

На правах рукописи

Гаврилюк Наталья Дмитриевна

**ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ
АНЕВРИЗМЫ ВОСХОДЯЩЕГО ОТДЕЛА АОРТЫ**

14.01.05 – кардиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук
Моисеева Ольга Михайловна

Официальные оппоненты:

Затейщиков Дмитрий Александрович – доктор медицинских наук, профессор, государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №51 Департамента здравоохранения г.Москвы», первичное сосудистое отделение, заведующий.

Болдуева Светлана Афанасьевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И.Мечникова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, кафера факультетской и госпитальной терапии, заведующая.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «22» марта 2021г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.054.04 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт–Петербург, ул. Аккуратова, д.2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт–Петербург, ул. Аккуратова, д.2, <http://www.almazovcentre.ru/>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 208.054.04,
доктор медицинских наук, профессор



Недошивин Александр Олегович

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Распространенность аневризмы восходящего отдела аорты (АВОА) в Российской Федерации по данным различных авторов варьирует от 0,16 до 1,6% (Покровский А.В., 1979; Иртюга О.Б., 2012). В странах Западной Европы АВОА диагностируется в 0,8% случаев (Landenhed M., 2015). В США расширение грудной аорты стоит на 15-м месте в рейтинге всех причин смерти лиц старше 65 лет (CDC report. 2018).

Наибольшую угрозу для жизни представляют диссекция и разрыв АВОА. В США от разрыва аневризм аорты (брюшной и грудной) ежегодно погибает большее количество людей, чем от ВИЧ-инфекции (Chau К.Н., 2013). При наступлении диссекции АВОА летальность в первые сутки без оперативного вмешательства составляет порядка 50 %, и даже при условии его выполнения достигает 20-25 % (Ehrlich M.P., 2000). Число осложнений при плановых операциях на АВОА, в том числе летальных исходов, в 7 раз меньше, чем при вмешательствах, выполняемых по экстренным показаниям (Williams J.B., 2012).

Несмотря на огромное значение ранней диагностики и планового оперативного лечения АВОА, своевременное выявление данной патологии по-прежнему вызывает большие трудности. Связано это в первую очередь с бессимптомным в 95% случаев течением заболевания (Elefterisdes J., 2008). С другой стороны, с увеличением использования визуализирующих методик все чаще выявляется пограничное расширение аорты, встречающееся в 1% популяции (Parsche et al 1980). Таким образом, появляется большое число лиц с аневризмой аорты пограничного диаметра, которые нуждаются в стратификации риска. Вместе с тем, знаний о патогенезе АВОА, полученных к настоящему времени, не хватает для прогнозирования дальнейшего течения заболевания.

Согласно настоящим рекомендациям (Hiratzka L.F., 2010; ESC guidelines, 2014), показанием к хирургическому лечению является достижение определенного диаметра АВОА. Однако, по данным крупного регистра диссекций ВОА, немалая доля случаев приходится на диаметр аорты 40-50мм (Evangelista 2015). Поэтому до сих пор остается нерешенным вопрос о дополнительных, в том числе генетических, факторах риска, которые могли бы предотвратить данные осложнения путем более раннего планового оперативного вмешательства на аорте.

По сравнению с аневризмой брюшной аорты, для которой ведущей причиной остается атеросклероз, в развитии аневризм грудного отдела аорты большое значение придается наследственности. Известно, что в 20% случаев АВОА являются наследуемыми (Romianowski et al, 2013). Важность определения причинной мутации при АВОА диктуется более агрессивным характером большинства наследуемых аневризм и риском диссекции при меньшем диаметре аорты.

Наиболее часто при семейной АВОА встречаются мутации гена АСТА2. В то же время работы по изучению мутаций гена АСТА2 у пациентов с несемейной АВОА в настоящее время единичны и противоречивы (Regalado E., 2015;

Morisaki H., 2009). Кроме того, полученные данные невозможно перенести на российскую популяцию, так как они получены на других этнических группах.

За последние годы множество работ посвящено изучению роли матриксных металлопротеиназ (ММП) в патогенезе АВОА. Получены убедительные доказательства дисбаланса между ММП и их тканевыми ингибиторами (ТИМП) в ткани аорты при развитии аневризм грудного и брюшного отделов независимо от причины (Rabkin S.W., 2014; Jackson V., 2012; Tamarina N.A., 1997; Wilton E., 2008; Иртюга О.Б., 2015).

Однако вклад полиморфных вариантов генов ММП хорошо изучен только на примере больных с аневризмой брюшной аорты (Duellman T., 2013). Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) генов ММП с развитием АВОА изучалась фрагментарно и на небольших выборках до 100 человек (LeMaire A., 2006; Rodriguez I., 2012; Yamada Y., 2012; Matrin et al, 2013; Kato K., 2012). И только в одном исследовании проводилось сопоставление данных генотипирования с реальным уровнем ММП в тканях больных АВОА.

Таким образом, изучение распределения генетических вариантов гена *ACTA2* и генов ММП у лиц с несемейной АВОА актуально с научной и практической точек зрения для совершенствования алгоритмов обследования данной категории больных в дальнейшем.

Цель исследования

Оценить клиническое значение полиморфизмов кандидатных генов у лиц с несемейной несиндромной аневризмы восходящего отдела аорты для обоснования персонализированного подхода к лечению и профилактике заболевания.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать клинические особенности несемейной несиндромной аневризмы восходящего отдела аорты и ее осложнений.
2. Проанализировать распределение генотипов полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ 1, 2, 9, 13 типов у больных с несемейной несиндромной аневризмой восходящего отдела аорты.
3. Оценить активность и содержание матриксных металлопротеиназ у пациентов с несемейной несиндромной аневризмой восходящего отдела аорты и сопоставить их с результатами генотипирования.
4. Изучить встречаемость миссенс-мутаций и редких полиморфных вариантов гена *ACTA2* в популяции пациентов с несемейной несиндромной аневризмой восходящего отдела аорты.

