

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МИОКАРДИАЛЬНОГО ФИБРОЗА: ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ИСХОДОВ У БОЛЬНЫХ АОРТАЛЬНЫМ СТЕНОЗОМ

Типтева Т.А.¹, Чумакова О.С.^{1,2}, Бровкин А.Н.³, Никитин А.Г.³, Резниченко Н.Е.², Затеищikov Д.А.^{1,3,4}

Цель. Изучить влияние генетических маркеров воспаления и фиброза на выживаемость больных с неоперированным аортальным стенозом (АС). Поиск новых прогностически неблагоприятных факторов у больных кальцинированным АС без оперативного лечения остается актуальной задачей.

Материал и методы. В течение 2,1±0,11 года наблюдали 191 больного (28,6% мужчин, 78,0±0,60 лет) с "естественным течением" АС (площадь аортального клапана (АК) ≤2,0 см²). Фиксировали все фатальные исходы (ФИ). В дальнейшем проводилось сравнение клинических, биохимических и эхокардиографических параметров, частот генотипов и аллелей однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) G(-238)A и G(-308)A гена *TNF*, C(-592)A гена *IL-10*, Arg25Pro гена *TGFβ1* в группах больных с ФИ и без. Оценивалось время дожития до ФИ.

Результаты. ФИ были зарегистрированы у 71 (37,2%) больного. Причинами смерти стали: инфаркт миокарда у 5, инсульт у 8, внезапная смерть у 10, хроническая сердечная недостаточность (ХСН) у 29, тромбоэмболия у 5, некардиальная причина у 14 больных. Независимыми факторами, ассоциированными с развитием ФИ стали: наличие ХСН III-IV по NYHA, уровень креатинина, площадь АК, индекс массы миокарда левого желудочка (ЛЖ) и носительство аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1* (p<0,05). Ассоциации ОНП G(-238)A и G(-308)A гена *TNF*, а также ОНП C(-592)A гена *IL-10* с ФИ установлено не было. Среднее время дожития до ФИ у носителей аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1* составило 468,6±99,62 дней против 617,6±77,19 дней у неносителей (p<0,05).

Заключение. Носительство аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1* можно рассматривать как еще один предиктор фатального исхода у больных с неоперированным АС. Очевидно, фиброз миокарда ЛЖ, развивающийся у больных с АС, может быть фактором, существенно влияющим на прогноз заболевания.

Российский кардиологический журнал 2018, 2 (154): 32–38

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-2-32-38>

Ключевые слова: аортальный стеноз, прогноз, IL-10, TGFβ1, TNF, фиброз.

¹ФГБУ ДПО Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации, Москва; ²ГБУЗ Городская клиническая больница № 17 Департамента Здравоохранения г. Москвы, Москва; ³ФГБУ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, Москва; ⁴ГБУЗ Городская клиническая больница № 51 Департамента Здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия.

Типтева Т.А.* — аспирант кафедры терапии, кардиологии и функциональной диагностики с курсом нефрологии, Чумакова О.С. — к.м.н., доцент кафедры терапии, кардиологии и функциональной диагностики с курсом нефрологии, врач-кардиолог, Бровкин А.Н. — к.б.н., с.н.с. лаборатории генетики, Никитин А.Г. — к.б.н., зав. лабораторией, Резниченко Н.Е. — к.м.н., зав. лабораторией, Затеищikov Д.А. — д.м.н., профессор, руководитель первичного сосудистого отделения, зав. кафедрой терапии, кардиологии и функциональной диагностики с курсом нефрологии, в.н.с. лаборатории генетики.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
tptteva@yandex.ru

АК — аортальный клапан, АС — аортальный стеноз, ВСС — внезапная сердечная смерть, ИМ — инфаркт миокарда, КСО — конечно-систолический объем, ЛЖ — левый желудочек, ММ — масса миокарда, ОНП — однонуклеотидный полиморфизм, ТЭ — тромбоэмболия, ФВ — фракция выброса, ФИ — фатальные исходы, ФК NYHA — функциональный класс по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца, ХПН — хроническая почечная недостаточность, ХСН — хроническая сердечная недостаточность, ЭхоКГ — эхокардиографическое исследование.

Рукопись получена 01.06.2017

Рецензия получена 06.07.2017

Принята к публикации 20.07.2017

GENETIC MARKERS OF MYOCARDIAL FIBROSIS: OPPORTUNITY TO PREDICT ADVERSE OUTCOMES IN AORTIC STENOSIS

Tipteva T. A.¹, Chumakova O. S.^{1,2}, Brovkin A. N.³, Nikitin A. G.³, Reznichenko N. E.², Zateyshchikov D. A.^{1,3,4}

Aim. To evaluate the influence of genetic markers of inflammation and fibrosis on survival rate of patients with non operated aortic stenosis (AS). The search for novel prognostically adverse factors in calcinated AS patients with none surgical treatment remains actual.

