

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TNF-Б (G308A) И IL-10 (G-1082A) ПРИ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА НА ЭКСПРЕССИЮ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ

В.С. Гольшко<sup>1</sup>, В.А. Снежицкий<sup>1</sup>, М.В. Ершова<sup>2</sup>, О.Е. Кузнецов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>—УО «Гродненский государственный медицинский университет»

<sup>2</sup>—УЗ «Гродненская областная клиническая больница»

*Значительное количество исследований посвящено поиску генетических факторов, предрасполагающих к неблагоприятному течению коронарной болезни сердца. Одно из главных направлений в этих исследованиях — изучение полиморфизма генов про- и противовоспалительных цитокинов. В статье приводятся результаты исследований по изучению ассоциаций полиморфизма генов TNF-б( G-308A) и IL-10(G-1082A) с инфарктом миокарда, и влияние данных полиморфизмов на экспрессию цитокинов.*

**Ключевые слова:** инфаркт миокарда, ДНК-полиморфизм, цитокины

В последние годы произошла переоценка ключевых положений патогенеза коронарной болезни сердца с позиций развития иммунного воспаления в сосудистой стенке. Установлено, что атеросклероз по многим признакам подобен хроническому воспалительному процессу с участием медиаторов воспаления, активно продуцируемых в зонах формирования атеросклеротической бляшки и очаге ишемии при инфаркте миокарда (ИМ). С целью поиска причин прогрессирования атеросклероза коронарных артерий и выявления лиц с высокой степенью риска ИМ представляется оправданным поиск новых эффективных профилактических мероприятий [1, 3].

Один из подходов к профилактике ИМ — изучение генов, обуславливающих предрасположенность к заболеванию. Генетические ассоциативные исследования и анализ генов-кандидатов позволили выявить ряд полиморфизмов, предрасполагающих к развитию острых коронарных событий [6, 8, 15, 20].

Гены цитокинов обладают чрезвычайно высокой степенью полиморфизма, причем количество участков этого полиморфизма в одном гене может достигать нескольких десятков. Другими словами, наличие аллельного полиморфизма в промоторных участках генов обеспечивает разнообразие индивидов по степени продукции цитокинов при формировании клеточных реакций, в том числе и при ИМ [1].

Для исследования выбраны 2 гена-кандидата, которые, согласно международным базам данных, ассоциируются с ИБС и ИМ: фактор некроза опухолей-б (TNF-б) и противовоспалительный интерлейкин-10 (IL-10).

Уровень TNF-б повышен в крови пациентов с острым коронарным синдромом по сравнению с больными со стабильной стенокардией и здоровыми лицами. Более того, риск коронарной смерти и развития ИМ имеет прямую корреляцию с уровнем этих показателей [19]. Установлено, что связывание TNF-б с соответствующими рецепторами приводит к активации факторов, кодирующих транскрипцию IL-6, IL1, факторов роста и индуцирующих апоптоз [8]. Несмотря на множество описанных возможных полиморфизмов гена TNF-б, лишь замена в позиции G-308A влияет на изменение транскрипции и продукции цитокина [13]. Учитывая множественность эффектов TNF-б, изучение полиморфизма G-308A гена TNF-б проводилось при многих заболеваниях: мутация G-308A гена TNFα (генотип AA) предрасполагает к развитию нефросклероза при пиелонефрите у детей, установлена зависимость между наличием аллеля A-308A и предрасположенностью к септическому шоку и смер-

ности от него [2, 8, 30].

Другой ген-кандидат в нашем исследовании — ген IL10, кодирующий интерлейкин, который относится к противовоспалительным цитокинам [21,27]. Считается, что повышение его уровня обеспечивает защитный эффект при развитии атеросклероза. Данный цитокин с условно противовоспалительной активностью тормозит экспрессию тканевого фактора, вызывая гипокоагуляцию, подавляет действие IL-1в, IL-6 и TNFб на эндотелиальные клетки и макрофаги. Известно, что у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ) уровень IL10 снижен по сравнению со средним уровнем [25]. В ряде исследований сообщалось об ассоциации между определенными генетическими вариантами гена IL10 и повышенным синтезом мРНК гена IL10, а также и собственно цитокина [16,17]. На основании этих данных был выбран полиморфный маркер (G-1082A) гена IL-10, который расположен в промоторе гена и, возможно, ассоциирован с уровнем синтеза интерлейкина [23].

