

А603G полиморфизм гена тканевого фактора и медиаторы иммунного воспаления у больных гипертонической болезнью, ассоциированной с ишемической болезнью сердца

Саха Д.¹, Сергеева Е.Г.¹, Костарева А.А.², Галкина О.В.¹,
Ионова Ж.И.¹, Саха С.¹, Богданова Е.О.¹, Горбач А.В.¹

¹ ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, Россия

Саха Д. — аспирант кафедры факультетской терапии ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ (СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова); Сергеева Е.Г. — доктор медицинских наук, профессор кафедры факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; Костарева А.А. — кандидат медицинских наук, директор Института медицинской биологии и генетики ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздравсоцразвития РФ; Галкина О.В. — кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией биохимического гемостаза организма научно-исследовательского института нефрологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; Ионова Ж.И. — врач-интерн кафедры факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; Саха С. — аспирант кафедры факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; Богданова Е.О. — старший лаборант лаборатории биохимического гемостаза организма научно-исследовательского института нефрологии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова; Горбач А.В. — аспирант кафедры факультетской терапии СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова.

Контактная информация: ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздравсоцразвития РФ, кафедра факультетской терапии, ул. Л. Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Россия, 197022. Тел./факс: 8 (812) 234–34–24. E-mail: ele195738@yandex.ru (Саха Дебдас).

Резюме

Актуальность. В условиях развития персонализированной медицины и фармакогеномики сохраняет свою актуальность поиск новых генетических факторов, влияющих на особенности клинических проявлений гипертонической болезни и ишемической болезни сердца (ИБС). **Цель исследования** — проанализировать взаимосвязь структурного полиморфизма А603G тканевого фактора с медиаторами иммунного повреждения эндотелия у больных гипертонической болезнью, ассоциированной с ишемической болезнью сердца. **Материалы и методы.** Генотип тканевого фактора определяли методом полимеразной цепной реакции у 105 больных гипертонической болезнью и ИБС, для определения уровня интерлейкина-8 (ИЛ-8), интерферона-гамма (ИФ-гамма), фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) плазмы крови применяли иммуноферментный метод. **Результаты.** 24 пациента (13,3 %) были носителями АА генотипа, 48 больных — АG генотипа (45,7 %) и 33 больных (30,5 %) имели GG генотип. Средний возраст дебюта ИБС был достоверно ниже у больных с GG генотипом — $52,1 \pm 2,5$ года по сравнению с соответствующим показателем у больных с АА генотипом ($59,2 \pm 2,5$ года) и АG генотипом ($60,1 \pm 1,8$ года). У больных с GG генотипом уровень ИЛ-8 составил $9,81 \pm 2,14$ пкг/мл, ИФ-гамма — $1,58 \pm 0,25$ пкг/мл, что достоверно выше, чем у больных с АА генотипом ($3,08 \pm 0,59$ и $0,99 \pm 0,21$ пкг/мл соответственно, $p < 0,05$). У всех больных ИБС уровень ФНО-альфа был выше референтных значений. **Выводы.** Таким образом, у больных гипертонической болезнью GG генотип тканевого фактора был ассоциирован с более ранним дебютом ИБС и повышением уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-8, ИФ-гамма, ФНО-альфа плазмы крови.

Ключевые слова: тканевый фактор, иммунное воспаление, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца.

A603G tissue factor gene polymorphism and mediators of immune inflammation in patients with arterial hypertension and coronary heart disease

Sakha D.¹, Sergeeva E.G.¹, Kostareva A.A.², Galkina O.V.¹, Ionova J.I.¹, Sakha S.¹, Bogdanova E.O.¹, Gorbach A.V.¹

¹Pavlov St Petersburg State Medical University, St Petersburg, Russia

²Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St Petersburg, Russia

Corresponding author: Pavlov St Petersburg State Medical University, Faculty Therapy Department, 6/8 L. Tolstoy st., St Petersburg, Russia, 197022. Tel./fax: 8 (812) 234–34–24. E-mail: ele195738@yandex.ru (Debdas Sakha, MD, a PhD student at Faculty Therapy Department at Pavlov St Petersburg State Medical University).

