

Je humorální aktivace u srdečního selhání ovlivněna genetickou predispozicí?*

Lenka Špinarová, Jindřich Špinar*, Anna Vašků**, Monika Pávková-Goldbergová**, Ondřej Ludka*, Josef Tomandl***, Jiří Vítovec

I. interní-kardioangiologická klinika, Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity,

*Interní-kardioangiologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity,

**Ústav patofyziologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity,

***Ústav biochemie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Česká republika

Špinarová L, Špinar J*, Vašků A**, Pávková-Goldbergová M**, Ludka O*, Tomandl J***, Vítovec J (I. interní-kardioangiologická klinika, Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, *Interní-kardioangiologická klinika, Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, **Ústav patofyziologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, ***Ústav biochemie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Česká republika). **Je humorální aktivace u srdečního selhání ovlivněna genetickou predispozicí?** *Cor Vasa* 2007;49(4):127–133.

Cíl studie: Prokázat vztah mezi plazmatickou koncentrací big endothelinu a endothelinu 1, klinickými parametry a dvěma nejčastějšími polymorfismy (-3A/-4A a G8002A) genu kódujícího endothelin-1 a mezi plazmatickou koncentrací TNF- α , klinickými parametry a genovými polymorfismy TNF- α -308 A/G, -238 A/G, TNF- β NcoI a 3'TACE (tumor necrosis factor α konvertujícího enzymu) u pacientů s chronickým srdečním selháním.

Soubor a metodika: Bylo zahrnuto celkem 266 pacientů se symptomatickým srdečním selháním a s prokázanou dysfunkcí levé komory (LK). Genotypizace a plazmatické koncentrace humorálních působků byly vyšetřeny u 224 pacientů s dysfunkcí LK s ejekční frakcí (EF) pod 40 %. Všichni měli symptomatické chronické srdeční selhání NYHA II–IV. Příčinou chronického srdečního selhání byla u 133 pacientů ischemická choroba srdeční a u 91 dilatační kardiomyopatie.

Výsledek: Nebyl nalezen vztah mezi polymorfismem v genu endothelinu G85002A a plazmatickou koncentrací big endothelinu a endothelinu ($p = 0,819$, $p = 0,87$), ani mezi polymorfismem -3A/-4A a plazmatickou koncentrací big endothelinu a endothelinu ($p = 0,749$, $p = 0,871$), rovněž jako ve vztahu plazmatických koncentrací TNF- α a genotypy ve čtyřech polymorfismech v genu pro TNF- α , β a TACE. V souboru byly nalezeny významné korelace mezi plazmatickými koncentracemi endothelinu-1 a big endothelinu a některými klinickými a laboratorními parametry, zejména mezi plazmatickými koncentracemi big endothelinu a stupněm plicního městnání.

Závěr: Nabízí se možnost hypotézy, že v případě produkce endothelinu i TNF- α u srdečního selhání není podstatné genetické vybavení, nýbrž spíše hemodynamická situace daná vlastním klinickým onemocněním.

Klíčová slova: Srdeční selhání – Genetické polymorfismy – Endothelin – TNF- α

Špinarová L, Špinar J*, Vašků A**, Pávková-Goldbergová M**, Ludka O*, Tomandl J***, Vítovec J (Ist Department of Internal Medicine-Cardioangiology, St Ann University Hospital and Masaryk University Medical School, *Department of Internal Medicine Cardiology, Brno University Hospital and Masaryk University Medical School, **Institute of Pathophysiology, Masaryk University Medical School, ***Institute of Biochemistry, Masaryk University Medical School, Brno, Czech Republic). **Is humoral activation in heart failure affected by a genetic predisposition?** *Cor Vasa* 2007;49(4):127–133.

Aim of study: To document an association between the plasma levels of big endothelin and endothelin-1, clinical parameters and the two most frequent polymorphisms (-3A/-4A and G8002A) of the endothelin-1 encoding gene on the one hand and the plasma levels of TNF- α , clinical parameters and the gene polymorphisms of TNF- α -308 A/G, -238 A/G, TNF- β NcoI, and 3'TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme) in patients with chronic heart failure (HF).

Patients and methods: A total of 266 patients with symptomatic HF and documented left ventricular (LV) dysfunction were included. Genotyping was performed and the plasma levels of humoral agents were determined in 224 patients with LV dysfunction and LV ejection fraction below 40%. All had symptomatic chronic HF of NYHA Class II–IV. The cause of chronic HF was coronary heart disease in 133 and dilated cardiomyopathy in 91 patients.

Results: No association was found between the polymorphism in the endothelin gene G85002A and the plasma levels of big endothelin and endothelin ($p = 0,819$; $p = 0,87$) or between the polymorphism -3A/-4A and the plasma levels of big endothelin and endothelin ($p = 0,749$; $p = 0,871$) as well as between the relationship of the plasma levels of TNF- α and the genotypes in the four polymorphisms in the TNF- α , β , and TACE genes. Significant correlations were established between the plasma levels of endothelin-1 and big endothelin and some clinical and laboratory parameters, in particular plasma big endothelin levels on the one hand and the degree of pulmonary congestion on the other.

*Práce byla podpořena výzkumným záměrem: MŠMT MSM 0021622402.

Conclusion: The hypothesis is suggested that a crucial role in endothelin and TNF- α production in heart failure is not played by the patient's genetic make-up but, rather, by their hemodynamic status due to the underlying clinical disease.

