

## Ассоциация полиморфизма некоторых генов-кандидатов с развитием эндокардитов неинфекционной и инфекционной этиологии

Бахарева Ю. С.<sup>1</sup>, Максимов В. Н.<sup>1,2</sup>, Акиншина Е. И.<sup>1</sup>, Чапаева Н. Н.<sup>2</sup>

**Цель.** Выявление возможных ассоциативных связей между полиморфизмами генов-кандидатов и развитием эндокардитов инфекционного (ИЭ) и неинфекционного генеза.

**Материал и методы.** Было обследовано 175 пациентов, которые были разделены на две группы: первая — 81 пациент с неинфекционным эндокардитом и вторая — 94 пациента с ИЭ. Мы приводим сравнительный анализ частот генотипов полиморфизмов пяти генов: rs11697325 (-8202 A/G) гена *MMP9*, 4a/4b гена *NOS3*, rs4340 гена *ACE*, rs2476601 (C1858T) гена *PTPN22*, rs231775 (49 A/G) гена *CTLA4* в группах с эндокардитами и здоровых индивидуумов.

**Результаты.** Обнаружена ассоциация с эндокардитами rs11697325 (-8202 A/G) гена *MMP-9* и 4a/4b гена *NOS3*, а также rs2476601 (C1858T) гена *PTPN22* с ИЭ.

**Заключение.** Таким образом, для трех из пяти изученных нами полиморфизмов выявлена ассоциация с синдромом вегетаций на клапанном аппарате сердца.

**Российский кардиологический журнал.** 2018;23(10):83–88

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-10-83-88>

**Ключевые слова:** неинфекционный и инфекционный эндокардит, однонуклеотидный полиморфизм.

**Финансирование.** Работа частично поддержана бюджетными проектами № 0324-2018-0002 и № 0324-2017-0048.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Бахарева Ю. С.\* — аспирантка, ORCID: 0000-0003-0480-1510, Максимов В. Н. — д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0002-7165-4496, Акиншина Е. И. — м.н.с, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0002-2924-9147, Чапаева Н. Н. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной терапии, ORCID: 0000-0003-0907-5044.

\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): 8578511@inbox.ru

ИЭ — инфекционный эндокардит, НИЭ — неинфекционный эндокардит, ОНП — однонуклеотидный полиморфизм, IL — интерлейкины.

Рукопись получена 27.02.2018

Рецензия получена 23.03.2018

Принята к публикации 30.03.2018

## Association of polymorphism of some candidate genes with the development of non-infectious and infectious endocarditis

Bakhareva Yu. S.<sup>1</sup>, Maksimov V. N.<sup>1,2</sup>, Akinshina E. I.<sup>1</sup>, Chapaeva N. N.<sup>2</sup>

**Aim.** To study association between polymorphisms of candidate genes and the development of non-infectious and infectious endocarditis (IE).

**Material and methods.** During the study 175 patients were examined. They were divided into two groups: the first group — 81 patients with non-infectious endocarditis and the second one — 94 patients with IE. We present a comparative analysis of the genotype frequencies of the five genes polymorphisms: rs11697325 (-8202 A/G) of the *MMP9* gene, 4a/4b of the *NOS3* gene, rs4340 of the *ACE* gene, rs2476601 (C1858T) of the *PTPN22* gene, rs231775 (49 A/G) of the *CTLA4* gene in groups of patients with endocarditis and healthy individuals.

**Results.** We found association between endocarditis and rs11697325 (-8202 A/G) of the *MMP9* gene, 4a/4b of the *NOS3* gene, as well as rs2476601 (C1858T) of the *PTPN22* gene with IE.

**Conclusion.** Thus, association between three of the five polymorphisms and vegetations on the valvular heart apparatus was revealed.

**Russian Journal of Cardiology.** 2018;23(10):83–88

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-10-83-88>

**Key words:** non-infectious and infectious endocarditis, single nucleotide polymorphism.

**Funding.** This work was partially supported by budget projects № 0324-2018-0002 and № 0324-2017-0048.

**Conflicts of Interest:** nothing to declare.

<sup>1</sup>SRI of Therapy and Prevention Medicine — branch of FSBSI Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SD RAS, Novosibirsk; <sup>2</sup>Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Bakhareva Yu. S. ORCID: 0000-0003-0480-1510, Maksimov V. N. ORCID: 0000-0002-7165-4496, Akinshina E. I. ORCID: 0000-0002-2924-9147, Chapaeva N. N. ORCID: 0000-0003-0907-5044.

