

УДК 616-092.4

Петров А.А., Сепп А.В., Петрова О.С., Чарторижская Н.Н.,  
Страмбовская Н.Н., Витковский Ю.А.

### ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА D-1208I НА ЭКСПРЕССИЮ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА

*ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита*

*Проведено исследование влияния генетического полиморфизма D-1208I на экспрессию TF. Установлено, что гетерозиготные носители полиморфизма D-1208I имели сниженные уровни макрофагальной и моноцитарной экспрессии TF, по сравнению с гомозиготными.*

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм D-1208I, TF

*Petrov A.A., Sepp A.V., Petrova O.S., Chartorizhskaya N.N., Strambovskaya N.N., Vitkovsky Yu.A.*  
**INFLUENCE OF D-1208I GENE POLYMORPHISM ON TISSUE FACTOR  
EXPRESSION**

*Abstract. Influence of D-1208I polymorphism on TF expression was observed. It was established, that D-1208I polymorphism heterozygous had shown to reduce the levels of macrophagic and monocytic TF expression in comparison with homozygous.*

**Key words:** genetic polymorphism D-1208I, TF

#### **Введение**

В настоящее время считается, что в предрасположенности к развитию тромботических заболеваний большое значение имеет генетический полиморфизм [3].

Известно, что тканевой фактор (TF) свертывания крови играет ключевую роль в развитии тромбоза [13]. E. Aranaud et al. (2000), описали шесть полиморфизмов TF. Из них три однонуклеотидных мутации А-603G, С-1322Т, С-1812Т и одна делеция/инсерция 18 bp в регионе -1208 оказались полностью конкордантны. Для удобства обозначения аллель, не содержащая инсерцию в позиции -1208, несущая С в -1812/1322 и А в -603, обозначена буквой D, тогда как аллель, содержащая инсерцию в регионе -1208 и ассоциированные с ней полиморфизмы, была обозначена буквой I. Два других варианта - С-21Т и G-1442С не были конкордантными и встречались крайне редко [9]. Влияние мутации D-1208I на экспрессию TF до конца не изучено. Данные, касающиеся этого вопроса, противоречивы.

В связи с этим целью нашей работы явилось изучение влияния генетического полиморфизма D-1208I на экспрессию TF.

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Исследовать показатели функциональной экспрессии TF моноцитами крови здоровых лиц у носителей различных аллельных вариантов этой мутации.
2. Оценить воздействие полиморфизма на уровень экспрессии TF макрофагами легочной ткани у больных с летальным исходом гриппа А H1N1.

#### **Материалы и методы**

Под наблюдением находились 84 здоровых волонтера. Из них 43 мужчины и 41 женщина. Средний возраст составил  $37 \pm 11$  лет.

Для оценки экспрессии TF макрофагами легочной ткани использован материал 20 пациентов, погибших от гриппа А H1N1 в 2009 году. Средний возраст этих больных составил  $40 \pm 14$  лет (6 мужчин и 14 женщин).

По национальной принадлежности все объекты исследования являлись русскими, родившимися и проживающими на территории Забайкальского края.

Генетический полиморфизм определяли при помощи полимеразной цепной реакции наборами реактивов ООО "Литех" (Россия). Детекцию продукта амплифика-

ции проводили в 3% агарозном геле. Для детекции мутации TF D-1208I использовали 3 ассоциированных конкордантных полиморфизма TF A-603G, C-1322T и C-1812T.

Генотипы исследованного контингента проверяли на соответствие закону Харди-Вайнберга.

Исследование функциональной экспрессии TF моноцитами крови осуществляли импедансным методом, предложенным R.A. Santucci et al. (2000). Для эксперимента использовали цельную цитратную кровь. В две полистироловые пробирки типа "Eppendorf" вносили 900 мкл цельной крови. В одну из них добавляли 100 мкл препарата ЛПС в концентрации 100 мкг/мл ООО "Медгамал" (Россия), в другую - 100 мкл стерильного физиологического раствора NaCl. Пробирки встряхивали на вортексе, помещали в термостат и инкубировали при температуре 37°С в течение 4-х часов. После инкубации кровь перемешивали и использовали для исследования функциональной экспрессии TF. Для этого 300 мкл цельной цитратной крови добавляли в керамическую кювету, которая предварительно была обработана 40 мкл 0,1 М раствора CaCl<sub>2</sub>. Время свертывания крови регистрировали с помощью импедансного коагулографа НМЗ (Россия). Для оценки экспрессии тканевого фактора моноцитами сравнивали время свертывания крови с добавлением препарата ЛПС и без него. Об экспрессии TF судили по степени сокращения времени коагуляции, выражаемой в процентах по формуле:  $(t_1 - t_2) \times 100\% / t_1$ , где:

$t_1$  - время свертывания нестимулированной крови;

$t_2$  - время свертывания стимулированной крови.

