© **Коллектив авторов**, 2012
**УДК** 612.115:[612.6.05:577.21

# ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА D-1208I НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ТКАНЕВОГО ФАКТОРА

**А.А. Петров**, **А.В. Сепп**, **О.С. Петрова**, **Н.Н. Чарторижская**, кандидат медицинских наук, **Н.Н. Страмбовская**, кандидат медицинских наук, **Ю.А. Витковский**, доктор медицинских наук, профессор

*ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России*

**E-mail:** aapetrov-chita@rambler.ru

*Исследовано влияние генетического полиморфизма D-1208I на функциональную активность тканевого фактора (TF). Установлено, что гетерозиготные носители полиморфного маркера D-1208I имели сниженный уровень моноцитарной экспрессии TF, по сравнению с гомозиготными (160,1±53,0 и 198,6±72,9 % M±SD, соответственно). Гетерозиготный генотип D-1208I связан с меньшей экспрессией TF макрофагами легочной ткани, в сравнении с гомозиготными аллельными вариантами (6,0 и 11,1 баллов, соответственно). Носительство генотипа II этого полиморфизма сопровождалось увеличением концентрации TF в плазме только после стимуляции цельной крови бактериальным липополисахаридом. Мутация не влияла на прокоагулянтную активность TF в плазме крови.*

***Ключевые слова:*** *генетический полиморфизм D-1208I, тканевой фактор*

***INFLUENCE OF D-1208I GENE POLYMORPHISM ON TISSUE FACTOR ACTIVITY***

***A.A. Petrov, A.V. Sepp, O.S. Petrova, N.N. Chartorizhskaya, N.N. Strambovskaya, Yu.A. Vitkovsky***

*State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Chita State Academy of Medicine» of the Ministry of Helthcare and Social Development of Russian Federation, Chita, Russia*

*Influence of D-1208I polymorphism on TF activity was observed. In heterozygous carriers D-1208I polymorphism was established to have reduced levels of monocytic TF expression in comparison with homozygous ones (160,1±53,0% and 198,6±72,9% M±SD, accordingly). If compared with homozygous allelic variants D-1208I heterozygous genotype is associated with less macrophagic TF expression in lungs (6,0 and 11,1 scores, correspondingly). The II genotype was accompanied with an increased concentration of TF in plasma only after LPS stimulation of whole blood. D-1208I mutation did not influence on TF procoagulant activity in plasma.*

***Key words:*** *D-1208I genetic polymorphism, tissue factor*

## ВВЕДЕНИЕ

Считается, что в предрасположенности к развитию тромботических заболеваний большое значение имеет генетический полиморфизм [4].

Известно, что тканевой фактор (TF) свертывания крови играет ключевую роль в развитии тромбоза [20]. Высокий уровень микровезикулярного TF является триггером гиперкоагуляции и способствует развитию инфаркта миокарда [3]. Повышенная экспрессия TF инициирует запуск фатального тромбоза на поздних стадиях онкологических заболеваний [15]. O. Aras, et al. (2004) показали, что стимуляция бактериальными эндотоксинами in vivo вызывает увеличение экспрессии TF. Это является причиной гиперкоагуляции при сепсисе [9].

E. Arnaud и соавт. [14] описали 6 полиморфизмов TF. Из них 3 однонуклеотидные мутации: A-603G, C-1322T, C-1812T и 1 делеция/инсерция 18 bp в регионе -1208 оказались полностью конкордантны. Для удобства обозначения аллель, не содержащая инсерцию в позиции -1208, несущая C в -1812/1322 и A 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 – C-21T и G-1442C – не были конкордантными и встречались крайне редко [14]. Влияние мутации D-1208I на функцию TF до конца не изучено. Ранее нами получены сведения о том, что у больных с ТЭЛА, погибших от гриппа A H1N1/09, совершенно не встречается гетерозиготный генотип DI, в то время как в альтернативных группах больных и контроле встречаемость этого показателя составляет 51% [2]. Данные, касающиеся роли этого полиморфного гена в развитии тромбоза, противоречивы.

Целью данной работы было изучение влияния полиморфного маркера D-1208I на функциональную активность TF. Были сформулированы следующие задачи:

1. Выявить влияние полиморфного маркера D-1208I на уровень и прокоагулянтную активность микровезикулярной формы TF в плазме крови здоровых волонтеров.