Material and methods. During 2,1±0,11 years, 191 patient has been followed up (28,6% males, 78,0±0,60 y.o.) with a "natural course" of AS (aortic valve area ≤2,0 cm²). All fatal outcomes (FO) were collected. Then the clinical, biochemical and echocardiographic parameters were compared, genotypes frequencies and alleles of mononucleotide polymorphisms (MNP) G(-238)A and G(-308)A gene *TNF*, C(-592)A gene *IL-10*, Arg25Pro gene *TGFβ1* in groups with FO and with none. Life duration towards FO was evaluated.

Results. Fatal outcomes were registered in 71 (37,2%) of patients. Death causes were: myocardial infarction in 5, stroke in 8, sudden death in 10, chronic heart failure (CHF) in 29, thromboembolism in 5, non-cardiac cause in 14. Independent factors associated with FO were: presence of CHF III-IV FC NYHA, creatinine level, aortic valve area, myocardial mass index of the left ventricle and carriage of allele Pro MNP Arg25Pro gene *TGFβ1* (p<0,05). Associations of MNP G(-238)A and G(-308)A gene *TNF*, as MNP C(-592)A gene *IL-10* with FO were not found. Mean life duration before

death in Pro MNP Arg25Pro gene *TGFβ1* carriers was 468,6±99,62 days versus 617,6±77,19 days in non-carriers (p<0,05).

Conclusion. The carriage of allele Pro MNP Arg25Pro gene *TGFβ1* can be regarded as one more predictor of fatal outcome in patients with non-operated AS. It is clear that LV myocardial fibrosis, developing in AS patients, might be a factor significantly influencing prognosis.

Russ J Cardiol 2018, 2 (154): 32–38

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-2-32-38>

Key words: aortic stenosis, prognosis, IL-10, TGFβ1, TNF, fibrosis.

¹Central State Medical Academy of the President Office, Moscow; ²City Clinical Hospital № 17 of Moscow Department of Health, Moscow; ³Federal Scientific-Research Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow; ⁴City Clinical Hospital №51 of Moscow Department of Health, Moscow, Russia.

Поиск новых факторов, способных предсказывать более быстрое прогрессирование и, соответственно, неблагоприятное течение аортального стеноза (АС) еще на ранних стадиях заболевания остается актуальной задачей. Клинические и инструментальные критерии неблагоприятного прогноза больных АС (обмороки, стенокардия, одышка, снижение фракции выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ)), вошедшие в рекомендации по ведению больных с клапанными пороками сердца Европейского кардиологического общества и Европейской ассоциации кардиоторакальных хирургов 2012г, отражают достаточно поздние и зачастую необратимые изменения миокарда.

Одним из современных путей решения данной задачи является изучение генетических вариантов, ассоциированных с патогенетическими механизмами АС (кальцификацией, фиброзом, ремоделированием межклеточного матрикса и воспалением) как в самом аортальном клапане (АК), так и в миокарде ЛЖ [1].

Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (transforming growth factor beta1, $TGF\beta 1$) является многофункциональным цитокином, активирующим процессы кальцификации и фиброза как в АК [2], так и миокарде ЛЖ при АС [3]. Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) — провоспалительный цитокин, обнаруживаемый как в АК, так и в крови больных с АС [4]. Интерлейкин 10 (interleukin-10, IL-10) — противовоспалительный цитокин, с неуточненной ролью в процессе развития порока АК, но с установленной связью однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) гена *IL-10* с наличием умеренно-тяжелого АС [5-7].

Целью работы стало изучение ассоциации вариантов генов *TGF\beta 1*, *TNF* и *IL-10* со смертностью больных с неоперированным АС в проспективном исследовании.

Материал и методы

В исследование был включено 196 больных с установленным по эхокардиографическим (ЭхоКГ) параметрам диагнозом АС (площадь АК $\leq 2,0$ см²), находящихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении ГБУЗ “Городская клиническая больница № 17 ДЗМ” и лечившихся консервативно. Все больные дали свое согласие на участие в исследовании. В исследование не включались больные с двухстворчатый АК, другой значимой клапанной патологией, с подозрением на ревматический генез порока, а также при невозможности контакта с больным после выписки. Исследование было одобрено местным этическим комитетом.

При включении больного в исследование фиксировались результаты общего осмотра, анамнеза, сведения о проводимой терапии, течении заболевания. Производилось взятие крови для определения биохимических параметров и генетического анализа.

При проспективном наблюдении проводились телефонные контакты с больными и их родственниками, либо отправлялся запрос в поликлинику по месту жительства, что позволило зарегистрировать все фатальные исходы (ФИ). Причина смерти устанавливалась на основании патологоанатомического заключения (при наличии) или справки о смерти. Для анализа ФИ были разделены на группы: смерть от инфаркта миокарда (ИМ), инсульта, внезапная сердечная смерть (ВСС), смерть в результате хронической сердечной недостаточности (ХСН), тромбоэмболий (ТЭ) и смерть от любой другой некардиальной причины. Также оценивалось время дожития больных до ФИ. В случае проведения больному хирургической коррекции порока он считался “потерянным” для наблюдения с даты оперативного вмешательства.