**Целью** данной работы было изучение влияния полиморфизма генов TGF-б (G-308A) и IL-10 (G-1082A) при ИМ на экспрессию про- и противовоспалительных цитокинов.

### Материалы и методы

Обследовано 87 пациентов с установленным, согласно критериям Европейского общества кардиологов на основании клинических, электрокардиологических и энзимологических данных, диагнозом инфаркт миокарда. Из них 72 мужчины и 15 женщин, в возрасте от 34 до 78 лет (средний возраст: 56,6 ± 9,64 лет). Все пациенты находились на лечении в учреждении здравоохранения «Гродненский областной клинический кардиологический центр». При проведении анализа частотных характеристик генотипов у больных ИБС в качестве контроля выступали 12 практически здоровых доноров. Генотипирование промоторных участков цитокинов проводили на основании данных о нуклеотидной последовательности исследуемых генов из базы данных Gen Bank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)) с использованием регистрационных номеров IL-10 G-1082A (rs1800896), TNFб G-308A (rs1800629). Определение полиморфизмов генов IL-10 (G-1082A), TNFб (G-308A) осуществляли методом real-time PCR (ПЦР в режиме реального времени, анализатор Rotor-Gene 6000) с аллель-специфичными праймерами, синтезированными в НПФ «Литех», Россия. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов цельной крови. Исследование выполнялось на базе клинико-диагностической ла-

боратории учреждения здравоохранения «Гродненская областная клиническая больница».

Оценку соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга (ПХВ) проводили с использованием критерия  $\chi^2$  (Пирсона), применяя online тест программы [www.tufts.edu/~mcourt01/documents/court%20lab%20%20hw%20calculator.xls](http://www.tufts.edu/~mcourt01/documents/court%20lab%20%20hw%20calculator.xls), при  $p < 0,05$  равновесие выполняется. Оценку достоверности различий по частотам генотипов между исследованными выборками проводили по критерию  $\chi^2$  с помощью статистической программы Statistica 6.0 (при  $p < 0,05$  результаты считались достоверно значимыми).

### Результаты исследования

В ходе анализа выполненных молекулярно-генетических исследований установлено, что частота генетического полиморфизма IL10 (G-1082A) у 3 (25,0%) резидентов контрольной группы наблюдалось GG – состояние аллелей, расцененное как нормальная гомозигота, у 9 (75,0%) резидентов – GA, гетерозигота. Среди исследуемой группы 55 (65,22%) резидентов выявлено GG-состояние аллелей, у 32 (36,78%) – гетерозиготное состояние аллелей. У обследованных резидентов двух групп мутантного состояния аллелей AA выявлено не было. При определении полиморфизма TNF(G-308A) в контрольной группе состояние аллеля GG (нормальная гомозигота) наблюдалось у 11(91,67%), гетерозиготное состояние у 1 (8,33%) резидента. Среди больных ИМ 69 (79,31%) определен генотип GG, у 18 (20,69%)–гетерозиготное состояние аллелей. Мутантное состояние аллелей также не было обнаружено ни в одной из групп (таблица 1). Нами не выявлено различий между группой с исследуемой патологией по сравнению со здоровыми при анализе полиморфизма G-308A гена TNF-б, что соответствует данным исследования по оценке полиморфизма в данной позиции на развитие ИМ у европейцев и другой сердечно-сосудистой патологии [4, 11, 18].

Таблица 1. Частота генотипов по полиморфизмам TGF- $\alpha$  (G-308A) и IL-10 (G-1082A). Группа 1 (пациенты с установленным ИМ) и 2 (практически здоровые)

Полиморфизм	Генотипы	1 (пациенты с ИМ) n=87		2 (здоровые) N=12		Критерий Пирсона, $\chi^2$
		n	частота	n	частота	
TNF- $\alpha$ G-308A	G/G	69	79,31%	11	91,67%	0,59506
	G/A	18	20,69%	1	8,33%	
	A/A	0	0,00	0	0,00%	
равновесие Харди–Вайнберга, P-значение		0,2818		0,8803		
IL-10 G-1082A	G/G	55	65,22%	3	25,00%	0,04183*
	G/A	32	36,78%	9	75,00%	
	A/A	0	0,00%	0	0,00%	
равновесие Харди–Вайнберга, P-значение		0,0356*		0,0377*		

Примечание: \* отмечено статистически достоверное различие,  $p < 0,05$

Как видно из представленных данных, у больных ИМ наблюдалось накопление генотипа GG локуса IL10 (G-1082A),  $\chi^2 = 19,3$ ;  $p < 0,04$ . В то же время встречаемость генотипа GA рассматриваемого локуса в группе больных ИМ была более чем в 2 раза ниже в сравнении с группой практически здоровых резидентов.