**Received:** 27.02.2018 **Revision Received:** 23.03.2018 **Accepted:** 30.03.2018

Инфекционный эндокардит (ИЭ) — это нарушение функции клапанов сердца, обусловленное их деструкцией, ассоциированное с инфекционным воспалением эндокарда, сопровождающееся системными воспалительными и аутоиммунными реакциями. Заболевание может возникнуть в любом воз-

расте, как у детей, так и у пожилых людей. Ежегодная заболеваемость ИЭ составляет 3,8 случая на 100 тыс. населения. Увеличение частоты заболеваемости ИЭ в последние годы связано с распространением оперативных вмешательств и диагностических манипуляций на сердце. Прогноз ИЭ остается более

в чем 80% случаев неблагоприятным. Причиной смерти пациентов становятся септические состояния с проявлением полиорганной недостаточности, тромбоэмболические осложнения с поражением центральной нервной системы, тромбоэмболии легочной артерии [1].

Известно, что некоторые изменения нуклеотидной последовательности ДНК могут влиять на инфекционный процесс, что ранее было доказано для сепсиса и других инфекционных процессов [2]. На ассоциацию с инфарктом миокарда проверялось 939 генов, по 91 из них имеется от 10 до 126 публикаций в PubMed. Поиск генетических маркеров ИЭ только начался и пока не увенчался значимыми находками. В базе данных HuGE Navigator в разделе Phenopedia имеются два фенотипа — эндокардит и бактериальный эндокардит. На ассоциацию с первым фенотипом проверялось 28 генов (из них по 6 генам 2 публикации), со вторым фенотипом — 6 генов. Так, например, показано, что полиморфизмы в гене рецептора тромбоцитов не влияют на течение ИЭ [3]. Не обнаружено достоверных ассоциаций с ИЭ вариантов генов некоторых толл-подобных рецепторов (TLR) и интерлейкинов (IL) [4]. Хотя для одного однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) в гене *TLR2* (R753Q) испанскими исследователями показано довольно высокое отношение шансов (от 3 до 13 в разных моделях). Возможно, это отчасти объясняется небольшим размером исследуемых групп (65 больных ИЭ и 66 человек контроль). И ещё для одного ОНП в гене *IL6* (с.471+870G/A) немецкими исследователями на группе (104 пациента) показана ассоциация с ИЭ [4, 5]. Основа генетической восприимчивости к эндокардитам остаётся малоизученной проблемой. Так, в одном из опубликованных в 2017г исследований на группе пациентов с ИЭ (г. Кемерово) было показано, что генотип GA полиморфизма rs1143634 гена *IL1B*, генотип GT полиморфизма rs3212227 гена *IL12B*, генотип AC полиморфизма rs1130864 гена *CRP* и G аллель полиморфизма rs1801197 гена *CALCR* ассоциированы с уменьшением риска ИЭ, тогда как TT генотип полиморфизма rs1205 в гене *CRP* был связан с более высоким риском ИЭ [6].

Неинфекционный эндокардит (НИЭ) характеризуется отложениями на створках клапанов, не содержащих бактерий [7]. Известно, что НИЭ может развиваться вследствие генетической предрасположенности. Развитие НИЭ может быть связано с нарушением в обмене фолатов, например, у гомозигот по T аллелю, полиморфизма C677T гена метилентетрагидрофолатредуктазы [8]. Представляет клинический интерес первичный антифосфолипидный синдром, развивающийся в результате аутоиммунных реакций к фосфолипидам эндотелия, мембранам эритроцитов и нервных клеток [9].

Исследование молекулярно-генетических основ многофакторных заболеваний относится к одной из наиболее сложных задач современной генетики. Знание генетических факторов, предрасполагающих к развитию заболевания и его осложнений, имеет важное прогностическое значение и может использоваться при досимптоматической диагностике [10]. Мы приводим сравнительный анализ частот генотипов полиморфизмов пяти генов: rs11697325 (-8202 A/G) гена матричной металлопротеиназы-9 (*MMP-9*), 4a/4b гена синтазы оксида азота (*NOS3*), rs4340 гена ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*), rs2476601 (C1858T) гена, кодирующего тирозиновую фосфатазу 22 типа (*PTPN22*), rs231775 (49 A/G) гена, кодирующего поверхностный антиген цитотоксических Т-лимфоцитов (*CTLA4*) в группах с эндокардитами и здоровых индивидуумов.

Цель исследования: выявление возможных ассоциативных связей между полиморфизмами генов-кандидатов и развитием эндокардитов инфекционного и неинфекционного генеза.