Трансторакальная ЭхоКГ. Исследование проводилось на ультразвуковом аппарате Vivid i фирмы General Electric с мультислотным фазированным датчиком 3S-RS (1,7-4,0 МГц). Применялся стандартный протокол исследования, рекомендованный Американской Ассоциацией эхокардиографии 2015г. Площадь АК высчитывалась с использованием уравнения непрерывности, согласно объединенным европейским и американским рекомендациям 2009г: ударный объем/интеграл пиковой скорости потока на АК. Площадь АК 1,5-2,0 см² соответствовала начальной степени, 1,0-1,5 см² — умеренной, а <1,0 см² — тяжелой степени АС.

Генетическое исследование. Венозная кровь собиралась в пробирки типа вакутейнеры с ЭДТА, которые сразу замораживались при температуре ниже -20⁰С. Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Идентификацию полиморфных маркеров проводили с помощью PCR-RFLP в реальном времени на термоциклере и на амплификаторе РНС-2 (“Techne”, Великобритания) с последующей рестрикцией специфическими эндонуклеазами и электрофоретическим разделением фрагментов ДНК в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) и 2% агарозном геле, которые окрашивали бромистым этидием. Термостабильную ДНК-полимеразу Taq получили от НПО “Биотех” (Москва), рестриктазы получали от НПО “Сибэнзим” (Новосибирск). Олигонуклеотидные праймеры синтезированы в НПО “Синтол” (Москва).

Были определены ОНП G(-238)A и G(-308)A гена *TNF*, C(-592)A гена *IL-10*, Arg25Pro гена *TGF\beta 1* у больных с АС, распределение частот генотипов изучаемых ОНП соответствовало уравнению Харди-Вайнберга (табл. 1). Проводилось сравнение распределения частот генотипов и аллелей между двумя группами выживших и умерших за время наблюдения больных с АС.

Трансформирующий фактор роста $\beta 1$. Измерение уровня $TGF\beta 1$ производилось с использованием

Таблица 1

Последовательности праймеров и зондов, использованных для определения однонуклеотидных полиморфизмов и соответствие уравнению Харди-Вайнберга распределения частот генотипов

Гены-кандидаты	Однонуклеотидные полиморфизмы	Последовательности праймеров и зондов	Соответствие уравнению Харди-Вайнберга
TNF	G(-238)A	FJL – CCTACACACAATCAGTCA R/L – CAAGCATCAAGGATACCC FAM- CTGCTCCGATTCGG -BHQ-1 VIC – CTGCTCTGATTCGG -BHQ-2	0,43
	G(-308)A	FJL – CTGTCTGGAAGTTAGAAGG R/L – GACTGATTTGTGTAGGA FAM – CCGTCCCATGCC -BHQ-1 VIC – CCGTCCATGCC -BHQ-2	0,44
IL-10	C(-592)A	FJ – GGCTAAATATCCTCAAAGTTC RJ – TGCCTGAGAATCCTAATG FAM – CCTACAGGACAGGCG -BHQ-1 VIC – CCTACAGTACAGGCG -BHQ-2	0,83
TGFβ1	915G>C или Arg25Pro	FJ – GCTCCATGTCGATAGTCTTG RJ – CTGCTGCTGCTGCTAC RJ2 – GCTGCTGTGGCTACTG FAM – CCTGGCCGGCCGG -BHQ-1 VIC – CCTGGCCGGCCGG -BHQ-2	0,76

иммуноферментного набора для количественного определения человеческого TGFβ1 в сыворотке крови (Bender MedSystems, Австрия). Для анализа была использована сыворотка крови, отделенная от сгустка эритроцитов сразу после свёртывания крови, алиquotированная и замороженная при температуре -20⁰ С. Нормальное значение от 4639 до 14757 пг/мл.

Креатинин. Измерение уровня креатинина проводилось кинетическим методом с использованием коммерческих наборов “Biosystems” (Испания) на биохимическом анализаторе “ILAB 650” (США).

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ). СКФ рассчитывалась по формуле Кокрофта-Голта (мл/мин): СКФ* = 88 × (140-возраст, годы) × масса тела, кг/72 × креатинин сыворотки, мкмоль/л.

* — для женщин результат умножали на 0,85.

