

Полиморфизм гена фактора некроза опухолей альфа у больных эссенциальной артериальной гипертензией

Я.Р. Тимашева, Т.Р. Насибуллин, А.Н. Закирова¹, О.Е. Мустафина

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук; ИГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет. Уфа, Россия

Tumor necrosis factor alpha gene polymorphism in patients with essential hypertension

Y.R. Timasheva, T.R. Nasibullin, A.N. Zakirova¹, O.E. Mustafina

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Centre, Russian Academy of Science; I Bashkir State Medical University. Ufa, Russia

Цель. Провести анализ ассоциаций -308G/A полиморфизма гена фактора некроза опухолей альфа (TNFA) с эссенциальной артериальной гипертензией (ЭАГ).

Материал и методы. В исследование были включены 354 пациента с ЭАГ и 295 здоровых людей. Дезоксирибонуклеиновую кислоту выделяли из венозной крови. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции в сочетании с рестрикционным анализом ампликонов.

Результаты. Частота генотипа TNFA -308*G/*G среди больных ЭАГ, перенесших инсульт, была значительно ниже, чем в контрольной группе – 60,98% vs 78,98% (p=0,015). У больных ЭАГ с генотипом TNFA -308*G/*G понижен относительный риск развития инсульта.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что полиморфизм -308G/A гена TNFA вносит вклад в развитие инсульта у больных ЭАГ.

Ключевые слова: первичная (эссенциальная) артериальная гипертензия, цитокины, генетический полиморфизм, инсульт, анализ ассоциаций.

Aim. To analyze the association between tumor necrosis factor-alpha gene -308 G/A polymorphism and essential arterial hypertension (EAH).

Material and methods. The study included 354 EAH patients and 295 age-matched healthy subjects. DNA was extracted from venous blood. Genotyping was performed using polymerase chain reaction followed by restriction amplicon analysis.

Results. TNFA -308*G/*G genotype frequency was significantly lower among EAH patients with stroke than in control group (60,98% vs 78,98%; p=0,015). EAH patients with TNFA -308 *G/*G genotype had lower stroke risk (OR=0,38; 95% CI: 0,21-0,83).

Conclusion. The results obtained suggest that TNFA gene -308G/A polymorphism is involved in stroke pathogenesis among EAH patients.

Key words: Primary (essential) arterial hypertension, cytokines, gene polymorphism, stroke, association analysis.

Введение

Эссенциальная артериальная гипертензия (ЭАГ) является многофакторным заболеванием, в развитии которого важную роль играет генетическая предрасположенность [1]. Очерчен ряд генов-кандидатов, которые, как полагают, вносят свой вклад в развитие ЭАГ [2]. Среди них гены компонентов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, участников липид-

ного обмена, гены синтаз оксида азота и многие другие. Начиная с 90-х годов прошлого века, большое внимание уделяется генам цитокинового каскада.

Воспаление – основной патофизиологический субстрат сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [3]. Повышенная экспрессия эндотелием медиаторов воспаления лежит в основе атеросклеротического повреждения сосу-

© Коллектив авторов, 2007
Тел.: (347) 235-60-88
Факс: (347) 235-61-00
e-mail ianinat@mail.ru

дистой стенки [4]. Дисфункция эндотелия, наряду с нарушением свертываемости крови и гиперхолестеринемией, приводит к нарушению тонуса сосудов, вазоконстрикции и тромбообразованию. Цитокины являются ключевыми медиаторами межклеточных взаимодействий, в т.ч. в процессе воспаления. Клетки эндотелия человека способны продуцировать и реагировать на широкий спектр про- и противовоспалительных цитокинов.

Фактор некроза опухолей альфа (ФНО- α) является провоспалительным цитокином. Обнаружено, что ФНО- α вырабатывается эндотелиоцитами, гладкомышечными клетками (ГМК), а также макрофагами, входящими в состав атеросклеротической бляшки [5]. Вначале ФНО- α был идентифицирован как фактор, способствовавший геморрагическому некрозу опухолей, но затем обнаружилось, что его эффекты гораздо разнообразнее. В экспериментах на модельных объектах обнаружено, что ФНО- α может вызвать дисфункцию левого желудочка (ЛЖ), отек легких и кардиомиопатию; оказалось, что ишемия приводит к персистирующей гиперэкспрессии ФНО- α [6]. Ген ФНО- α (TNFA) локализован на коротком плече хромосомы 6 (6p21.3), в кластере генов главного комплекса гистосовместимости, между локусами HLA-B и HLA-DR [7]. Описаны многочисленные полиморфизмы в составе гена, в т.ч. однонуклеотидная замена гуанина (аллель *G или TNF*1) на аденин (аллель *A или TNF*2) в позиции 308 промотора. Показано, что аллель TNFA-308*A ассоциирован с повышенной выработкой ФНО- α [8].

