



Генетический полиморфизм эндотелиальной синтазы оксида азота при ишемической болезни сердца

Hasanzad M., Imeni M., Mohammadhasani M.R., Hassanzad M., Jamaldini S.H.*

Авторы:

Mandana Hasanzad, д.м.н., Медицинский исследовательский центр медицинского факультета Тегеранского филиала Исламского Университета Азад. Тегеран, Иран

Mahdieh Imeni, Медицинский исследовательский центр медицинского факультета Тегеранского филиала Исламского Университета Азад. Тегеран, Иран; Исследовательский центр кардиогенетики, Тегеранский медицинский университет. Тегеран, Иран

Mohammad Reza Mohammadhasani, Медицинский исследовательский центр медицинского факультета Тегеранского филиала Исламского Университета Азад. Тегеран, Иран

Maryam Hassanzad, Исследовательский центр респираторных заболеваний у детей, Национальный исследовательский институт туберкулеза и заболеваний легких (NRITLD), Медицинский университет Shahid Beheshti. Тегеран, Иран

Seyed Hamid Jamaldini, Исследовательский центр кардиогенетики, Тегеранский медицинский университет. Тегеран, Иран

Резюме

Актуальность

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из ведущих причин смертности среди населения Ирана. Взаимодействие между генетической предрасположенностью и факторами внешней среды определяет восприимчивость человека к ИБС. Оксид азота (NO) является важным эндогенным вазодилататором, который синтезируется в клетках эндотелия эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS) из L-аргинина и играет важную роль в регуляции гомеостаза сердечно-сосудистой системы.

Цель

Цель исследования – анализ полиморфизма гена eNOS C786T при ИБС.

Материал и методы

В исследование были включены 213 больных и 106 здоровых добровольцев. Полиморфизм eNOS rs41322052 генотипировали с использованием протокола полимеразной цепной реакции с определением полиморфизма длины рестрикционных фрагментов.

Результаты

Предыдущие исследования полиморфизма eNOS T786C выдвинули гипотезу, что этот полиморфизм играет важную роль при развитии сердечно-сосудистых заболеваний и, в особенности, ИБС. Определили распространенность полиморфизма eNOS T786C у здоровых жителей Ирана и у больных, страдающих ИБС. Доля генотипа CC составила ~ 100% как для больных, так и для контрольной группы, так что аллель C в данном исследовании не увеличивал подверженность субъектов заболеванию ИБС.

Заключение

Не было обнаружено значимых различий в экспрессии полиморфизма гена eNOS C786T между здоровыми добровольцами и пациентами с ИБС. Таким образом, генетическая изменчивость по eNOS не может способствовать развитию ИБС.

Ключевые слова

ишемическая болезнь сердца, эндотелиальная синтаза оксида азота, Иранские пациенты.

Genetic polymorphism of endothelial nitric oxide synthase in coronary artery disease

Hasanzad M., Imeni M., Mohammadhasani M.R., Hassanzad M., Jamaldini S.H.

Authors:

Mandana Hasanzad, PhD, Medical Sciences Research Center, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Mahdieh Imeni, Msc, Medical Sciences Research Center, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Cardiogenetics Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Mohammad Reza Mohammadhasani, MD, Medical Sciences Research Center, Tehran Medical Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Maryam Hassanzad, MD, Pediatric Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Seyed Hamid Jamaldini, MD, Cardiogenetics Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Background

Coronary artery disease (CAD) is a leading cause of mortality and morbidity in the Iranian population. Interaction between genetic and environmental factors determines susceptibility of an individual to develop CAD. Nitric oxide (NO) is an important endogenous vasodilator that is produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) from L-arginine in endothelial and plays a critical role in the regulation of cardiovascular homeostasis.

Objective

The purpose of this study was to analyze the eNOS C786T polymorphism in CAD.

Materials and Methods

The study included 213 patients and 106 controls. eNOS rs41322052 polymorphism was genotyped using PCR-RFLP protocol.