Key words: Heart failure – Genetic polymorphisms – Endothelin – TNF- α

Adresa: prof. MUDr. Lenka Špinarová, PhD, FESC, I. interní-kardioangiologická klinika, FN u sv. Anny a LF MU, Pekařská 53, 656 91 Brno, Česká republika, e-mail: lenka.spinanova@fnusa.cz

ÚVOD

Chronické srdeční selhání je klinický syndrom, který je charakterizován změnami v hemodynamice, na periférii a také aktivací humorálních působků. Jedním z nejvýznamnějších vazokonstrikčních systémů, mimo renin-angiotenzinový a sympatoadrenergní systém, je systém endothelinový.⁽¹⁾

Endothelin (ET) je arteriální a venózní konstriktor, který se hojně vyskytuje v lidských tkáních, jehož vazebná místa byla prokázána v cévách, srdci a ledvinách. Jedná se o několik typů peptidů, které se vyskytují nejméně ve čtyřech izoformách (ET-1, ET-2, ET-3 a vazoaktivní intestinální kontraktor). Každý z endothelinů je produktem samostatného genu, který kóduje tvorbu prekurzorového proteinu – prepro-endotelinu, který se štěpí na proendothelin (big endothelin) a dále endothelin-konvertujícím enzymem (ECE) na konečný produkt – endothelin.

Hlavním kardiovaskulárním endothelinem je ET-1.

Část endothelinu je uvolňována do cirkulace, ale více se ho uvolňuje k přiléhající hladké svalové buňce než do cévního lumen, proto je jeho sekrece více para-

krinní. Big endothelin, ET-1 a ET-3 jsou sice prokazatelné v krvi, ale jejich koncentrace je malá a představuje přibližně 25–30 % ET, tvořeného endotelialními buňkami. Z tohoto množství největší část představuje big endothelin (65 %), E-1 (25 %) a dále E-3 (10 %).

Tumor necrosis faktor alfa (TNF- α) způsobuje svalový úbytek, snižuje svalovou kontraktilitu a indukuje myokardiální hypertrofii. Zvýšení TNF, které je pozorováno zejména u těžších stupňů onemocnění – pacientů NYHA IV, může vést k těžkému omezení tolerance zátěže a koreluje s kardiální kachexií a špatnou prognózou.

CÍL

Cílem studie je prokázat vztah:

1. mezi plazmatickou koncentrací big endothelinu a E-1, klinickými parametry a dvěma nejčastějšími polymorfismy (-3A/-4A a G8002A) genu kódujícího E-1 u pacientů s chronickým srdečním selháním;
2. mezi plazmatickou koncentrací TNF- α , klinickými parametry a genovými polymorfismy

Tabulka I
Základní charakteristiku souboru

	Počet	Průměr	Frekvence	Minimum	Maximum	Standardní odchylka
Big end (pmol/l)	266	2,162737	5	0,110000	18,45000	2,328220
E-1 (pmol/l)	182	1,453136	10	0,000000	18,37000	2,820760
TNF- α hl (ng/l)	120	43,85442	107,0000			
EF (%)	266	24,6090	46	10,0000	50,0000	7,3750
KTI (%)	250	56,4520	28	42,0000	77,0000	6,3188
PM	250	0,9240	147	0,0000	2,0000	0,6386
TKs (mm Hg)	266	119,7566	49	80,0000	180,0000	18,8094
TKd (mm Hg)	266	75,8801	79	60,0000	100,0000	10,3452
TF	266	76,7707	49	50,0000	130,0000	11,5090
Na (mmol/l)	265	138,1321	43	118,0000	148,0000	3,5325
K (mmol/l)	265	4,2034	30	3,0000	5,5000	0,4494
U (mmol/l)	266	8,0494		2,0000	29,0000	3,7182
Kreat (mmol/l)	266	108,1910	14	64,0000	272,0000	26,3514
ALP (kat/l)	266	1,5128	9	0,3800	12,4700	0,9292
GMT (kat/l)	266	1,2884		0,1600	22,0000	1,9093
AST (kat/l)	266	0,5942	11	0,2000	12,2000	0,8369
ALT (kat/l)	266	0,7323	11	0,2000	27,1000	1,6895
Chol (mmol/l)	266	5,0526		2,1300	8,6900	1,2302
HDL (mmol/l)	265	1,1420		0,3500	2,4500	0,3604
LDL (mmol/l)	260	3,4639	5	1,0500	101,0000	6,1453
TG (mmol/l)	265	2,0514	5	0,4700	18,9000	1,6571
KM (mmol/l)	265	421,9472	5	103,0000	947,0000	120,7829
Gly (mmol/l)	266	6,5786	15	1,6000	17,5000	2,3855
Bil (mmol/l)	266	18,3195		1,3000	107,000	12,526
Ery $10^{12}/l$	266	4,4371	6	2,9100	5,740	0,509
Leu $10^9/l$	266	7,5494	13	3,6000	17,500	1,929
Tro $10^9/l$	266	209,5655	8	24,0000	452,000	63,342

Big end – big endothelin, E-1 – endothelin 1, TNF- α – tumor necrosis factor alfa, EF – ejekční frakce, KTI – kardiotorakální index, PM – plicní měštnání, TKs – systolický krevní tlak, TKd – diastolický krevní tlak, TF – tepová frekvence, Na – natrium, K – kalium, U – urea, Kreat – kreatinin, ALP – alkalická fosfatáza, GMT-gama – glutamyltranspeptidáza, AST – aspartát transferáza, ALT – alanin transferáza, Chol – cholesterol, HDL – high density lipoprotein, LDL – low density lipoprotein, TG – triglyceridy, KM – kyselina močová, Gly – glykemie, Bil – bilirubin, Ery – erytrocyty, Leu – leukocyty, Tro – trombocyty

TNF- α 308 A/G, -238 A/G, TNF- β , NcoI a 3'TACE (tumor necrosis factor- α konvertujícího enzymu).

