Полиморфизм генов белков, связанных с функцией эндотелия, у пациентов с инфекционным эндокардитом

Понасенко А. В., Цепокина А. В., Кутихин А. Г., Кудрявцева Ю. А.

Цель. Провести ассоциативное исследование зависимости между полиморфизмом пяти сайтов генов *EDN1*, *SELE*, *SELP*, *SELPLG* с рисками развития инфекционного эндокардита (ИЭ) и связью генотипов исследуемых сайтов с концентрацией соответствующих белков в крови.

Материал и методы. В исследование включено 208 пациентов с ИЭ и 300 условно здоровых доноров. Генотипирование проводили по 6 полиморфным сайтам 4 генов методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Уровни эндотелина-1, sE-селектина, sP-селектина определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. Определено, что рисковым эффектом в отношении ИЭ обладает аллель T (генотип G/T) полиморфного сайта rs5370 гена *EDN1* по сверхдоминантному типу наследования (ОШ =1,58 (95% ДИ 1,05-2,35), p=0,027). В то же время, зависимость количественного содержания эндотелина-1, sE- и sP-селектинов от носительства вариабельных генотипов соответствующих генов не найдена. Однако отмечено, что у пациентов с ИЭ сывороточные концентрации биологически активных белков эндотелия отличаются от таковых у здоровых лиц.

Заключение. Проведенное исследование подтверждает присутствие маркеров эндотелиальной дисфункции в крови пациентов с ИЭ. Показано наличие ассоциации сайта rs5370 *EDN1* с увеличением риска развития ИЭ у гетерозиготных носителей минорного аллеля T. Однако необходимо проведение дополнительных исследований для подтверждения этих наблюдений и подробного описания механизма того, как вариабельность генов определяет предрасположенность к развитию ИЭ.

Российский кардиологический журнал. 2018;23(10):88–96
http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-10-88-96

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, *EDN1*, *SELE*, *SELP*, *SELPLG*.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 546-2015-0011 “Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов”.

Конфликт интересов: не заявлен.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия.

Понасенко А. В.* — к.м.н., зав. лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-3002-2863, Цепокина А. В. — м.н.с. лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-4467-8732, Кутихин А. Г. — к.м.н., с.н.с. лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0001-8679-4857, Кудрявцева Ю. А. — д.м.н., зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии, ORCID: 0000-0002-6134-7468.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
ponaav@kemcardio.ru

ИЭ — инфекционный эндокардит, ВПС — врожденные пороки сердца, ИКА — информационный критерий Акаике, GWAS — полногеномный поиск ассоциаций, ОШ — отношение шансов.

Рукопись получена 30.08.2018
Рецензия получена 19.09.2018
Принята к публикации 28.09.2018

Polymorphism of protein genes associated with endothelial function in patients with infective endocarditis

Ponasenko A. V., Tsepokina A. V., Kutixin A. G., Kudryavtseva Yu. A.

Aim. To study relationship between the polymorphism of five polymorphic sites of *EDN1*, *SELE*, *SELP*, *SELPLG* genes with the risk of infectious endocarditis (IE) and the connection of genotypes of studied sites with concentration of the corresponding proteins in the blood.

Material and methods. The study included 208 patients with IE and 300 healthy donors. Genotyping was performed on 6 polymorphic sites of 4 genes by real-time PCR. The levels of endothelin-1, sE-selectin, sP-selectin were determined by the ELISA technique.

Results. We determined that the T allele (G/T genotype) of rs5370 polymorphic site of *EDN1* gene have a risk effect on IE in the superdominant mode of inheritance (OR=1,58, 95% CI=1,05-2,35, p=0,027). At the same time, the association between levels of endothelin-1, sE and sP selectins and carriage of the variable genotypes of the corresponding genes was not found. We noted that serum concentrations of biologically active endothelial proteins differ between patients with IE and healthy individuals.

Conclusion. The study confirms the presence of endothelial dysfunction markers in the blood of patients with IE. It shows the association between rs5370 site of *EDN1* gene and an increased risk of IE in heterozygous carriers of the minor T allele. However, additional research is needed to confirm these observations and to get detailed description of how gene variability determines underlying risk for IE.

Russian Journal of Cardiology. 2018;23(10):88–96
http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2018-10-88-96

Key words: infective endocarditis, *EDN1, SELE, SELP, SELPLG*.

Funding. This study was supported by the comprehensive program of fundamental scientific research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the framework of the fundamental subject of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 546-2015-0011 “Pathogenetic rationale for the development of implants for cardiovascular surgery based on biocompatible materials, with the implementation of a patient-oriented approach using mathematical modeling, tissue engineering methods and genomic predictors.”

Conflicts of Interest: nothing to declare.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia.

Ponasenko A. V. ORCID: 0000-0002-3002-2863, Tsepokina A. V. ORCID: 0000-0002-4467-8732, Kutixin A. G. ORCID: 0000-0001-8679-4857, Kudryavtseva Yu. A. ORCID: 0000-0002-6134-7468.

