

## АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *FGB*, *LPL*, *GPIIIA* И *TGFB* С ВАРИАНТАМИ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Лилия Айратовна Гараева\*, Светлана Дмитриевна Маянская

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 31.03.2017; принята в печать 22.05.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/КМЖ2017-669

**Цель.** Оценить влияние полиморфизма генов трансформирующего фактора роста  $\beta$ , липопротеинлипазы, фибриногена  $\beta$  и гликопротеина 3а у пациентов на различные варианты тяжести течения атеросклеротического процесса.

**Методы.** В исследовании приняли участие 319 пациентов с верифицированным по данным ангиографии атеросклерозом. У всех было проведено генотипирование полиморфизма генов *FGB* (rs1800788), *LPL* (rs328), *GpIIIa* (rs5918) и *TGFB* (rs1800469). У всех пациентов оценивали влияние полиморфизма исследуемых генов на параметры тяжести течения атеросклеротического процесса, такие как наличие окклюзии и наличие и тяжесть стенозов. За критерии тяжести течения принимали наличие окклюзии, наличие окклюзии и/или двух и более стенозов более 70%, наличие окклюзии и множественные критические стенозы.

**Результаты.** Показана ассоциация полиморфизма исследуемых генов с тяжёлым течением атеросклероза. Так, полиморфизм гена *GpIIIa* наиболее часто встречался у пациентов с более тяжёлым течением вне зависимости от наличия окклюзии и количества и тяжести стенозов. Ген *FGB* оказал своё влияние на частоту развития окклюзий, ген *TGF* проявил себя только в случае с делением по признаку наличия окклюзии и/или двух и более стенозов более 70%, а ген *LPL* оказался значимым для развития окклюзий, сопровождающихся критическими стенозами.

**Вывод.** Частота редких аллелей полиморфных участков значимо ассоциируется с различными вариантами тяжёлого течения атеросклероза; это может свидетельствовать о неравнозначности влияния полиморфизма генов, а также их белков на различных этапах атерогенеза и требует дальнейшего исследования.

**Ключевые слова:** атеросклероз, гены-кандидаты, однонуклеотидные полиморфизмы, ишемическая болезнь сердца, тяжесть заболевания.

## ASSOCIATION OF *FGB*, *LPL*, *GPIIIA* AND *TGFB* GENE POLYMORPHISMS WITH VARIANTS OF ATHEROSCLEROSIS SEVERITY

L.A. Garaeva, S.D. Mayanskaya

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

**Aim.** To estimate the effect of transforming growth factor  $\beta$ , lipoprotein lipase, fibrinogen  $\beta$  and glycoprotein 3a gene polymorphisms on different variants of atherosclerosis severity.

**Methods.** The study included 319 patients with angiographically verified atherosclerosis. In all patients *FGB* (rs1800788), *LPL* (rs328), *GpIIIa* (rs5918) and *TGFB* (rs1800469) polymorphism genotyping was performed. In all patients we evaluated the influence of the studied gene polymorphisms on parameters of atherosclerosis severity such as occlusion and presence and severity of stenosis. Presence of occlusion, occlusion and/or two and more stenoses over 70%, occlusion and multiple critical stenoses were considered the severity criteria.

**Results.** The studied gene polymorphisms were shown to be associated with severe course of atherosclerosis. *GPIIIa* polymorphism was commonly determined in patients with more severe course regardless of occlusion and number and severity of stenoses. *FGB* gene influenced the rate of occlusion development, *TGF* gene was expressed only in the group with occlusion and/or two and more stenoses over 70%, and *LPL* gene proved to be significant for the development of occlusion associated with critical stenosis.

**Conclusion.** The frequency of rare alleles of polymorphic regions is significantly associated with different variants of severe atherosclerosis course; this could suggest unequal influence of gene polymorphisms as well as their proteins on different stages of atherogenesis and requires further investigation.

**Keywords:** atherosclerosis, candidate gene, single-nucleotide polymorphism, ischemic heart disease, disease severity.

Многочисленные исследования доказывают, что наследственные факторы значительно влияют как на частоту развития атеросклероза, так и на риск развития осложнений у больных, уже имеющих патологию [1].

Атеросклероз, так же как и многие другие, является заболеванием полигенной этиологии, основную роль в развитии которого отводят однонуклеотидным полиморфизмам различных генов-кандидатов

[2]. Некоторые из них отвечают за инициацию атеросклеротического процесса, другие связаны с дестабилизацией бляшки и тромбозом. При этом влияние данных полиморфизмов как на инициацию, так и на прогрессирование атеросклероза требует продолжающихся исследований с использованием различных методик.