Цель настоящей работы – анализ ассоциаций полиморфизма -308 G/A гена TNFA с риском развития ЭАГ и ее клинических фенотипов.

Материал и методы

В исследование были включены 354 пациента с ЭАГ, находившихся на стационарном лечении в Республиканском кардиологическом диспансере (г.Уфа). Диагноз устанавливали в соответствии с Национальными рекомендациями по профилактике, диагностике и лечению артериальной гипертензии второго пересмотра, Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) 2004. Клиническая характеристика группы пациентов представлена в таблице 1. Контрольную группу составили 295 человек без признаков ССЗ и семейной отягощенности по ССЗ, систолическое артериальное давление (САД) которых было <130 мм рт.ст., а диастолическое (ДАД) <90 мм рт.ст. Пациенты и лица, включенные в контрольную группу, – татары по этнической принадлежности, проживающие в

Республике Башкортостан. Все они дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) выделяли из 5 мл цельной венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции [9]. Генотипирование осуществляли методом полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом. Для амплификации использовали праймеры F 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3', R 5' TCC TCC GTG CTC CGA TTC CG 3'. Продукт амплификации подвергали рестрикции с помощью эндонуклеазы Bsp19I (изошизомер NcoI); полученные фрагменты разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле. Аллель TNFA -308*A идентифицировался по отсутствию сайта рестрикции и ему соответствовал фрагмент 107 п.о., аллель TNFA -308*G при наличии сайта рестрикции – (два фрагмента длиной 87 и 20 п.о.) [10].

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя пакет прикладных программ Statistica 6.0, а также алгоритм Answer tree (эффективная сегментация при помощи деревьев решений), реализованного в пакете программ SPSS. Для сравнения распределения частот генотипов и аллелей применяли точный двусторонний критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Соответствие полученного распределения частот теоретически ожидаемому, проверяли, используя критерий χ^2 (программа Rows&Columns, R&C). Относительный риск (ОР) развития заболевания вычисляли по показателю соотношения шансов OR (odds ratio) [10].

Результаты и обсуждение

Эмпирическое распределение частот генотипов полиморфизма -308G/A гена TNFA в контрольной группе соответствовало теоретически ожидаемому по закону Харди-Вайнберга ($\chi^2=0,2855$; $p=0,915$). Сравнивая частоты генотипов полиморфизма -308G/A гена TNFA в популяциях мира (таблица 2), обнаружили, что они варьируют незначительно в большинстве популяций Европы и Северной Америки, и в более широких пределах – в популяциях Центральной и Южной Африки. В популяциях народов, относящихся к монголоидной группе, наблюдается низкая частота аллеля TNFA -308*A (наименьшая – у японцев). В корейской популяции отмечается самый низкий уровень гетерозиготности. Популяция татар по распределению частот генотипов не отличается от большинства европейских популяций.

Статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей между группой больных и контрольной группой не наблюдается (таблица 3). Поскольку известно, что экспрессия цитокинов зависит от гормонального профиля [24], был проведен анализ ассоциаций с учетом половой принадлежности. Различия между сравниваемыми группами не достигают уровня статистической значимости

Таблица 1

Клиническая характеристика группы пациентов

Показатель	Мужчины	Женщины
Численность (n)	282	72
Возраст (лет)	53,33±10,06	58,36±9,87
Вес (кг)	79,63±11,69	75,57±10,89
ИМТ (кг/м ²)	27,32±3,53	30,07±4,45
САД (мм рт.ст.)	149,9±20,4	152,3±21,3
Глюкоза крови (ммоль/л)	4,6±0,85	5,02±1,52
ОХС (ммоль/л)	5,02±1,2	5,88±1,33
ЛНП (ммоль/л)	3,45±1,21	3,47±1,24

Примечание: приведены средние значения и стандартные ошибки; ОХС – общий холестерин; ЛНП – липопротеины низкой плотности.