Received: 30.08.2018 **Revision Received:** 19.09.2018 **Accepted:** 28.09.2018

В течение последнего десятилетия в литературе появился достаточный объем научной информации, подтверждающей идею важности молекул функции эндотелия и клеточной адгезии в патофизиологических механизмах развития заболеваний человека, в том числе, связанных с инфекцией. Инфекционный эндокардит (ИЭ) — смертельно опасное заболевание и, несмотря на достижения в его лечении, частота летальных исходов и тяжёлых осложнений при этой патологии остается высокой [1]. Заболеваемость ИЭ регистрируется во всех странах мира, а в Российской Федерации составляет более 10 тыс. человек в год, из которых около 2500 нуждаются в хирургическом вмешательстве. Мужчины заболевают в полтора — три раза чаще, чем женщины. Чаще заболевают лица трудоспособного возраста (20-50 лет), только 25% всех случаев фиксируется в возрастной группе от 60 лет и старше. Частота первичного ИЭ составляет 41,1-69,7% [2]. Несмотря на изменившуюся клиническую картину течения ИЭ, методы его диагностики и лечения совершенствуются параллельно с развитием научно-технического прогресса [1]. Однако молекулярно-генетические тесты в основном направлены на изучение свойств микроорганизмов, потенциальных возбудителей ИЭ: изменения вирулентности [3-5], способов обнаружения [6] или определения механизмов антибиотикорезистентности возбудителя [7]. Клинические исследования описывают факторы и состояния, отягощающие прогноз, такие как: ранее перенесенный ИЭ, нелеченые синие врождённые пороки сердца (ВПС) и ВПС после паллиативных шунтирующих операций, имплантация протезов клапанов сердца или кондуитов, искусственные материалы для восстановления клапанов, двухстворчатый аортальный клапан, пролапс митрального клапана и кальцинированный стеноз аорты [1]. Тем не менее, специалисты отмечают, что зачастую ИЭ развивается без известной патологии сердца (не учитывая ИЭ у лиц, практикующих внутривенное употребление наркотических средств). Несмотря на то, что установлены многочисленные факторы риска, связанные с особенностями клапанного аппарата, 30-50% случаев ИЭ диагностируется у пациентов без каких-либо известных факторов риска [8]. Но всё же недостаточно внимания уделяется генетическим предикторам, определяющим количественный и качественный состав белковых молекул, ответственных за ключевые моменты патогенеза ИЭ — от рецепторов врожденного иммунного ответа и других ассоциированных с успешной элиминацией возбудителя факторов до факторов, обеспечивающих благоприятные условия адгезии микроорганизмов на клапанных структурах сердца.

Селектины являются лектиноподобными трансмембранными гликопротеинами, опосредуют начальное низкоаффинное взаимодействие лейкоцитов с эндотелиальными клетками. Это переходное связывание приводит к дальнейшей активации лейкоцитов и к последующей устойчивой адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. Кроме того, активация лейкоцитов, в ответ на медиаторы инфицирования, имеет решающее значение для адекватной защиты организма от любого вида травм или внедрения бактериального агента. Селектины в основном распознают лиганды, имеющие структуры углеводного региона, сиалированного антигена Lex (sLex) [9]. Так, при изучении синдрома дефицита адгезии лейкоцитов II (LAD II) показано, что когда на поверхности лейкоцитов отсутствуют лиганды для селектинов эндотелиальных клеток, передача сигнала невозможна и нейтрофилы не привлекаются в очаг воспаления. Соответственно, роль эффекторных клеток в активации иммунной системы остается не реализованной. Растворимые циркулирующие формы селектинов могут быть обнаружены в плазме, где их концентрации увеличиваются при воспалительных заболеваниях [10]. Существует три тесно связанных члена семейства селектинов, каждый из которых экспрессируется на различных типах клеток: на лейкоцитах (L-селектин), эндотелиальных клетках (E-селектин, P-селектин) и тромбоцитах (P-селектин). Своими характеристиками особенно примечателен E-селектин, активно участвующий в воспалении посредством увеличения своей экспрессии на активированном эндотелии микрососудов, а также в клеточном роллинге, передаче межклеточных сигналов и хемотаксисе. Ранее нами было продемонстрировано [11], что у пациентов с ИЭ даже в подостром периоде, после прохождения медикаментозной терапии, предваряющей операцию по протезированию клапанов сердца, отмечается повышенная активность лейкоцитов и эндотелия. Сопровождается такое состояние увеличением сывороточных концентраций P- и L-селектинов, а в послеоперационном периоде ключевую роль играет E-селектин, увеличение концентраций которого связано с прогрессированием системного воспалительного ответа и развитием осложнений в виде полиорганной недостаточности. Поэтому нами предположено, что могут существовать генетические детерминанты, связанные с дисфункцией эндотелия и определяющие возникновение условий как для адгезии микроорганизмов на поверхности нативных клапанных структур сердца и на входящем в состав протезов клапанов материале, так и определяющие количество экспрессируемых белков.

Цель исследования: провести анализ генетических ассоциаций с риском развития заболевания и определить взаимосвязь отдельных полиморфных вариантов генов *EDN1*, *SELE*, *SELP*, *SELPLG* с количеством их белковых продуктов в сыворотке крови на трех этапах оперативного лечения ИЭ.

Материал и методы

Исследование проведено на базе Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (НИИ КПССЗ). Критерии включения в группу исследования: 1) проживание в Кемеровской области в течение как минимум двух поколений; 2) принадлежность к русскому этносу; 3) клинически (по модифицированным критериям Дьюка при наличии как минимум одного большого и одного малого критериев или трех малых критериев [12]) и гистологически верифицированного диагноза ИЭ; 4) подписанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: 1) принадлежность к коренным или пришлым этносам; 2) злокачественные новообразования в анамнезе; 3) сопутствующие психические и/или аутоиммунные заболевания; 4) отказ подписать информированное согласие на участие в исследовании. Для группы сравнения внесены поправки: в вышеперечисленные критерии исключения добавлены пункты — отсутствие когда-либо перенесенного или имеющегося ИЭ, хронических инфекционных заболеваний, наркозависимость от инъекционных и не инъекционных препаратов.

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. Все участники подписали Информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

Всего в исследование включено 208 пациентов с установленным диагнозом ИЭ, поступивших в клинику НИИ КППСЗ с 2009 по 2016гг. Все пациенты поступили в стационар для оперативного лечения в объеме протезирования клапана сердца, получали антибактериальную терапию до поступления в стационар и находились в “холодном” периоде заболевания (подострый ИЭ).