Abstract

Background. Genetic factors have clinical significance in arterial hypertension and coronary heart disease (CHD). **Objective.** To assess A603G tissue factor gene polymorphism and mediators of immune inflammation in patients with arterial hypertension and CHD. **Design and methods.** The A603G genotype was determined in a sample of 105 patients with arterial hypertension and CHD by a polymerase chain reaction-restriction length polymorphism (PCR-RFLP)-based method. We studied the mediators of immune inflammation — interleukin-8 (IL-8), interferon-gamma (IF-gamma), tumor necrosis factor-alpha (TNF) and interleukin-10 (IL-10). **Results.** 24 patients (13,3 %) were the carriers of AA genotype, patients had AG and GG genotype. CHD was diagnosed at the age of $52,1 \pm 2,48$ years in patients with GG genotype compared to $59,2 \pm 2,54$ years in AA genotype group and $60,1 \pm 1,84$ years in AG genotype group ($p < 0,05$). Levels of IL-8 ($9,81 \pm 2,14$ pkg/ml) and IF-gamma ($1,58 \pm 0,25$ pkg/ml) were elevated in patients with GG genotype in comparison with AA genotype patients ($3,08 \pm 0,59$ и $0,99 \pm 0,21$ pkg/ml, respectively, $p < 0,05$). **Conclusion.** Our data support that GG genotype of tissue factor in patients with arterial hypertension is associated with early debut of CHD and activation of proinflammatory cytokines, mediators of endothelial dysfunction.

Key words: tissue factor, immune inflammation, arterial hypertension, coronary heart disease.

Статья поступила в редакцию: 28.06.12. и принята к печати: 10.07.12.

Введение

В условиях развития персонализированной медицины и фармакогеномики сохраняет свою актуальность поиск новых генетических факторов, влияющих на особенности клинических проявлений гипертонической болезни (ГБ) и ишемической болезни сердца (ИБС). Особый интерес представляет поиск генов-кандидатов, которые могут иметь отношение к более раннему дебюту ИБС у больных ГБ. В качестве новых факторов риска атеросклероза рассматриваются протромбогенные факторы.

Тканевый фактор является начальным звеном, запускающим каскад коагуляционных событий в сосудистой стенке при ее повреждении. Его концентрация в плазме крови и в сосудистой стенке имеет прогностическое значение у больных ИБС [1]. Было показано, что базальная активность тканевого фактора плазмы крови является независимым фактором риска кардиоваскулярной смерти у больных острым инфарктом миокарда [1, 2].

Тканевый фактор может присоединяться к клеточным рецепторам, где он, в свою очередь, способствует продукции и выделению медиаторов воспаления. Установлено, что моноциты и макрофаги, стимулированные провоспалительными цитокинами, экспрессируют тканевый фактор [3].

Известно несколько вариантов полиморфизма гена тканевого фактора. А603G генотип тканевого фактора ассоциируется с развитием инфаркта миокарда [4].

Однако не проводилось исследований об ассоциации А603G полиморфизма гена тканевого фактора с активностью медиаторов иммунного воспаления и возрастом дебюта ИБС, что актуально для выбора персонализированной терапии.

Целью настоящей работы стал анализ взаимосвязи структурного полиморфизма А603G тканевого фактора с медиаторами иммунного повреждения эндотелия у больных ГБ, ассоциированной с ИБС, для разработки дифференцированной врачебной тактики.

Материалы и методы

Обследовано 105 больных ГБ, ассоциированной с ИБС, в возрасте от 32 до 78 лет. Все пациенты прошли обследования на предмет исключения симптоматических артериальных гипертензий. Длительность ГБ до 5 лет имела место у 23 больных, от 5 до 10 лет — у 48 и более 10 лет — у 34 пациентов.

Возраст дебюта ИБС до 50 лет отмечался у 30 человек, старше 50 лет — у 75 пациентов. Инфаркт миокарда в анамнезе имел место у 69 больных, курение — у 70 человек. Липидный спектр оценивался у 59 больных до начала гиполипидемической терапии. Только у одного пациента показатели липидов крови были в пределах целевых значений, у 20 больных выявлена комбинированная гиперхолестеринемия и гипертриглицеридемия.

A603G генотип тканевого фактора изучался методом полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом.

Концентрацию интерлейкина-8 (ИЛ-8), интерферона-гамма (ИФ-гамма), фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа), интерлейкина-10 (ИЛ-10) оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием иммуноферментных наборов фирмы Bender Medsystems и ООО «Цитокин». Параметры липидного спектра крови изучали спектрофотометрическим методом. Полученные данные анализировали методами параметрической статистики с использованием пакета программ Statgraphics.