2. Исследовать показатели функциональной экспрессии TF моноцитами крови здоровых людей у носителей различных аллельных вариантов этой мутации.

3. Оценить воздействие полиморфизма на уровень экспрессии TF макрофагами легочной ткани при летальном исходе гриппа А H1N1.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находились 84 здоровых волонтера: 42 мужчины и 42 женщины. Средний их возраст составил 37±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 ± 14 лет (6 мужчин и 14 женщин). Инфекция лабораторно подтверждена методом ПЦР. Непосредственной причиной смерти этих пациентов явились тромбоэмболия легочной артерии (8 человек) и респираторный дистресс-синдром (12 человек).

Все обследованные по национальной принадлежности были русскими, родившимися и проживающими на территории Забайкальского края.

Генетический полиморфизм определяли с помощью полимеразной цепной реакции наборами реактивов ООО «Литех» (Россия). Детекцию продукта амплификации 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.

Уровень микровезикулярной формы TF исследовали с помощью иммуноферментного анализа наборами реактивов «American Diagnostica» (США) на аппарате ADALTIS PersonalLab (Италия). Степень прокоагулянтной активности микровезикулярного TF оценивали с использованием наборов «American Diagnostica» (США) на приборе ADALTIS PersonalLab (Италия). Уровень и степень прокоагулянтной активности липидизированного TF изучали в плазме крови, стимулированной и не стимулированной бактериальным липополисахаридом (ЛПС) (ООО «Медгамал», Россия). Цельную кровь в объеме 900 мкл вносили в пробирку типа «Eppendorf» и добавляли 100 мкл препарата ЛПС в концентрации 100 мкг/мл. Пробирки встряхивали на вортексе, помещали в термостат и инкубировали при температуре 37°С в течение 4 ч. По истечении указанного времени пробирки центрифугировали согласно инструкции наборов. Плазму отбирали для иммуноферментного исследования уровня и степени прокоагулянтной активности TF.

Функциональную экспрессию TF моноцитами крови исследовали импедансным методом, предложенным R. Santucci и соавт. [11]. Для эксперимента использовали цельную цитратную кровь. В 2 полистироловые пробирки типа «Eppendorf» вносили 900 мкл цельной крови. В одну из них добавляли 100 мкл препарата ЛПС в концентрации 100 мкг/мл, в другую – 100 мкл стерильного физиологического раствора NaCl. Пробирки встряхивали на вортексе, помещали в термостат и инкубировали при температуре 37°С в течение 4 ч. После инкубации кровь перемешивали и использовали для исследования функциональной экспрессии TF. Для этого 300 мкл цельной цитратной крови вносили в тефлоновую кювету с добавлением 40 мкл 0,1 М раствора $CaCl_2$. Время свертывания ре-

Таблица 1

**ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ГЕНОТИПОВ МУТАЦИИ TF D-1208I, %**

| Генотип | Здоровые (n=84) | Больные (n=20) |
|---|---|---|
| DD | 27,4 | 35 |
| DI | 52,2 | 40 |
| II | 21,4 | 25 |

Таблица 2

**КОНЦЕНТРАЦИЯ МИКРОВЕЗИКУЛЯРНОГО TF В ПЛАЗМЕ ЛИЦ С РАЗНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ПОЛИМОРФИЗМА D-1208I, ПГ/МЛ (M±SD)**

| Генотип | n | Без стимуляции ЛПС | Со стимуляцией ЛПС |
|---|---|---|---|
| DD | 23 | 238±75,0 | 207,2±75,0* |
| DI | 43 | 245,1±82,1 | 218,5±81,0** |
| II | 18 | 299,89±89,4 | 285,54±71,1 |

***Примечание.*** * – p=0,002 между ЛПС-стимулированным уровнем TF у носителей генотипов DD и II; ** – p=0,003 у носителей генотипов DI и II.

