

А.О. ЛИСОВОЙ¹, В.Е. ДОСЕНКО¹,
А.Н. ПАРХОМЕНКО², А.А. МОЙБЕНКО¹

¹ Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

² Национальный научный центр «Институт кардиологии
им. Н.Д. Стражеско» АМН Украины, Киев
E-mail: oleksandrisovyy@yahoo.com

ЧАСТОТА ПОЛИМОРФИЗМА ПРОМОТОРА ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ЭПОКСИГЕНАЗУ 2J2, У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМ КОРОНАРНЫМ СИНДРОМОМ



Представлены результаты определения полиморфизма G⁻⁵⁰→T промотора гена, кодирующего фермент эпоксигеназу 2J2, у 107 больных с острым коронарным синдромом и 104 здоровых индивидуумов. Установлено, что соотношение генотипов G/G, G/T и T/T составило 91, 9, 0 % соответственно (в контроле – 92, 7, 1 %; P > 0,05 по χ²-критерию). Полученные данные свидетельствуют о том, что полиморфизм промотора гена, кодирующего фермент эпоксигеназу 2J2, не влияет на вероятность развития острого коронарного синдрома в украинской популяции.

© А.О. ЛИСОВОЙ, В.Е. ДОСЕНКО, А.Н. ПАРХОМЕНКО,
А.А. МОЙБЕНКО, 2010

Введение. Роль продуктов эпоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний активно изучается в последние годы [1–4]. Известно, что эпоксигеназной активностью обладают несколько цитохром P450-содержащих ферментов [12], большая часть которых локализуется преимущественно в печени, осуществляя НАДФ-зависимое окисление ксенобиотиков [5, 6]. В тканях сердца преобладает 2J2 эпоксигеназа, осуществляющая преобразование арахидоновой кислоты в ряд биологически активных эйкозаноидов (эпоксиэйкозатриеновых кислот, ЭК) [7, 8]. Установлено, что эйкозаноиды, образующиеся при участии этой эпоксигеназы, обладают противовоспалительными, антитромботическими, фибринолитическими и вазодилатирующими свойствами, а также ингибируют экспрессию молекул клеточной адгезии, адгезию моноцитов и миграцию гладкомышечных клеток [4, 9–12]. Кардиопротективные свойства этих молекул также были подтверждены на экспериментальных моделях ишемии–реперфузии сердца [1, 3].

Ген человеческой эпоксигеназы 2J2 (CYP2J2), которая является единственным представителем 2J подсемейства цитохром P450-содержащих эпоксигеназ, находится на коротком плече хромосомы 1 [7, 13]. В результате секвенирования гена CYP2J2 человека были открыты генетические вариации в промоторной зоне, экзонах, а также в 3'-некодирующих и 3'-нетранслируемых зонах [14]. Для одного из найденных полиморфизмов, а именно замещения гуанидинового нуклеотида тимидиновым в –50 положении промотора, была показана ассоциация с повышенным риском развития ишемической болезни сердца в немецкой популяции [14] и эссенциальной гипертензией в русской популяции [15]. Установлено, что при таком замещении нуклеотидов происходит потеря сайта связывания транскрипционного фактора Sp1 с существенным снижением активности промотора гена CYP2J2 и, как следствие, уменьшается концентрация продуктов эпоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты в плазме крови [14].

Цель настоящей работы – определить частоту полиморфизма G⁻⁵⁰→T промотора гена CYP2J2 у больных с острым коронарным синдромом (ОКС) в украинской популяции для установления возможной взаимосвязи между

аллельными вариантами этого гена и вероятностью развития ОКС.

Материалы и методы. В основу работы положены результаты обследования 107 больных с ОКС (81,7 % мужчин и 18,3 % женщин) в возрасте от 40 до 83 лет (средний возраст $58,5 \pm \pm 0,7$ года), госпитализированных в отделение реанимации и интенсивной терапии Института кардиологии им. Н.Д. Стражеско АМН Украины. Заключительный диагноз нестабильной стенокардии (НС) выставлен 33,5 % больных, острого инфаркта миокарда (ИМ) – 66,5 % больных. Диагноз острого ИМ и НС устанавливали на основании данных клинических, электрокардиографических и биохимических обследований, согласно рекомендациям экспертов ВОЗ, а также в соответствии с рекомендациями Европейского и Американского обществ кардиологов [16–18]. Контрольную группу составили 104 практически здоровых донора, у которых отсутствие сердечно-сосудистой патологии подтверждали путем сбора анамнестических данных, снятия электрокардиограммы и измерения артериального давления. Контрольная группа и группа больных не отличались по возрасту и соотношению полов, $P > 0,05$ по χ^2 -критерию.