Определение уровня **глюкозы, общего холестерина, липопротеинов высокой плотности (ЛВП), липопротеинов низкой плотности (ЛНП), триглицеридов** сыворотки крови также проводили с помощью коммерческих наборов “Biosystems” (Испания) на биохимическом анализаторе “ILAB 650” (США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартного статистического пакета программ IBM SPSS Statistics v.22. Для непрерывных показателей проводился анализ распределения и критериев его соответствия нормальному при помощи теста Колмогорова-Смирнова. Для описания признаков с нормальным распределением использовали среднее с указанием стандартного отклонения (M±SD), для признаков с отличным от нормального распределения указывали медиану и межквартирный интервал — 25-й и 75-й процентиль (Me(Q1-Q3)). Дискретные величины сравнивали с применением

критерия χ^2 Пирсона. Сравнение количественных признаков, подчиняющихся нормальному распределению, проводили с использованием т-критерия Стьюдента, не подчиняющихся нормальному распределению с использованием непараметрического теста Mann-Whitney и Kruskal-Wallis для несвязанных групп. Обработка данных по генотипированию проводилась с использованием унифицированной программы “Ген Эксперт”: рассчитывали распределение частот генотипов (тест Харди-Вайнберга), генетический риск развития заболевания с использованием мультипликативной, общей, доминантной и рецессивной моделей наследования. Анализ выживаемости и влияющих на нее факторов проводилась методом Kaplan-Meyer с использованием статистического критерия Log Rank и при помощи регрессии Кокса. В регрессионный однофакторный анализ Кокса были включены параметры, различавшиеся при простом сравнительном анализе между группами больных с благоприятным исходом и с ФИ. Анализ ассоциации генотипов ОНП с инструментальными и лабораторными параметрами проводили при помощи логистической регрессии. Для всех видов анализа статистически значимыми считали значения p<0,05.

Результаты

Из 196 больных с АС, включенных в исследование, 5 были потеряны для наблюдения по различным причинам (отказ от дальнейших контактов (1), смена контактных данных (4)). У 9 больных срок наблюдения оказался меньше, чем в основной группе, из-за хирургического лечения порока.

В результате, прогноз был известен для 191 больного с АС (28,6% мужчин, 78,0±0,6 лет). За период

Таблица 2

Сравнительная характеристика клинических, лабораторных и инструментальных показателей выживших и умерших за время наблюдения больных с АС

Параметр	Все (n=191)	Благоприятный исход (n=120)	Фатальные исходы (n=71)	p
Анамнез				
Возраст, лет (M±SD)	78,0±0,60	76,8±0,77	79,1±0,86	нд
Пол мужской, n (%)	52 (28,6%)	34 (28,3%)	22 (31,0%)	нд
АГ, n (%)	175 (96,2%)	116 (96,7%)	68 (95,8%)	нд
Стенокардия, n (%)	144 (79,1%)	85 (70,8%)	63 (88,7%)	0,016
Обмороки, n (%)	28 (15,4%)	18 (15,0%)	12 (16,9%)	нд
ХСН III-IV ФК, n (%)	60 (33,0%)	27 (22,5%)	38 (53,5%)	<0,0001
Инсульт, n (%)	31 (17,0%)	16 (13,3%)	14 (19,7%)	нд
ИМ, n (%)	89 (48,9%)	51 (42,9%)	43 (60,6%)	0,024
СД, n (%)	44 (24,2%)	28 (23,3%)	18 (25,4%)	нд
Атеросклероз периферических артерий, n (%)	44 (24,2%)	27 (22,5%)	15 (21,1%)	нд
Курение, n (%)	30 (16,5%)	23 (19,2%)	10 (14,1%)	нд
МА, n (%)	82 (45,1%)	45 (37,5%)	36 (50,7%)	нд
ИМТ, кг/м ² (M±SD)	30,4±0,41	30,6±0,52	30,0±0,69	нд
Лабораторные характеристики				
Креатинин, мкмоль/л (M±SD)	116,7±3,54	109,2±2,69	129,8±8,16	0,001
СКФ, мл/мин (M±SD)	49,0±1,28	52,7±1,64	44,2±1,96	0,002
ХС, ммоль/л (M±SD)	5,2±0,10	5,3±0,12	5,1±0,15	нд
ТГ, ммоль/л (M±SD)	1,7±0,08	1,8±0,12	1,6±0,10	нд
ЛНП, ммоль/л (M±SD)	2,6±0,07	2,7±0,10	2,5±0,10	нд
ЛВП, ммоль/л (M±SD)	1,4±0,04	1,4±0,06	1,3±0,07	нд
TGFβ1, пг/мл (M±SD)	20834,2±998,00	21592,6±1278,52	20732,2±1543,17	нд
Эхокардиографические параметры				
Площадь АК, см ² (M±SD)	1,0±0,03	1,1±0,04	0,9±0,06	0,002
Ср. градиент АК, мм рт.ст. (M±SD)	27,1±1,34	24,3±1,53	33,0±2,34	0,001
Индекс систолического объема ЛП (M±SD)	41,4±1,02	39,3±1,19	43,9±1,73	0,05
ФВ ЛЖ, %	62,3±0,96	63,7±1,10	59,6±1,71	0,046
ТМЖП, мм (M±SD)	12,6±0,20	12,3±0,24	13,1±0,35	0,034
Индекс ММ ЛЖ, г/м ² (M±SD)	119,6±2,80	113,3±3,22	130,4±4,65	0,001
Нарушения лок. сократимости, n (%)	28 (14,7%)	11 (9,2%)	18 (25,4%)	0,001
E/e' (M±SD)	13,4±0,48	13,1±0,50	15,1±1,02	нд
Аллели и генотипы				
TNFG(-238)A , (n=166) GG/GA/AA, n (%)	147 (88,6%)/19 (11,4%)/0	88 (86,3%)/14 (13,7%)	59 (92,2%)/5 (7,8%)	нд
TNFG(-308)A , (n=171) GG/GA/AA, n (%)	152 (88,9%)/19 (11,1%)/0	92 (86,0%)/15 (14,0%)	60 (93,8%)/4 (6,3%)	нд
IL-10 C(-592)A , (n=161) AA/CC+CA, n (%)	5 (3,1%)/107 (66,5%)+49 (30,4%)	2 (2,0%)/96 (98,0%)	3 (4,7%)/61 (95,3%)	нд
TGFβ1Arg25Pro , (n=171) ArgPro+ProPro/ArgArg, n (%)	28 (16,4%)+1(0,6%)/142 (83,0%)	13 (12,1%)/94 (87,9%)	16 (25,0%)/48 (75,0%)	0,030