Научная новизна

Получены новые данные о профиле матриксных металлопротеиназ в стенке аорты и сыворотке крови пациентов с несемейной несиндромной аневризмой восходящей аорты в зависимости от анатомии аортального клапана.

Впервые на больших выборках (309 пациентов с несемейной несиндромной аневризмой восходящего отдела аорты и 321 человек контрольной

группы) проведено сравнение распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов матриксных металлопротеиназ. Показаны различия в концентрации матриксных металлопротеиназ в стенке аорты и сыворотке крови в зависимости от вариантов полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ.

Впервые в российской популяции пациентов с несемейной несиндромной аневризмой восходящего отдела аорты проведено секвенирование гена гладкомышечного актина *ACTA2*. Выявлено 15 миссенс-вариантов в некодирующих областях гена, 9 из которых описаны ранее, 6 - описаны впервые.

Теоретическая и практическая значимость работы

У пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты выявлены изменения концентрации матриксных металлопротеиназ в стенке аорты и сыворотке крови, включающие повышение концентрации общей и латентной матриксной металлопротеиназы 2 типа, в большей степени у пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном, а также повышение концентрации латентной матриксной металлопротеиназы 9 типа. При исключении влияния атеросклероза отмечен более высокий уровень активности матриксных металлопротеиназ 9 и 1 типов в ткани аорты у пациентов с бicuspidальным аортальным клапаном.

Выявлена корреляция между концентрацией латентной матриксной металлопротеиназы 9 в сыворотке крови с активностью матриксных металлопротеиназ 9 и 1 в ткани аорты, а также связь скорости распространения пульсовой волны с концентрацией матриксных металлопротеиназ 2 и 9 сыворотки и матриксной металлопротеиназы 1 в ткани аорты. Полученные данные свидетельствуют о роли воспалительного процесса в патогенезе структурных изменений стенки аорты.

Определение жесткости сосудистой стенки имеет значение только для прогнозирования дилатации дуги и брюшного отдела аорты, что подтверждается наличием взаимосвязи между скоростью распространения пульсовой волны и диаметром аорты в вышеперечисленных отделах.

Показана ассоциация генотипов полиморфных вариантов генов *MMP9* (rs11697325), *MMP2* (rs2285053) и *MMP13* (rs2252070) с аневризмой восходящего отдела аорты, а также связь AA генотипа rs11697325 гена *MMP9* с диаметром аорты и активностью ММП в ткани аорты, что может быть использовано в дальнейшем для стратификации риска пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты, в том числе при пограничных показателях диаметра восходящей аорты.

В настоящей работе доказано отсутствие целесообразности рутинного скрининга мутаций в гене *ACTA2* у лиц с несемейной формой аневризмы восходящего отдела аорты. Дополнительного внимания требуют выявленные редкие интронные полиморфизмы гена *ACTA2*, сопровождавшиеся клиническими признаками: более выраженное расширение аорты, извитость сосудистой сети и молодой возраст.

Методология и методы исследования

В исследование включено 309 пациентов с несемейной аневризмой восходящего отдела аорты. В работе использованы общеклинические, лабораторные и инструментальные методы исследования, соответствующие современному методическому уровню обследования больных с аневризмой восходящего отдела аорты. Достоверность полученных результатов подтверждена современными методами математической статистики.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты характерны изменения профиля матриксных металлопротеиназ в тканях аорты, а также концентрации матриксных металлопротеиназ в сыворотке крови. Пациенты с аневризмой восходящего отдела аорты с двустворчатым аортальным клапаном отличаются более высокой активностью матриксных металлопротеиназ 1 и 9 в стенке восходящей аорты. Повышение скорости распространения пульсовой волны ассоциировано с изменением концентрации матриксных металлопротеиназ в сыворотке и ткани аорты у пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты на фоне трикуспидального аортального клапана, но отражает преимущественно возрастные изменения в стенке аорты и влияние на нее факторов риска.
2. Полиморфные варианты генов: *MMP2* (rs2285053), *MMP9* (rs11697325) и *MMP13* (rs2252070) могут быть дополнительными факторами риска развития аневризмы восходящего отдела аорты. Учитывая ассоциацию генотипа AA rs11697325 гена *MMP9* с более выраженным расширением аорты в группе с аневризмой восходящего отдела аорты, можно говорить о перспективах исследования генетических вариантов генов матриксных металлопротеиназ для оценки риска осложнений аневризмы восходящего отдела аорты. В популяции Северо-Западного региона России полиморфные варианты гена *ACTA2* не могут рассматриваться в качестве ведущей генетической причины развития несемейной аневризмы восходящего отдела аорты.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования представлены в виде докладов на российских и международных научных конференциях и симпозиумах: 24-25-м конгрессы Европейского Общества Артериальной Гипертензии (Милан 2013; Лондон 2014), Российский национальный конгресс кардиологов (Москва, 2015), Конгресс Европейского общества кардиологов (Барселона 2014; Лондон, 2015).

С исследованием дважды были получены призовые места в конкурсе грантов Санкт-Петербурга для студентов, аспирантов, молодых ученых, молодых кандидатов наук – 2015г. и 2016г., организованном Комитетом по Науке и Высшей Школе. Результаты доложены в виде устных докладов на 20-й и 21-й Санкт-Петербургской ассамблеи молодых ученых и специалистов в 2015г. и 2016г.

Результаты диссертационной работы включены в отчет о научно-исследовательской работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России по теме государственного задания 2014-2017 гг. «Изучение патофизиологических механизмов формирования патологии аорты различной локализации, в том числе при системных заболеваниях соединительной ткани, и поиск новых прогностических маркеров и способов лечения». Работа прошла апробацию на заседании проблемной комиссии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова».