Таблица 2

Распределение частот генотипов полиморфизма -308G/A гена TNFA в популяциях мира

Популяция	N	p±sp, 95% ДИ			χ ² , p
		*G/*G	*A/*G	*A/*A	
Татары (Башкортостан)	233	78,98±2,37 (73,88-83,49)	20,34±2,34 (15,89-25,39)	0,68±0,48 (0,08-2,43)	0,2855 0,915
Норвежцы [12]	110	69,09±4,41 (59,57-77,55)	28,18±4,29 (20,02-37,56)	2,73±1,55 (0,57-7,76)	0,0000 1,000
Датчане [13]	325	65,85±2,63 (60,41-70,99)	30,46±2,55 (25,5-35,78)	3,69±1,05 (1,92-6,36)	0,0485 1,000
Немцы [14]	91	86,81±3,55 (78,1-93)	10,99±3,28 (5,4-19,28)	2,2±1,54 (0,27-7,71)	0,7503 0,744
Англичане [15]	239	69,87±2,97 (63,63-75,62)	27,62±2,89 (22,05-33,75)	2,51±1,01 (0,93-5,38)	0,0846 1,000
Бельгийцы [16]	100	70±4,58 (60,02-78,76)	28±4,49 (19,48-37,87)	2±1,4 (0,24-7,04)	0,0253 1,000
Французы [17]	210	78,1±2,85 (71,88-83,49)	19,52±2,74 (14,39-25,54)	2,38±1,05 (0,78-5,47)	0,6983 0,7092
Испанцы [18]	160	83,75±2,92 (77,1-89,18)	15±2,82 (9,85-21,49)	1,25±0,88 (0,15-4,44)	0,4171 0,9106
Африканцы (Судан) [19]	342	80,41±2,15 (75,8-84,48)	18,42±2,1 (14,46-22,94)	1,17±0,58 (0,32-2,97)	0,1507 1,000
Южноафриканцы [20]	120	60,83±4,46 (51,5-69,61)	30±4,18 (21,98-39,04)	9,17±2,63 (4,67-15,81)	1,8016 0,4364
“Белое население” Америки [21]	139	70,5±3,87 (62,18-77,93)	27,34±3,78 (20,13-35,54)	2,16±1,23 (0,45-6,18)	0,1562 1,000
Корейцы [22]	581	83,3±1,55 (80,02-86,25)	14,11±1,44 (11,38-17,21)	2,58±0,66 (1,45-4,22)	7,2783 0,0266
Японцы [23]	218	97,25±1,11 (94,11-98,98)	2,75±1,11 (1,02-5,89)	–	0,0000 1,000

Примечание: n – численности групп, p – частота генотипа; sp – ошибка.

(таблица 4). В то же время у мужчин, страдающих ЭАГ, с уровнем САД > 155 мм рт.ст. статистически значимо повышена частота генотипа TNFA -308*A/*A – 84,42% vs 67,82% (p=0,017, OR=0,39, 95% доверительный интервал – ДИ: 0,18-0,84). Этот же генотип встречается с большей частотой у больных с уровнем ДАД > 90 мм рт.ст. – 77,92% vs 69,23% (p=0,044, OR=0,45, 95% ДИ: 0,21-0,97). В группе женщин подобные различия отсутствовали.

Влияние ФНО-α на уровень АД мало изучено. Известно, что ФНО-α увеличивает продукцию эндотелина-1 и ангиотензиногена, тем

самым способствуя нарушению эндотелий-зависимой вазорелаксации и повышению тонуса резистивных сосудов. Есть данные о наличии положительной корреляции между концентрацией ФНО-α в плазме, величиной САД и инсулинорезистентностью (ИР) у больных ЭАГ, страдающих ожирением [25]. Полагают, что при ожирении усиливается экспрессия ФНО-α, поскольку он является мощным антиадиогенным фактором, ингибируя дифференцировку и стимулируя апоптоз жировых клеток, а также способствует развитию ИР. В настоящем исследовании не обнаружены какие-либо ассо-

Таблица 3

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма -308G/A гена TNFA среди больных и в контрольной группе

Генотипы/аллели	Контроль		Больные ЭАГ	
	n	p±sp, % (95% ДИ)	n	p±sp, % (95% ДИ)
*G/*G	233	78,98±2,37 (73,88-83,49)	264	74,58±2,31 (69,7-79,03)
*A/*G	60	20,34±2,34 (15,89-25,39)	85	24,01±2,27 (19,65-28,81)
*A/*A	2	0,68±0,48 (0,08-2,43)	5	1,41±0,63 (0,46-3,27)
*G	526	89,15±1,28 (86,36-91,55)	613	86,58±1,28 (83,85-89,01)
*A	64	10,85±1,28 (8,45-13,64)	95	13,42±1,28 (10,99-16,15)
Всего	295		354	

Примечание: n – численности групп, p – частота генотипа; sp – ошибка.