Сокращения: АГ — артериальная гипертензия, ХСН — хроническая сердечная недостаточность, ИМ — инфаркт миокарда, СД — сахарный диабет, МА — мерцательная аритмия, ИМТ — индекс массы тела, СКФ — скорость клубочковой фильтрации, рассчитанная по формуле Кокрофта-Голта, ЛНП — липопротеины низкой плотности, ЛВП — липопротеины высокой плотности, АК — аортальный клапан, ЛП — левое предсердие, ФВ ЛЖ — фракция выброса, ТМЖП — толщина межжелудочковой перегородки, ММ ЛЖ — масса миокарда ЛЖ, E/e' — отношение пика E трансмитрального кровотока к пику e скорости движения фиброзного кольца митрального клапана.

наблюдения (в среднем 2,1±0,11 года) умер 71 (37,2%) больной. Распределение по причинам смерти было следующим: ИМ (5), инсульт (8), ВСС (10), ХСН (29), ТЭ (5). 14 больных умерли от некардиальных причин: 7 — прогрессирующие сопутствующие заболевания с развитием полиорганной недостаточности, 3 —

онкология, 1 — черепно-мозговая травма, 1 — расщепление аневризмы аорты, 2 — желудочно-кишечное кровотечение.

Сравнительная характеристика выживших и умерших за время наблюдения больных с АС представлена в таблице 2.

Таблица 3

Влияние клинических, инструментальных и лабораторных параметров на смертность больных с АС (n=171) (регрессионная модель Кокса)

Параметр	Однофакторный анализ ОР (95% ДИ)	p	Многофакторный анализ ОР (95% ДИ)	p
Анамнез				
Стенокардия	2,261 [1,080-4,733]	0,030	1,542 [0,661-3,598]	нд
ХСН III-IV ФК	2,730 [1,711-4,359]	<0,0001	1,872 [1,106-3,168]	0,020
Инфаркт в анамнезе	1,896 [1,175-3,059]	0,009	1,421 [0,812-2,489]	нд
Лабораторные характеристики				
Креатинин, мкмоль/л	1,009 [1,006-1,013]	<0,0001	1,011 [1,006-1,014]	<0,0001
ЭхоКГ параметры				
Площадь АК, см ²	3,777 [2,248-6,346]	<0,0001	2,476 [1,343-4,565]	0,004
Индекс систолич. объема ЛП	1,020 [1,004-1,036]	0,015	1,000 [0,979-1,022]	нд
Индекс ММ ЛЖ, г/м ²	1,011 [1,005-1,017]	<0,0001	1,011 [1,002-1,019]	0,013
ФВ ЛЖ, %	0,523 [0,321-0,853]	0,009	1,228 [0,670-2,251]	нд
Аллели и генотипы				
TGFβ1Arg25ProArgPro+ProPro	2,350 [1,321-4,180]	0,004	2,333 [1,274-4,271]	0,006

Сокращения: ХСН — хроническая сердечная недостаточность, АК — аортальный клапан, ЛП — левое предсердие, ФВ ЛЖ — фракция выброса ЛЖ, ММ ЛЖ — масса миокарда ЛЖ.