#### Материал и методы

Первая группа с НИЭ состоит из 81 пациента: 40 мужчин (49,4%), 41 женщина (50,6%). Средний возраст пациентов на момент обследования составил:  $43 \pm 13,89$  лет. Вторую группу составили 94 пациента с ИЭ (из них 76 пациентов с первичным эндокардитом и 18 с вторичным эндокардитом). При первичном эндокардите: 54 мужчины и 22 женщины (71,1 и 28,9%, соответственно). При вторичном эндокардите: 15 мужчин и три женщины (83,3 и 16,7%, соответственно). Средний возраст на момент обследования составил  $38 \pm 12,46$  и  $41 \pm 16$  лет, соответственно. Средний возраст пациентов не имел существенных различий, большинство составили лица молодого и среднего возраста, по гендерному признаку в группе с НИЭ распределение оказалось в равном процентном соотношении, а в группе инфекционного эндокардита значительно преобладали мужчины,  $p=0,001$ . Клинический блок исследований включал сбор и анализ: жалоб, анамнеза заболевания и жизни; оценку объективного статуса. Пациенты с недавно перенесенными острыми состояниями (травма, полихимиотерапия, недавнее хирургическое вмешательство), а также беременные были исключены. Двести условно здоровых человек (без клапанной патологии), сопоставимых по возрасту и полу составили контрольную группу.

Информированное согласие было подписано всеми участниками исследования. Исследование выполнено в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека».

Сыворотка крови была получена у пациентов, проходивших лечение и обследование в условиях

Таблица 1

## Частоты генотипов ОНП в группе с НИЭ и ИЭ и контрольной группе

Полиморфизм Ген	Генотипы	Контрольная группа (III) n (%)	Группа с ИЭ (II) n (%)	Группа с НИЭ (I) n (%)	P <sub>III-II</sub>
rs11697325 <i>MMP9</i>	AA	44 (22)	15 (39,5)	12 (31,6)	0,03
	AG	108 (54)	17 (44,7)	15 (39,5)	
	GG	48 (24)	6 (15,8)	11 (28,9)	
4a/4b <i>NOS3</i>	4a/4a	6 (3)	2 (5,3)	1 (2,6)	0,015
	4a/4b	51 (25,5)	15 (39,5)	17 (44,7)	
	4b/4b	143 (71,5)	21 (55,3)	20 (52,6)	
rs4340 <i>ACE</i>	II	43 (21,5)	6 (15,8)	9 (23,7)	0,53
	ID	105 (52,5)	24 (63,2)	22 (57,9)	
	DD	52 (26)	8 (21,1)	7 (18,4)	
rs231775 <i>CTLA4</i>	AA	52 (26)	12 (31,6)	14 (36,8)	0,3
	AG	102 (51)	18 (47,4)	19 (50)	
	GG	46 (23)	8 (21,1)	5 (13,2)	
rs2476601 <i>PTPN22</i>	CC	150 (75)	25 (65,8)	28 (73,6)	0,01
	CT	48 (24)	7 (18,4)	10 (26,4)	
	TT	2 (1)	6 (15,8)	0	

ГБУЗ НСО ГKB № 34 (главный врач Ярошно В. И.). Генотипирование выполняли на базе Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины. Геномную ДНК выделяли из 6-10 мл венозной крови. Образцы крови до экстракции ДНК хранили при температуре -20° С. Экстракция ДНК из крови проводилась фенол-хлороформным методом. Полиморфизмы 4a/4b гена *NOS3* и I/D гена *ACE* тестировали с помощью ПЦР с фланкирующими праймерами с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле, по опубликованным методикам. Полиморфизмы rs11697325 гена *MMP9*, rs2476601 гена *PTPN22*, rs231775 гена *CTLA4* тестировали с помощью ПЦР с анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов по опубликованным методикам [10]. Частоты генотипов в изучаемых группах представлены в таблице 1. Статистический анализ проводили с помощью статистического пакета SPSS, версия 21.0. Распределение частот генотипов всех полиморфизмов в контрольной группе соответствовало равновесию Харди-Вайнберга. Расчет величины отношения шансов (ОШ) проводили по методу Вульфа-Холдейна, который допускает расчёты по таблице 2x2 для случаев, когда хотя бы одна из ячеек таблицы имеет значение ноль. Достоверность различий частот изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию  $\chi^2$  с поправкой Йейтса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц — РТМФ2. Статистически значимыми считались различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Поражение клапанов сердца варьировало от минимальных нарушений (небольшая регургита-