Results

Previous eNOS T786C polymorphism studies suggested this polymorphism has an important role in cardiovascular disorders and especially in its association with the risk of CAD. We determined the prevalence of eNOS T786C polymorphism in healthy volunteers from an Iranian population and in patients suffering from CAD. Distribution of genotypes CC was around 100% for patients and control groups, so the C allele was not the susceptible allele for CAD subjects in this study.

Conclusion

According to the current study, there were no significant differences in endothelial nitric oxide synthase gene C786T polymorphism between healthy volunteers and patients with CAD. Therefore, genetic variation in eNOS may not contribute to etiology and risk of CAD.

Key words

Coronary artery disease, endothelial nitric oxide synthase, Iranian patients

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одной из ведущих причин смерти во всем мире. Во многих эпидемиологических исследованиях показано, что в развитие ИБС вносят вклад как факторы внешней среды, так и генетические факторы, но генетические факторы играют более важную роль в предрасположенности к ИБС [1, 2].

Очевидно, что эндотелиальные клетки играют важнейшую роль в прогрессировании и клинических проявлениях атеросклероза [3, 4]. Одним из наиболее важных веществ, выделяемых эндотелиальными клетками, является оксид азота (NO), главный медиатор эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД), синтезируемый в эндотелиальных клетках из L-аргинина под действием гомодимерного фермента эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). Помимо вазодилатации, NO подавляет агрегацию тромбоцитов, пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам [5,6]. За счет этих эффектов eNOS может играть атеропротективную роль [7].

Полиморфизм гена eNOS может влиять на синтез NO. Ген расположен в хромосоме 7q35-36 [8]. Ген eNOS экспрессируется и функционально регулируется множеством регуляторных путей [9, 10], а также несколькими полиморфизмами [11].

Замена нуклеотида Т на Ц в 786 позиции в 5'-концевой области гена eNOS, ведет к уменьшению промоторной активности этого гена, что ассоциировано с ИБС [12].

Целью настоящего исследования была оценка взаимосвязи генетических вариантов полиморфизма eNOS 786С > Т (rs41322052) с риском ИБС.

Материал и методы

В исследовании в общей сложности участвовали 319 человек, из них 213 пациентов с ИБС и 106 здоровых добровольцев.

Критериями включения для пациентов с ИБС были:

- возраст на момент постановки диагноза ИБС: ≤ 55 лет у мужчин и ≤ 65 лет у женщин;
- не менее чем 50% стеноз в одной из крупных коронарных артерий (КА), или одной из их ветвей, верифицированный ангиографией.

Тяжесть заболевания определялась в соответствии с количеством КА со стенозом от 50%, как в одном бассейне, так и в разных сосудах. Диагноз инфаркта миокарда (ИМ) подтверждали по историям болезни с помощью критериев Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [13] на основе симптоматики, повышения уровня сердечных ферментов в крови и изменений на ЭКГ.

У всех пациентов была собрана информация о коронарных факторах риска (ФР), таких как сахарный диабет (СД), артериальная гипертония (АГ), гиперхолестеринемия (ГХС) и курение. С помощью традиционных методов клинической биохимии были измерены уровни триглицеридов (ТГ), общего холестерина (ОХС), липопротеидов высокой плотности (ЛВП) и липопротеидов низкой плотности (ЛНП). АГ определяли как повышение систолического артериального давления (САД) ≥ 140 мм рт. ст. и/или диастолического артериального давления (ДАД) ≥ 90 мм рт.ст. более чем один раз. Пациенты с СД в анамнезе или гликемией натощак > 120 мг/дл определялись как имеющие СД.

Генотипирование

Геномную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) экстрагировали из лейкоцитов периферической крови (объемом 10 мл с ЭДТА в качестве антикоагулянта) с использованием метода высаливания.

Скрининг на полиморфизм eNOS 786С>Т проводили с помощью полимеразной цепной реакции с определением полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Использовали следующие праймеры: 5'-ТГГАГАГТГЦТГГТГТАЦЦЦА-3' (прямой) и 5'-ГЦЦТЦАЦЦЦЦАЦЦЦТГТЦ-3' (обратный).