Цель настоящего исследования — изучение распространённости полиморфизма генов трансформирующего фактора роста  $\beta$  (*TGFB*), липопротеинлипазы (*LPL*), фибриногена  $\beta$  (*FGB*) и гликопротеина 3а (*GpIIIa*) у

Характеристика пациентов (n=319)

Мужчины, n (%) / женщины, n (%)	200 (62,7) / 119 (37,3)
Возраст, годы (M±SD)	66±10,7
Наличие гипертонической болезни, n (%)	219 (77,4)
Наличие ишемической болезни сердца, n (%)	182 (78,1)
Наличие острого или перенесённого инфаркта миокарда, n (%)	164 (51,4)
Наличие повторного инфаркта миокарда, n (%)	39 (12,2)

Таблица 2

Ассоциация полиморфизма исследуемых генов с частотой хотя бы одной окклюзии

	Первая группа, n=198	Вторая группа, n=121	OR	95% CI	p
<i>FGB</i> rs1800788					
CC	80	75	1,77	1,22–2,57	p=0,002
CT	99	36			
TT	19	10			
<i>LPL</i> rs328					
CC	174	101	0,78	0,43–1,43	p=0,43
CG	22	20			
GG	2	0			
<i>GpIIIa</i> rs5918					
CC	7	0	1,75	1,04–2,92	p=0,03
CT	46	22			
TT	145	99			
<i>TGF</i> rs1800469					
CC	102	47	0,92	0,65–1,31	p=0,65
CT	78	64			
TT	18	10			

Примечание: CC, CT, TT, CG, GG — аллели генов; OR — отношение шансов, CI — доверительный интервал, p — уровень значимости.

пациентов с различными вариантами тяжести течения атеросклеротического процесса.

Были обследованы 319 человек в возрасте от 44 до 73 лет с верифицированным по данным ангиографии атеросклерозом, находившихся на стационарном лечении в сосудистом отделении №1 ГАУЗ «Республиканская клиническая больница», а также в кардиологических отделениях ГАУЗ «Городская клиническая больница №7» г. Казани.

Проводили стандартный клинический осмотр всех пациентов, изучали анамнез. Применяли коронароангиографию, а также ангиографию сосудов брюшной части аорты, нижних конечностей, ветвей дуги аорты по показаниям. Кроме того, у пациентов проведены гематологические исследования общего анализа крови и коагулограммы, биохимические исследования липидного спектра сыворотки крови.

Тяжесть течения атеросклеротического процесса оценивали с помощью нескольких критериев, на основании которых были сформированы парные группы сравнения.

В первом случае тяжесть течения оценивали по наличию хотя бы одного окклюзированного сосуда любого бассейна. В первую группу входили пациенты, имеющие одну и более окклюзию по данным ангиографии (198 человек), во второй группе находились пациенты, не имевшие окклюзированных участков (121 человек).

Во втором случае пациенты были разделены по наличию окклюзии и/или двух и более значимых стенозов более 70%. В первую группу (191 человек) вошли пациенты, имевшие один и более окклюзированный сосуд и/или стенотические поражения более 70% двух и более сосудов. Во вторую группу вошли 128 пациентов с более лёгкими поражениями, у которых было обнаружено не более одного сосуда со стенозом более 70%.

В третьем случае тяжёлое течение заболевания определялось наличием хотя бы одной окклюзии и хотя бы одного стеноза более 70%. Первую группу составили 98 пациентов с множественным атероскле-

## Ассоциация полиморфизма исследуемых генов с частотой окклюзии и/или двух и более стенозов более 70%

	Первая группа, n=191	Вторая группа, n=128	OR	95% CI	p
<i>FGB</i> rs1800788					
CC	87	68	1,35	1,13–1,61	p=0,10
CT	83	52			
TT	21	8			
<i>LPL</i> rs328					
CC	160	115	1,76	1,64–1,88	p=0,10
CG	29	13			
GG	2	0			
<i>GpIIIa</i> rs5918					
CC	7	0	2,08	1,23–3,50	p=0,006
CT	47	21			
TT	137	107			
<i>TGF</i> rs1800469					
CC	99	50	0,63	0,44–0,90	p=0,01
CT	80	61			
TT	12	16			

Примечание: CC, CT, TT, CG, GG — аллели генов; OR — отношение шансов, CI — доверительный интервал, p — уровень значимости.