Результаты и их обсуждение

У большинства больных ГБ, ассоциированной с ИБС, выявлялись гетерозиготные или гомози-

готные полиморфные варианты гена тканевого фактора с заменой А аллеля на G аллель. GG генотип был выявлен у 33 больных (30,5 %), AG генотип — у 48 (45,7 %) и AA генотип у 24 пациентов (22,8 % из общего числа больных). Частота встречаемости G аллеля была несколько выше частоты встречаемости А аллеля (0,55 против 0,45).

Уровень липопротеинов низкой плотности у больных с AA, AG и GG генотипами не имел достоверных различий ($3,6 \pm 0,51$; $3,2 \pm 0,24$ и $3,2 \pm 0,31$ ммоль/л соответственно).

Анализ клинического течения ИБС у больных с различным генотипом тканевого фактора выявил следующее. Дебют ИБС в возрасте до 50 лет отмечался у 12 больных с GG генотипом (36 %), у 12 больных с AG генотипом (27 %) и у 6 больных с AA генотипом (25 %). Таким образом, имелась тенденция к более раннему дебюту ИБС в возрасте до 50 лет у больных с GG генотипом. Средний возраст дебюта ИБС у больных с GG генотипом составил $52,1 \pm 2,48$ года, по сравнению с больными с AA генотипом — $59,2 \pm 2,54$ года ($p < 0,05$) и у больными с AG генотипом — $60,1 \pm 1,84$ года ($p < 0,02$).

В последние годы обсуждается роль факторов иммунного воспаления и дисфункции эндотелия в раннем дебюте ИБС. ИЛ-8 является признанным маркером повреждения эндотелия. В свою очередь, дисфункция эндотелия в последние годы рассматривается как один из факторов риска атеросклероза, поэтому для нас представлялось интересным оценить уровень ИЛ-8 у больных ИБС с различным генотипом тканевого фактора. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1

УРОВЕНЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 И ИНТЕРФЕРОНА-ГАММА У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА, И РАЗЛИЧНЫМ ГЕНОТИПОМ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА

Показатель	Генотип гена тканевого фактора			P
	AA n = 14	AG n = 25	GG n = 23	
Интерлейкин — 8, пкг/мл, $M \pm m$	$3,08 \pm 0,59$	$4,36 \pm 0,91$	$9,81 \pm 2,14$	P1 = 0,315 P2 = 0,050 P3 = 0,032
Интерферон-гамма, пкг/мл, $M \pm m$	$0,99 \pm 0,21$	$1,45 \pm 0,20$	$1,58 \pm 0,25$	P1 = 0,190 P2 = 0,050 P3 = 0,700

Примечание: P1 — значимость различий показателей у больных с AA и AG генотипами; P2 — значимость различий показателей у больных с AA и GG генотипами; P3 — значимость различий показателей у больных с AG и GG генотипами.

Таблица 2

**УРОВЕНЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА И ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 ПЛАЗМЫ КРОВИ
У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ
СЕРДЦА, И РАЗЛИЧНЫМ ГЕНОТИПОМ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА**

Показатель	Генотип гена тканевого фактора			P
	AA n = 6	AG n = 15	GG n = 12	
ФНО-альфа, пкг/мл, M ± m	17,3 ± 2,06	18,4 ± 1,29	18,2 ± 1,12	P1 = 0,75 P2 = 0,82 P3 = 0,83
ИЛ-10, пкг/мл, M ± m	4,3 ± 1,58	10,2 ± 1,98	7,8 ± 1,12	P1 = 0,304 P2 = 0,796 P3 = 0,217

Примечание: ФНО-альфа — фактор некроза опухоли-альфа; ИЛ-10 — интерлейкин-10; P1 — значимость различий показателей у больных с AA и AG генотипами; P2 — значимость различий показателей у больных с AA и GG генотипами; P3 — значимость различий показателей у больных с AG и GG генотипами.

Установлено, что у больных ИБС с GG генотипом уровень ИЛ-8 был значимо выше, чем у пациентов с AG генотипом и, особенно, с AA генотипом: $9,81 \pm 2,14$ против $4,36 \pm 0,91$ и $3,08 \pm 0,59$ пкг/мл соответственно, $p < 0,05$. Напротив, наиболее низкое содержание ИЛ-8 в плазме крови отмечено у пациентов с AA генотипом (табл. 1). Уровень ИЛ-8 у здоровых доноров не превышал 5 пкг/мл.