По результатам исследования опубликованы 20 печатных работ, из них 10 статей: 6 – в изданиях, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации, 1 - в рецензируемых международных журналах; 10 тезисов как в отечественных (4), так и в зарубежных (6) сборниках трудов научных конференций.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в диагностический и лечебный процесс отделения кардиологии №6 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России. Теоретические положения, сформулированные в диссертационном исследовании, могут быть рекомендованы для использования в учебном процессе кафедр кардиологии, внутренних болезней и сердечно-сосудистой хирургии Института медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 94 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа содержит 12 таблиц и 10 рисунков. Указатель литературы включает 136 источников, из них 2 – отечественных и 134 – зарубежных.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» с сентября 2012 года по май 2016 года. В исследование включено 335 пациентов АВОА. Перед включением в исследование все пациенты подписали информированное согласие, одобренное локальным этическим комитетом. Обследование проводилось согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов по диагностике и лечению заболеваний аорты (ESC Guidelines, 2014). Исследуемая группа условно разделена на 2 подгруппы в зависимости от морфологии аортального клапана (в соответствии с интраоперационными данными и/или результатами

эхокардиографического исследования): пациенты с бicuspidальным (БАК) и трикуспидальным аортальным клапаном (ТАК).

Критерии включения в исследование были следующими:

- 1.Расширение восходящего отдела аорты >40мм по данным мультиспиральной компьютерной томографии с внутривенным контрастированием;
- 2.Возраст 18-70 лет,
- 3.Подписание добровольного информированного согласия

К критериям невключения относились:

- 1.Синдромные случаи аневризмы восходящего отдела аорты, такие, как синдром Марфана, синдром Элерса-Данлоса, синдром Лойса-Дитца и др.
- 2.Инфекционный эндокардит клапанов сердца,
- 3.Хроническая ревматическая болезнь сердца,
- 4.Посттравматическая аневризма восходящей аорты,
- 5.Тяжелые сопутствующие заболевания (инсулинозависимый сахарный диабет, бронхиальная астма или хроническая обструктивная болезнь легких тяжелого течения, заболевания системы крови, аутоиммунные заболевания и т.д.),
- 6.Беременность и/или период лактации,
- 7.Онкологические заболевания.

Для оценки влияния традиционных факторов риска и клинко-лабораторных данных выбрана группа сравнения – 116 пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, не имеющих АВОА. Контрольную группу для оценки распределения полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ составили 227 практически здоровых лиц. Контрольные образцы для секвенирования гена *AC1A2* в количестве 51 были взяты у той же группы.

У 66 больных с АВОА, отобранных для хирургического лечения, проводился интраоперационный забор участков стенки восходящей аорты. Контрольная группа для оценки нормального уровня матриксных металлопротеиназ и компонентов внеклеточного матрикса представлена биопсийным материалом от 15 доноров ортотопической трансплантации сердца.

Контрольные группы и группа больных с АВОА были сопоставимы по демографическим характеристикам.

Методы исследования:

Клиническое обследование. Всем пациентам проведены: сбор жалоб, изучение анамнеза заболевания и объективный осмотр; эхокардиография по стандартному протоколу (Vivid 7 Dimension, GE), МСКТ аортография грудного и брюшного отделов с контрастным усилением (Siemens, Somatom Definition flash 128).

Исследование показателей жесткости сосудистой стенки проведено методом аппланационной тонометрии на приборе SphygmoCor (Atcor Medical, Австралия) у 151 пациента с АВОА.

Генетическое обследование. Выделение геномной ДНК из образцов цельной крови выполнялось с использованием наборов QIAamp blood mini kit QIAGEN (Германия). Далее проводилось определение полиморфизмов генов ММП -1, -2, -9 и 3 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с помощью аллель-специфичных праймеров с флуоресцентными зондами (rs514921 в гене *MMP1*, rs2285053 в *MMP2*, rs 11697325, rs2274755, rs17599 в *MMP9*, rs675 392 и rs2252070 в *MMP13*) Applied Biosystems на амплификаторе 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США). Для анализа гена *ACTA2* было применено пиросеквенирование - вариант секвенирования нового поколения (NGS) - (GS Junior, Roche, США). В данной работе использовалось «пулирование» - смешивание образцов от разных пациентов в одной «пуле» с последующей идентификацией лиц с полиморфизмами.

Исследование биопсийного материала. У 66 больных АВОВ проводился интраоперационный забор ткани восходящей аорты. Контрольная группа для оценки нормального уровня матриксных металлопротеиназ представлена биопсийным материалом от 15 доноров ортотопической трансплантации сердца.

Относительное содержание ММП 1, 2 и 9 типа в стенке аорты оценивалось с помощью метода вестерн-блотт. В качестве первых антител выбраны антитела к матриксным металлопротеиназам 2 и 9 (Chemicon, USA). В качестве вторых антител использованы антитела, меченые пероксидазой хрена (Chemicon, USA, AP160A). Концентрация исследуемых веществ обозначалась в условных единицах, которые используются в программе QuantiScan. Активность ММП 1,2 и 9 оценивалась при помощи субстрат-специфической зимографии и выражалась в условных единицах.

Исследование концентрации и активности ММП 1, 2 и 9 в сыворотке крови. Оценка уровней ММП1,2 и 9 в сыворотке крови проводилась с помощью метода вестерн-блотт с использованием первых антител (Chemicon, USA) и вторых антител, меченых пероксидазой хрена (Chemicon, USA, AP160A). Для исследования активности ММП1,2 и 9 использовалась субстрат-специфическая зимография.