SOUBOR PACIENTŮ

Klinicky bylo vyšetřeno celkem 266 pacientů se symptomatickým srdečním selháním a s prokázanou dysfunkcí levé komory.

Genotypizace a plazmatické koncentrace humorálních působků byly vyšetřeny u 224 pacientů s dysfunkcí levé komory (LK) s ejekční frakcí (EF) pod 40 %. Z celkového počtu nemocných bylo 176 mužů a 48 žen. Všichni měli symptomatické chronické srdeční selhání stadia NYHA II–IV. Ve třídě NYHA II bylo 82 pacientů, ve třídě NYHA III 131 a ve třídě NYHA IV 11 pacientů. Průměrný věk pacientů byl 52 ± 12 let. Příčinou chronického srdečního selhání byla u 133 pacientů ischemická choroba srdeční (70% zúžení nejmenší jedné koronární tepny při koronarografii nebo dokumentovaný srdeční infarkt) a u 91 dilatační kardiomyopatie. Diagnóza dilatační kardiomyopatie byla stanovena na základě echokardiografických a klinických kritérií. Základní charakteristiku souboru podává tabulka I.

METODIKA

Pacienti

Pacienti byli vyšetřeni klinicky: anamnéza, klasifikace NYHA, základní laboratorní vyšetření – plazmatická koncentrace sodíku, močoviny, kreatininu a hemoglobinu, EKG a RTG srdce a plic. Echokardiografie: z dvojrozměrného vyšetření levé komory v apikální čtyřdutinové projekci byl hodnocen konečný diastolický objem (EDV), konečný systolický objem (ESV) a ejekční frakce levé komory (EF). Tyto parametry jsou počítány Chapmanovou modifikací Simpsonovy metody.

Biochemické metody

Stanovení plazmatické koncentrace big endotelinu jsme prováděli soupravou firmy Biomedica (Viedeň, Rakousko). Princip: byla použita metoda ELISA, fyziologické hodnoty nejvýše 0,7 pmol/l a endotelinu: souprava firmy Biomedica (Viedeň, Rakousko). Princip: ELISA, fyziologické hodnoty: 0,2–0,7 pmol/l. TNF- α byl stanovován soupravou firmy Biorad International (Camarillo, CA, USA). Princip: sendvičová technika ELISA, fyziologické hodnoty do 10 ng/l.

Genotypizace

Genotypizace 6 polymorfismů v kandidátních genech byly provedeny v Laboratoři molekulární medicíny na Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. DNA byla izolována z leukocytů z periferní krve pacientů pomocí proteinázy K.

EDN-1 G8002A (6p23.1)

V genu pro endotelin-1 jsme detekovali dva, v populaci nejčastější polymorfismy. Polymorfismus G8002A ve 4. intronu genu kódujícího endotelin-1 byl detekován podle protokolu optimalizovaného v naší laboratoři. Produkt PCR (polymerase chain reaction-polymerázové řetězové reakce) byl dále analyzován restriční analýzou pomocí Taq I. Gelovou elektroforézou

na 3% agaróze jsme detekovali tři genotypy: GG – 50 + 208 bp, GA – 358, 150 + 208 bp a AA – 358 bp.

EDN-1 -138 AA/A (6p23.1)

-3A/-4A polymorfismus (-138 inserce/delece) v genu kódujícím endotelin-1 byl analyzován PCR metodou s užitím restričního enzymu BsiYI (CCNNNNN↓NNGG). Genotypy jsou -4A/-4A = 195 bp, -4A/-3A = 176+195+19bp, -3A/-3A = 176+19 bp.

TNF- α -238 A/G (6p21.3)

Polymorfismus v promotoru genu pro TNF- α v pozici -238 (G/A) byl detekován pomocí PCR za vzniku produktu o 190 bp. Produkt PCR byl následně štěpen pomocí HpaII (C↓CGG) při 37 °C po dobu 4 hodin. Vzniklé fragmenty byly separovány elektroforézou ve 3 % agarozovém gelu a vizualizovány ethidium bromidem. Alela G má 169 bp a 21 bp dlouhé fragmenty, alela A 190 bp dlouhý fragment a heterozygoti AG vykazovali všechny tři fragmenty: 190 bp, 169 bp a 21bp.

TNF- α -308 A/G (6p21.3)

Polymorfismus v promotoru genu pro TNF- α v pozici -308 (G/A) byl detekován pomocí PCR. Vzniklý produkt měl délku 328 bp. Produkt PCR byl následně štěpen pomocí BsmFI (GGG AC (N)₁₀ ↓) při 65 °C po dobu 4 hodin. Vzniklé fragmenty byly odděleny elektroforézou ve 3% agarozovém gelu a vizualizovány ethidium bromidem. Alelu G jsme detekovali pomocí fragmentů délky 137 bp, 103 bp a 88 bp; alelu A jako 191 bp a 137 bp dlouhé fragmenty; u heterozygotů jsme viděli všechny čtyři fragmenty: 191 bp, 137 bp, 103 bp a 88 bp.