Регрессионный анализ не выявил взаимосвязи уровня ИЛ-8 с содержанием общего холестерина, триглицеридов, липопротеинов низкой и высокой плотности у больных ИБС. Однако была выявлена тесная связь между содержанием ИЛ-8 и уровнем противовоспалительного цитокина ИЛ-10 у обследованных больных ИБС. Исследования последних лет показали, что ИФ-гамма является важным медиатором дисфункции эндотелия. Нами проведено исследование уровня этого провоспалительного цитокина в плазме крови больных с различным генотипом тканевого фактора (табл. 1).

Во всех трех группах больных ИБС с различным генотипом уровень ИФ-гамма был выше референтных значений. Нами установлено, что уровень ИФ-гамма плазмы крови был выше у больных ИБС с GG генотипом: $1,58 \pm 0,251$ против $0,99 \pm 0,205$ пкг/мл ($p < 0,05$) у больных с AA генотипом. Содержание этого провоспалительного цитокина в плазме крови больных ИБС с AG генотипом также было незначительно выше, чем у больных с AA генотипом.

Анализировалось содержание ФНО-альфа в плазме крови больных ИБС с различным генотипом тканевого фактора. Из данных, представленных в таблице 2, следует, что у всех больных ИБС с различными генотипами гена тканевого фактора уро-

вень ФНО-альфа был существенно выше референтных значений (2–3 пкг/мл), которые были получены при обследовании 80 образцов донорской крови. Так, у больных ИБС с AA генотипом концентрация ФНО-альфа плазмы крови составила $17,3 \pm 2,06$ пкг/мл, с AG генотипом — $18,4 \pm 1,29$ пкг/мл и у пациентов с GG генотипом — $18,2 \pm 1,12$ пкг/мл.

В последние годы большое клинико-патогенетическое значение придается балансу про- и противовоспалительных цитокинов при инициации и прогрессировании атеросклеротического процесса.

ИЛ-10 является одним из ведущих полифункциональных противовоспалительных цитокинов, но его патогенетическая роль в процессе иммунного воспаления у больных ГБ, ассоциированной с ИБС, изучена недостаточно.

Нами проанализировано содержание ИЛ-10 плазмы крови больных ИБС с различным генотипом гена тканевого фактора. Из данных, представленных в таблице 2, следует, что имеется тенденция к увеличению уровня ИЛ-10 у больных ИБС с AG и GG генотипами по сравнению с пациентами с AA генотипом: $10,2 \pm 1,98$ и $7,8 \pm 1,12$ против $4,3 \pm 1,58$ пкг/мл соответственно ($p > 0,05$). Следует отметить, что уровень этого противовоспалительного цитокина существенно не отличался от референтных значений (3,9–8,8 пкг/мл).

Имелась отчетливая, но статистически незначимая тенденция к снижению уровня ИЛ-10 у больных ГБ, у которых ИБС дебютировала в возрасте до 50 лет: $4,46 \pm 1,69$ против $9,30 \pm 1,15$ пкг/мл в группе пациентов с дебютом ИБС в возрасте старше 50 лет. Не исключено, что более низкая активность этого универсального противовоспалительного цитокина могла вносить вклад в ранний дебют ИБС.

Корреляционный и регрессионный анализ не выявил достоверных взаимосвязей между содержанием ИЛ-10 и параметрами липидного спектра плазмы крови.

Установлена сильная положительная связь между концентрацией ИФ-гамма и содержанием ИЛ-10 плазмы крови больных ИБС: $r = 0,576$, $p < 0,001$. Не исключено, что имеется патогенетическая связь между двумя этими цитокинами, один из которых обладает провоспалительными, а другой — противовоспалительными свойствами.

Таким образом, нами установлено, что у больных ИБС с GG генотипом тканевого фактора уровень ИЛ-8 был значимо выше, чем у больных с AA генотипом. Известно, что интактные эндотелиоциты не выделяют большого количества ИЛ-8. Так как этот хемокин продуцируется преимущественно эндотелием в активированном состоянии, можно сделать предположение о хронической дисфункции эндотелия у больных ИБС с GG генотипом тканевого фактора, которая замыкает порочный круг дальнейшего повышения уровня этого прокоагулянта в сосудистой стенке. Известно, что при GG генотипе уровень тканевого фактора в плазме крови и в сосудистой стенке значительно выше, что способствует активации иммунного воспаления [5]. Регрессионный анализ не выявил взаимосвязи уровня вышеуказанного провоспалительного цитокина с параметрами липидного спектра крови, что косвенно свидетельствовало о нелипидных механизмах повышенной экспрессии ИЛ-8.