Визуализация при эхокардиографии подвижных вегетаций на клапанах, флуктуирующих в соответствии с током крови, наблюдалась у всех пациентов, включённых в исследование. Посевы крови на культуральные среды выявили септицемию в 55 (26,5%) случаях. Наиболее частыми случаями обнаружения при положительных результатах посевов были факультативные анаэробные грамположительные микроорганизмы родов *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Из всех положительных посевов на долю *St. aureus* приходится 49% идентифицированных возбудителей, на *E. faecalis* — 10,9%, смешанная стрептокко-стафилококковая флора выделена также в 10,9%. Иная микрофлора встречалась в единичных случаях.

Группу сравнения составили 300 условно здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту с группой исследования. Половозрастные и социальные характеристики групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Количественные показатели, характеризующие группы обследуемых лиц

Показатель	Группы	
	Пациенты с ИЭ N=208	Группа сравнения N=300
Мужчины, n (%)	136 (65,4)	194 (64,5)
Возраст, лет	46 (от 22 до 77)	55 (от 21 до 81)
Инъекционные наркоманы, n (%)	20 (21,7)	0

Сбор венозной периферической крови проводили при поступлении в стационар, до проведения терапевтических и хирургических вмешательств, в вакуумные пробирки с активатором свертывания для биохимического анализа и с антикоагулянтом K3-ЭДТА — для молекулярно-генетического тестирования.

Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции с протеиназой-К по стандартному протоколу. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Контроль качества генотипирования проводили путем повторного генотипирования 10% образцов. Генотипирование проведено по 6 полиморфным сайтам 4 генов. Для исследования выбраны маркерные сайты, имеющие доказанную связь с клиническими эффектами полиморфизма.

Для полиморфных сайтов rs3087459 гена *EDN1*, rs1805193 и s5361 гена *SELE*, rs6136 гена *SELP* и rs2228315 гена *SELPLG* равновесие определенных и ожидаемых частот встречаемости аллелей соответствовало закону распределения Харди-Вайнберга (ХВ). Равновесие не было соблюдено лишь в одном случае. В контрольной группе частота минорного аллеля T полиморфного сайта rs5370 гена *EDN1* превышала расчетное количество и уровень p составил 0,013. Согласно базе данных dbSNP информационного ресурса открытого доступа NCBI, частота минорного аллеля T полиморфного сайта rs5370 гена *EDN1* колеблется от 20 до 25% в зависимости от исследуемой популяции (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=5370). В популяции условно-здоровых жителей Кемеровской области, вошедших в нашу группу сравнения, частота встречаемости аллеля T равнялась 15%. Так как вероятность ошибки генотипирования нами исключена повторным генотипированием 10% случайно выбранных образцов и суммарно по популяции отклонения частот встречаемости от расчетных не отмечено (ХВ p=0,11), мы оставили данный полиморфный сайт для проведения дальнейшего анализа. Вероятно, изменение соотношения частот аллельных вариантов данного сайта связано с популяционными процессами адаптации к климатическим и экологическим факторам проживания в промышленном регионе Западной Сибири. Для группы исследования (больные с ИЭ)

Таблица 2

Распределение частот генотипов полиморфизмов генов *EDN1* (rs3087459, rs5370), *SELE* (rs1805193, rs5361), *SELP* (rs6136), *SELPLG* (rs2228315), в группе условно здоровых доноров крови и у пациентов с ИЭ, с поправками на пол и возраст)

