена eNOS вдалося здобути японським ученим [10] із використанням люциферазного тесту (luciferase reporter gene assay). Було доведено, що при трансверсії $T^{-786} \rightarrow C$ значно зменшується активність промотору гена eNOS як за звичайних умов культивування клітин, так і за впливу гіпоксії. Водночас поліморфізм в інших сайтах промотору не впливав на інтенсивність транскрипції. Як можливий механізм впливу заміни $T^{-786} \rightarrow C$ у промоторі на зчитування гена eNOS розглядається специфічне зв'язування білка реплікації А1 (RPA1) зі зміненим сайтом промотору [9]. Цей протеїн відомий як білок, що має здатність до зв'язування з одноланцюговими молекулами ДНК і залучається в процеси репарації, реплікації та рекомбінації генів. Саме внаслідок зв'язування RPA1 знижуються активність промотору в разі заміни $T^{-786} \rightarrow C$. Це підтверджується тим, що введення оліго-

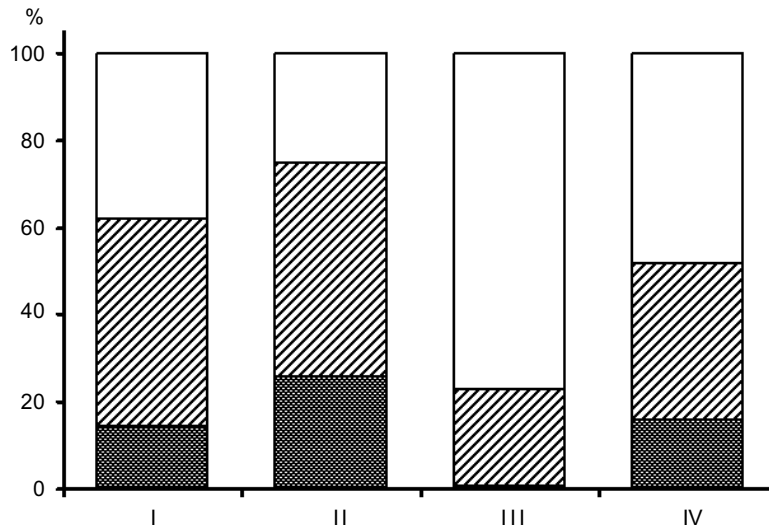


Рис. 2. Частота алельних варіантів промотору гена ендотеліальної NO-синтази у хворих на ішемічну хворобу серця в різних популяціях: I – Великобританія [9], II – Італія [7], III – Японія [10], IV – результати власних досліджень. 1 – нормальні гомозиготи, 2 – гетерозиготи, 3 – патологічні гомозиготи

нуклеотидної послідовності комплементарної RPA1 відновлює транскрипційну активність промотору гена eNOS при наявності цієї трансверсії. Зазначений поліморфізм має і функціональні прояви. Так, Yoshimura та співавт. [17] установили збільшення базального тонуусу та підвищення відповіді на введення ацетилхоліну (АХ) та ізосорбиду епікардіальних коронарних артерій у людей із $T^{-786} \rightarrow C$ поліморфізмом, що, за слушною думкою цих авторів, є свідченням зменшення синтезу NO в ендотеліальних клітинах. У роботі Erbs та співавт. наводиться дещо інша інформація [8]. У відповідь на введення АХ швидкість розширення коронарної або мамарної артерії (за даними доплерівської велосиметрії) була значно меншою у носіїв патологічних варіантів промотору ($T^{-786} \rightarrow C$) і 7-го екзону ($G^{786} \rightarrow T$) – на 44 та 26 % відповідно порівняно з носіями нормальних алелів. Фізичне навантаження протягом 4 тиж (їзда на велоергометрі 6 разів за добу протягом 10 хв) позитивно впливало на здатність указаних артерій розширюватися під дією АХ, однак цей ефект спостерігався тільки у носіїв нормальних і патологічних алелів у 7-му екзоні. За наявності $T^{-786} \rightarrow$

C -поліморфізму швидкість вазодилатації навіть зменшувалася порівняно з вихідним рівнем (44 і 36 % відповідно). Ці результати зумовлюють необхідність диферційованого підходу не тільки до фармакотерапії хворих з серцево-судинною патологією, але й до рекомендацій щодо фізичної активності та способу життя.

Таким чином, отримані результати свідчать, що $T^{-786} \rightarrow C$ -поліморфізм промотору гена NO-синтази є одним із предикторів розвитку гострого коронарного синдрому в українській популяції, а найбільш перспективний напрямок подальших досліджень – пошук методів диференційованого підходу до лікування хворих з різними алельними варіантами промотору зазначеного гена.