## Ассоциация полиморфизма исследуемых генов с частотой окклюзии и одного и более стеноза более 70%

	Первая группа, n=198	Вторая группа, n=121	OR	95% CI	p
<i>FGB</i> rs1800788					
CC	42	113	1,4	0,97–2,01	p=0,07
CT	43	92			
TT	13	16			
<i>LPL</i> rs328					
CC	75	200	2,94	1,58–5,47	p=0,0006
CG	21	21			
GG	2	0			
<i>GpIIIa</i> rs5918					
CC	7	0	1,78	1,12–2,86	p=0,02
CT	21	47			
TT	70	174			
<i>TGF</i> rs1800469					
CC	39	110	1,24	0,86–1,80	0,24
CT	51	91			
TT	8	20			

Примечание: CC, CT, TT, CG, GG — аллели генов; OR — отношение шансов, CI — доверительный интервал, p — уровень значимости.

ротическим поражением сосудов, имевших как окклюзированный участок, так и стенотическое неокклюзирующее поражение более 70% одного и более сосудов другой локализации, во второй группе были исследованы пациенты без подобных поражений (221 человек).

Полная клинико-лабораторная характеристика обследованных пациентов отображена в табл. 1.

У всех пациентов были типированы однонуклеотидные полиморфные локусы генов фибриногена  $\beta$  (*FGB*, C > T, rs1800788), липопротеинлипазы (*LPL*, C > G, rs328), гликопротеина 3a (*GpIIIa*, C > T, rs5918) и трансформирующего фактора роста  $\beta$  (*TGF*, C > T, rs1800469). Для молекулярно-генетического исследования выделяли дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) из венозной крови с использованием фенол-

хлороформной экстракции. Типирование однонуклеотидных полиморфных локусов проводили с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов согласно инструкции фирмы-производителя (ООО «СибДНК», г. Новосибирск).

Для статистической обработки использованы пакеты статистики Genetics и Hardy–Weinberg программного обеспечения R-project ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Соответствие равновесию Харди–Вайнберга оценивали с помощью точного теста Фишера (p exact). Наличие ассоциации с вариантами тяжести течения заболевания проводили с помощью регрессионного анализа, на основании результатов которого вычисляли отношение шансов (OR — от англ. odds ratio), его 95% доверительный интервал (95% CI — от англ. confidence interval) и уровень значимости полученных результатов (p-value). Отношение шансов вычисляли с учётом гендерных различий, наличия артериальной гипертензии как фактора риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Критический уровень значимости принимали равным 0,05.

Распределение частот аллелей и генотипов исследованных полиморфных локусов соответствует равновесию Харди–Вайнберга ( $p > 0,05$ ).

В каждом случае исследовано распределение редких аллелей генов в зависимости от тяжести течения атеросклероза. Результаты представлены в табл. 2–4.

Ввиду значимости гиперхолестеринемии и артериальной гипертензии для прогрессирования атеросклеротического процесса, помимо стандартных поправок на пол и возраст, в регрессионную модель были введены поправки на высокий уровень общего холестерина и наличие артериальной гипертензии.

Исходя из данных табл. 3, видно, что нами получены подтверждения существенной связи генотипа некоторых генов с различными вариантами тяжести течения атеросклероза.

С частотой возникновения тяжёлых поражений в виде наличия хотя бы одной окклюзии ассоциируется –Т аллель гена фибриногена. Т аллель гена трансформирующего фактора роста  $\beta$  значимо влияет на факт наличия хотя бы одной окклюзии и/или стеноза более 70%, а –С аллель гена липопроteinлипазы ассоциируется с наиболее тяжёлыми поражениями в виде обяза-

тельного наличия хотя бы одной окклюзии, сопровождающейся гемодинамически значимыми стенозами. При этом полиморфизм гена гликопротеина 3а был ассоциирован с каждым вариантом тяжести течения заболевания.

Липопроteinлипаза служит одним из ключевых ферментов в метаболизме хиломикронов и липопроteinов очень низкой плотности. Предполагают, что повышенные уровни триглицеридов, снижая биодоступность оксида азота, вызывают эндотелиальную дисфункцию, с которой начинаются процессы атерогенеза [3]. Кроме того, гипертриглицеридемия может временно вызывать агрегацию эритроцитов и способствовать нарушениям коагуляции и фибринолиза [4]. Липопроteinлипаза, воздействуя на триглицериды на поверхности эндотелия капилляров, резко снижает количество триглицеридов, липопроteinов очень низкой плотности и повышает уровень липопроteinов высокой плотности, что должно свидетельствовать о её существенных антиатерогенных свойствах.