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием прикладных статистических программ Statistica for Windows ver. 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Результаты представлены в виде среднего арифметического (M), средней арифметической ошибки (m) и количества признаков в группе. Достоверность различий показателей в группах оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для независимых групп. Для оценки корреляций между признаками применялся корреляционный анализ Спирмена. Для анализа влияния различных генотипов применялся критерий Фишера. Различия считались достоверными при значениях $p < 0,05$. Для оценки связей между скоростью распространения пульсовой волны и клиническими показателями был применен линейный множественный регрессионный анализ.

Результаты исследования и их обсуждение

Основная группа из 335 пациентов АВОА условно разделена на две подгруппы в зависимости от морфологии аортального клапана: БАК и ТАК в соотношении 1:1,2, соответственно. Во всех подгруппах преобладали мужчины (м:ж = 2,8:1). Максимальный диаметр аорты был выше у лиц с ТАК по сравнению с пациентами, имеющими БАК (55 ± 1 мм против 52 ± 1 мм соответственно; $p=0,01$). Диссекция восходящей аорты имела место у 15% больных. Клиническая характеристика подгрупп представлена в таблице №1.

Таблица 1- Клиническая характеристика подгрупп

Показатель	БАК n=150	ТАК n=185	Группа сравнения n=116
Возраст, лет	$52,3 \pm 0,9$	$57,9 \pm 0,7^{***}$ †††	$50,6 \pm 1$
Пол м:ж	3,3:1 ^{***}	2,3:1 ^{**}	1,2:1
ИМТ, кг/м ²	$27,5 \pm 0,4$	$28,6 \pm 0,3 \dagger$	$28,6 \pm 0,5$
Курение, %	45%	44%	55%
Сахарный диабет, %	10%	10%	17%
Офисное САД, мм.рт.ст.	$124 \pm 1^{***}$	$129 \pm 1 \dagger\dagger\dagger$	132 ± 2
Офисное ДАД, мм.рт.ст.	$77 \pm 1^{***}$	$78 \pm 1^{**}$	82 ± 1
Терапия			
Статины, %	21%	25%*	15%
БАБ, %	52%*	53%**	40%
ИАПФ или АРА, %	48%**	63%††	60%
БКК, %	23%†††	9%	0
Лабораторные параметры			
Глюкоза плазмы, ммоль/л	$5,39 \pm 0,08^*$	$5,6 \pm 0,08$	$5,73 \pm 0,13$
ОХС, ммоль/л	$4,7 \pm 0,1^{***}$	$4,8 \pm 0,09^{***}$	$5,4 \pm 0,1$
ТГ, ммоль/л	$1,47 \pm 0,11$	$1,48 \pm 0,09$	$1,66 \pm 0,1$
ХС-ЛПВП, ммоль/л	$1,16 \pm 0,04^*$	$1,15 \pm 0,03^{***}$	$1,34 \pm 0,04$

ХС-ЛПНП, ммоль/л	2,93 ± 0,14**	2,96 ± 0,09**	3,37 ± 0,11
Гомоцистеин, мкмоль/д	14,1 ± 0,7	13,9 ± 0,3	13,2 ± 0,6
Инсулин, пмоль/л	74 ± 9	79 ± 5	89 ± 9
НОМА IR	2,7 ± 0,4	2,9 ± 0,2	3,6 ± 0,5
Креатинин, ммоль/л	82 ± 2	87 ± 2	80 ± 2
СРБ, мг/мл	5,7 ± 1,9	15,9 ± 4,2	3 ± 0,4

Данные представлены в виде средней и ошибки средней. Значимость различий по сравнению с контролем: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$. Значимость различий между подгруппами БАК и ТАК: † - $p < 0,05$, †† - $p < 0,01$, ††† - $p < 0,001$

Результаты компьютерной томографии

Согласно результатам компьютерной томографии, диаметр аорты практически на всех уровнях: синусов Вальсальва, дуги аорты, в нисходящей грудной и брюшной аорте были выше у пациентов с ТАК ($p < 0,05$) (Табл.2).

Таблица 2 - Диаметр различных отделов аорты по данным компьютерной томографии

Показатель	БАК N=89	ТАК N=139
Максимальный диаметр аорты, мм	52,9 ± 0,8	55,8 ± 0,8**
Индекс максимального диаметра аорты, мм/м ²	26,9 ± 0,5	27,9 ± 0,5
Диаметр аорты На уровне синусов Вальсальвы, мм	45,8 ± 1	48,7 ± 0,8*
В восходящем отделе, мм	51,2 ± 1,1	49,9 ± 0,9
На уровне дуги аорты, мм	33,6 ± 0,8	35,7 ± 0,6*
В нисходящем отделе, мм	27,7 ± 0,4	32,1 ± 0,7***
В брюшном отделе, мм	23,3 ± 0,4	27,3 ± 0,6***

Примечание: Данные представлены в виде средней и ошибки средней. Значимость различий между подгруппами БАК и ТАК: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$.

Оценка жесткости сосудистой стенки

По данным апplanationной тонометрии, среди пациентов с АВОА повышение скорости распространения пульсовой волны (СРПВ) отмечалось только в подгруппе ТАК и встречалась у 13% больных (Табл.3). Увеличение

СРПВ было ассоциировано с диаметром аорты на уровне дуги ($r=0,3$, $p=0,006$) и в абдоминальном отделе ($r=0,4$, $p<0,001$). Обнаружена связь повышения СРПВ с концентрацией ММП2 и ММП9 в сыворотке крови у больных с АВОА ($r=0,7$, $p=0,04$ и $r=0,8$, $p=0,02$ соответственно). Выявлена ассоциация СРПВ с ММП1 в ткани у больных с ТАК ($r=0,9$, $p=0,05$).