TNF- β +252 (6p21.3)

Polymorfismus v prvním intronu genu pro TNF- β v pozici -252 (G/A) byl detekován pomocí PCR za vzniku produktu o 782 bp. PCR produkt byl následně štěpen pomocí NcoI (C↓CATGG) při 37 °C po dobu 3 hodin. Vzniklé fragmenty byly odděleny elektroforézou ve 2% agarozovém gelu a vizualizovány ethidium bromidem. Alela G se jevila jako 586 bp a 196 bp dlouhé fragmenty, alela A jako 782 bp dlouhý fragment (homozygot AA se ale v souboru nevyskytoval); u heterozygotů jsme zaznamenali všechny tři fragmenty: 782 bp, 586 bp a 196 bp.

3'TACE (ADAM17, 2p25)

V 3' oblasti genu pro TACE byly detekovány genotypy polymorfismu v 3' oblasti genu pro TACE (tumor necrosis factor converting enzyme, 2p25). Amplifikace se provádí metodou PCR s následnou heteroduplexní analýzou na nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu (MDETM Gel; AT BIOCHEM, USA). Touto analýzou prokážeme dvojgenotyp polymorfismů A +/- v pozici 2 698 a G2712A v genu pro TACE, které jsou v kompletní vazbě.

Statistické metody

Asociační analýzy byly prováděny standardními metodami χ^2 , Fischerovým testem a Kruskalovým-Wallisovým testem ANOVA, pomocí statistického programu Statistica StatSoft 1994–2000 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Hodnoty $p < 0,05$ jsou považovány za statisticky významné.

Tabulka II
Korelace plazmatických koncentrací big endotelinu s laboratorními parametry a funkcí levé komory

	Počet	Spearmanův test	T (N-2)	p
End (pmol/l) 1 & big end (pmol/l)	172	0,356543	4,97577	0,000002
EF (%) & big end (pmol/l)	211	-0,266274	-3,99366	0,000090
Chol (mmol/l) & big end (pmol/l)	212	-0,248508	-3,71785	0,000258
HDL (mmol/l) & big end (pmol/l)	211	-0,178170	-2,61765	0,009501
LDL (mmol/l) & Big end (pmol/l)	208	-0,186671	-2,72717	0,006939
TG (mmol/l) & Big end (pmol/l)	211	-0,225760	-3,35027	0,000958
Gly (mmol/l) & Big end (pmol/l)	212	-0,178168	-2,62388	0,009332
Bil (mol/l) & big end (pmol/l)	211	0,375426	5,85581	0,000000

End – endotelin, big end – big endotelin, EF – ejekční frakce, Chol – cholesterol, HDL – high density lipoprotein, LDL – low density lipoprotein, TG – triglyceridy, Gly – glykemie, Bil –bilirubin

Tabulka III
Signifikantní rozdíly v plazmatických koncentracích big endotelinu podle stupně plicního městnání (test Kruskalův-Wallisův, ANOVA: H (2, n = 187) = 14,87937, p = 0,0006)

PM	Big end (pmol/l) průměr	Big end n	Big end (pmol/l) SD	Big end (pmol/l) minimum	Big end (pmol/l) maximum
0	1,153333	27	0,601715	0,260000	3,26000
1	1,867213	89	2,520095	0,110000	17,64000
2	2,541070	71	2,613111	0,330000	18,45000
Celá skupina	2,019989	187	2,418467	0,110000	18,45000

PM 0 – bez městnání, PM 1 – redistribuce plicní kresby, PM 2 – intersticiální edém, SD – směrodatná odchylka, Big end – big endotelin

VÝSLEDKY

V souboru byly nalezeny významné korelace mezi plazmatickými koncentracemi E-1 a big endotelinu a níže uvedenými klinickými a laboratorními parametry (*tabulka II*); zejména mezi plazmatickými koncentracemi big endotelinu a stupněm plicního městnání (*tabulka III*).

Tabulka IV
Vztahy mezi plazmatickými koncentracemi big endotelinu a polymorfismy v genech pro endotelin-1

Polymorfismus	Big end (P)	N	H
G8002A	0,8194	258	0,3984569
-3A/-4A	0,7499	260	0,5756244

P – pravděpodobnost signifikantního rozdílu v plazmatických koncentracích mezi genotypy, N – počet vyšetřených, H – testové kritérium Kruskalova-Wallisova testu ANOVA (neparametrický test používaný pro srovnání více než dvou nezávislých skupin – genotypů)

Tabulka V
Vztahy mezi plazmatickými koncentracemi endotelinu a polymorfismy v genech pro endotelin 1

Polymorfismus	Endotelin-1 (P)	N	H
G8002A	0,8700	175	0,2784973
-3A/-4A	0,8711	178	0,27604900

P – pravděpodobnost signifikantního rozdílu v plazmatických koncentracích mezi genotypy, N – počet vyšetřených, H – testové kritérium Kruskalova-Wallisova testu ANOVA (neparametrický test používaný pro srovnání více než dvou nezávislých skupin – genotypů)

U pacientů s chronickým srdečním selháním jsme však neprokázali ani naznačené rozdíly v plazmatických koncentracích big endotelinu a E-1 mezi genotypy obou polymorfismů v genu pro endotelin (*tabulky IV a V*), ani v plazmatických koncentracích TNF- α mezi genotypy ve čtyřech polymorfismech v genu pro TNF- α , β a TACE (*tabulka VI*).