Для иммуногистохимического исследования использовали ткань легких, полученную при аутопсии больных, умерших от осложненного гриппа А(Н1N1) в октябре-декабре 2009 г. в Забайкальском крае. Препараты фиксировали в нейтральном 10% растворе формалина в течение 24 часов. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4 мкм стандартным способом. Иммуногистохимическое изучение препаратов осуществляли биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом

с мышинными моноклональными антителами к тканевому фактору человека - TF (TF9-10H10) производства Santa Cruz Biotechnology (США). Предварительную демаскировку антигенов проводили путем двукратной обработки образцов в фосфатно-солевом буфере (рН = 6,0) в микроволновой печи при мощности излучателя 450 Вт в течение 15 минут с интервалом в 4 минуты между процедурами для охлаждения. После инактивации эндогенной пероксидазы срезы инкубировали с первичными антителами в разведении 1:250 на протяжении 30 минут при температуре 36°С. В качестве вторичных антител использовали биотинилированные козы антимышинные антитела. Визуализацию осуществляли раствором диаминобензидина. Дополнительную окраску срезов проводили водным раствором гематоксилина Гаррисона.

Экспрессию TF на макрофагах легочной ткани оценивали полуколичественно. Результат считали отрицательным, если окрашенных клеток определялось менее чем 10%. В остальных случаях, положительный результат регистрировался по шкале от 1 до 4 баллов: 1 - 10-25% окрашенных клеток, 2 - 25-50% окрашенных клеток, 3 - 50-75% окрашенных клеток, 4 - более 75% окрашенных клеток в одном поле зрения. В каждом препарате просматривали 10 полей зрения.

Статистическая обработка проведена с использованием t- критерия Стьюдента и U-теста Манна-Уитни.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования частоты полиморфизма TF D-1208I приведены в таблице 1. Распределение генотипов этой мутации во всех исследованных группах соответствовало соотношению Харди-Вайнберга.

Таблица 1

Частота встречаемости генотипов мутации TF D-1208I, %

	Здоровые лица, n=84	Больные, n=20
Генотип DD	27,4	35
Генотип DI	52,2	40
Генотип II	21,4	25

Установлено, что средний уровень функциональной экспрессии TF моноцитами методом Santucci R.A. (2000) в группе волонтеров составил  $179,4 \pm 66,2$  %. Обнаружено, что носители гетерозиготных аллельных вариантов демонстрировали сниженную функциональную экспрессию TF, по сравнению с гомозиготными (табл. 2).

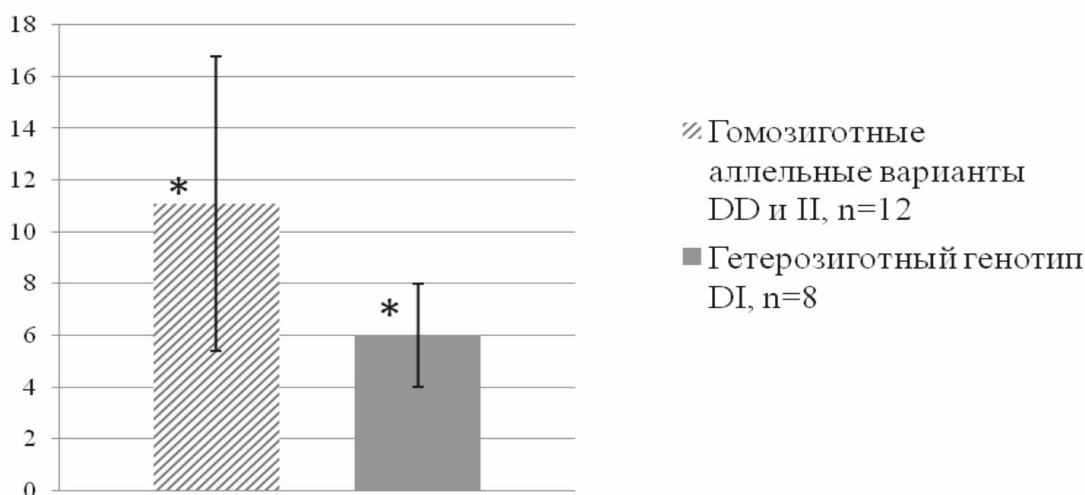
Таблица 2

Функциональная экспрессии TF у лиц с разными генотипами полиморфизма D-1208I,  $M \pm SD$  %

Генотипы DD и II, n=41	$198,6 \pm 72,9^*$
Генотип DI, n=43	$160,1 \pm 53,0^*$

\* t-тест,  $p=0,007$  при сравнении различий между уровнем экспрессии TF в группах носителей гетерозиготных и гомозиготных аллельных вариантов.

Выявлено, что уровень экспрессии TF макрофагами легких у носителей гетерозиготных и гомозиготных аллелей D-1208I существенно различался (рис. 1). Средний уровень этого показателя в группе гетерозиготных больных составлял 6 баллов, в то время как в группе гомозиготных пациентов - 11,1 баллов ( $p=0,016$ ).



**Рис. 1.** Экспрессия TF макрофагами легочной ткани у пациентов с различными генотипами мутации D-1208I,  $M \pm SD$  баллы.

U-тест \*  $p=0,016$  при сравнении различий между уровнем экспрессии TF в группах носителей гетерозиготного и гомозиготных генотипов.