В целях поиска конкретных механизмов реализации генетической предрасположенности или устойчивости индивидуума к развитию атеросклеротического процесса в коронарных сосудах и возникновению острых состояний у пациентов с ИБС проведен анализ уровня воспа-

лительных и противовоспалительных цитокинов в ассоциации с фенотипическими маркерами предрасположенности к инициации ИБС.

Так, TNF-б является ключевым медиатором формирования и прогрессирования атеросклероза сосудов и одним из главных факторов ИБС, а повышение его продукции рассматривают как одну из важных причин дестабилизации ИБС [5]. Концентрация в плазме TNF-б ассоциирована со степенью развития раннего атеросклероза и коррелирует с метаболическими изменениями, считающимися важными для васкулярных процессов. Повышение продукции TNF-б – раннее и центральное событие в атерогенезе [22]. В независимых проведенных исследованиях анализа SNP-полиморфизма в позициях-308 выявлена корреляция с уровнем транскрипционной активности промоторного гена TNF-б, а, следовательно, с уровнем продукции цитокина [15]. Однако определение генетических маркеров может отражать подверженность предполагаемому фактору риска в течение всей жизни пациента лучше, чем определение его концентрации в плазме, результаты которого могут изменяться со временем. Сопоставление показателей в зависимости от генотипа TNF(G-308A) представлено на рис. 1.

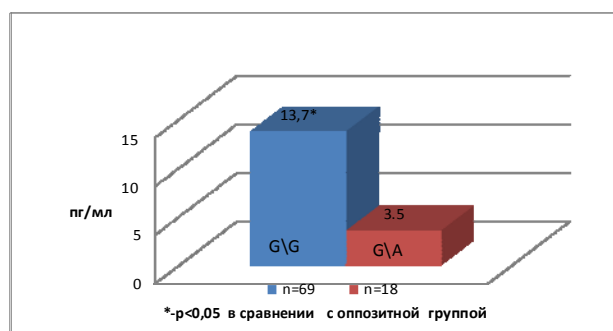


Рис. 1. Уровень фактора некроза опухолей-б в зависимости от генотипа TNF-б (G-308A)

Как видно, увеличение исходных значений цитокина в группе больных с фенотипом G/G по сравнению с группой G/A -позитивных индивидуумов достоверно ( $p < 0,0009$ ): 13,7 (7,8; 20,0) пг/мл и 3,5 (6,0; 8,2), соответственно.

Эти данные подтверждает и то, что Шевченко с соавторами выявили снижение риска развития ИБС и ИМ у носителей гетерозиготного варианта в позиции-308 гена TNF-б по сравнению с таковыми у здоровых лиц. Вероятно, именно наличие мутантного и дикого аллелей в генотипе является фактором физиологической стабильности экспрессии гена [1].

IL-10 секретируется активированными макрофагами и Т-хелперами второго типа. Он выполняет множество противовоспалительных функций. Множество исследований показало, что изменение уровня IL-10 не только смягчает развитие атеросклероза, но и снижает повреждение тканей. Производство IL-10 в организме человека генетически детерминировано [9, 12, 17]. Результаты показателей IL-10 генотипа G/A и G/G представлены на рис. 2.

Как видно, при сопоставлении показателей IL-10 у резидентов с генотипом G/A определялась увеличенная продукция цитокина: при наличии нормального гомозиготного генотипа G/G уровень IL-10 составил 4,7 (3,0; 10,0) пг/мл, против 9,6 (4,0; 16,6) пг/мл, ( $p < 0,02$ ) у пациентов с гетерозиготным носительством G/A аллелей. Полимор-