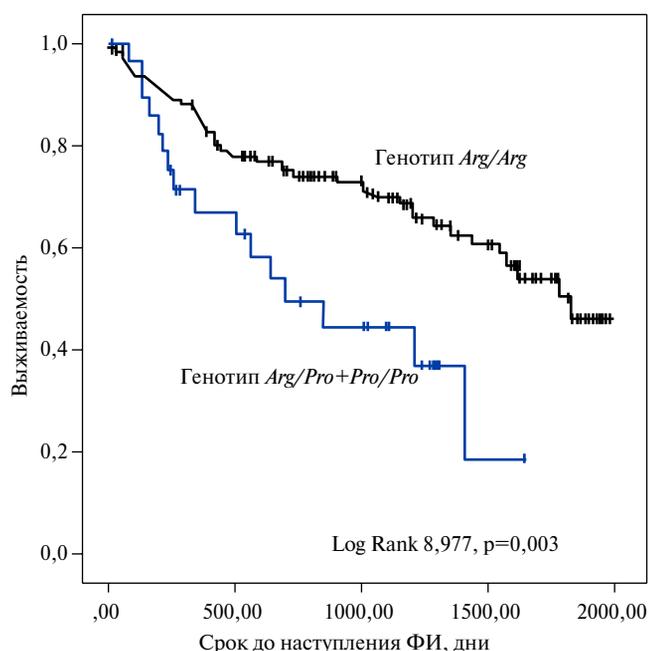


Рис. 1. Выживаемость больных АС (график Каплан-Мейра) в зависимости носительства аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1*.

При проведении многофакторного регрессионного анализа независимыми факторами, ассоциированными с развитием ФИ у неоперированных больных с АС стали: наличие ХСН III-IV ФК NYHA (p=0,020), уровень креатинина (p<0,0001), площадь АК (p=0,004), индекс ММ ЛЖ (p=0,013), а также носительство аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1* (p=0,006) (табл. 3). Среднее время дожития до ФИ у носителей аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1*

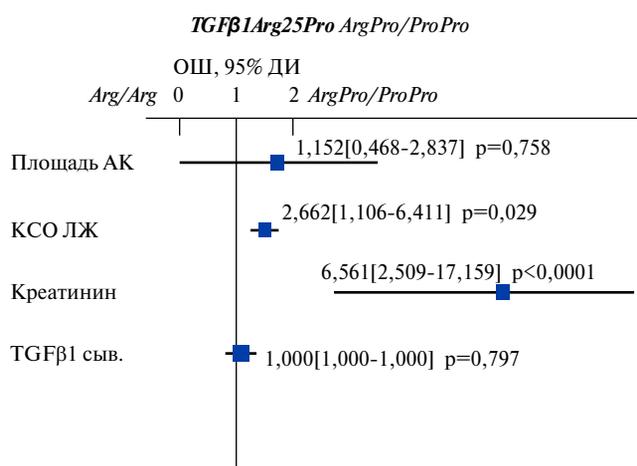


Рис. 2. Ассоциация генотипа ArgPro/ProPro ОНП *TGFβ1Arg25Pro* с инструментальными и лабораторными показателями у больных с АС (логистическая регрессия).

Сокращения: АК — аортальный клапан, АС — аортальный стеноз, КСО ЛЖ — конечно-систолический объем левого желудочка.

составило $468,6 \pm 99,62$ дней против $617,6 \pm 77,19$ дней у неносителей (p=0,003). Выживаемость в группе АС в зависимости от наличия аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1* (p=0,003) представлена на рисунке 1.

Носительство аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGFβ1* ассоциировалось с большим конечно-систолическим объемом (КСО) ЛЖ (p=0,029) и более высоким уровнем креатинина (p<0,0001), в то время как ассоциации с площадью АК и уровнем цитокина в сыворотке крови выявлено не было (рис. 2).

Ассоциации с прогнозом других ОНП: G(-238)A и G(-308)A гена *TNF*, C(-592)A гена *IL-10* не было обнаружено.

Обсуждение

Полученная в результате проведенного исследования взаимосвязь между клиническими проявлениями ХСН III-IV ФК NYHA, уровнем креатинина, площадью АК, индексом массы миокарда и ФИ согласуется с известными данными о неблагоприятном влиянии перечисленных факторов на выживаемость больных с АС.

Фактор некроза опухоли (TNF) — провоспалительный цитокин, присутствие которого в клапане и повышенный уровень в крови при АС изучены ранее [4]. Установлена корреляция плазменных уровней TNF с уровнем его экспрессии в АК и выраженностью кальцификации последнего [9]. В предшествующей работе с участием контрольной группы больных без АС ассоциации ОНП G(-238)A и G(-308)A этого гена с развитием умеренно-тяжелого АС нами выявлено не было [5]. В настоящей работе также не оказалось и связи с прогнозом.

Полученный отрицательный результат при очевидной вовлеченности цитокина в патогенез заболевания позволяют предположить, что большая функциональная активность белка TNF у больных с АС предопределяется носительством других вариантов его гена, а также возможным регуляторным влиянием ОНП G(-238)A и G(-308)A на соседние гены, в частности, гены комплекса гистосовместимости (Human Leucocyte Antigens, HLA).