Известно, что повышение экспрессии TF сопряжено с риском тромбозов. Доказано, что экспрессия TF в моноцитах существенно повышена у больных с нестабильной стенокардией и при выраженном атеросклерозе [4, 11]. Последнее положение подтверждено исследованиями Santucci R. A et al. (2000), которые установили, что активность TF в цельной крови выше у больных с нестабильной стенокардией нежели у здоровых лиц. Показано также, что при выраженном атеросклерозе тканевой фактор в высокой степени экспрессируется пенстыми клетками, производными макрофагов, внутри атеросклеротических бляшек [6]. Эти результаты подтверждают, что высокий уровень TF на поверхности поврежденной бляшки запускает тромбоз и инфаркт миокарда. Известно, что aberrantная экспрессия тканевого фактора запускает внутрисосудистый тромбоз в поздних стадиях онкологических заболеваний [8]. Как выяснилось, повышение экспрессии TF вносит весомый вклад в расстройство коагуляции при сепсисе [5]. Мы установили, что гетерозиготные носители D-1208I имеют значительно сниженный уровень как функциональной моноцитарной экспрессии, так и экспрессии TF макрофагами лег-

ких, по сравнению с носителями гомозиготных аллелей. Исследования, касающиеся этого вопроса немногочисленны. Имеются данные, что I-аллель обуславливает повышение экспрессии тканевого фактора на 40% и коррелирует с укорочением времени свертывания крови [12]. Существуют работы, продемонстрировавшие тот факт, что больные с септическими осложнениями, являющиеся носителями II гаплотипа, имеют в два раза повышенный базальный уровень TF-mRNA, по сравнению с носителями генотипа DD [8]. Вместе с тем, исследования проведенные нами ранее показали, что гетерозиготное носительство полиморфизма D-1208I совершенно не встречается у пациентов с гриппом А H1N1, погибших от ТЭЛА, тогда как в контрольной группе его распространенность достигает 51% [2]. Вероятно, на экспрессию TF влияет также полиморфизм CD14 [1]. Тот факт, что гетерозиготный аллельный вариант сопровождается сниженной экспрессией TF на поверхности макрофагов, объясняет его протективное влияние на развитие ТЭЛА.

#### Выводы:

Гетерозиготные носители полиморфизма D-1208I имеют сниженный уровень макрофагальной и моноцитарной экспрессии TF, по сравнению с гомозиготными.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Генетический полиморфизм CD14, TNF $\alpha$  и FCGR2A у больных гриппом А H1N1 в Забайкальском крае / Петров А.А. и др. // Мед иммунол. - 2011. - Т. 13. - № 1. С. 83-86.
2. Петров А.А. Мутации FII, TF, FV и MTHFR у больных с летальным исходом гриппа А H1N1 в Забайкальском крае / А.А. Петров, О.С. Петрова // Материалы Международного молодежного научного форума "ЛЮМОНОСОБ-2012" [Электронный ресурс] - М.: МАКСПресс, 2012. - 1 электрон. опт. диск
3. D'Amato N. Aortic Thrombus and Acute Pulmonary Embolism in an Individual Heterozygous for the MTHFR C677-T Mutation / N. D'Amato, M. Correale, C. D'Agostino // Rev Esp Cardiol. - 2010. - Vol. 63. - №11. - P. 1366.
4. Evidence for timedependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or instable angina / B. Jude [et al.] // Circulation. - 1994. - Vol. 90. P. 1662-1668.
5. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular, tissue factor in human endotoxemia / O. Aras [et al.] // Blood. - 2004. - Vol. 103. - P. 4545-4553.
6. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque / J.N. Wilcox [et al.] // Proc. Natl Acad Sci. - 1989. -Vol. 86. - P. 2839-2843.
7. Measurement of tissue factor activity in whole blood / R.A. Santucci [et al.] // J Thromb Haemost. - 2000. -Vol. 83. - P. 445-454 Polymorphism in the tissue factor region is associated with basal but not endotoxin induced tissue factor-mRNA levels in leukocytes / C. MARSIK [et al.] // J Thromb haemost. - 2006. Vol. 4. - P. 745-749.
8. Polymorphisms in the 5' regulatory region of the tissue factor gene and the risk of myocardial infarction and venous thromboembolism: the ECTIM and PATHROS studies / E. Arnaud [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. - 2000. - №20. - P. 892-898.
9. Rickles F.R. Tissue factor, thrombin, and cancer / F.R. Rickles, S. Patierno, P.M. Fernandez. // Chest. - 2003. - Vol. 124. - P. 58-68.
10. Tissue factor in atherosclerosis / E. Tremoli [et al.] // Atherosclerosis. - 1999. - Vol. 144. - P. 273-283.
11. Tissue Factor-603 A-G promoter polymorphism is associated with human monocyte constitutive but not with LPS induced gene expression / J. L. Reny [et al.] // J Thromb Haemost. - 2003. Suppl. 1. - abstr № OC236
12. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis / M. A. Maly [et al.] // Physiol. Res. - 2007. - Vol. 56. - P. 685-695.