Таблица 3

**АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМЕ КРОВИ МИКРОВЕЗИКУЛЯРНОГО TF ПРИ РАЗНЫХ ГЕНОТИПАХ ПОЛИМОРФИЗМА D-1208I, ПМ (M±SD)**

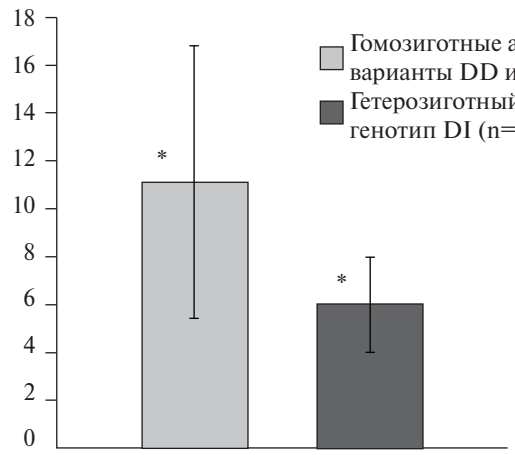
| Генотип | n | Без стимуляции ЛПС | Со стимуляцией ЛПС |
|---|---|---|---|
| DD | 23 | 1,0±0,41 | 1,15±0,34 |
| DI | 43 | 0,99±0,3 | 1,1±0,41 |
| II | 18 | 1,1±0,29 | 1,2±0,35 |

Таблица 4

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ TF У ЛИЦ С РАЗНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ПОЛИМОРФИЗМА D-1208I, % (M±SD)**

| | |
|---|---|
| Генотипы DD и II, n=41 | 198,6±72,9* |
| Генотип DI, n=43 | 160,1±53,0* |

***Примечание.*** * t-тест; p=0,007 – достоверность различий между уровнем экспресии TF в группах носителей гетеро- и гомозиготных аллельных вариантов.




***Примечание.*** U-тест * p=0,016 – достоверность различий между уровнем экспрессии TF в группах носителей гетеро- и гомозиготных генотипов.

*Экспрессия TF макрофагами легочной ткани у пациентов с различными генотипами мутации D-1208I, баллы (M±SD)*

кальцифицированной крови регистрировали с помощью импедансного коагулографа НМЗ (Россия). Для оценки экспрессии тканевого фактора моноцитами сравнивали время свертывания крови при добавлении препарата ЛПС и без него. О функциональной экспрессии TF судили по степени сокращения времени коагуляции (в %) по формуле: $(t_1–t_2) \cdot 100\%/t_1$, где: $t_1$ – время свертывания нестимулированной, $t_2$ – стимулированной крови.

Для иммуногистохимического исследования использовали ткань легких, полученную при аутопсии больных, умерших от осложнений гриппа A(H1N1) в октябре-декабре 2009 г. в Забайкальском крае. Препараты фиксировали в нейтральном 10% растворе формалина в течение 24 ч. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4 мкм стандартным способом. Иммуногистохимическое изучение препаратов осуществляли биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом с мышиными моноклональными антителами к TF человека (TF9-10H10) производства Santa Cruz Biotechnology (США). Предварительную демаскировку антигенов проводили путем двукратной обработки образцов в фосфатно-солевом буфере (pH=6,0) в микроволновой печи при мощности излучателя 450 Вт в течение 15 мин с интервалом 4 мин между процедурами для охлаждения. После инактивации эндогенной пероксидазы срезы инкубировали с первичными антителами в разведении 1:250 на протяжении 30 мин при температуре 36°C. В качестве вторичных антител использовали биотинилированные козьи антимышиные 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 результат был положительным и регистрировался в пределах от 1 до 4 баллов: 1 балл – окрашенных клеток 10–25%; 2 балла – 25–50%; 3 балла – 50–75%; 4 балла – более 75% окрашенных клеток в 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, полученные при исследовании частоты полиморфизма TF D-1208I, приведены в табл. 1. Распределение генотипов этой мутации во всех исследованных группах соответствовало соотношению Харди–Вайнберга (p>0,05).

Установлено, что у здоровых волонтеров средний уровень TF антигена в плазме крови, не стимулированной ЛПС, составил 253,8±83,8 пг/мл. Зависимость концентрации TF от носительства различных аллельных вариантов полиморфизма D-1208I отсутствовала (табл. 2). В плазме крови, стимулированной ЛПС, средняя величина липидизированного TF достигала 229,8±81,9 пг/мл. У носителей гомозиготного генотипа II уровень TF в стимулированной крови оказался существенно выше, чем у носителей генотипов DD (p=0,002) и DI (p=0,003) (см. табл. 2). Средняя степень активности микровезикулярного TF в плазме нестимулированой крови находилась в пределах 1,0±0,27 пМ, в плазме крови, стимулированной ЛПС – 1,1±0,37 пМ. Взаимосвязи активности TF в плазме с полиморфным маркером D-1208I не выявлено (табл. 3).