В то же время мутация гена липопроteinлипазы на участке –447Х (rs328), приводящая к преждевременному образованию стоп-кодона, предположительно сопровождается повышением количества и активности фермента. Однако многочисленные исследования не подтверждают непосредственного влияния полиморфизма на уровень триглицеридов в плазме крови [5].

Полученные нами данные не соответствуют гипотезе о протективной роли полиморфизма. Это может быть обусловлено некоторыми особенностями механизма действия липопроteinлипазы. Во-первых, взаимодействие фермента с крупными липопроteinами само по себе приводит к образованию большого количества свободных жирных кислот, которые могут увеличивать проницаемость эндотелия и проникновение липидов в стенку сосуда. Кроме этого, липопроteinлипаза производится также некоторыми видами макрофагов и при повышенной экспрессии приводит к накоплению ими липидов, провоцирует их превращение в пенистые клетки [6].

Таким образом, наши результаты могут отражать как возможное влияние полиморфизма локуса *LPL* rs328 на повышенные уровни экспрессии и активности фермента в целом, так и специфическое его воздействие, приводящее к повышению активности липопроteinлипазы именно на поздних

стадиях атеросклеротического поражения.

В то же время полиморфизм гена гликопротеина 3а (ген *ITGB3*) был ассоциирован со всеми вариантами тяжёлого течения атеросклероза в нашем исследовании.

Гликопротеин 3а — специфический тромбоцитарный рецептор, играющий главную роль в адгезии тромбоцитов и формировании тромба на месте повреждения сосуда.

Согласно многочисленным исследованиям полиморфизм *ITGB3* в позиции rs5918 значительно ассоциируется с многочисленными проявлениями атеросклероза, что, скорее всего, обусловлено повышенной аффинностью изменённого рецептора к фибриногену, что приводит к повышению агрегации тромбоцитов [7].

Данные нашего исследования свидетельствуют в первую очередь о существенном влиянии полиморфизма на прогрессирование атеросклероза и формирование тяжёлых осложнений. Есть немногочисленные исследования, предполагающие, что экспрессия рецептора на тромбоцитах значительно выше у пациентов с нестабильной стенокардией и тяжёлым атеросклерозом — по сравнению с пациентами со стабильной стенокардией [8], однако в целом вопрос о влиянии рецептора на тяжесть течения заболевания остаётся открытым.

Агрегация тромбоцитов и тромбоз, являющиеся одним из ключевых моментов в дестабилизации бляшки, реализуются посредством нескольких факторов, один из которых — фибриноген. В нашем исследовании полиморфизм гена фибриногена в позиции rs1800788 ассоциирован именно с наличием окклюзий, субстрат которых — тромбообразование. Помимо этого, фибриноген также реализует своё участие в атерогенезе, провоцируя пролиферацию и миграцию клеток и липидов в бляшку [9].

Однако данные литературы ставят под сомнение влияние полиморфизма rs1800788 β-цепи фибриногена на его количество и активность [10]. В некоторых исследованиях отмечено влияние гетерозиготной формы на активность белка, что требует дальнейших исследований.

В то же время роль полиморфизма трансформирующего фактора роста β (rs1800469) в атерогенезе изучена значительно больше [11]. Однако существующие данные говорят о неоднозначности его влияния. Замена цитозина на тимин в этой позиции приводит к уменьшению влияния факторов транс-

крипции, что характеризуется повышением количества трансформирующего фактора β в крови. Большинство исследователей не находят прямой ассоциации полиморфизма rs1800469 с частотой возникновения атеросклероза. Однако Surtis и соавт., а также Wang и соавт. в своих работах изучали именно влияние –Т аллеля на тяжесть течения заболевания, исходя из данных ангиографии, и определили, что его наличие достоверно приводит к увеличению частоты стенозов [11, 12].

Это соответствует полученным нами данным о влиянии аллеля Т на частоту развития тяжёлых поражений в виде окклюзии и/или 70-процентного стеноза. И хотя исследователи в своих работах принимали за тяжёлое течение значительно более лёгкие поражения (более 50% сосуда), подобные результаты могут говорить о значимости полиморфизма для формирования именно больших по размеру бляшек.