Таблица 3 - Результаты аппланационной тонометрии

Показатель	БАК N = 27	ТАК N = 78	Группа сравнения N = 46
Центральное САД, мм.рт.ст.	130 ± 6	133 ± 2	133 ± 4
Центральное ДАД, мм.рт.ст.	79 ± 3	79 ± 2	75 ± 2
Центральное ПД, мм.рт.ст.	55 ± 6	55 ± 2	58 ± 3
Давление Аугментации, мм.рт.ст.	14 ± 1	13 ± 1	13 ± 1
СРПВ, м/с	6,6 ± 0,3*	7,8 ± 0,2	7,7 ± 0,3††
СРПВ>10м/с, n (%)	0*	9 (13%)	7 (15%)

Примечание: Данные представлены в виде средней и ошибки средней. Значимость различий между подгруппами БАК и ТАК: †† $p < 0,005$ Значимость различий подгруппы БАК по сравнению с контролем: * - $p < 0,05$.

Уровни матриксных металлопротеиназ в тканях аорты

У всех пациентов с АВОА выявлено повышение концентрации общей и латентной ММП2, более выраженное у лиц с БАК, а также повышение латентной ММП9 (Табл.4). При сопоставлении подгрупп АВОА с БАК и ТАК не выявлено различий в профиле ММП в ткани аорты. Однако, при исключении из анализа группы со значимыми (более 70%) стенозами коронарных артерий, появились отличия между БАК и ТАК в уровне активной ММП9: 352 (351-897) у.е. против 208 (108-540) у.е. ($p = 0,03$) (Рис.1а). и ММП1 активной 31(24-68) у.е. против 0 у.е. ($p = 0,03$).

Также обращали на себя внимание различия в уровне активной ММП9 в зависимости от наличия значимого атеросклероза коронарных артерий в группе ТАК (рис. 1б)

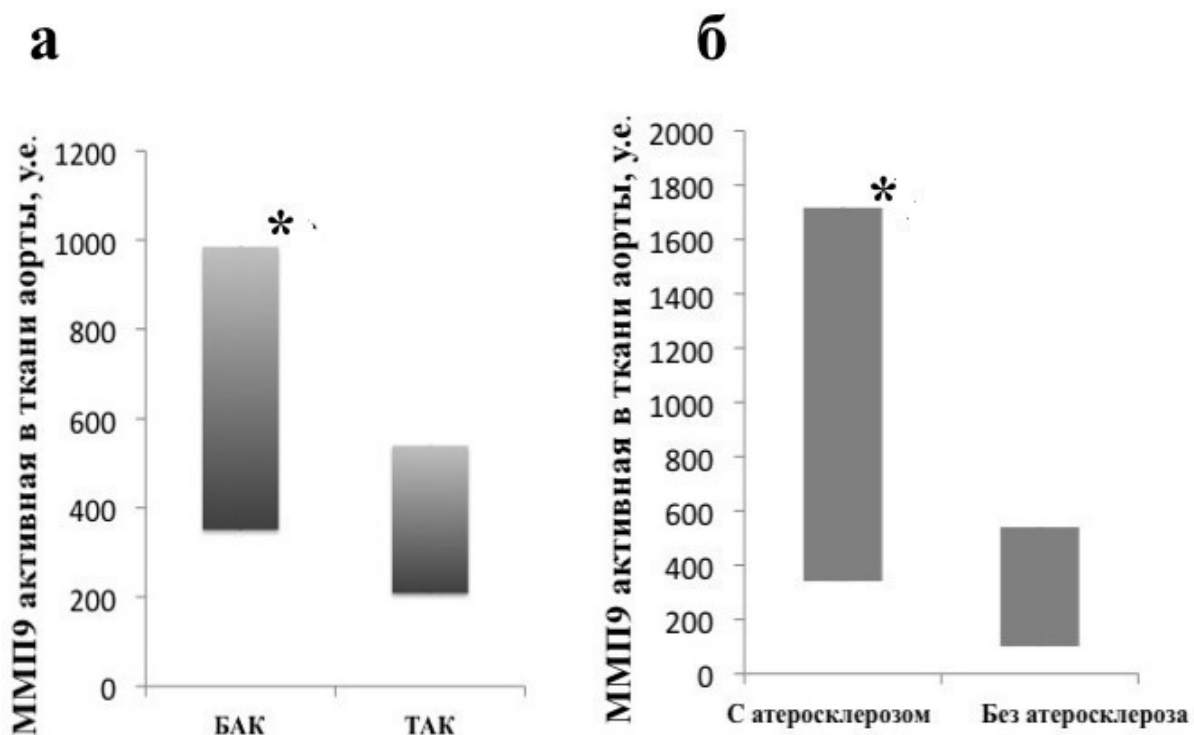


Рисунок 1а - Уровень ММП9 в ткани аорты в подгруппах АВОА с БАК и ТАК при исключении влияния атеросклероза

Рисунок 1б - Уровень ММП9 в ткани аорты у лиц с АВОА в зависимости от наличия признаков атеросклероза

Отмечена корреляция между концентрацией латентной ММП9 в сыворотке крови и активной ММП9 в ткани аорты ($r=0,5$, $p=0,02$), а также латентной ММП9 в сыворотке крови и активной ММП1 ткани аорты ($r=0,7$, $p=0,04$).

Таблица 4 - Профиль матричных металлопротеиназ в ткани аорты в подгруппах

Показатель	БАК N=38	ТАК N=28	Контроль n=15
ММП2 общ., у.е.	1903 (1460-2741) ***	1766 (997-3134) *	489 (389-1233)
ММП2 акт., у.е.	393 (299-825)	350 (197-635)	272 (187-413)
ММП2 лат., у.е.	1315 (969-1708) ***	1282 (295-1776) *	252 (121-472)
ММП9 общ., у.е.	786 (579-1515)	752 (495-1057)	838 (303-1378)
ММП9 акт., у.е.	534 (351-876)	307 (189-624)	359 (182-845)
ММП9 лат., у.е.	352 (203-755) *	387 (196-648)	207 (106-481)

По сравнению с контролем: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Результаты генетического обследования

Генотипирование полиморфизмов генов ММП

Независимо от морфологии аортального клапана, выявлена ассоциация генотипа АА гена *MMP9* (rs11697325) с развитием АВОА. При этом генотип АА достоверно чаще встречался у пациентов с АВОА по сравнению с контрольной группой (Табл.5). У лиц с генотипом АА был значительно выше риск развития АВОА (ОШ 2,9 ДИ 95% 1,57-5,62).