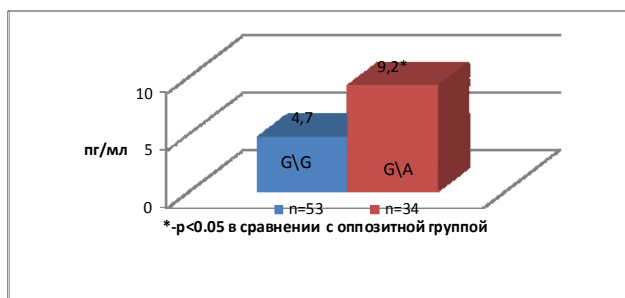


Рис. 2. Уровень интерлейкина-10 в зависимости от генотипа IL-10 (G-1082A)

фный маркер (G-1082A) гена IL-10, видимо, ассоциирован с регуляцией экспрессии гена IL-10, так как нуклеотид в положении-1082 входит в состав участка связывания фактора PU.1 – репрессора транскрипции гена IL-10, приводит к более или менее выраженной воспалительной реакции, которая влияет на течение ИБС [12, 24].

Полученные нами результаты перекликаются с работой L. Rees et al. в том, что аллель А дает в два раза увеличение транскрипционной активности IL-10 по сравнению с аллелем G, а повышение уровня IL10, связанного с улучшением прогноза у больных с ИМ, обладает протекторным свойством: генотип GA локуса IL-10(G-1082A) [12, 25, 28].

#### Выводы

1. Не показано ассоциации полиморфизма G-308A гена TNF-б с развитием ИМ в выборке населения Гродненской области. Установлено, что генотип G/G полиморфного маркера G(-308)A гена TNF-б связан с более высокой продукцией фактора некроза опухоли по сравнению с генотипом G/A.

2. Установленные различия в распределении генотипов между больными и контрольной группой полиморфного варианта G-1083A гена IL-10 (преобладание генотипа GG) свидетельствуют о вкладе данного полиморфизма в развитие ИМ у населения Гродненской области, при этом носительство данного генотипа сопровождается меньшей продукцией данного цитокина, а генотип GA локуса IL-10 (G-1082A) обладает протекторным свойством.

#### Список использованной литературы

1. Аллельный полиморфизм генов про- и противовоспалительных цитокинов при инфаркте миокарда в европеоидной популяции мужчин / В.И. Коненков [и др.] // Бюллетень СО РАМН. - 2006. - №2(120). - С. 56-62.
2. Анализ полиморфизма трех позиций промоторного региона гена TNF-б у пациентов с ишемической болезнью сердца, нестабильной стенокардией и инфарктом миокарда / А.В. Шевченко [и др.] // Кардиология. - 2010. - №2. - С. 9-14.
3. Ассоциация полиморфных маркеров генов иммунной системы с количественными признаками патогенетически значимыми для хронического вирусного гепатита / И.А. Гончарова [и др.] // Молекулярная биология. - 2008. - №2. - С. 242-246.
4. Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian risk of population / F. Poll [et al.] // Eur. J. Immunogen. - 2002. - Vol. 29. - P. 237-240.
5. Altman, R. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the mitting point / R. Altman // Thrombosis J. - 2003. - Vol. 1. - P. 4-14.
6. Arnett, D.K. Relevance of genetics and genomics for

prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart association Council on epidemiology and prevention, the Stroke Council, and Functional genomics and Translational biology interdisciplinary working group / D.K. Arnett, A.E Baird, R.A. Barkley // Circulation. - 2007. - Vol. 115. - P. 2878-2901.

7. Association of gene polymorphisms with myocardial infarction in individuals with or without conventional coronary studies/ K. Nishihama [et al.] // Ann Hum Genet. - 2006. - Vol. 70. - P. 145-169.

8. Association of TNF-a Promoter Polymorphism, With Septic Shock Susceptibility and Mortality / J.P. Mira [et al.] // J. Am. Med. Assoc. - 1999. - Vol. 282. - P. 561-568.

9. Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus mediated gene transfer of interleukin 10 in LDLr/ mice. / J.H. Von Der Thusen [et al.] // FASEB J. - 2001. - Vol. 15. - P. 2730-2732.

10. Candidate gene genotypes, along with conventional risk factor assessment? Improve estimation of coronary heart disease risk in healthy UK men / S.E. Humphries [et al.] // Clin Chem. - 2007. - Vol. 53. - P. 8-16.

11. Das, U.N. Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction / U.N. Das // Mol. Cell Biochem. - 2000. - Vol. 215. - P. 145-152.