Показано, что средний уровень функциональной экспрессии TF моноцитами методом Santucci R. [11] в группе волонтеров составил 179,4±66,2%. У носителей гетерозиготных аллельных вариантов была пониженная по сравнению с гомозиготными носителями (p=0,007) функциональная экспрессия TF (табл. 4).

Уровень экспрессии TF макрофагами легких у носителей гетеро- и гомозиготных аллелей D-1208I существенно различался (рис. 1). В среднем этот показатель в группе гетерозиготных больных составлял 6 баллов, гомозиготных – 11,1 балла (p=0,016).

Как известно, дополнительный микровезикулярный ресурс TF может способствовать развитию тромбоза. Содержание TF не зависит от пола и возраста обследуемых [5]. Механизм влияния микровезикулярного TF на гемостаз окончательно не выяснен. M. Aleman и соавт. [6] продемонстрировали, что высокой протромбиназной активностью обладают только TF-позитивные микровезикулы моноцитарного происхождения. Они способны инициировать образование фибринового сгустка, увеличивать его плотность и

устойчивость к фибринолизу [6]. Как выяснилось, уровень плазменного TF увеличен у больных с острым коронарным синдромом [16]. Более того, K. Misumi и соавт. [3] установили, что количество TF в крови пациентов с нестабильной стенокардией повышено и коррелирует с выраженностью проявлений болезни, при этом на фоне лечения наступает значимое снижение содержания указанного фактора [3].

Мы обнаружили влияние полиморфного маркера D-1208I на концентрацию TF антигена только после стимуляции крови бактериальным ЛПС. Мнение других исследователей по этому вопросу неоднозначно. Так, K. Gertow и соавт. [17] не установили взаимосвязи между уровнем TF и носительством этой мутации. Вместе с тем имеются сведения о том, что носительство D-гаплотипа мутации связано с низким плазменным уровнем микровезикулярного TF и снижением риска венозного тромбоза [14]. Другая группа исследователей, напротив, полагает, что наиболее низкий уровень микровезикулярного TF характерен только для носителей гетерозиготного аллельного варианта [8]. Нами не выявлено связи активности TF в плазме с полиморфизмом D-1208I.

Известно, что повышение экспрессии TF сопряжено с риском тромбозов. Доказано, что экспрессия TF в моноцитах существенно повышена при нестабильной стенокардии и выраженном атеросклерозе [7, 18]. Последнее подтверждено исследованиями R. Santucci и соавт. [11], установивших, что функциональная экспрессия TF в цельной крови выше у больных с нестабильной стенокардией, чем у здоровых. Показано также, что при выраженном атеросклерозе TF в высокой степени экспрессируется пенистыми клетками, производными макрофагов, внутри атеросклеротических бляшек [10]. Эти результаты подтверждают, что высокий уровень TF на поверхности поврежденной бляшки запускает тромбоз и инфаркт миокарда. Известно, что аберрантная экспрессия TF запускает внутрисосудистый тромбоз в поздних стадиях онкологических заболеваний [15]. Как выяснилось, повышение экспрессии TF вносит весомый вклад в расстройство коагуляции при сепсисе [9]. Мы установили, что у гетерозиготных носителей D-1208I значительно понижен уровень как функциональной моноцитарной экспрессии, так и экспрессии TF макрофагами легких (по сравнению с носителями гомозиготных аллелей). Соответствующих исследований, касающихся этого вопроса, немного. Есть данные, что I-аллель обусловливает повышение экспрессии тканевого фактора на 40% и коррелирует с укорочением времени свертывания крови [19]. В ряде работ продемонстрировано, что у больных с септическими осложнениями, являющихся носителями II гаплотипа, в 2 раза более высокий базальный уровень TF-mRNA, чем у носителей генотипа DD [13]. Вместе с тем исследования, проведенные нами ранее, показали, что гетерозиготное носительство полиморфизма D-1208I не встречается у пациентов с гриппом A 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 пониженной экспрессией TF на поверхности макрофагов, объясняет его протективное влияние на развитие ТЭЛА.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что полиморфный маркер D-1208I существенно изменяет функциональную активность TF. Возможно, влияние этого полиморфизма реализуется только при воспалении. Для любого воспалительного процесса характерно микротромбообразование, которое часто носит распространенный характер и завершается массивным тромбозом с развитием полиорганной недостаточности (ДВС-синдром) [12]. Результаты нашего исследования позволяют по-новому взглянуть на патогенез диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Дальнейшее изучение данного вопроса позволит сформировать критерии для прогнозирования тромботических осложнений тяжелых инфекционных заболеваний и сепсиса, а также создаст предпосылки для дифференцированной антикоагулянтной терапии этих состояний.