Модель наследования	Генотип	Группа сравнения	Пациенты с ИЭ	ОШ (95%ДИ)	P	ИКА
EDN1 (rs3087459)						
Кодоминантная	A/A	220 (73,3%)	140 (67,3%)	1,00	0,32	691,2
	A/C	74 (24,7%)	64 (30,8%)	1,36 (0,91-2,02)		
	C/C	6 (2,0%)	4 (1,9%)	1,05 (0,29-3,78)		
Доминантная	A/A	220 (73,3%)	140 (67,3%)	1,00	0,14	689,3
	A/C-C/C	80 (26,7%)	68 (32,7%)	1,34 (0,91-1,97)		
Рецессивная	A/A-A/C	294 (98,0%)	204 (98,1%)	1,00	0,95	691,5
	C/C	6 (2,0%)	4 (1,9%)	0,96 (0,27-3,45)		
Сверхдоминантная	A/A-C/C	226 (75,3%)	144 (69,2%)	1,00	0,13	689,2
	A/C	74 (24,7%)	64 (30,8%)	1,36 (0,91-2,01)		
Лог-аддитивная	---	---	---	1,26 (0,89-1,79)	0,19	689,8
EDN1 (rs5370)						
Кодоминантная	G/G	221 (73,7%)	138 (66,3%)	1,00	0,071	688,2
	G/T	66 (22,0%)	64 (30,8%)	1,55 (1,04-2,33)		
	T/T	13 (4,3%)	6 (2,9%)	0,74 (0,27-1,99)		
Доминантная	G/G	221 (73,7%)	138 (66,3%)	1,00	0,076	688,3
	G/T-T/T	79 (26,3%)	70 (33,6%)	1,42 (0,96-2,09)		
Рецессивная	G/G-G/T	287 (95,7%)	202 (97,1%)	1,00	0,39	690,7
	T/T	13 (4,3%)	6 (2,9%)	0,66 (0,25-1,75)		
Сверхдоминантная	G/G-T/T	234 (78,0%)	144 (69,2%)	1,00	0,027	686,6
	G/T	66 (22,0%)	64 (30,8%)	1,58 (1,05-2,35)		
Лог-аддитивная	---	---	---	1,22 (0,88-1,68)	0,23	690,1
SELE (rs1805193)						
Кодоминантная	G/G	242 (80,7%)	168 (80,8%)	1,00	0,79	374,3
	A/G	55 (18,3%)	39 (18,8%)	1,02 (0,65-1,61)		
	A/A	3 (1,0%)	1 (0,5%)	0,48 (0,05-4,66)		
Доминантная	G/G	242 (80,7%)	168 (80,8%)	1,00	0,98	372,5
	A/G-A/A	58 (19,3%)	40 (19,2%)	0,99 (0,63-1,56)		
Рецессивная	G/G-A/G	297 (99,0%)	207 (99,5%)	1,00	0,5	372,7
	A/A	3 (1,0%)	1 (0,5%)	0,48 (0,05-4,63)		
Сверхдоминантная	G/G-A/A	245 (81,7%)	169 (81,2%)	1,00	0,91	372,4
	A/G	55 (18,3%)	39 (18,8%)	1,03 (0,65-1,62)		
Лог-аддитивная	---	---	---	0,97 (0,63-1,47)	0,87	372,6
SELE (rs5361)						
Кодоминантная	T/T	248 (82,7%)	170 (81,7%)	1,00	0,54	692,2
	G/T	48 (16,0%)	37 (17,8%)	1,12 (0,70-1,80)		
	G/G	4 (1,3%)	1 (0,5%)	0,36 (0,04-3,29)		
Доминантная	T/T	248 (82,7%)	170 (81,7%)	1,00	0,79	691,4
	G/T-G/G	52 (17,3%)	38 (18,3%)	1,07 (0,67-1,69)		
Рецессивная	T/T-G/T	296 (98,7%)	207 (99,5%)	1,00	0,32	690,5
	G/G	4 (1,3%)	1 (0,5%)	0,36 (0,04-3,22)		
Сверхдоминантная	T/T-G/G	252 (84,0%)	171 (82,2%)	1,00	0,6	691,2
	G/T	48 (16,0%)	37 (17,8%)	1,14 (0,71-1,82)		
Лог-аддитивная	---	---	---	1,00 (0,66-1,54)	0,98	691,5
SELP (rs6136)						
Кодоминантная	T/T	235 (78,3%)	166 (79,8%)	1,00	0,88	693,2
	G/T	61 (20,3%)	40 (19,2%)	0,93 (0,59-1,45)		
	G/G	4 (1,3%)	2 (1,0%)	0,71 (0,13-3,91)		
Доминантная	T/T	235 (78,3%)	166 (79,8%)	1,00	0,69	691,3
	G/T-G/G	65 (21,7%)	42 (20,2%)	0,91 (0,59-1,41)		

Рецессивная	T/T-G/T	296 (98,7%)	206 (99,0%)	1,00	0,7	691,3
	G/G	4 (1,3%)	2 (1,0%)	0,72 (0,13-3,96)		
Сверхдоминантная	T/T-G/G	239 (79,7%)	168 (80,8%)	1,00	0,76	691,4
	G/T	61 (20,3%)	40 (19,2%)	0,93 (0,60-1,46)		
Лог-аддитивная	---	---	---	0,91 (0,61-1,36)	0,64	691,3
SELPLG (rs2228315)						
Кодоминантная	C/C	268 (89,3%)	189 (90,9%)	1,00	0,33	691,2
	C/T	30 (10,0%)	19 (9,1%)	0,90 (0,49-1,64)		
	T/T	2 (0,7%)	0 (0,0%)	0,00 (0,00-NA)		
Доминантная	C/C	268 (89,3%)	189 (90,9%)	1,00	0,57	691,2
	C/T-T/T	32 (10,7%)	19 (9,1%)	0,84 (0,46-1,53)		
Рецессивная	C/C-C/T	298 (99,3%)	208 (100,0%)	1,00	0,15	689,4
	T/T	2 (0,7%)	0 (0,0%)	0,00 (0,00-NA)		
Сверхдоминантная	C/C-T/T	270 (90,0%)	189 (90,9%)	1,00	0,74	691,4
	C/T	30 (10,0%)	19 (9,1%)	0,90 (0,49-1,66)		
Лог-аддитивная	---	---	---	0,80 (0,45-1,42)	0,44	690,9

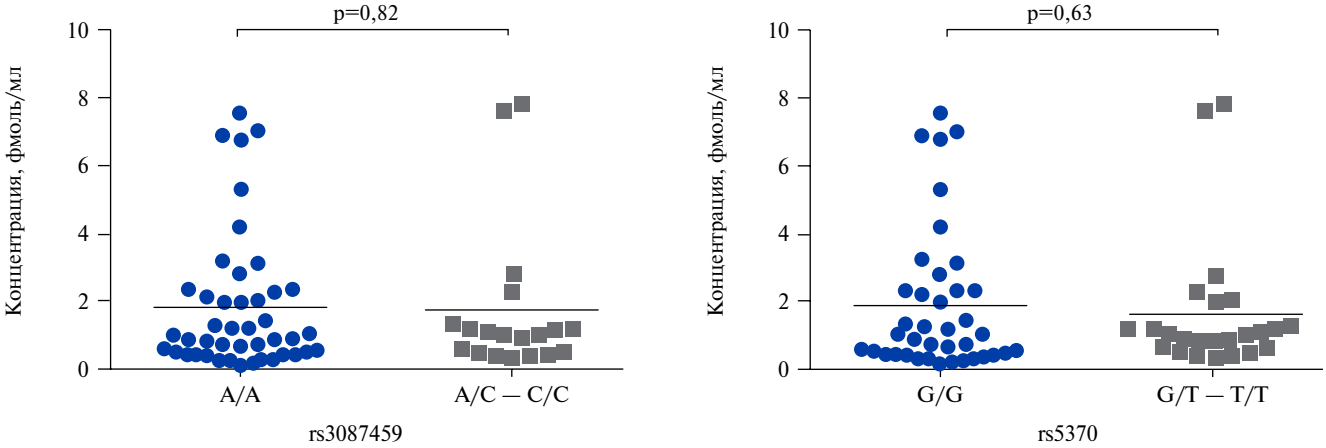

Рис. 1. Зависимость концентрации эндотелина-1 в сыворотке крови от носительства генотипов полиморфных сайтов *EDN1*.