Генотип СС rs2285053 *MMP2* чаще выявлялся в группе пациентов с АВОА (Табл.5).

Имелись различия и в распределении генотипов полиморфных вариантов гена *MMP13* rs2252070. По сравнению с группой контроля в группе больных АВОА достоверно чаще встречались носители аллеля А (Табл.5).

Распределение генотипов других SNP *MMP9* (rs2274755, rs17577), *MMP1* (rs514921) и *MMP13* (rs675392) в группе больных с АВОА принципиально не отличалось от контрольной группы (Табл. 5).

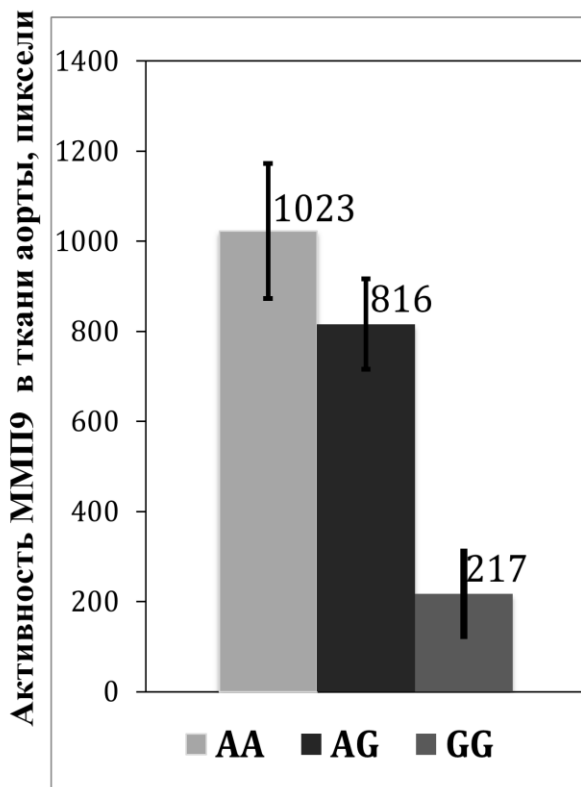
Таблица 5 - Распределение генотипов полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ

Ген	SNP	Генотипы	Группа n=309	Контроль n=321	χ^2	ОШ (ДИ)	p
<i>MMP9</i>	rs11697325	АА	37 (12%)	14 (4%)	12	2,9 (1,57-5,62)	<0,001
		АG	218 (71%)	262 (82%)			
		GG	54 (17%)	45 (14%)			
	rs17577	АА	8 (3%)	5 (2%)	2,0	0,6 (0,19-1,8)	0,4
		АG	94 (30%)	116 (36%)			
		GG	207 (67%)	200 (62%)			
rs2274755	GG	201 (65%)	211 (66%)	0,03	1 (0,7-1,3)	0,8	
	GT	99 (32%)	104 (32%)				
	TT	9 (3%)	6 (2%)				
<i>MMP2</i>	rs2285053	CC	263 (85%)	245 (76%)	7,8	1,8 (1,2-2,7)	0,005

		CT	44 (14%)	74 (23%)			
		TT	2 (1%)	2 (1%)			
<i>MMP1</i>	rs514921	AA	176(57%)	179 (56%)	0,07	1 (0,8-1,4)	0,8
		AG	120 (39%)	125 (39%)			
		GG	14 (4%)	17 (5%)			
<i>MMP1</i>	rs2252070	AA	34 (11%)	49 (15%)	*2,9	*1,3 (0,9-1,8)	0,02
3		AG	143 (46%)	113 (35%)			
		GG	132 (43%)	159 (50%)			
	rs 675 392	CC	88 (28%)	115 (36%)	3,8	0,7 (0,5-1,0)	0,06
		CG	153 (50%)	149 (46%)			
		GG	68 (22%)	57 (18%)			

Имелись также различия в диаметре восходящей аорты. Среди пациентов с АВОА наибольший диаметр наблюдался у лиц с генотипом AA (54 ± 3 мм) ($p=0,04$) rs11697325. Напротив, носители генотипов AG и GG имели меньший диаметр аорты (50 ± 1 мм и 48 ± 1 мм соответственно). Также у пациентов с генотипом AA, имеющих ТАК, отмечено повышение активной ММП 9 в тканях аорты ($p= 0,04$) (Рис.2).