Таблица 4

Распределение частот генотипов и аллелей полиморфизма -308G/A гена TNFA среди больных и в контрольной группе в зависимости от половой принадлежности

Генотипы/ аллели	Контроль		Больные ЭГ					
	Мужчины n	Женщины p±sp,% (95% ДИ)	Мужчины n	Женщины p±sp,% (95% ДИ)	Мужчины n	Женщины p±sp,% (95% ДИ)		
*G/*G	127	76,51±3,29 (69,31-82,73)	106	82,17±3,37 (74,46-88,35)	208	73,76±2,62 (68,21-78,8)	56	77,78±4,9 (66,44-86,73)
*A/*G	38	22,89±3,26 (16,74-30,04)	22	17,05±3,31 (11,01-24,67)	71	25,18±2,58 (20,22-30,67)	14	19,44±4,66 (11,06-30,47)
*A/*A	1	0,6±0,6 (0,02-3,31)	1	0,78±0,77 (0,02-4,24)	3	1,06±0,61 (0,22-3,08)	2	2,78±1,94 (0,34-9,68)
*G	292	87,95±1,79 (83,96-91,25)	234	91,05±1,78 (86,87-94,24)	477	86,1±1,47 (82,94-88,87)	126	87,5±2,76 (80,97-92,42)
*A	40	12,05±1,79 (8,75-16,04)	23	8,95±1,78 (5,76-13,13)	77	13,9±1,47 (11,13-17,06)	18	12,5±2,76 (7,58-19,03)
Всего	166		129		282		72	

Примечание: n – численности групп, p – частота генотипа; sp – ошибка.

Таблица 5

Частоты генотипов и аллелей полиморфизма -308G/A гена TNFA в группе больных ЭАГ, перенесших инсульт, больных неосложненной ЭАГ и в контрольной группе

Генотипы/аллели	Больные ЭАГ, перенесшие инсульт		Больные неосложненной ЭАГ		Контроль	
	n	p±sp,% (95% ДИ)	n	p±sp,% (95% ДИ)	n	p±sp,% (95% ДИ)
*G/*G	25	60,98±7,62 (44,5-75,8)	159	76,44±2,94 (70,08-82,03)	233	78,98±2,37 (73,88-83,49)
*A/*G	15	36,59±7,52 (22,12-53,06)	46	22,12±2,88 (16,67-28,37)	60	20,34±2,34 (15,89-25,39)
*A/*A	1	2,44±2,41 (0,06-12,86)	3	1,44±0,83 (0,3-4,16)	2	0,68±0,48 (0,08-2,43)
*G	65	79,27±4,48 (68,89-87,43)	364	87,5±1,62 (83,93-90,52)	526	89,15±1,28 (86,36-91,55)
*A	17	20,73±4,48 (12,57-31,11)	52	12,5±1,62 (9,48-16,07)	64	10,85±1,28 (8,45-13,64)

Примечание: n – численности групп, p – частота генотипа; sp – ошибка.

циации полиморфизма -308G/A гена TNFA с АГ в зависимости от величины индекса массы тела (ИМТ).

Был проведен анализ ассоциаций полиморфизма -308G/A гена TNFA с осложненным течением ЭАГ. Оказалось, что в группе больных ЭАГ, перенесших инсульт, понижена частота генотипа TNFA -308*G/*G (60,98%) относительно таковой в контрольной группе – 78,98% (p=0,015), и в группе больных неосложненной ЭАГ – 76,44% (p=0,05) (таблица 5). Это дает основание считать генотип TNFA -308*A/*A протективным в отношении развития инсульта у больных ЭАГ. ОР по данному генотипу составил 0,48 (95%ДИ: 0,24-0,97). Следует отметить, что и другими авторами была обнаружена ассоциация полиморфизма -308G/A гена TNFA с риском развития инсульта [22].