Интерлейкин 10 (IL-10) — противовоспалительный цитокин, продуцирующийся лимфоцитами и препятствующий воспалению, в том числе путем ингибирования синтеза TNF, хемокинов и ферментов в активированных макрофагах, Т-клетках, полиморфноядерных лейкоцитах, естественных киллерах, способный регулировать пролиферацию и дифференцировку В-клеток. Полученные результаты предшествующих исследований относительно уровня цитокина как в АК, так и в периферической крови при АС неоднозначны [6, 7]. Противоречивы и данные о влиянии ОНП (-592 C/A) гена *IL-10* на экспрессию белка: повышение [6] или его снижение [7]. Известно также, что на экспрессию белка влияют два соседних промотерных ОНП этого гена: G(1082)A и C(-819)T.

Связь ОНП C(-592)A гена *IL-10* с наличием умеренно-тяжелого АС была выявлена нами ранее [5], однако в настоящем исследовании не было ассоциации между этим полиморфизмом и прогнозом больных с АС. Таким образом, у носителей варианта C(-592)A гена *IL-10* снижена противовоспалительная защита в АК, что облегчает развитие кальцификации, но не вносит вклад в прогноз этих больных.

Трансформирующий фактор роста β 1 (TGF β 1) — цитокин, выполняющий в норме защитную роль для нейронов центральной и периферической нервной систем, являющийся мощным иммуносуппрессором,

стабилизирующим атеросклеротические бляшки путем ингибирования местной воспалительной реакции, и способствующий заживлению ран, за счет стимуляции миграции нейтрофилов, моноцитов и фибробластов. В случае повышенной экспрессии TGF β 1 при ряде заболеваний увеличивается синтез белков экстрацеллюлярного матрикса, в результате прогрессирует фиброз, приводящий к дисфункции соответствующего органа [8].

Повышенная экспрессия мРНК TGF β 1 в АК у больных с АС подтверждена предшествующими исследованиями [2]. Данные об уровне TGF β 1 в периферической крови у больных с АС противоречивы [2, 9]. В одних исследованиях уровень TGF β 1 снижается с увеличением степени стеноза, в других корреляция противоположная. Ассоциации между сывороточным уровнем цитокина и площадью АК в нашей работе получено не было.

ОНП Arg25Pro расположен в экзоне 1, в сигнальной последовательности, отвечающей за транспорт синтезированного белка через мембрану во внеклеточное пространство. Влияние известных промотерных и сигнальных ОНП гена *TGF β 1* на функцию белка остается до конца не уточненным.

Ранее получены данные о том, что у носителей генотипа ArgArg ОНП Arg25Pro экспрессия TGF β 1 была выше, чем у гетерозигот ArgPro [10], что послужило основанием считать аллель Arg высокопродуцирующим, а аллель Pro — низкопродуцирующим.

ОНП Arg25Pro в отношении связи с АС не изучался ранее. Предшествующие работы на примере других полиморфизмов гена *TGF β 1* неоднозначны: 509 C/T показал тенденцию к ассоциации с аортальным склерозом ($p=0,10$) у женщин в постменопаузе [11], у ОНП rs6957 связь с наличием АС отсутствовала [12].

В нашей работе была выявлена ассоциация носительства аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGF β 1* с развитием ФИ у больных с АС. Мы также изучали ассоциацию носительства аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена *TGF β 1* с параметрами АК и состоянием ЛЖ, а также функцией почек (рис. 2).

Полученные нами данные о независимом, в том числе от степени тяжести порока и уровня креатинина (или скорости клубочковой фильтрации), неблагоприятном влиянии носительства аллеля Pro на прогноз больных с АС, вероятно, можно объяснить интенсификацией фиброза преимущественно в миокарде ЛЖ, а не в АК и почках.

Предшествующие работы подтверждают наличие связи экспрессии TGF β 1 в миокарде ЛЖ со степенью его фиброза, определяемого по объему коллагена при гистологии у больных с АС [3]. Хорошо изучена и взаимосвязь ЭхоКГ параметров КСО ЛЖ и ФВ ЛЖ со степенью фиброза ЛЖ по данным МРТ у больных с АС. ОНП гена химазы *СМА1* rs1800875 и rs1956923, способного активировать *TGF β 1*, ассо-

цировались с гипертрофией ЛЖ у больных с АС [13]. Более высокий уровень цитокина в периферической крови коррелировал с толщиной задней стенки ЛЖ у больных с АС до и после хирургического протезирования АК [14].

Таким образом, можно предполагать преимущественную активность $TGF\beta 1$ в миокарде ЛЖ по сравнению с АК у больных с АС, что является существенным фактором, отягощающим прогноз таких больных.

Отсутствие корреляции между различными генотипами и аллелями изучаемого ОНП гена $TGF\beta 1$ и сывороточным уровнем цитокина в нашей работе может быть связано с несколькими причинами.