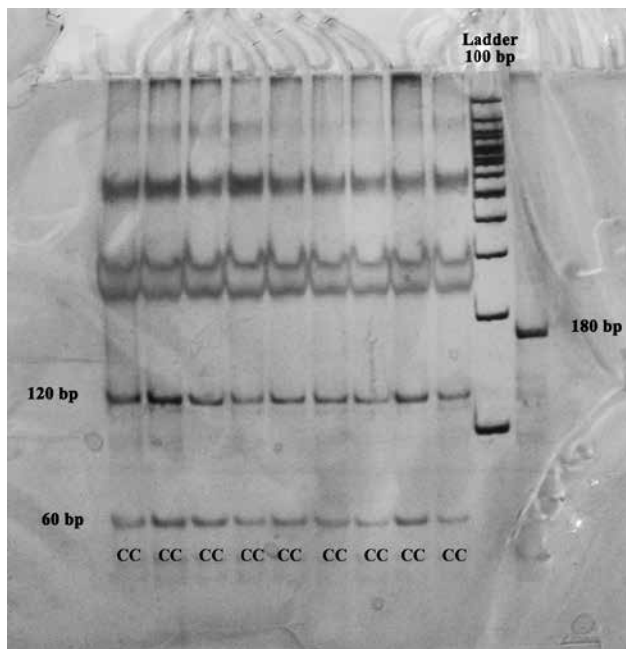


Рис. 1. Показательный результат скрининга на полиморфизм С786Т эндотелиальной синтазы оксида азота; полоса 180 п.н., генотип ТТ; 120 и 60 п.н., генотип СС; полосы 180, 120 и 60 п.н., генотип СТ. Примечание: лестница 100 п.н.; 180 п.н.; 120 п.н.; 60 п.н.

ДНК амплифицировали в течение 40 циклов; каждый цикл включал денатурацию при 94 °С в течение 1 мин, отжиг при 62 °С в течение 1 мин, удлинение при 70 °С в течение 1 мин и финальное удлинение на 5 мин при 70 °С. Начальную стадию денатурации проводили при 95 °С в течение 7 мин. Продукты ПЦР расщепляли рестриктазой BsmAI при 37 °С в течение ночи. При наличии Ц в позиции 786, ПЦР-продукт в 180 пар оснований (п.о.) расщеплялся на два фрагмента: в 120 п.н. и 60 п.н. продукты ПЦР разделяли на 8% акриламидном геле (рис. 1).

Адекватность данной ПЦР-ПДРФ была подтверждена прямым секвенированием нескольких образцов ПЦР каждого генотипа (рис. 2).

Результаты

В группе пациентов с ИБС наблюдали большую частоту АГ, СД, курения и семейного анамнеза ранней ИБС по сравнению с контрольной группой. У больных с ИБС был более высокий индекс массы тела (ИМТ), ОХС крови, ЛНП и ТГ. Согласно данным, семейный анамнез, АГ, СД, курение, ожирение, высокий уровень ОХС крови, ЛНП и ТГ, низкий уровень ЛВП значительно повышают риск ИБС.

Доля СС генотипов составила ~ 100% как у пациентов с ИБС, так и в контрольной группе.

Обсуждение

В последнее время появились исследования на тему различных мутаций гена eNOS, в этих исследованиях выдвигается гипотеза, что эти мутации могут быть ФР для развития ИБС, ИМ и АГ. В этих исследованиях также показано, что распределение этих полиморфизмов сильно различается между расами вследствие различий схемы сцепления и наследования полиморфизмов 786Т/С, Glu298Asp и 4a/4b в разных расах. В данном исследовании впервые оценивается взаимосвязь мутацией Т786С гена eNOS и ИБС среди населения Ирана.

Результаты не показали никакой связи между аллелем С гена eNOS и ИБС среди иранцев.