Для генотипирования венозную кровь забирали в стерильных условиях в моноветты объемом 2,7 мл с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты в качестве антикоагулянта («Sarstedt», Германия), замораживали и сохраняли при температуре при -20 °С. ДНК выделяли из цельной крови с использованием наборов ДНК-Prep («Изоген», Россия). Методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов определяли $G^{-50} \rightarrow T$ полиморфизм промотора гена CYP2J2 [14]. Для этого амплифицировали участок указанного гена с помощью пары специфических праймеров: прямой (sense) – 5'-TTTTCTGAGACCGGTGCGTG-3' и обратный (antisense) – 5'-TAGGAGAGTCCGAGGATGGA-3' («Metabion», Германия). Для амплификации брали 50–100 нг ДНК и добавляли к смеси, содержащей 5 мкл пятикратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфата магния, 200 мкМ смеси четырех нуклеотидтрифосфатов, по 30 рМ каждого из праймеров и 0,1 ед. Таq-полимеразы («АмплиСенс»,

Россия), объем доводили до 25 мкл деионизированной водой. PCR проводили в термоциклере «GeneAmp System 2700» («Applied Biosystems», США). Амплификация фрагмента промотора состояла из 35 циклов: денатурация – 95 °С (45 с), отжиг праймеров – 60,5 °С (45 с) и элонгация – 72 °С (45 с). В дальнейшем 8 мкл продукта амплификации фрагмента гена инкубировали при 37 °С в течение 24 ч с 2 ед. рестриктазы AluI («Ферментас», Литва) в буфере tango следующего состава: 33 мМ трис-ацетата (рН 7,9), 10 мМ ацетата магния, 66 мМ ацетата калия, 0,1 мг/мл сывороточного альбумина быка (BSA) («Ферментас», Литва). Если в положении –50 промотора гена CYP2J2 гуанидиновый нуклеотид заменялся на тимидиновый, то амплификат, состоящий из 242 пар оснований, расщеплялся рестриктазой AluI на два фрагмента – 143 и 99 пар оснований. В противном случае сайт рестрикции для AluI (AGCT) теряется и образуется один фрагмент длиной 242 п.н. (рис. 1).

Амплификаты фрагмента исследуемого гена после рестрикции разделяли в 2,5%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Визуализацию ДНК после горизонтального электрофореза (155 В на протяжении 45 мин) осуществляли с помощью трансиллюминатора и программного обеспечения ViTrap («Биоком», Россия).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием программы Excel 2000. При этом достоверность отличий определяли по χ^2 -критерию. Значение $P < 0,05$ считали достоверным.

Результаты исследований и их обсуждение. Нами была определена частота различных генотипов в контрольной группе и у больных с ОКС, которая схематически показана на рис. 2. Соотношение генотипов G/G, G/T и T/T в опытной группе составило 91, 9, 0 % соответственно (в контроле – 92, 7, 1 %; $P > 0,05$ по χ^2 -критерию). Среди 211 генотипированных людей была найдена всего лишь одна патологическая гомозигота T/T. Это свидетельствует о том, что в украинской популяции упомянутый полиморфизм гена CYP2J2 встречается крайне редко.

Полученные данные говорят о том, что распределение частот аллельных вариантов гена

CYP2J2 практически не отличается от аналогичного показателя в контрольной группе и группе больных с ОКС. Эти данные согласуются с опубликованными результатами других авторов, которыми было показано, что исследуемый полиморфизм промотора гена CYP2J2 встречается довольно редко в немецкой и российской популяциях [11, 15]. В немецкой популяции частота генотипов G/G, G/T и T/T у больных с ишемической болезнью сердца и практически здоровых доноров составляла 82,7; 14,9; 2,4 % и 89,4; 10,2; 0,4 % соответственно, что позволило исследователям сделать вывод о влиянии данного полиморфизма на частоту возникновения ишемической болезни сердца. При помощи функционально-генетических исследований этими авторами было установлено снижение активности промотора исследуемого гена в случае замены G⁻⁵⁰ → T, а также уменьшение содержания 14,15-дигидроксиэйкозатриеновой кислоты (стабильный метаболит ЭК) в плазме крови индивидуумов с редким вариантом промотора гена CYP2J2. Анализ клинических данных позволил авторам установить, что у гетерозигот (G/T) и гомозигот (T/T) по сравнению с нормальными гомозиготами (G/G) значительно выше уровень общего холестерина и триглицеридов в плазме крови, а также чаще регистрируется повышенное артериальное давление. При этом не было установлено влияние указанного полиморфизма на частоту развития острого коронарного синдрома и ишемии мозга [15]. Широкомасштабное исследование, проведенное в Курске, позволило установить влияние исследованного полиморфизма на частоту развития артериальной гипертензии в российской популяции. Исследователями не было выявлено ни одной редкой гомозиготы (T/T), однако количество гетерозигот (G/T) у гипертоников было значительно выше, чем в контрольной группе — 10,2 и 2,5 % соответственно [11]. В 2007 г. были опубликованы результаты совместного исследования французских и немецких ученых, посвященного изучению ассоциации полиморфизма G⁻⁵⁰ → T гена CYP2J2 с ишемической болезнью сердца (ИБС), ИМ и смертностью в когорте LURIC (Ludwigshafen risk and cardiovascular health cohort). Полученные данные