а



б

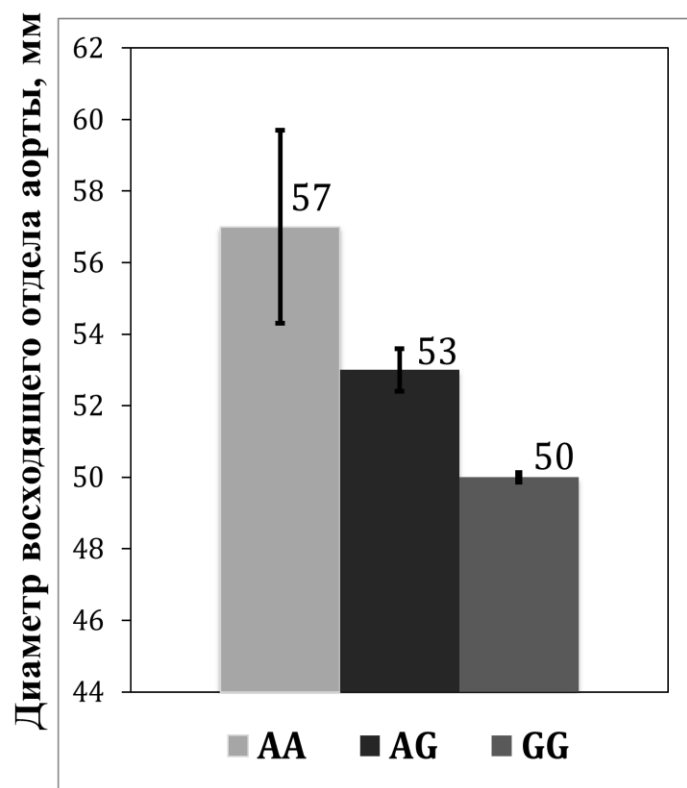


Рисунок 2 - Активность ММП9 в ткани аорты(а) и диаметр восходящей аорты (б) у пациентов с АВОА в зависимости от генотипа полиморфизма гена *MMP9* rs11697325

Секвенирование гена гладкомышечного актина *ACTA2*

Генетическое исследование выполнено у 280 пациентов АВОА и 51 человека из контрольной группы. Секвенированы кодирующие белок экзоны гена *ACTA2* (со 2 по 9) с прилегающими участками интронов. В общей сложности получено 15 миссенс-вариантов в некодирующих областях. Из них 9 были описаны ранее и 6 выявлены впервые.

Особого внимания заслуживает полиморфный вариант rs3781212. Этот редкий интронный вариант выявлен у двух пациентов с необычной клинической картиной. Оба пациента имели нормальный ТАК В обоих случаях имела место значительная извитость артериального русла – в одном случае брюшной аорты, в другом – извитость сосудов шеи. Один из пациентов 36 лет, наряду с патологической извитостью, имел сочетание аневризмы с дефектом межпредсердной перегородки.

Выводы

1. Пациенты с сердечно-сосудистыми заболеваниями и аневризмой восходящего отдела аорты не отличаются от пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями без расширения аорты по традиционным факторам риска, за исключением преобладания лиц мужского пола.
2. Повышение скорости распространения пульсовой волны ассоциировано с возрастом и наличием традиционных факторов риска, а также с дилатацией нисходящего грудного и брюшного отделов аорты.
3. У больных с расслоением восходящего отдела аорты имеется повышение уровней всех форм матриксной металлопротеиназы 9 типа в сыворотке крови по сравнению с неосложненной аневризмой восходящего отдела аорты.
4. У пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты выявлено повышение уровня общей и латентной матриксной металлопротеиназы 2, а также латентной матриксной металлопротеиназы 9 в стенке восходящей аорты. При исключении влияния атеросклероза активность матриксной металлопротеиназы 1 и 9 типа в ткани аорты выше у больных с бicuspidальным аортальным клапаном, что может быть одним из механизмов более раннего развития аневризмы восходящего отдела аорты у этой категории пациентов.
5. Лица с генотипом АА rs11697325 гена *MMP9*, генотипом СС rs2285053 гена *MMP2*, а также носители А аллеля rs2252070 гена *MMP13* имеют повышенный риск развития аневризмы восходящего отдела аорты. Генотип АА гена *MMP9* rs11697325 ассоциирован с наибольшим диаметром восходящей аорты и повышенной концентрацией матриксной металлопротеиназы 9 в стенке аорты. Сочетание неблагоприятных генотипов не оказывает дополнительного влияния на выраженность дилатации аорты.
6. Мутации гена *ACTA2* не являются основной генетической причиной спорадической аневризмы восходящего отдела аорты в популяции Северо-Западного региона России.

Практические рекомендации

1. Пациентам с несемейной аневризмой восходящего отдела аорты проводить секвенирование гена АСТА2 при рутинном генетическом скрининге не целесообразно.
2. Определение генотипов полиморфных вариантов генов *MMP2*, *MMP9* и *MMP13* может быть использовано для выявления групп высокого риска развития аневризмы восходящего отдела аорты. Получение информации о вышеуказанных полиморфизмах может быть дополнительным аргументом при решении вопроса об операции у лиц с пограничным расширением аорты.
3. Метод пиросеквенирования с использованием «пулирования» позволяет быстро и точно определять наличие полиморфизмов в исследуемых генах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гаврилюк, Н.Д. Полиморфизмы генов матриксных металлопротеиназ 2 и 9 у пациентов с аневризмой восходящего отдела аорты / Гаврилюк Н. Д., Иртюга О. Б., Дружкова Т.А. [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2015. – Т.126, №10. – С.65-69.
2. Гаврилюк, Н.Д. Аневризма восходящего отдела аорты: от молекулярно-генетических особенностей патогенеза до выбора метода лечения / Н.Д. Гаврилюк, В.Е. Успенский А.Б.Малашичева [и др.] // Трансляционная медицина. – 2016. – Т.1, №3. – С.6-20.
3. Жуков, В.А. Анализ аллельного полиморфизма гена АСТА2 у пациентов с несемейной аневризмой восходящего отдела аорты с помощью пиросеквенирования / Жуков В.А., Жернаков А.И., Гаврилюк Н.Д. [и др.] // Молекулярная медицина. 2016. – Т. 14., № 2. - С.45-49.
4. Иртюга, О.Б. Роль остеопонтина и матриксной металлопротеиназы -9 в формировании аневризмы грудного отдела аорты / Иртюга О.Б., Дружкова Т.А., Гаврилюк Н.Д. [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2015. – Т.123, №7. - С.73–77.
5. Иртюга, О.Б. Механизмы формирования аневризмы восходящего отдела аорты различной этиологии / Иртюга О.Б., Гаврилюк Н.Д., Воронкина И.В. [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2013. - Т.99, №1. - С. 14-18.
6. Костина Д.А., Воронкина И.В., Смагина Л.В., Гаврилюк Н.Д., Моисеева О.М., Иртюга О. Б., Успенский В.Е., Костарева А.А., Малашичева А.Б. Исследование функциональных свойств гладкомышечных клеток при аневризме аорты. Цитология. 2013. Т. 55.№10. С. 725-731.
7. Гаврилюк, Н.Д. Двустворчатый аортальный клапан и расширение восходящего отдела аорты (обзор литературы). Часть I: Анатомические особенности и этиопатогенез / Гаврилюк Н.Д., Успенский В.Е., Иртюга О.Б. [и др.] // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии. – 2013. – Т.21, №4. – С.5-11.