12. Differential regulation of IL-10 production by genetic and environmental factors—a twin study/ E. Reuss [et al.] // Genes Immun. - 2002. - Vol. 3. - P. 407-413.

13. Excessive fat accumulation is associated with the TNFa -308G/A promoter polymorphism in women but not in men / J. Hoffstedt [et al.] // Diabetologia. - 2000. - Vol. 43. - P. 117-120.

14. Gene polymorphism in the TNF locus and the Myocardial infarction / J.C. Padovani [et al.] // Thrombosis Research. - 2000. - Vol. 100. - P. 263-269.

15. Hollegaard, M.V. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Sup, 3 / M.V. Hollegaard, J.L. Bigwell // Gen immune. - 2006. - Vol. 7. - P. 269-276.

16. IL10 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo and ex vivo response to endotoxin / E.F. Schippers [et al.] // Cytokine. - 2005. - Vol. 29. - P. 215-228.

17. Interindividual variations in constitutive IL10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms / A. Suarez [et al.] // Transplantation. - 2003. - Vol. 75. - P. 711-717.

18. Interleukine-10 and tumor necrosis factor gene polymorphism and risk of coronary artery disease and myocardial infarction / P.M. Koch [et al.] // Atherosclerosis. - 2001. - Vol. 98. - P. 435-437.

19. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in carotid atherosclerosis / B.B. Worrall [et al.] // Stroke. - 2003. - Vol. 34, № 3. - P. 790-793.

20. Investigating the genetic determinants of cardiovascular disease using candidate genes and meta-analysis of association risk factors / J.P. Casas [et al.] // Intern J Molec Med. - 2007. - Vol. 19. - P. 129-41.

21. Li, J. Enhancing antiinflammatory cytokine IL10 may be beneficial for acute coronary syndrome / J. Li, Y. Guo // Med. Hypoth. - 2005. - Vol. 65. - P. 103-106.

22. Plasma tumor necrosis factor and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men / T. Skoog [et al.] // Eur. Heart J. - 2002. - Vol. 23. - P. 376-383.

23. Polymorphism in the IL10 promoter region and early markers of atherosclerosis: The cardiovascular risk in young finns study / M. Heiskanen [et al.] // Atherosclerosis. - 2010. - Vol. 208. - P. 190-196.

24. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute

coronary syndrome / A. Malarstig [et al.] // Heart. - 2008. - Vol. 94. - P. 724-729.

25. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes / C. Heeschen [et al.] // Circulation. - 2003. - Vol. 107. - P. 2109-2114.

26. Serum levels of the antiinflammatory cytokine IL-10 are decreased in patients with unstable angina / D.A. Smith [et al.] // Circulation. - 2001. - Vol. 104. - P. 746-749.

27. Tedgui, A. Antiinflammatory mechanisms in the vascular wall / A. Tedgui, Z. Mallat // Circ. Res. - 2001. - Vol. 88. - P. 877-887.

28. The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance / L. Rees [et al.] // Cellular And Molecular Life Science. - 2002. - Vol. 59. - P. 560-569.

29. The TNF $\alpha$  gene g(-308)a polymorphism as a marker for myocardial infarction in type 2 diabetes mellitus / H. Reschner [et al.] // BJMG. - 2008. - №2. - P.11-16.

30. Tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in fanner's lung patients / B.M. Schaaf [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2001. - Vol. 163. - P. 379-382.

## THE INFLUENCE OF TNF- $\beta$ ( G-308A) AND IL-10(G-1082A) POLYMORPHISM IN MYOCARDIAL INFARCTION ON CYTOKINES EXPRESSION

V.S.Holyshko<sup>1</sup>, V.A. Snezhytskij<sup>1</sup>, M.V. Ershova<sup>2</sup>,  
O.E. Kuznetsov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Educational Establishment «Grodno State Medical University»

<sup>2</sup>- Public Health Establishment «Grodno Regional Clinical Hospital»

*Numerous investigations are devoted to genetic factors predisposing to unfavorable course of myocardial infarction. One of the main directions in this field is to investigate the polymorphism of pro- and anti-inflammatory cytokines. The present article analyzes the results of investigations devoted to association of TNF- $\beta$ ( G-308A) and IL-10(G-1082A) polymorphism with myocardial infarction and the effects of these polymorphisms on cytokines expression.*

*Key words: myocardial infarction, DNA polymorphism, cytokines.*

Поступила 25.09.2012