Prokázali jsme naproti tomu signifikantní rozdíl v distribuci genotypů a frekvenci alel polymorfismů 3'TACE v souboru pacientů s CHSS rozděleném podle plicního městnání (*obrázek 1*).

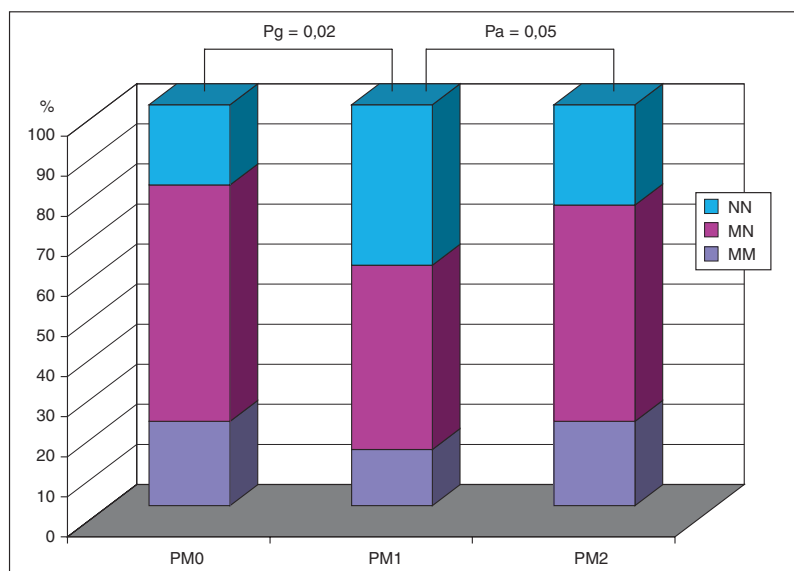
Zajímavé je, že dvojnásobných heterozygotů pro endotelin -3A/-4A a dva polymorfismy TNF je hraničně signifikantně méně u pacientů s CHSS při srovnání „case-control“:

genotypů -3A-4A (EDN-1)/AG (-308A/G TNF- α) bylo 20 (12 %) na 165 kontrol oproti 15 (7 %) na 224 pacientů s CHSS (poměr šancí /odds ratio/ = 0,55, 95% konfidenční interval 0,27–1,11, p = 0,07). Dvojnásobných heterozygotů -3A-4A (EDN-1)/AG (+252

Tabulka VI
Vztahy mezi plazmatickými koncentracemi TNF- α a polymorfismy v genech pro TNF- α , β a TACE (TNF- α konvertující enzym)

Polymorfismus	TNF- α (P)	N	H
-308G/A TNF- α	0,2860	70	2,503338
-238 G/A TNF- α	0,3380	108	0,9179796
TNF beta NcoI	0,4361	107	1,659792
3'TACE	0,5795	70	1,091255

P – pravděpodobnost signifikantního rozdílu v plazmatických koncentracích mezi genotypy, N – počet vyšetřených, H – testové kritérium Kruskalova-Wallisova testu ANOVA (neparametrický test používaný pro srovnání více než dvou nezávislých skupin – genotypů)



Obr. 1

Zastoupení genotypů a alel polymorfismů 3'TACE v souboru pacientů s chronickým srdečním selháním rozděleném podle plicního městnání

Pg – pravděpodobnost rozdílu v distribuci genotypů,

Pa – pravděpodobnost rozdílu ve frekvenci alel,

PM 0 – bez městnání,

PM 1 – redistribuce plicní kresby,

PM 2 – intersticiální edém

A/G TNF α a β) jsme identifikovali 30 (19 %) na 155 kontrol oproti 39 (12 %) na 315 pacientů s CHSS (odds ratio = 0,64, 95% konfidenční interval 0,38–1,07, $p = 0,06$).

Závěrem je tedy možno říci, že polymorfismus -3A/-4A v genu pro E-1 sám o sobě není asociován s klinickými ani biochemickými parametry chronického srdečního selhání, ale jeho interakce s polymorfismy v genu pro TNF- α i β jsou evidentní. Dvojnásobná asociace s parametry měřenými u srdečního selhání jsou obvykle spjaté s vyššími plazmatickými koncentracemi právě u těchto heterozygotních dvojgenotypů (údaje nejsou uvedeny). Otázkou je, jaké jejich zastoupení bychom našli u pacientů, kteří na srdeční selhání zemřeli.

Všechny výsledky svědčí pro to, že jde o geny – modifikátory, které jsou schopny modulovat průběh chronického srdečního selhání. Interakční výsledky podporují koncepci multigenní dědičnosti, jako interakce v populaci četných, relativně neutrálních alel.