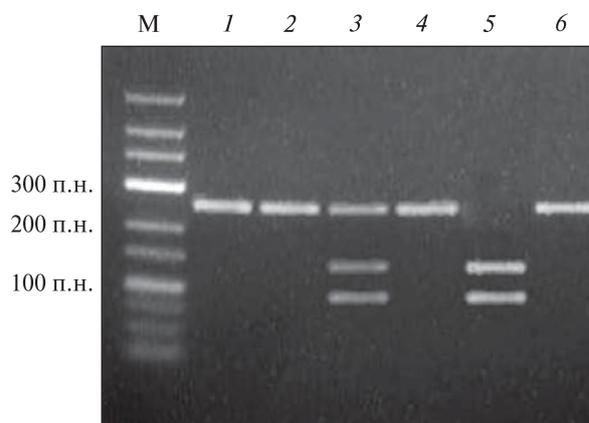


Рис. 1. Результаты электрофореза фрагмента гена эпоксигеназы 2J2 после рестрикции с использованием фермента AluI: М — маркер молекулярной массы (п.н. — пары нуклеотидов), дорожки 1, 2, 4, 6 соответствуют G/G-генотипу, 3 — G/T-генотипу, 5 — T/T-генотипу

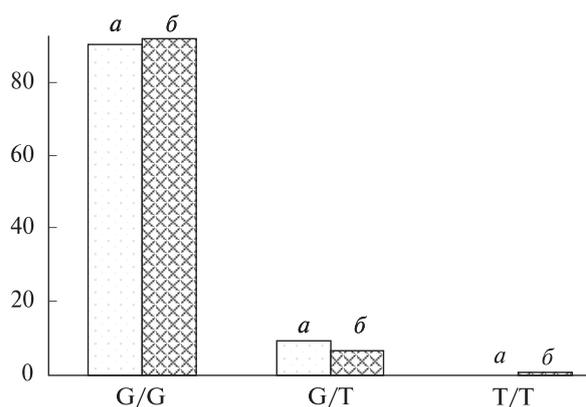


Рис. 2. Частота различных генотипов, %, при определении G⁻⁵⁰ → T полиморфизма гена эпоксигеназы 2J2 у больных с острым коронарным синдромом (а) и практически здоровых индивидуумов (б)

свидетельствуют об отсутствии ассоциации этого полиморфизма с ИБС, ИМ, а также смертностью в результате сердечно-сосудистых заболеваний [19]. Авторы постулируют, что противоречивые результаты исследований ассоциации полиморфизмов тех или иных генов с какими-либо патологиями могут быть обусловлены недостаточным размером выборок. Вместе с тем исследование когорты ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) установило ассоциацию G⁻⁵⁰ → T полиморфизма гена CYP2J2 со сниженным риском развития вне-

запной ИБС у афроамериканцев и отсутствие этой болезни у выходцев с Кавказа [20]. Представленные в литературе противоречивые данные относительно связи полиморфизма промотора гена CYP2J2 с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, по-видимому, свидетельствуют о неравнозначности эпоксигеназного пути метаболизма АК для различных популяций.

Несущественная разница в распределении генотипов при определении G⁻⁵⁰ → Т полиморфизма промотора гена CYP2J2 у больных с ОКС и у практически здоровых людей, установленная в нашей работе, свидетельствует о том, что исследованный полиморфизм не играет существенной роли в патогенезе ОКС в украинской популяции.

А.О. Лисовой, В.Е. Досенко,
А.Н. Пархоменко, А.А. Мойбенко

THE FREQUENCY OF CYP2J2 G⁻⁵⁰ → T
POLYMORPHISM IN ACUTE CORONARY
SYNDROME PATIENTS

G⁻⁵⁰ → T promoter polymorphism of gene encoding human epoxygenase 2J2 in 107 patients with acute coronary syndrome and in 104 practically healthy people was determined. It was shown that interrelation of genotypes G/G, G/T and T/T was 91 %, 9 % та 0 % correspondingly (in control – 92 %, 7 %, 1 %; P > 0,05 by χ^2 -test). The data indicate that epoxygenase 2J2 gene polymorphism is not a risk factor of acute coronary syndrome in Ukrainian population.