## ВЫВОДЫ

У гетерозиготных носителей полиморфизма D-1208I понижен уровень макрофагальной и моноцитарной экспрессии TF по сравнению с таковым у гомозиготных носителей. Носительство генотипа II этого полиморфизма сопровождается повышением уровня микровезикулярного TF в плазме только после стимуляции крови бактерильным ЛПС. Мутация не влияет на прокоагулянтную активность микровезикулярного TF в плазме крови.

## ЛИТЕРАТУРА


1. Петров А.А. и др. Генетический полиморфизм CD14, TNF и FCGR2A у больных гриппом A H1N1 в Забайкальском крае // Мед. иммунол. – 2011; 13 (1): 83–6.
2. Петров А.А. и др. / Полиморфизм генов FII, TF, FV и MTHFR у больных с летальным исходом гриппа A/H1N1 в Забайкальском крае // Молекул. медицина. – 2012. – № 2. С. 46–49.
3. Misumi K. et al. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris // Am. J. Cardiol. – 1998; 81: 22–6.
4. D'Amato N., Correale M., D'Agostinoa C. Aortic Thrombus and Acute Pulmonary Embolism in an Individual Heterozygous for the MTHFR C677-T Mutation // Rev Esp Cardiol. – 2010; 63 (11): 1366.
5. Albrecht S. et al. Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population // J. Thromb. Haemost. – 1996; 75: 772–7.
6. Aleman M. et al. Differential contributions of monocyte- and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability // J. Thromb. Haemost. – 2011; 11: 2251–61.
7. Jude B. et al. Evidence for time dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or instable angina // Circulation. – 1994; 90: 1662–8.
8. Opstad T. et al. Gender differences of polymorphisms in the TF and TFPI genes, as related to phenotypes in patients with coronary heart

disease and type-2 diabetes // Thromb. J. – 2010; 8 (7): 1–10.
9. Aras O. et al. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular, tissue factor in human endotoxemia // Blood. – 2004; 103: 4545–53.
10. Wilcox J. et al. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1989; 86: 2839–43.
11. Santucci R. et al. Measurement of tissue factor activity in whole blood // J. Thromb. Haemost. – 2000; 83: 445–54.
12. Osterud B. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation / B. Osterud, E. Bjorklid // Semin Thromb Hemost. – 2001. Vol. 27. - №6. – P 605-617.
13. Marsik C. et al. Polymorphism in the tissue factor region is associated with basal but not endotoxin induced tissue factor-mRNA levels in leukocytes // J. Thromb. haemost. – 2006; 4: 745–9.
14. Arnaud E. et al. 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 // Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. – 2000; 20: 892–8.
15. Rickles F., Patierno S., Fernandez P. Tissue factor, thrombin, and cancer // Chest. – 2003; 124: 58–68.
16. Nishiyama K. et al. Simultaneous elevation of the levels of circulating monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor in acute coronary syndromes // Jpn. Circ. J. – 1998; 62: 710–2.
17. Gertow K. et al. Tissue factor gene promoter haplotype associates with carotid intima-media thickness in subjects in cardiovascular risk prevention // Atherosclerosis. – 2009; 207 (1): 168–73.
18. Tremoli E. et al. Tissue factor in atherosclerosis // Atherosclerosis. – 1999; 144: 273–83.
19. Reny J. et al. Tissue Factor-603 A–G promoter polymorphism is associated with human monocyte constitutive but not with LPS induced gene expression // J. Thromb. Haemost. – 2003. Suppl. 1. - abstr № OC236.
20. Maly M. et al. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis // Physiol. Res. – 2007; 56: 685–95.