DISKUSE

Endotelin u pacientů s chronickým srdečním selháním reguluje plicní vaskulární rezistenci.^(2,3) I v naší dřívější práci, která se zabývá vztahy echokardiografických a hemodynamických parametrů s humorálními působky, jsme našli významné korelace mezi plazmatickou koncentrací endotelinu a středním arteriálním tlakem v plicnici a středním tlakem v zaklínění, což může odrážet nepříznivý účinek endotelinu na plicní cirkulaci.⁽⁴⁾ I v této práci jsme našli volnější, ale statisticky vysoce významné korelace mezi plazmatickými koncentracemi big endotelinu a ejekční frakcí levé komory a koncentrací brain-natriuretic-kého peptidu. Zajímavým zjištěním byly i velmi vol-

né negativní korelace plazmatických koncentrací big endotelinu s koncentracemi cholesterolu, HDL-cholesterolu, LDL-cholesterolu, triglyceridů a glykemie. Lze spekulovat o tom, že pacienti s vyšší plazmatickou koncentrací big endotelinu a tedy i tíží srdečního selhání mohou mít výraznější katabolismus než pacienti s lehčím stupněm srdečního selhání. Big endotelin jako prekurzor endotelinu daleko lépe odráží nadprodukcii endotelinu než vlastní plazmatické koncentrace endotelinu.⁽⁵⁾ Ve studii Pachera a spol. plazmatická koncentrace big endotelinu signifikantně korelovala s funkční třídou NYHA, denní dávkou furosemidu a plazmatickou koncentrací sodíku. Byly nalezeny významné korelace mezi tlakem v pravé síni, tlakem v zaklínění, indexem tepového objemu, srdečním indexem, ejekční frakcí a plicní vaskulární rezistencí (vždy $p < 0,0001$).⁽⁶⁾ Pacienti se srdečním selháním, kteří mají poruchu funkce jak levé tak i pravé komory, mají hodnoty big endotelinu vyšší než pacienti s pouhou levokomorovou dysfunkcí.^(7,8) V naší dřívější práci byla statisticky významně vyšší koncentrace big endotelinu u nemocných, kteří zemřeli nebo u těch, kteří byli transplantováni než u přežívajících.⁽⁹⁾ Přežívání je signifikantně nižší u pacientů s plazmatickou koncentrací big endotelinu vyšší než 4,3 fmol/l ($p < 0,01$). Tato práce ukazuje, že pacienti s těžkým srdečním selháním mohou být rozděleni na různé skupiny s rozdílným rizikem kardiálního úmrtí na podkladě plazmatických koncentrací big endotelinu, které tak mohou pomoci v rozhodování před zařazením pacientů na čekací listinu na srdeční transplantaci.⁽¹⁰⁾ Plazmatické koncentrace big endotelinu jsou tak významným prognostickým ukazatelem.^(11,12)

Brugada a spol. prokázali, že polymorfismus G8002A E-1 ovlivňuje hypertrofii levé komory u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. Výraznější masa levé komory byla nalezena u nosičů alely 8002A ve srovnání s ostatními.⁽¹³⁾

Komplexní interakce mezi třemi polymorfismy (CA/CT dinukleotidový opakovací polymorfismus v promotoru genu pro endotelin-1, I/D polymorfis-

mus v promotoru a Taq1 v intronu 4) uvnitř genu kódujícího E-1 u pacientů s hypertenzí byly studovány naší skupinou. Alelická délka CA/CT repetitivního polymorfismu byla signifikantně vyšší u hypertoniků. U hypertoniků, I/D promotorový polymorfismus koreloval s homozygotností u CA/CT repetitivního promotorového polymorfismu.^(14,15)

Lajemi a spol. hodnotili vliv genetických variant několika komponent endotelinového systému: endotelinový receptor A (ETAR) (-231A/G a 1363 C/T), endotelinový receptor B (ETBR) 30G/A a 138 inserce/deleční polymorfismus v genu pro endotelin-1 (I/D) (= -3A/-4A) na tuhost aorty, geometrii levé komory a parametry arteria radialis u 528 dosud neléčených hypertoniků. Genové polymorfismy pro ETAR -231A/G a ETBR 30G/A byly asociovány s aortální tuhostí, měřenou pulsovou rychlostí. Nebyl nalezen vztah mezi polymorfismem 138I/D genu pro endotelin-1 a parametry pro levou komoru či arteria radialis.⁽¹⁶⁾

Existuje pouze omezené množství prací, které se zabývají geny kódujícími endotelin či receptory pro endotelin: ETAR a ETBR u pacientů se srdečním selháním. V případě endotelinu-1 se naše práce řadí k prvním studiím, protože doposud bylo publikováno jen minimálně podobných prací. Jednou z nich je studie CARDIGENE, která se zabývá polymorfismem genu pro endotelin-1 (138 Insertion A, 61 G/T), receptor endotelinu ETA (231 A/G, 1 363 C/T) a receptor endotelinu ETB (30 A/G). Byla provedena u 433 pacientů a 400 věkově a pohlavím shodných kontrol. V této studii homozygoti pro T alelu u 1 363 C/T (cytosin/thymin) polymorfismu na exonu 8 v receptorovém genu ETA měli signifikantně vyšší výskyt onemocnění dilatační kardiomyopatie. Analýza ostatních polymorfismů neukázala rozdíly ve frekvenci genotypů či alel mezi pacienty a kontrolami.⁽¹⁷⁾ U dilatační kardiomyopatie byly rovněž vyšetřovány polymorfismy genu pro E-1, receptory ETA a ETB a bylo zjištěno, že polymorfismus ETA receptoru H323H (C/T) pro nositele alely T byl negativním prediktorem přežívání.⁽¹⁸⁾ V naší studii, která se zabývala korelacemi dvou polymorfismů v genu pro E-1 a plazmatickými koncentracemi endotelinu 1 a big endotelinu, jsme nenalezli žádný vzájemný vztah. Zdá se, že u chronického srdečního selhání jsou plazmatické koncentrace působků více ovlivněny hemodynamickými ukazateli a tíží onemocnění jako takového, která může překrývat vrozený genetický podklad. U pacientů s chronickým srdečním selháním jsme však našli signifikantní rozdíl v distribuci genotypů -3A/-4A polymorfismu pro endotelin-1 ve skupině pacientů s kardiotorakálním indexem (KTI) nad 60 % a s plicním městnáním. U pacientů s chronickým srdečním selháním s KTI nad 60 % se zvyšuje také počet nositelů genotypu ET-1 8002A (AA a AG genotypů).⁽¹⁹⁾ Mohla by existovat korelace mezi genetickými polymorfismy a klinickými známkami plicního městnání u pacientů s těžším stupněm srdečního selhání. Tato asociace by mohla být zprostředkována tkáňovým endotelinovým systémem, jehož aktivitu však lze v klinické praxi měřit jen obtížně.⁽²⁰⁾ V naší další práci jsme u pacientů se srdečním selháním na podkladě ischemické choroby srdeční našli rozdíl v distribuci genotypu G8002A pro endotelin v závislosti na dalších přidatných onemocněních. Nemocní s ICHS a diabetes mel-