отклонений от расчетных частот не наблюдалось, однако частота аллеля T и в этой группе была ниже (18%, ХВ p=0,82), чем в опубликованных данных.

Для анализа ассоциаций полиморфных вариантов и количественного содержания в сыворотке крови из всей выборки пациентов с ИЭ выбрано 73 пациента без наркозависимости, имеющих ИЭ нативного митрального клапана. Исключение из этого типа анализа реципиентов протезов (протезный эндокардит), лиц с врожденными аномалиями аортального клапана и наркозависимых продиктовано необходимостью условной стандартизации факторов, при которых на экспрессию специфических белков эндотелия не будут воздействовать дополнительные факторы риска.

Концентрации эндотелина-1 (ЭТ-1), sE-селектина и sP-селектина определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем компаний eBioscience/Affymetrix (США) и R&D Systems (США) в соответствии с инструкцией производителя. Анализ иммуноферментных реакций проводили с использованием микропланшетного ридера УНИПЛАН/АИФР-01 (Пикон, Россия).

Статистическая обработка данных проведена с использованием специализированного программного обеспечения SNPstats и GraphPadPrism (GraphPadSoftware). Для обработки количественных данных использован тест для независимых выборок Краскала-Уолиса и U-критерий Манна-Уитни. Центральную тенденцию выражали в виде медианы (Me), рассеяние в виде 25-го и 75-го (25Q; 75Q) процентилей. Для графической демонстрации корреляционных связей между двумя переменными использованы диаграммы рассеяния. Однолокусный анализ связи генотипов с переменного ответа проведен на математическом построении пяти моделей наследования: кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная. Количественное выражение рисков производили в виде отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала к нему (95% ДИ). Для выбора из нескольких статистических моде-

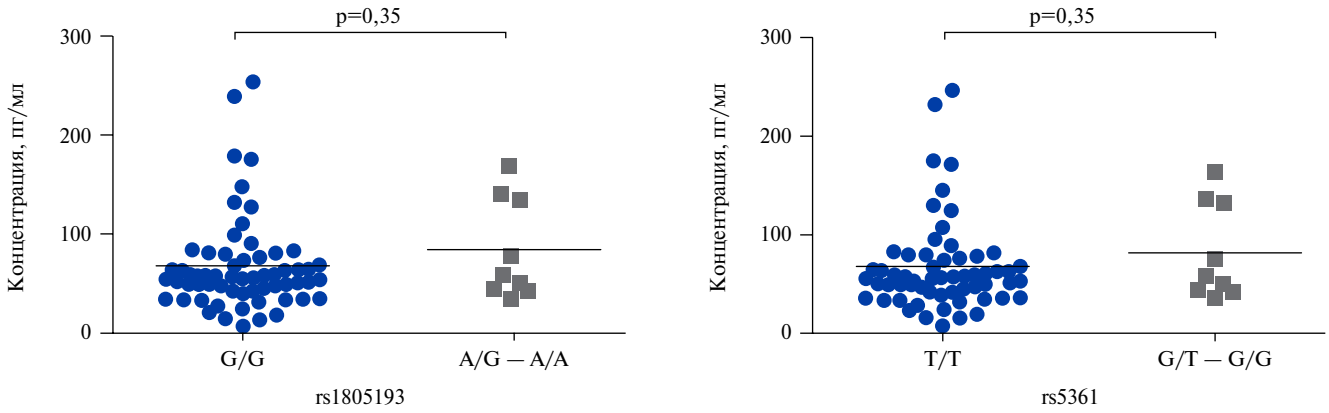

Рис. 2. Зависимость концентрации sE-селектина в сыворотке крови от носительства генотипов полиморфных сайтов *SELE*.

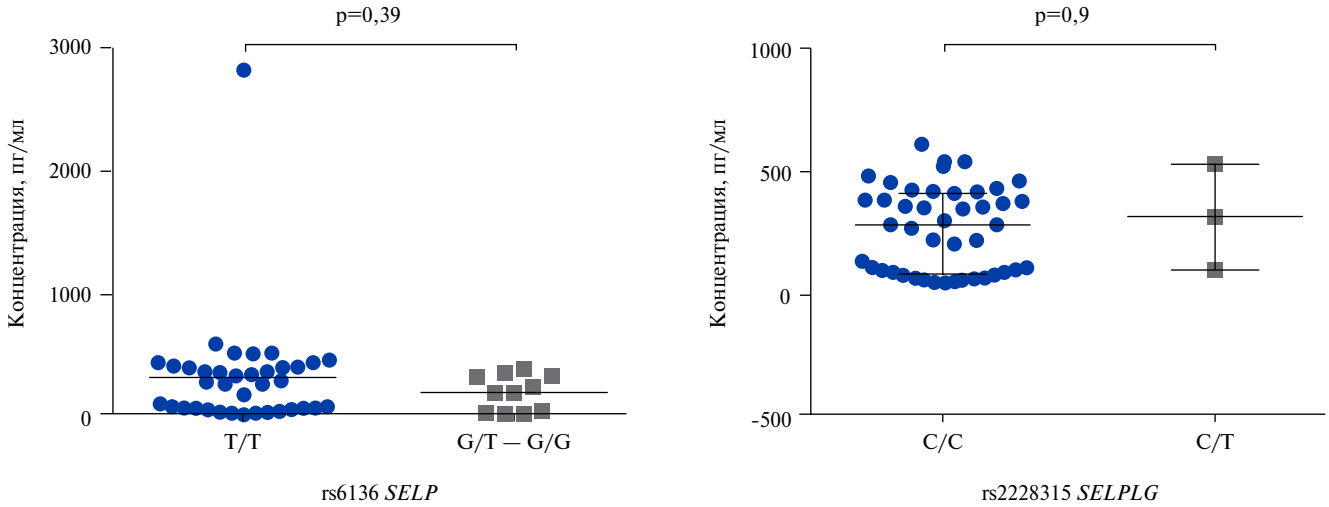

Рис. 3. Зависимость концентрации sP-селектина в сыворотке крови от носительства генотипов полиморфных сайтов *SELP* и *SELPLG*.