V.E.Dosenko, V.Yu.Zagoriy, Ya.M.Lutay,
A.N.Parkhomenko, A.A.Moibenko

**$T^{-786} \rightarrow C$ PROMOTER ALLELIC
POLYMORPHISM OF ENDOTHELIAL
NO-SYNTASE GENE AS GENETIC PREDICTOR
OF ACUTE CORONARY SYNDROME**

Frequency of promoter endothelial NO-synthase gene allelic polymorphism by using polymerase chain reaction and

restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) was determined in 221 patients with acute coronary syndrome (ACS) and in 83 almost healthy subjects. Data obtained indicate that different promoter allelic variant frequency differs significantly in patients with ACS and in control group. Correlation of normal homozygotes (T/T), heterozygotes (T/C) and pathologic homozygotes (C/C) was 48%, 36% and 16% respectively in patients, and in control it was 48%, 46%, 6% ($P < 0.05$ by χ^2 -test). Thus, in patients with ACS in Ukrainian population pathologic C/C variants of 5'-flanking region of eNOS gene were found 2.7-times more often in ACS patients, than in control. This allows us to suggest, that this allelic polymorphism can be considered as one of genetic risk factors of ACS development.

O. O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Горбунова В.Н., Баранов В.С. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний. – СПб.: Спец. литература, 1997. – 287 с.
2. Досенко В.Є., Загорій В.Ю., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М. Патологічні аспекти генетичного поліморфізму ендотеліальної NO-синтази // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, №6. – С. 86–102.
3. Alvarez R., Gonzalez P., Batalla A. et al. Association between the NOS3 (-786 T/C) and the ACE (I/D) DNA genotypes and early coronary artery disease // Nitric Oxide. – 2001. – **5**, № 4. – P. 343–348.
4. Bertrand M.E., Simoons M.L., Fox K.A. et al. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force on the Management of Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology // Eur. Heart J. – 2002. – **23**. – P. 1809–1840.
5. Braunwald E., Antman E.M., Brooks N.H. et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non ST-elevation myocardial infarction: Executive summary and Recommendations. A report of the American College of Cardiology / American Heart Association task force on practice guidelines (committee on management of patients with unstable angina) // Circulation. – 2000. – **102**. – P. 1193–1209.
6. Casas J.P., Bautista L.E., Humphries S.E., Hingorani A.D. Endothelial nitric oxide synthase genotype and ischemic disease. Meta-analysis of 26 studies involving 23028 subjects // Ibid. – 2004. – **109**. – P. 1359–1365.
7. Erbs S., Baither Y., Linke A. et al. Promoter but not exon polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affects training-induced correction of endothelial dysfunction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003. – **23**. – P. 1814–1819.
8. Ghilardi G., Biondi M.L., DeMonti M. et al. Independent risk factor for moderate to severe internal carotid artery stenosis: T786C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene // Clin. Chem. – 2002. – **48**, № 7. – P. 989–993.
9. Jeerooburkhan N., Jones L.C., Bujac S. et al. Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease // Hypertension. – 2001. – **38**. – P. 1054–1061.
10. Miyamoto Y., Saito Y., Nakayama M. et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina // Hum. Mol. Genet. – 2000. – **9**, № 18. – P. 2629–2637.
11. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T-786-C Mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm // Circulation. – 1999. – **99**. – P. 2864–2870.
12. Nakayama M., Yasue H., Yoshimura M. et al. T(-786)→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis // Amer. J. Cardiol. – 2000. – **86**, № 6. – P. 628–634.
13. Nasreen S., Nabika T., Shibata H. et al. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2002. – **22**, № 4. – P. 605–610.
14. Park K.W., You K.H., Oh S. et al. Association of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene polymorphism with acute coronary syndrome in Koreans // Heart. – 2004. – **90**. – P. 282–285.
15. Sing C.F., Stengard J.H., Kardia S.L.R. Genes, environment, and cardiovascular disease // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003. – **23**. – P. 1190–1196.
16. Tanus-Santos J.E., Desai M., Flockhart D.A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants // Pharmacogenetics. – 2001. – **11**, № 8. – P. 719–725.
17. World Health Organization. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease // Circulation. – 1979. – **59**. – P. 607–609.
18. Yoshimura M., Yasue H., Nakayama M. et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786→C and missense Glu298Asp variants // J. Investig. Med. – 2000. – **48**, № 5. – P. 367–374.

Ин-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 15.10.2004