ция, утолщение створок клапанов), выявляемых при эхокардиографическом исследовании до тяжелых пороков (стеноз или недостаточность клапанов сердца). В связи с этим требовалось проведение более детального анализа тромботических наслоений. Диагноз НИЭ был выставлен после исключения инфекционной природы эндокардита, согласно критериям Duke [1]. В группе пациентов с НИЭ отмечали поражение митрального клапана в 88,8% случаев, аортального клапана — в 51,3%. Формирование вегетаций на трикуспидальном клапане являлось наиболее частым при ИЭ: в 77% случаев на интактных клапанах и 28% случаев на измененных клапанах,  $p=0,03$ . Размер групп относительно невелик, в частности, из-за низкой частоты выявляемости клапанного поражения у пациентов. Особенно низкий процент обнаружения вегетаций характерен для пациентов с НИЭ в связи со скудными клиническими проявлениями: медленно формируется порок сердца, не так быстро, как при ИЭ, прогрессирует сердечная недостаточность.

В нашем исследовании изучены полиморфизмы пяти генов, как возможные молекулярно-генетические маркёры развития эндокардита, как инфекционной, так и неинфекционной природы. По результатам генотипирования, на первом этапе определяли частоты генотипов, изучаемых полиморфизмов, в группах пациентов с эндокардитами и контрольной группе, затем оценивали соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга в контрольной группе (по критерию хи-квадрат). У всех исследованных полиморфизмов, распределение частот генотипов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга.

Предполагается, что некоторые белки, экспрессируемые при ИЭ, могут быть полезны в качестве прогностических биомаркеров болезни. Например, матриксные металлопротеиназы MMP2 и MMP9, а также ингибиторы ММП, синтезируются в пораженных клапанах и представляют собой ферменты, участвующие в деградации тканей и ремоделировании вегетаций. Нами выявлено статистически значимое повышение частоты носительства генотипа AA полиморфизма rs11697325 (-8202 A/G) гена *MMP9* в группе пациентов с эндокардитами (у 40%), по сравнению с контрольной группой (в 22%),  $p=0,03$ . Соответственно, носительство генотипа AA повышает вероятность возникновения эндокардита как инфекционной, так и неинфекционной природы практически в два раза по сравнению с группой контроля, ОШ = 1,95, 95% ДИ: 1,1-3,48,  $p=0,03$ . При изолированном сравнении группы с ИЭ по отношению к группе контроля, генотип AA rs11697325 (-8202 A/G) гена *MMP-9* повышает риск развития эндокардита более чем в два раза, ОШ: 2,31, 95% ДИ 1,11- 4,81,  $p=0,04$ .

Эндотелиальные клетки сосудов чувствительны к различным повреждающим факторам, таким как свободные радикалы, воспалительные белки или холестерин, а система синтеза оксида азота является наиболее вероятным звеном, влияющим на эндотелий. Оксид азота задействован в двух важных для сердечно-сосудистой системы процессах: регуляции тонуса гладких мышц сосудов и агрегации тромбоцитов в процессе свертывания крови. При исследовании полиморфизмов генов *NOS3* выявлено, что снижение содержания оксида азота нарушает нормальное функционирование сосудов, повышает тонус сосудистой стенки и усиливает тромбообразование, а увеличение данного фермента является протективной мерой [11]. Частота носительства генотипа 4b/4b гена *NOS3* в группе здоровых лиц оказалась выше, чем у пациентов с эндокардитами, то есть наличие генотипа 4b/4b гена *NOS3* уменьшает вероятность развития эндокардита, причем как инфекционной, так и неинфекционной природы, ОШ = 0,47, 95% ДИ: 0,27-0,81,  $p=0,006$ . Белки семейства тирозиновой фосфатазы участвуют в предупреждении спонтанной Т-клеточной активации путем дефосфорилирования и инактивации ассоциированных с Т-клеточным рецептором киназ и их субстратов. *PTPN22*, экспрессированный на лимфоцитах через образование комплекса с С-концевой киназой (Src Kinase-CSK), супрессирует последующие медиаторы сигналинга Т-клеточного рецептора. Замена аргининового

на триптофановый аминокислотный остаток (кодон 620-R620W) исключает возможность взаимодействия *PTPN22* с CSK, что приводит к нарушению обратной регуляции активированных лимфоцитов [12]. Отношение шансов развития ИЭ у носителей генотипа ТТ полиморфизма rs2476601 (C1858T) гена *PTPN22* значительно выше по сравнению с носителями двух других генотипов (С/Т+С/С): ОШ = 8,49, 95% ДИ: 1,67-43,02,  $p=0,006$ . Экспрессия гена *ACE* приводит к увеличению концентрации ангиотензинпревращающего фермента в крови, лимфе и тканях, что является фактором, повышающим риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркта миокарда, гипертрофии левого желудочка, ишемической болезни сердца), болезни почек, атеросклероза, болезни Альцгеймера, кардиомиопатий [13]. Нами не выявлено ассоциаций с эндокардитами I/D полиморфизма гена *ACE*.