лей применили информационный критерий Акаике (ИКА) — самой вероятной моделью наследования являлась модель наименьшего ИКА.

Критическим уровнем статистической значимости отличий между анализируемыми параметрами принят уровень $p<0,05$.

Результаты

При анализе ассоциаций выявлена одна статистически значимая связь (p=0,027): полиморфный сайт rs5370 гена *EDN1* (табл. 2) связан с увеличением риска развития ИЭ у гетерозиготных носителей минорного аллеля T по сверхдоминантному типу наследования. Иных ассоциаций не обнаружено.

Установлено, что у лиц с ИЭ концентрации эндотелина-1 колебались от 0,12 до 7,84 фмоль/мл, однако среднее значение по группе составило 0,99 (0,46; 2,19) фмоль/мл. В ассоциативном анализе между носительством гомозиготных генотипов по мажорному аллелю против генотипов, содержащих минорный аллель, полиморфных сайтов гена *EDN1* и концентрацией ЭТ-1 в сыворотке крови у пациентов с ИЭ нативного митрального клапана статистически значимой разницы не определено (рис. 1).

Аналогично, не обнаружено статистически значимых связей между сывороточными концентрациями sE-селектина (рис. 2) в сыворотке крови (средняя концентрация 56,65 (43,35; 84,05) пг/мл) и носительством гомозиготных генотипов по мажорному аллелю против генотипов, содержащих минорный аллель, полиморфных сайтов гена *SELE*.

Полиморфные сайты генов *SELP* и *SELPLG* также не продемонстрировали влияния на количество (в среднем 281,3 (78,2; 410,9) пг/мл) сывороточного содержания sP-селектина (рис. 3) у пациентов обследуемой группы.

Иных закономерностей выявлено в исследовании не было.

Обсуждение

Сосудистый эндотелий выполняет свои основные функции, в том числе и участие в воспалительном ответе, за счет биологически активных веществ [13]. Известно, что здоровый эндотелий представляет

собой неадгезивную поверхность, а дисфункцию эндотелия сосудов можно рассматривать как дисбаланс между вазодилатирующими и вазоконстрикторными механизмами, со сдвигом в сторону вторых. От степени этого дисбаланса, и способности эндотелиоцитов противостоять ему, зависит дальнейшее развитие биологических событий в стенке сосудов. Традиционно считают, что эндотелиальная дисфункция непосредственно связана с нарушением равновесия медиаторов, обеспечивающих регуляцию сосудистого тонуса: эндогенными факторами сосудистой релаксации (NO, натрийуретический пептид типа С) и констрикции (эндотелин-1, простагландин, F2a) [14]. Литературные данные свидетельствуют о сложном патогенезе дисбаланса функции эндотелия. В его развитии наиболее вероятно принимают участие множество факторов, начиная от вариабельности кодирующих биологически активные белки генов и возраста, заканчивая факторами образа жизни и окружающей среды. Экспериментальные данные и наблюдения подтверждают предположение, что патогенные микроорганизмы прикрепляются к сосудистым эндотелиальным клеткам или участкам сосудистого повреждения, инициирующим внутрисосудистые инфекции только при наличии определенных условий микроокружения. В обзоре Golias C, et al. [9] обосновали парадигму патофизиологии клеточной адгезии при развитии ИЭ, в которой эндотелий играет ключевую роль.

В работах наших соотечественников также показано значение эндотелиальной дисфункции при ИЭ. Доказано, что у пациентов с ИЭ преобладает вазоконстрикция. Эндотелин-1 является самым распространенным из семейства эндотелинов, а также самым мощным вазоконстриктором, концентрация которого в плазме крови человека в норме составляет 0,1-1 фмоль/мл или не выявляется [15]. Соответственно, при патологических состояниях, сопровождающихся эндотелиальной дисфункцией, его концентрации должны увеличиваться относительно нормальных значений. Однако в нашем исследовании показано, что у обследованных пациентов среднее значение концентраций не отличалось от описываемых для нормы (0,99 (0,46; 2,19) фмоль/мл). Тем не менее, у отдельных пациентов регистрировались более высокие значения (до 7,84 фмоль/мл), что предположительно могло быть связано с полиморфизмом гена, его кодирующего, и с более активной экспрессией. Однако таких закономерностей выявлено не было. Предполагаем, что такое состояние обусловлено медикаментозной терапией и подавлением воспалительного ответа на момент обследования практически у всех поступающих в стационар пациентов. Тем не менее, определенное количество лиц может иметь более выраженное воспаление, ассоциированное с определенными видами микроорганизмов. В этом отношении рациональным представляется сбор сепарированных по нескольким признакам групп (как то – этиологический агент, давность инфекции, длительность и объем антимикробной терапии и концентрация эндотелина-1) с последующим проведением ассоциативных исследований внутри таких структурированных групп. К сожалению, в настоящее время наша группа не обладает возможностью провести такое исследование по причине очень низкой диагностической ценности бактериологических посевов (73,5% пациентов не имеют подтверждения этиологического агента в бактериальных культурах).