О.О. Лисовой, В.Е. Досенко,
О.М. Пархоменко, О.О. Мойбенко

ЧАСТОТА ПОЛІМОРФІЗМУ
ПРОМОТОРУ ГЕНА,
ЩО КОДУЄ ЭПОКСИГЕНАЗУ 2J2,
У ХВОРИХ З ГОСТРИМ
КОРОНАРНИМ СИНДРОМОМ

Наведено результати визначення алельного поліморфізму промотору гена, що кодує фермент эпоксигеназу 2J2 (G⁻⁵⁰ → Т), у 107 хворих на гострий коронарний синдром і 104 здорових індивідуумів. Встановлено, що співвідношення генотипів G/G, G/T и T/T при аналізі поліморфізму гена эпоксигенази 2J2 становить 91, 9, 0 % відповідно (в контролі – 92, 7, 1 %; P > 0,05 за χ^2 -критерієм). Отримані дані свідчать про те, що поліморфізм гена, який кодує фермент эпоксигеназу 2J2, не впливає на ймовірність розвитку гострого коронарного синдрому в українській популяції.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nithipatikom K., Moore J. M., Isbell M. A. et al. Epoxyeicosatrienoic acids in cardioprotection: ischemic versus reperfusion injury // Amer. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2006. – **291**, № 2. – P. 537–542.
2. Roman R. J. P450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function // Physiol. Rev. – 2002. – **82**. – P. 131–185.
3. Seubert J. M., Zeldin D. C., Nithipatikom K. et al. Role of epoxyeicosatrienoic acids in protecting the myocardium following ischemia/reperfusion injury // Prostaglandins. Other. Lipid. Mediat. – 2007. – **82**, № 1–4. – P. 50–59.
4. Spiecker M., Liao J. Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 and the risk of coronary artery disease // Trends Cardiovasc. Med. – 2006. – **16**, № 6. – P. 204–208.
5. Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T. et al. P450 super-family: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature // Pharmacogenetics. – 1996. – **6**. – P. 1–42.
6. Scarborough P.E., Ma J., Qu W., Zeldin D.C. P450 subfamily CYP2J and their role in the bioactivation of arachidonic acid in extrahepatic tissues // Drug. Metab. Rev. – 1999. – **31**. – P. 205–234.
7. Wu S., Moomaw C.R., Tomer K.B., Falck J.R., Zeldin D.C. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**. – P. 3460–3468.
8. Zeldin D. C. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**. – P. 36059–36062.
9. Node K., Huo Y., Ruan X. et al. Antiinflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids // Science. – 1999. – **285**. – P. 1276–1279.
10. Node K., Ruan X.L., Dai J. et al. Activation of Gas mediates induction of tissue-type plasminogen activator gene transcription by epoxyeicosatrienoic acids // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**. – P. 15983–15989.
11. Oltman C.L., Weintraub N.L., VanRollins M., Dellsperger K.C. Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation // Circ. Res. – 1998. – **83**. – P. 932–939.
12. Sun J., Sui X., Bradbury J.A. et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by cytochrome p450 epoxygenase-derived eicosanoids // Circ. Res. – 2002. – **90**. – P. 1020–1027.
13. Ma J., Ramachandran S., Fiedorek F. T., Zeldin D.C. Mapping of the CYP2J cytochrome P450 genes to human chromosome 1 and mouse chromosome 4 // Genomics. – 1998. – **49**. – P. 152–155.
14. Spiecker M., Darius H., Hankeln T. et al. Risk of coro-

- nary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 // *Circulation*. – 2004. – **110**. – P. 2132–2136.
15. *Polonikov A.V., Ivanov V.P., Solodilova M.A.* A common polymorphism G-50T in cytochrome P450 2J2 gene is associated with increased risk of essential hypertension in a Russian population // *Dis. Markers*. – 2008. – **24**, № 2. – P. 119–126.
 16. *Bertrand M.E., Simoons M.L., Fox K. 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.
 17. *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.
 18. *World Health Organization.* Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease // *Circulation*. – 1979. – **59**. – P. 607–609.
 19. *Hoffmann M.M., Bugert P., Seelhorst U. et al.* The –50G>T polymorphism in the promoter of the CYP2J2 gene in coronary heart disease: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study // *Clin. Chem.* – 2007. – **53**, № 3. – P. 539–540.
 20. *Lee C.R., North K.E., Bray M.S. et al.* CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study // *Pharmacogenet. Genomics*. – 2007. – **17**, № 5. – P. 349–358.

Поступила 24.02.09