В исследовании, проведенном с участием жителей Кавказа, показано, что полиморфизм гена eNOS (Т786С) является важным ФР развития ИБС в этой популяции [14]. У японцев существует связь между снижением синтеза NO вследствие поли-

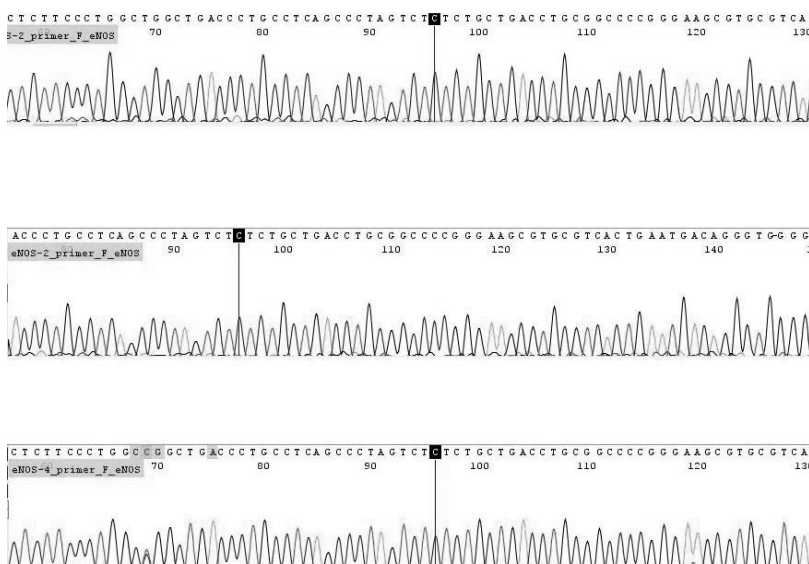


Рис. 2. Образец результата секвенирования для подтверждения генотипирования eNOS. Примечание: вертикальная линия показывает положение ОНП С786Т.

морфизма гена фермента и предрасположенностью пациентов с мутацией к спазму КА [12].

Исследование турецкого населения показало значительно более высокую частоту генотипа eNOS - 786C/C у больных острым коронарным синдромом (ОКС), чем в контрольной группе, что указывает на взаимосвязь генотипа eNOS (786C/C) с ОКС. Кроме того, обнаружение значительно более высокой частоты генотипа T/T в группе ИБС может указывать на связь генотипа CC с ОКС без предшествующей ИБС [15].

Исследования этого полиморфизма на других популяциях отсутствуют. Дальнейшее изучение должно быть направлено на определение других однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в настоящей популяции и создание панели ОНП, которые могут быть использованы в качестве маркеров генетического риска.

В данном исследовании, полиморфизм C786T гена eNOS видимо не имеет существенной связи с риском ИБС у отобранных пациентов.

Конфликт интересов: не заявлен.

Литература

- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, et al. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med.* 1994;330:1041–6.
- Ramakrishnan L, Sachdev HS, Sharma M, et al. Relationship of APOA5, PPARg and HL gene variants with serial changes in childhood body mass index and coronary artery disease risk factors in young adulthood. *Lipids Health Dis.* 2011;10:68.
- De Caterina R. Endothelial dysfunctions: common denominators in vascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:9–23.
- Gimbrone Jr MA. Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155:1–5.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002–12.
- Luscher TF. The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease. *Eur J Clin Investig.* 1993;23:670–85.
- Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis: John French Lecture 2000. *Atherosclerosis.* 2001;154:521–7.
- Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268:17478–88.
- Rossi GP, Seccia TM, Nussdorfer GG. Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Int Rev Cytol.* 2001;209:241–72.
- Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999;43:521–31.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999;100:1515–20.
- Masafumi Nakayama, Hirofumi Yasue, Michihiro Yoshimura, et al. C 786 → T Mutation in the 5'-Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With Coronary Spasm. *Circulation* 1999;99:2864–70.
- Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. *Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Circulation.* 1979;59:607–8.
- Rossi GP, Cesari M, Zanchetta M. The T-786C endothelial nitric oxide synthase genotype is a novel risk factor for coronary artery disease in Caucasian Patients of the GENICA study. *JACC.* 2003;41(6):930-7.
- Ciftçi C, Melil S, Cebi Y, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase promoter region (T-786C) gene polymorphism with acute coronary syndrome and coronary heart disease. *Lipids Health Dis.* 2008 Feb 25;7:5