Высокие же концентрации селектинов (для sE =56,65 (43,35; 84,05) пкг/мл и sP =281,3 (78,2; 410,9) пг/мл в сравнении с данными здоровых лиц — sE =32,8 (18,2±1,33) [16] и sP =39,39±1,52 [17]) вполне закономерны. Е-селектин и Р-селектин синтезируются в эндотелиальных клетках, и в покое их концентрации незначительны. В случае повреждения ткани и последующей активации эндотелия, например цитокинами (интерлейкином-1(IL-1) или фактором некроза опухоли (TNFα) в первую очередь) или некоторыми продуктами бактериального распада, активирующими фактор транскрипции NF-kB, селектины способны быстро транспортироваться из клетки на поверхность. При этом, Р-селектин хранится в особых гранулах — “тельцах Вайбеля-Паладе” и его генная и белковая транскрипция стимулируется провоспалительными агентами, такими как TNFα, IL-1, липополисахаридом (LPS) [18], и под воздействием противовоспалительного интерлейкина-4 (IL-4) [19]. В отличие от Р-селектина, Е-селектин не хранится в клетке в запасе и его необходимо транскрибировать, переводить и переносить на поверхность клетки [16]. При этом в нашей ранней работе [20] показано наличие дисфункции цитокиновой регуляции воспалительного ответа у пациентов с ИЭ. Соответственно, дисбаланс иммунного ответа не может не найти отражения в развитии дисфункции эндотелия. В то же время, в настоящей работе мы не нашли никакой взаимосвязи между изучаемыми полиморфными сайтами соответствующих генов и рисками развития ИЭ, а также их концентрации не имели зависимости от полиморфизма в этих сайтах. Помимо причин, описанных выше, существует вероятность, что при выборе полиморфных сайтов для исследования мы упустили более значимый сайт, но до нашего исследования, насколько нам известно, подобных поисков генетических полиморфизмов не производилось. Результаты же первого исследования GWAS по связи генной изменчивости с ИЭ опубликованы совсем недавно — в апреле 2018г [21]. Авторы изучали потенциальную генетическую предрасположенность

к развитию ИЭ в случае бактериемии *S. aureus*. В исследовании определено, что четыре SNP, близко расположенных на хромосоме 3, предположительно связанны с *S. aureus*-ассоциированным ИЭ. При этом, определены не рисковые, а протективные эффекты минорных аллелей SNP гена *SLC7A14* (Solute Carrier Family 7, член 14). Этот ген кодирует гликозилированный катионный аминокислотный транспортерный белок с 14 транс-мембранными доменами. Экспрессируется в основном в фибробластах кожи, нейронной ткани и первичных эндотелиальных клетках, и, как прогнозируется, белок опосредует лизосомальное поглощение катионных аминокислот. Авторы не нашли никакой связи с вариабельностью генов врождённого иммунного и воспалительного ответа, ранее описанных в литературе [22-25], или с генами эндотелиальной функции [26]. Однако сами исследователи сообщают, что основным ограничением проведенного ими исследования является отсутствие статистической значимости результатов, полученных в GWAS, за счет малых размеров выборки, анализа только *S.aureus*-ассоциированного ИЭ и скудной информации о функции белка SLC7A14, что затрудняет интерпретацию его роли в патофизиологическом механизме, связывающем экспрессию этого гена с появлением ИЭ. В заключении авторы говорят о том, что для подтверждения результатов потребуются более крупные когорты, но такие исследования будут очень востребованы.

Заключение

Проведенное нами исследование подтверждает присутствие маркеров эндотелиальной дисфункции в крови пациентов с ИЭ. Определено наличие одной ассоциации между полиморфным сайтом rs5370 гена *EDN1* и увеличением риска развития ИЭ у гетерозиготных носителей минорного аллеля T по сверхдоминантному типу наследования. В то же время, мы не обнаружили связи между полиморфизмом изучаемых сайтов генов *EDN1*, *SELE*, *SELP*, *SELPLG* и ассоциированных с ними белков. Однако наше исследование имеет достаточное количество ограничений, что обусловливает потребность дополнительных исследований для подтверждения этих наблюдений и подробного описания механизма того, как вариабельность генов определяет предрасположенность к развитию ИЭ.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 546-2015-0011 “Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов”.