ФНО-α является одним из основных медиаторов воспаления в центральной нервной системе (ЦНС) и связан с развитием многих неврологических состояний. Обнаружено, что данный цитокин может выполнять как про-, так и противовоспалительные функции в нейронах, что можно объяснить существованием двух различных путей передачи сигнала ФНО-α, опосредуемых двумя рецепторами, p55 и p75. Обе изоформы рецептора обнаружены в ЦНС, причем, как оказалось, активация p55 ведет к апоптозу нейронов. В ЦНС ФНО-α синтезируется

резидентными макрофагами, астроцитами и клетками микроглии, обладая провоспалительным эффектом во время острой фазы воспаления и иммуносупрессивным – во время хронической [25]. Показано, что при экспериментальной ишемии введение ФНО-α непосредственно в мозг мышей увеличивает зону некроза; введение антител, блокирующих действие ФНО-α, напротив, ограничивает ее. В то же время у мышцей, которым вводили ФНО-α до развития инсульта, отмечалось значительное уменьшение повреждения. Это позволяет предположить, что ФНО-α обладает как нейротоксическим, так и нейропротективным эффектами [27].

Заключение

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что генотип TNFA -308*G/*G ассоциирован с пониженным риском развитием инсульта у больных ЭАГ. Возможно, это обусловлено уменьшением выработки ФНО-α, поскольку аллель -308*G связан с уменьшением экспрессии гена TNFA. После того, как будут выяснены конкретные механизмы данной взаимосвязи, возможна разработка соответствующих фармакотерапевтических подходов в ведении больных ЭАГ.

Работа частично финансировалась за счет гранта Российского Гуманитарного Научного Фонда 07-06-00309а.

Литература

1. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhager WH. Essential hypertension. *Lancet* 2003; 361: 1629-41.
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=145500>.
3. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
4. Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clin Science* 2005; 108: 205-13.
5. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, et al. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101: 2149-53.
6. Irwin MW, Mak S, Mann DL, et al. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999; 99: 1492-8.
7. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA, A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177: 557-60.
8. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-9.
9. Johns M, Paulus-Thomas J. Purification of human genomic DNA from whole venous blood using proteinase K treatment followed by phenol-chloroform extraction. *Annal Biochem* 1989; 180: 276-8.
10. Keso T, Perola M, Laippala P et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2001; 154: 691-7.
11. Bland JM, Altman DG. The odds ratio. *Br Med J* 2000; 320: 1468.
12. Mitchell SA, Grove J, Spurkland A, et al. Association of the tumour necrosis factor a - 308 but not the interleukin 10 - 627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gut* 2001; 49: 288-94.
13. Rasmussen SK, Urhammer SA, Jensen JN, et al. O. The -238 and -308 G/A polymorphisms of the tumor necrosis factor α gene promoter are not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1731-4.
14. Spriewald BM, Witzke O, Wassmuth R, et al. Distinct tumour necrosis factor a, interferon c, interleukin 10, and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 457-61.
15. McCarron SL, Edwards S, Evans PR, et al. Influence of cytokine gene polymorphisms on the development of prostate cancer. *Cancer Research* 2002; 62: 3369-72.
16. Louis R, Leyder E, Malaise M, et al. Lack of association between adult asthma and the tumour necrosis factor a-308 polymorphism gene. *Eur Respir J* 2000; 16: 604-8.
17. Tuglular S, Berthoux P, Berthoux F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor a gene at position -308 and TNFa microsatellite in primary IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transpl* 2003; 18: 724-31.
18. Caballero A, Bravo J, Nieto A, et al. TNFA promoter polymorphism and susceptibility to brucellosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 480-3.
19. Moukoko CE, El Wali N, Saeed OK, et al. No evidence for a major effect of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in periportal fibrosis caused by Schistosoma mansoni infection. *Infect Imm* 2003; 71: 5456-60.
20. Corbett EL, Mozzato-Chamay N, Butterworth AE, et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor- α gene promoter may predispose to severe silicosis in black South African miners. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 690-3.
21. Kubota T, McNamara DM, Wang JJ, et al. Effects of Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms on Patients With Congestive Heart Failure. *Circulation* 1998; 97: 2499-501.
22. Um JY, Kim HM. Frequencies of the tumor necrosis factor gene polymorphisms in the Korean population. *Hereditas* 2003; 139: 184-8.
23. Funayama T, Ishikawa K, Ohtake Y, et al. Variants in optineurin gene and their association with tumor necrosis factor- α polymorphisms in Japanese patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4359-67.
24. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 2002; 23: 90-119.
25. Pausova Z, Deslauriers B, Gaudet D, et al. Role of tumor necrosis factor- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 2000; 36: 14-9.
26. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacology* 2006; 147: 232-40.
27. Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 2002; 8: 1363-8.

Поступила 30/11-2006
Принята к печати 04/12-2006