Еще один важный медиатор дисфункции эндотелия — это ИФ-гамма. По нашим данным, во всех трех группах больных ИБС с различным генотипом тканевого фактора ИФ-гамма был выше референтных значений. Однако максимально уровень этого провоспалительного цитокина был повышен у больных с GG генотипом. Следует отметить, что эти изменения происходили по нелипидным механизмам, так как значимых корреляций с параметрами липидного спектра крови выявлено не было.

ИФ-гамма не только подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток, но и усиливает их апоптоз. В состоянии апоптоза гладкомышечные клетки в усиленных количествах выделяют тканевый фактор. Утрата гладкомышечного и коллагенового каркаса в атеросклеротической бляшке приводит к ее дестабилизации и провокации острого коронарного синдрома, а также к формированию неинтимы в зоне атеросклеротических изменений сонных артерий [6].

Следует отметить, что сочетанное повышение ИЛ-8 и ИФ-гамма оказывает взаимопотенцирующий эффект на процесс иммунного воспаления.

ФНО-альфа является универсальным провоспалительным цитокином, который запускает механизм экспрессии других провоспалительных цитокинов и хемокинов через систему ядерного трансляционного фактора каппа-бета. Согласно нашим данным, уровень ФНО-альфа во всех трех группах больных ИБС с различным генотипом гена тканевого фактора был существенно выше референтного значения, которое составляло 2,5 пкг/мл у здоровых доноров (табл. 2).

Известно, что ФНО-альфа индуцирует продукцию ИЛ-8 эндотелиоцитами. Все вышеуказанные изменения могут замыкать порочный круг иммунного воспаления. Имеются данные, что тромбин и ФНО-альфа вызывали экспрессию тканевого фактора в эндотелиоцитах и гладкомышечных клетках человека.

Картина иммунного воспаления будет неполной без исследования противовоспалительных факторов. ИЛ-10 является универсальным противовоспалительным цитокином. Поэтому оценка его концентрации в плазме крови больных ИБС входила в одну из задач нашего исследования. По нашим данным, уровень ИЛ-10 у больных ИБС с различным генотипом тканевого фактора был в пределах референтных значений. Однако наблюдалась тенденция к повышению этого провоспалительного цитокина у больных с GG и AG генотипами, но различия не достигали статистической значимости.

Нами установлена сильная положительная связь между концентрацией ИФ-гамма и содержанием ИЛ-10 в плазме крови больных ИБС. Не исключено, что мощная активация провоспалительных цитокинов вызывает компенсаторный противовоспалительный ответ, что характерно для иммунного воспаления [7].

Заключение

Таким образом, у больных артериальной гипертензией GG генотип тканевого фактора был ассоциирован с более ранним дебютом ИБС и повышением уровня провоспалительных цитокинов — ИЛ-8, ИФ-гамма, ФНО-альфа плазмы крови.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов.

Литература

1. Roldán V., Marín F., Fernández P. et al. Tissue factor/tissue factor pathway inhibitor system and long-term prognosis after acute myocardial infarction // *Int. J. Cardiol.* — 2001. — Vol. 78, № 2. — P. 115–119.
2. Morange P.E., Blankenberg S., Alessi M.C. et al. Prognostic value of plasma tissue factor and tissue factor pathway inhibitor

for cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study // J. Thromb. Haemost. — 2007. — Vol. 5, № 3. — P. 475–482.

3. Buchard B.A., Tracy P.B. The participation of leukocytes in coagulant reactions // J. Thromb. Haemost. — 2003. — Vol. 1, № 3. — P. 464–469.

4. Ott I., Koch W., von Beckerath N. et al. Tissue factor promoter polymorphism — 603 A/G is associated with myocardial infarction // Atherosclerosis. — 2004. — Vol. 177, № 1. — P. 189–191.

5. ten Cate H. Tissue factor-driven thrombin generation and inflammation in atherosclerosis // Thromb. Res. — 2012. — Vol. 129, Suppl. 2. — P. S38–S40.

6. Geng Y-J., Wu Q., Muszynski M., Hansson G.K., Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon- γ , tumor necrosis factor- α , and interleukin-1- β // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 1996. — Vol. 16, № 1. — P. 19–27.

7. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease // N. Engl. J. Med. — 1999. — Vol. 340, № 2. — P. 115–126.