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

Литература/References

1. Habib G, Lancellotti P, Antunes M, et al. 2015 ESC guidelines for the management of infective endocarditis. Russian Journal of Cardiology. 2016;21(5):65-116. (In Russ.) Habib G, Lancellotti P, Antunes M, et al. Рекомендации ESC по ведению больных с инфекционным эндокардитом 2015. Российский кардиологический журнал. 2016;21(5):65-116. doi:10.15829/1560-4071-2016-5-65-116.
2. Gurevich MA. Several points about infective endocarditis in present-day practice. Almanac of Clinical Medicine. 2014;(35):30-3. (In Russ.) Гуревич М.А. Некоторые особенности современного инфекционного эндокардита. Альманах клинической медицины. 2014;(35):30-3. doi:10.18786/2072-0505-2014-35-30-33.
3. Faraji R, Behjati-Ardakani M, Moshtaghioun SM, et al. The diagnosis of microorganism involved in infective endocarditis (IE) by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR: A systematic review. The Kaohsiung journal of medical sciences. 2018;34(2):71-8. doi:10.1016/j.kjms.2017.09.011.
4. Jans C, Boleij A. The road to infection: Host-microbe interactions defining the pathogenicity of Streptococcus bovis/Streptococcus equinus complex members. Frontiers in microbiology. 2018;9:603. doi:10.3389/fmicb.2018.00603.
5. Mevada V, Patel R, Patel B, et al. Comparative homology model building and docking evaluation for RNA III inhibiting peptide of Multi drug resistant Staphylococcus aureus strain MRSA252. ComputBiol Chem. 2018;73:189-99. doi:10.1016/j.compbiolchem.2018.02.011.
6. Boujelben I, Gdoura R, Hammami A. A broad-range PCR technique for the diagnosis of infective endocarditis. Brazilian Journal of Microbiology. 2018. doi:10.1016/j.bjm.2017.03.019.
7. Domitrovic TN, Hujer AM, Perez F, et al. Multidrug Resistant Pseudomonas aeruginosa Causing Prosthetic Valve Endocarditis: A Genetic-Based Chronicle of Evolving Antibiotic Resistance. In Open forum infectious diseases. 2016;3(4):ofw188. doi:10.1093/ofid/ofw188.
8. Hoen B, Duval X. Epidemiology of infective endocarditis. La Revue du praticien. 2012;62(4):511-4.
9. Golias C, Batistatou A, Bablekos G, et al. Physiology and pathophysiology of selectins, integrins, and IgSF cell adhesion molecules focusing on inflammation. A paradigm model on infectious endocarditis. Cell communication & adhesion. 2011;18(3):19-32. doi:10.3109/15419061.2011.606381.
10. Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, et al. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. Expert opinion on therapeutic targets. 2007;11(11):1473-91. doi:10.1517/14728222.11.11.1473.
11. Ponasenko AV, Khutornaya MV, Antonova LV, et al. Dynamics of concentration of cell adhesion molecules at formation systemic inflammatory response after surgery acquired heart diseases. Fundamental research. 2014;7-3:549-53. (In Russ.) Понасенко А.В., Хуторная М.В, Антонова Л.В. и др. Динамика концентраций молекул клеточной адгезии при формировании системного воспалительного ответа после оперативного лечения приобретённых пороков сердца. Фундаментальные исследования. 2014;7-3:549-53.
12. Habib G, Hoen B, Tornos P, et al. ESC Committee for Practice Guidelines. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer. Eur. Heart J. 2009;30,19:2369-413.
13. Inzhutova AI, Larionov AA, Salmina AB, et al. Molecular and cellular mechanisms of endothelial dysfunction in different pathology. report 1. Siberian Medical Journal (Irkutsk). 2010;5:85-8. (In Russ.) Инжутова А.И., Ларионов А.А., Салмина А.Б. и др. Молекулярно-клеточные механизмы эндотелиальной дисфункции различного генеза (сообщение 1). Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2010;5:85-8.
14. Popova AA, Berezikova EN, Mayanskaya SD. Mechanism of endothelial dysfunction development. Siberian Medical Review. 2010;64(4):7-11. (In Russ.) Попова А.А., Березикова Е.Н., Маянская С.Д. Эндотелиальная дисфункция и механизмы ее формирования. Сибирское медицинское обозрение. 2010;64(4):7-11.
15. Dremina NN, Shurygin MG, Shurygina IA. Endothelin is normal and with pathology. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2016;10(2):210-4. (In Russ.) Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А. Эндотелин в норме и при патологии. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016;10(2):210-4.
16. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart

disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. Circulation. 1997;96(12):4219-25. doi:10.1161/01.CIR.96.12.4219.

17. Yagoda AV, Koroj PV, Gilyazova GI. Selectins as predictors of stable virological clearance in chronic viral hepatitis C. Medical news of north Caucasus. 2013;8(3):5-9. (In Russ.) Ягода А.В., Корой П.В., Гилязова Г.И. Селектины как предикторы стабильного вирусологического клиренса при хроническом вирусном гепатите С. Медицинский вестник северного Кавказа. 2013; 8(3):5-9. doi:10.14300/mnnc.2013.08001.
18. Janeway C. Immunobiology: the immune system in health and disease. New York: Garland Science. 2005. ISBN 0-8153-4101-6.
19. Wang J, Li J, Liu Q. Association between platelet activation and fibrinolysis in acute stroke patients. Neurosci. Lett. 2005;384(3):305-9. doi:10.1016/j.neulet.2005.04.090.
20. Ponasenko AV, Khutornaya MV, Golovkin AS, et al. Potential role as a proinflammatory cytokines in postoperative severe systemic inflammatory response syndrome undergoing heart valve replacement surgery. Complex Issues of Cardiovascular Diseases. 2013;(4):71-6. (In Russ.) Понасенко А.В., Хуторная М.В., Головкин А.С. и др. Вклад провоспалительных цитокинов в формирование системного воспалительного ответа после операций протезирования клапанов сердца. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2013;4:71-6.
21. Moreau K, Clemenceau A, Le Moing V, et al. Human Genetic Susceptibility to Native Valve Staphylococcus aureus Endocarditis in Patients With S. aureus Bacteremia: Genome-Wide Association Study. Frontiers in microbiology 2018; 9: 640. doi:10.3389/fmicb.2018.00640.
22. Golovkin AS, Ponasenko AV, Yuzhalin AE, et al. An association between single nucleotide polymorphisms within TLR and TREM-1 genes and infective endocarditis. Cytokine. 2015;71:16-21. doi:10.1016/j.cyto.2014.08.001.
23. 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;1-21. doi:10.1155/2017/7962546.
24. 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. doi:10.1371/journal.pone.0110151.
25. Bustamante J, Tamayo E, Flórez S, et al. Toll-like receptor 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis Rev EspCardiol. 2011;64(11):1056-9. doi:10.1016/j.recesp.2011.02.024.
26. Kerrigan SW, McDonnell C. Dysregulation of the endothelium following Staphylococcus aureus infection. BiochemSoc Trans. 2015;43(4):715-9. doi:10.1042/BST20140309.