Одним из генов-кандидатов является ген *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4, поверхностный антиген цитотоксических Т-лимфоцитов), белковый продукт которого участвует в регуляции активности Т-лимфоцитов и, следовательно, может играть важную роль в развитии аутоиммунных процессов, наиболее часто ассоциированных с НИЭ. [14]. Нами не выявлено ассоциаций с эндокардитами rs231775 (49 A/G) гена *CTLA4*. Относительно небольшие размеры исследуемых групп, недостаточная их однородность могут быть причиной таких результатов. Однако это общий недостаток исследований генетических ассоциаций с эндокардитами.

### Заключение

Обнаружена ассоциация с эндокардитами rs11697325 (-8202 A/G) гена *MMP-9* и 4a/4b гена *NOS3*, а также rs2476601 (C1858T) гена *PTPN22* с ИЭ. Таким образом, для трех из пяти изученных нами полиморфизмов выявлена ассоциативная связь с синдромом вегетаций на клапанном аппарате сердца. Необходимы дальнейшие исследования для подтверждения результатов на выборках большого объема с включением в анализ большого количества полиморфизмов для более полного изучения генетического вклада в развитие эндокардитов.

**Финансирование.** Работа частично поддержана бюджетными проектами № 0324-2018-0002 и № 0324-2017-0048.

**Конфликт интересов:** все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## Литература/References

1. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J*. 2015;36(44):3036-7.
2. Thuny F, Habib G, Le Dolley Y, et al. Circulating matrix metalloproteinases in infective endocarditis: a possible marker of the embolic risk. *PLoS One*. 2011;14:6(4):e18830.
3. Daga S, Shepherd JG, Callaghan JG, et al. Platelet receptor polymorphisms do not influence *Staphylococcus aureus*-platelet interactions or infective endocarditis. *Microbes Infect*. 2011;13(3):216-25.
4. Weinstock M, Grimm I, Dreier J et al. Genetic Variants in Genes of the Inflammatory Response in Association with Infective Endocarditis *PLoS One*. 2014;9(10):e110151.
5. Bustamante J, Tamayo E, Florez S, et al. Toll-Like Receptor 2 R753Q Polymorphisms Are Associated With an Increased Risk of Infective Endocarditis. *Rev. Esp. Cardiol*. 2011;64(11):1056-9.
6. Ponasenko AV, Kutikhin AG, Khutornaya MV, et al. Inherited Variation in Cytokine, Acute Phase Response, and Calcium Metabolism Genes Affects Susceptibility to Infective Endocarditis. *Mediators Inflamm* 2017. doi:10.1155/2017/7962546 (4 June 2017).
7. Asopa S, Patel A, Omar A. Khan et al. Non-bacterial thrombotic endocarditis. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2007;32:696-701.
8. Durante-Mangoni E, Iossa D, Nappi F, et al. Inherited hyper-homocysteinemia as a cause of nonbacterial thrombotic endocarditis. *Heart Valve Dis*. 2011;20(2):232-3.
9. Siddique S, Risse J, Canaud G, et al. Vascular Manifestations in Antiphospholipid Syndrome (APS): Is APS a Thrombophilia or a Vasculopathy? *Curr Rheumatol Rep*. 2017;19(10):64.
10. Rovenskih DN, Maksimov VN, Tatarnikova NP, et al. The role of molecular genetic factors in the risk of acute deep vein thrombosis in the lower limbs. *Byulleten SO RAMN*. 2012;32(4). (In Russ.) Ровенских Д.Н., Максимов В.Н., Татарникова Н.П. и др. Роль молекулярно-генетических факторов в риске развития острого тромбоза глубоких вен нижних конечностей. *Бюллетень СО РАМН*. 2012;32(4).
11. Man HS, Yan MS, Lee JJ, et al. Epigenetic determinants of cardiovascular gene expression: vascular endothelium. *Epigenomics*. 2016;8(7):959-79.
12. Alberici F, Martorana D, Vaglio A. Genetic aspects of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;1:37-45.
13. Rani B, Kumar A, Bahl A, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms as potential modifiers of hypertrophic and dilated cardiomyopathy phenotypes. *Mol Cell Biochem*. 2017;27(1-2):1-11.
14. Wang K, Zhu Q, Lu Y, et al. CTLA-4 +49 G/A Polymorphism Confers Autoimmune Disease Risk: An Updated Meta-Analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2017;21(4):222-7.