Во-первых, с разной активностью гена: усилением экспрессии у больных с начальным и умеренным пороком АК и ее снижением при прогрессировании заболевания. Известно, что уровень $TGF\beta 1$ повышается в периферической крови у больных с начальным АС и, наоборот, снижается у больных с критическим АС [2]. Изученное ранее снижение циркулирующего $TGF\beta 1$ у больных с критическим АС является неблагоприятным прогностическим фактором [15], что подтверждает полученное нами негативное прогностическое влияние низкопродуцирующего аллеля Pro гена $TGF\beta 1$.

Во-вторых, сывороточный уровень $TGF\beta 1$ является результирующим продуктом нескольких

источников его синтеза: макрофагов, Т-клеток, нейтрофилов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток, тромбоцитов, клеток почечных канальцев [8]. Таким образом, сопутствующие заболевания, в частности ХПН, дегрануляция тромбоцитов при получении сыворотки или плазмы крови, могут влиять на уровень цитокина в крови, затрудняя его интерпретацию.

Ограничения работы: в данном исследовании не анализировался уровень цитокинов IL-10 и TNF в периферической крови, что дало бы больше данных о функциональной активности изучаемых генов.

Заключение

В настоящей работе изучена взаимосвязь генетических маркеров фиброза и воспаления с развитием фатального исхода у больных с АС.

Независимыми факторами, повышающими смертность больных с АС стали: ХСН III-IV ФК NYHA, уровень креатинина, площадь АК, индекс ММ ЛЖ, а также носительство аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена $TGF\beta 1$. Наши данные свидетельствуют в пользу того, что фиброз миокарда ЛЖ, развивающийся у больных с АС, может быть фактором, существенно влияющим на прогноз заболевания. Носительство аллеля Pro ОНП Arg25Pro гена $TGF\beta 1$ можно рассматривать в качестве потенциального фактора риска у больных с АС.

Литература

1. Boeva OI, Shcheglova EV, Yagoda AV, et al. Impact of genotype on the progression of calcific aortic valve stenosis (prospective study). *European Heart Journal* 2016; 37 (Abstract Supplement), 557.
2. Jian B, Narula N, Li Q-y, et al. Progression of aortic valve stenosis: TGF- $\beta 1$ is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2003; 75 (2): 457-65.
3. Beaumont J, López B, Hermida N, et al. MicroRNA-122 down-regulation may play a role in severe myocardial fibrosis in human aortic stenosis through TGF- $\beta 1$ up-regulation. *Clinical science* 2014; 126 (7): 497-506.
4. Shavelle DM, Katz R, Takasu J, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and aortic valve calcification in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *J Heart Valve Dis* 2008; 17 (4): 388-95.
5. Tipteva TA, Chumakova OS, Baklanova TN, et al. Single nucleotide polymorphism C(-592)A of interleukin-10 gene is associated with aortic stenosis. *Kremlyovskaya Medicina. Clinichesky Vestnik*. 2017; 1: 24-31. (In Russ.) Типтева Т.А., Чумакова О.С., Бакланова Т.Н. и др. Однонуклеотидный полиморфизм C(-592)A гена интерлейкин-10 ассоциирован с аортальным стенозом. *Кремлевская медицина Клинический вестник* 2017; 1: 24-31.
6. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-105' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1999; 42 (6): 1101-8.
7. Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 2003; 349 (23): 2201-10.
8. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor- $\beta 1$ in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 2006; 118 (1): 10-24.
9. Attaran S, Sherwood R, Dastidar MG, El-Gamel A. Identification of low circulatory transforming growth factor β -1 in patients with degenerative heart valve disease. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 2010; 11 (6): 791-3.
10. Ochsner S, Guo Z, Binswanger U, Knoflach A. Tgf- $\beta 1$ Gene Expression In Stable Renal Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation Supplement* 2002; 2: 234.
11. Nordstrom P, Glader CA, Dahlen G, et al. Oestrogen receptor alpha gene polymorphism is related to aortic valve sclerosis in postmenopausal women. *Journal of internal medicine* 2003; 254 (2): 140-6.
12. Gaudreault N, Ducharme V, Lamontagne MG, et al. Replication of genetic association studies in aortic stenosis in adults. *Am J Cardiol* 2011; 108 (9): 1305-10.
13. Orłowska-Baranowska E, Gora J, Baranowski R, et al. Common genetic polymorphisms and haplotypes of chymase gene affect left ventricular hypertrophy in male patients with symptomatic aortic stenosis. *European Heart Journal* 2013; 34 (suppl 1): 2604.
14. Villar AV, Cobo M, Llano M, et al. Plasma levels of transforming growth factor- $\beta 1$ reflect left ventricular remodeling in aortic stenosis. *PLoS One* 2009; 4 (12): e8476.
15. Attaran S., Sherwood R., Dastidar M.G., El-Gamel A. Identification of low circulatory transforming growth factor beta-1 in patients with degenerative heart valve disease. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010; 11(6): 791-3.