litus, prodělaným infarktem myokardu či ischemickou chorobou dolních končetin, měli častěji přítomnu alelu A a méně často přítomnu alelu G než ischemici bez těchto onemocnění. Genotyp s alelou A je spojen s vyšším rizikem dalších přidatných onemocnění.⁽²¹⁾ Detekce genotypů pro endotelin není tedy potřebná pro léčbu rozvinutého srdečního selhání, ale pro vytipování rizikových pacientů s chronickým srdečním selháním, u nichž by se měla důsledněji uplatňovat prevence a agresivněji léčit přidatná onemocnění – zejména ateroskleróza a diabetes mellitus.

V oblasti cytokinů je u srdečního selhání nejvíce sledován tumor necrosis faktor alfa (TNF- α).⁽²²⁾ Způsobuje svalový úbytek, redukuje svalovou kontraktilitu a indukuje myokardiální hypertrofii.⁽²³⁾ Účinky TNF tak způsobují endoteliální dysfunkci a současně poškození syntézy a zrychlení katabolismu proteinů kosterního svalu.⁽²⁴⁾ Zvýšení TNF, které je pozorováno zejména u pacientů NYHA IV, tak může vést k těžkému omezení tolerance zátěže a koreluje s kardiální kachexií a špatnou prognózou.⁽²⁵⁾

Posouzení TNF- α u pacientů s chronickým srdečním selháním bylo původně užíváno jako biochemický mechanismus pro kachexii, která se u těchto pacientů objevuje. Torre-Amione a spol. hodnotili retrospektivně plazmatické koncentrace tohoto cytokinu ve studii SOLVD, kdy zjistili že zvyšování TNF- α je spojeno se zhoršením srdečního selhání.⁽²⁶⁾ Je známo, že TNF- α působí rovněž kardiodepresivně stimulací inducibilní NO syntázy. Hodnocení TNF- α může mít větší význam u kachektických pacientů se závažnějším srdečním selháním.⁽²⁷⁾

Enzym konvertující TNF- α (TACE) štěpí transmembránovou formu TNF- α a upravuje ji na aktivní solubilní formu. Polymorfismus 3'TACE, který sledujeme v následujících analýzách, je novým polymorfismem, nalezeným v našich laboratořích a jeho vztah ke kardiovaskulárním onemocněním nebyl dosud publikován.

V naší práci jsme prokázali, že pacienti se srdečním selháním, kteří zemřeli nebo byli transplantováni, měli vyšší hodnoty TNF- α než přežívající.^(28,29)

V literatuře zatím nebyla publikována žádná asociace 3'TACE polymorfismu s multifaktoriálním onemocněním. Zvýšená exprese TACE byla nalezena v lidských tkáních u myokarditidy, dilatační kardiomyopatie či srdečního selhání.

V naší práci jsme nenalezli žádné vztahy polymorfismů TNF- α , β či TACE k plazmatickým koncentracím TNF- α . Situace je tak obdobná jako v případě endotelinového systému, kdy plazmatické koncentrace těchto působků jsou zřejmě určovány přímo závažností onemocnění a polymorfismy v genech kódující tyto působky slouží spíše k určení určitého rizika. Polymorfismus NN v TACE a alela N byla čtenější u pacientů s městnáním na plicích oproti pacientům bez městnání.

ZÁVĚR

1. V naší práci jsme nenalezli žádné korelace mezi dvěma nejčastějšími polymorfismy genu pro endotelin-1 (G8002A a -3A/-4A) a plazmatickou koncentrací endotelinu-1 či big endotelinu. Nabízí se však možnost hypotézy, že v případě produkce endotelinu u srdečního selhání není podstatné genetické vyba-

vení, nýbrž spíše hemodynamická situace daná vlastním klinickým onemocněním.

2. Nebyly nalezeny korelace mezi plazmatickými koncentracemi TNF- α a genovými polymorfismy v genech pro TNF- α , -308 A/G, -238 A/G, TNF- β , Ncol a 3'TACE. Stejně jako v případě vztahu plazmatických koncentrací endotelinu a big endotelinu k polymorfismům genu pro endotelin, bude i plazmatická koncentrace TNF- α určována zřejmě hemodynamickou situací než podmíněna geneticky.