- 8.** Успенский, В.Е. Двустворчатый аортальный клапан и расширение восходящего отдела аорты (обзор литературы) Часть II Диагностика и лечение / Успенский В.Е., Гаврилюк Н.Д., Иртыга О.Б. [и др.] // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии. – 2013. - Т. 21, №4. - С.12-18.
- 9.** Kostina, D.A. Functional properties of smooth muscle cells in ascending aortic aneurysm / Kostina D.A., Gavriiliuk N.D., Moiseeva O.M. [et al.] // Cell and Tissue Biology. – 2014. - Т.8, №1. - С.61-67.
- 10.** Zhernakov, A. s-dePooler: determination of polymorphism carriers from overlapping DNA pools / A. I. Zhernakov, A. M. Afonin, N. D. Gavriiliuk [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2019. – Vol. 20. – P. 45.
- 11.** Гаврилюк, Н.Д. Значение однонуклеотидных полиморфизмов генов матриксных металлопротеиназ в развитии аневризмы восходящего отдела аорты / Гаврилюк Н.Д., Иртыга О.Б., Дружкова Т.А. [и др.] // Тезисы российского кардиологического конгресса. – 2015. - С.158.
- 12.** Gavriiliuk, N. Extracellular matrix protein imbalance and matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms formation / Gavriiliuk N., Irtyuga O., Smagina L [et al.] // Journal of Hypertension. - Volume 31, e-Supplement 1, June 2013, ESH 2013 Abstract Book, e156.
- 13.** Gavriiliuk, N. Role of matrix metalloproteinase single nucleotide polymorphisms in thoracic aortic aneurysm development / Gavriiliuk N., Uspenskiy V., Moiseeva O. [et al.] // European Heart Journal. – 2015 . - Volume 36 Abstract Supplement ESC 2015. - P. 1160.
- 14.** Gavriiliuk, N. Association of matrix metalloproteinase 2 and 9 genes single nucleotide polymorphisms with matrix metalloproteinase activity and thoracic aortic aneurysm development / Gavriiliuk N., Uspensky E., Moiseeva O. // European Heart Journal. – 2014. – Volume 35 (Abstract Supplement, ESC2014)- P. 301.
- 15.** Gavriiliuk, N. Arterial pressure waveform characteristics in patients with ascending aortic aneurysm and bicuspid aortic valve / Gavriiliuk N., Druzhkova T.A., Irtyuga O., [et al.] // Journal of Hypertension. - Volume 32.- e-Supplement 1, 2014, ESH 2014 Abstract book- e136.
- 16.** Irtyuga, O. Role of extracellular matrix proteins, matrix metalloproteinase activity and arterial stiffness in ascending aorta dilatation / Irtyuga O., Gavriiliuk N., Smagina L [et al.] // European Heart Journal. – Volume 34, e-Supplement 1, ESC 2013 Abstract book, P.4763.
- 17.** Kostina, A.S. Notch-dependent regulation of endothelial-to-mesenchymal transition is impaired in aortic endothelial cells of BAV patients / Kostina A.S., Gavriiliuk, N.D., Uspensky V.E. [et al.] // Cardiovascular Research. - Volume 103, Issue supplement 1, 15 July 2014, P S32.
- 18.** Гаврилюк, Н.Д. Аневризма восходящего отдела аорты: от молекулярно-генетических особенностей патогенеза до выбора метода лечения / Н.Д. Гаврилюк, В.Е. Успенский А.Б. Малашичева [и др.] // Трансляционная медицина. 2-е изд. [под ред. Шляхто Е.В.] Изд. “Инфо-Ра”. Санкт-Петербург. – 2015. - С.53-75.

- 19.** Гаврилюк, Н.Д. Полиморфизмы генов и активность матриксных металлопротеиназ 2 и 9 у пациентов с аневризмой грудного отдела аорты // Сборник тезисов двадцатой Санкт-Петербургской ассамблеи молодых ученых и специалистов. – 2015. - С. 201.
- 20.** Гаврилюк, Н.Д. Поиск биомаркеров острой и хронической диссекции восходящей аорты // Сборник тезисов двадцать первой Санкт-Петербургской ассамблеи молодых ученых и специалистов. – 2016. - С. 196.

Список сокращений

- АВОА – аневризма восходящего отдела аорты
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АРА – антагонисты рецепторов ангиотензина
АСТ – аспаргатаминотрансфераза
БАБ – бета адреноблокаторы
БКК – блокаторы кальциевых каналов
БАК – бикуспидальный аортальный клапан
ДАД – диастолическое артериальное давление
ИМТ – индекс массы тела
ИАПФ – ингибиторы ангиотензин превращающего фермента
КА – коэффициент атерогенности
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
ММП – матриксные металлопротеиназы
ОХС – общий холестерин
САД – систолическое артериальное давление
СРБ – С-реактивный белок
СРПВ – скорость распространения пульсовой волны
ТАК – трикуспидальный аортальный клапан
ТГ – триглицериды
ТИМП – тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ
у.е. – условные единицы
SNP – single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)