Detekce genotypů není potřebná pro léčbu srdečního selhání, ale pro vytipování rizikových pacientů, u nichž by se měla důsledněji uplatňovat prevence a agresivněji léčit přídatná onemocnění, zejména ateroskleróza a diabetes mellitus.

LITERATURA

1. Špinar J, Špinarová L, Vítovec J, a spol. Big endotelin a chronické srdeční selhání. *Vnitř Lék* 2002;48:3-7.
2. Špinar J, Vítovec J. Chronické srdeční selhání. Brno: Medica s. r. o., 2000:65.
3. Yanagisawa M, Kurihana H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
4. Špinarová L, Toman J, Pospíšilová J, et al. Humoral response in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol* 1998;65:227-32.
5. Bartůněk L. Endoteliny a chronická srdeční insuficience. *Vnitř Lék* 2000;46:54-7.
6. Pacher R, Stanek B, Huelsman M, et al. Prognostic impact of big endothelin-1 plasma concentrations compared with invasive hemodynamic evaluation in severe heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:633-41.
7. Špinarová L, Toman J, Meluzín J, et al. Big endothelin, interleukin 6 and right ventricle function assessed by tissue Doppler imaging. *Eur J Echocardiogr* 2004;5(S1):68.
8. Špinarová L, Toman J, Meluzín J, a spol. Big endotelin, interleukin 6 a funkce pravé komory. *Vnitř Lék* 2005;51:965-70.
9. Špinar J, Vítovec J, Špinarová L, et al. The value of big endothelin level and hemodynamic variables in heart transplant candidates. *Cor Vasa* 2000;42:495-500.
10. Špinar J, Vítovec J, Špác J, Blaha M, Špinarová L, Toman J. Non invasive prognostic factors in chronic heart failure. One year survival of 300 patients with diagnosis of chronic heart failure due to ischemic heart disease or dilative cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 1996;56:283-8.
11. Pousset F, Isnard R, Lechat P, et al. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997;18:254-8.
12. Stanek B, Frey B, Hulsmann M, et al. Validation of big endothelin plasma levels compared with established neurohumoral markers in patients with severe chronic heart failure. *Transpl Proc* 1997;29:595-6.
13. Brugada R, Kelsey W, Lechin M, et al. Role of candidate modifier genes on the phenotypic expression of hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Invest Med* 1997;45:542-51.
14. Vašků A, Izakovičová Hollá L, Tschoplová S, et al. An association of three polymorphisms in the gene coding for endothelin-1 in essential hypertension. *Atherosclerosis* 2000;151:255.
15. Klepárník K, Malá Z, Příbyla L, Blažková M, Vašků A, Boček P. Ultrafast detection of microsatellite repeat polymorphism in endothelin 1 gene by electrophoresis in short capillaries. *Electrophoresis* 2000;21:238-46.
16. Lajemi M, Gautier S, Poirier O, et al. Endothelin gene variations and aortic and cardiac structure in never-treated hypertensives. *Am J Hypertens* 2001;14:755-60.
17. Charron P, Tesson F, Poirier O, et al. Identification of a genetic risk for idiopathic dilated cardiomyopathy. Involvement of a polymorphism in the endothelin receptor type A gene. *Eur Heart J* 1999;20:1587-90.
18. Herrmann SM, Schmidt-Petersen K, Pfeifer J, et al. A polymorphism in the endothelin-A receptor gene predicts survival in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2001;22:1948-53.
19. Špinarová L, Špinar J, Vašků A, et al. Big endothelin in chronic heart failure: marker of disease severity or genetic determination? *Int J Cardiol* 2004;93:63-8.
20. Špinarová L, Špinar J, Vašků A, et al. Gene polymorphisms of endothelin 1 in patients with chronic heart failure. Mendel symposium: genes and the heart. Abstract book. Brno, August 26-29, 2003.
21. Špinarová L, Špinar J, Vašků A, a spol. Má polymorfismus G8002A v genu pro endotelin význam pro další rizika u pacientů se srdečním selháním? *Vnitř Lék* 2006;52:34-9.
22. Niebauer J. Inflammatory mediators in heart failure. *Int J Cardiol* 2000;72:209-13.
23. Levine B, Kalman J, Mayer L, et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *New Engl J Med* 1993;323:236-41.
24. Packer M. Is tumor necrosis factor an important neurohumoral mechanism in chronic heart failure? *Circ* 1995;92:1379-82.
25. Sharma RB, Coats AJ, Anker S. The role of inflammatory mediators in chronic heart failure: cytokines, nitric oxide, and endothelin-1. *Int J Cardiol* 2000;72:175-86.
26. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol* 1996;27:1201-6.
27. Feldman AM, Combes A, Wagner D, et al. The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:537-44.
28. Špinarová L, Toman J, Meluzín J, et al. Is the function of right ventricle important for mortality of chronic heart failure patients? *Eur J Echocardiogr* 2003;4S:133.
29. Špinarová L, Toman J, Meluzín J, a spol. Je funkce pravé komory důležitá pro prognózu pacientů s chronickým srdečním selháním? *Cor Vasa* 2005;47:33-7.

Došlo do redakce 13. 11. 2006

Přijato po úpravách 3. 1. 2007