В пользу этой же гипотезы может свидетельствовать плейотропная природа цитокина. На ранних этапах атерогенеза трансформирующий фактор роста препятствует развитию бляшки, тормозя миграцию и пролиферацию и блокируя локальный иммунный ответ, однако на более поздних стадиях он провоцирует значительное разрастание экстрацеллюлярного матрикса в *media* сосудов, усиливает ремоделирование сосудов и провоцирует неоангиогенез [13]. Это в свою очередь может провоцировать значительный рост зрелых бляшек, приводя к увеличению стенозов сосудов.

## ВЫВОДЫ

1. Нами получены данные о существенном влиянии некоторых генов-кандидатов на различные варианты тяжести течения атеросклеротического процесса. Так, во всех случаях более тяжёлое течение заболевания значимо ассоциировалось с Т аллелем гена гликопротеина 3а (rs5918). –Т аллель полиморфного участка rs1800788 гена фибриногена ассоциировался с частотой окклюзий. Полиморфизм гена трансформирующего фактора роста (rs1800469) оказал существенное влияние на частоту развития тяжёлых поражений в виде окклюзий и/или 70-процентного стенозирования сосудов. Ген липопротеинлипазы оказался значимым в случае наиболее тяжёлых поражений в виде окклюзий, сопровождавшихся множественными критическими стенозами.

2. Полученные результаты могут свидетельствовать о неравнозначности влияния полиморфизма генов, а также их белков на различных этапах атерогенеза. В целом нами было показано влияние полиморфизмов генов фибриногена  $\beta$  (*FGB*, C >T, rs1800788), липопротеинлипазы (*LPL*, C >G, rs328), гликопротеина 3a (*GpIIIa*, C >T, rs5918) и трансформирующего фактора роста  $\beta$  (*TGF*, C >T, rs1800469) на различные варианты тяжести течения атеросклероза, что с учётом наличия противоречивых данных литературы требует дальнейшего исследования.

*Исследование не имело спонсорской поддержки, и авторы не получали гонорар за исследование.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по данной статье.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hasdai D., Gibbons R.J., Holmes D.R.Jr. et al. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. *Circulation*. 1997; 96: 3390–3395. DOI: 10.1161/01.CIR.96.10.3390.
2. Baliga R., Rampling M.W., Kooner J.S. High fat meal induces changes in blood rheology in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1997; 96 (suppl. 1): I-2206.
3. Arca M., Campagna F., Montali A. et al. The common mutations in the lipoprotein lipase gene in Italy: effects on plasma lipids and angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Clin. Genetics*. 2000; 58: 369–374. DOI: 10.1034/j.1399-0004.2000.580507.x.
4. Goldberg I.J. Lipoprotein lipase and lipolysis:

central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* 1996; 36: 693–707. PMID: 8732771.

5. Khatami M., Heidari M.M. Common rs5918 (PLA1/A2) polymorphism in the *ITGB3* gene and risk of coronary artery disease. *Arch. Med. Sci. Atherosclerotic Dis.* 2016; 1: 9–15. DOI: 10.5114/amsad.2016.59587.

6. Yakushkin V.V., Zyuryaev I.T., Khaspekova S.G. et al. Glycoprotein IIb-IIIa content and platelet aggregation in healthy volunteers and patients with acute coronary syndrome. *Platelets*. 2011; 22: 243–251. DOI: 10.3109/09537104.2010.547959.

7. Papageorgiou N., Tousoulis D., Siasos G. Is fibrinogen a marker of inflammation in coronary artery disease? *Hellenic J. Cardiol.* 2010; 51: 1–9. PMID: 20118037.

8. Behague I., Poirier O., Nicaud V., Evans A.  $\beta$  Fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. *Circulation*. 1996; 93: 440–449. DOI: 10.1161/01.CIR.93.3.440.

9. Syrris P., Carter N.D., Metcalfe J.C. et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. *Clin. Sci. (London)*. 2005; 95 (6): 659–667. DOI: 10.1042/cs0950659.

10. Wang X.L., Sim A.S., Wilcken D.E.L. A common polymorphism of the transforming. *Clin. Sci.* 1998; 95: 745–746. DOI: 10.1042/cs0950745.

11. Border W.A., Noble N.A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New Engl. J. Med.* 1994; 331 (19): 1286–1292. DOI: 10.1056/NEJM19941103311907.

12. Bolognese L.B. Changing patterns of ST elevation myocardial infarction epidemiology. *Am. Heart J.* 2010; 160: 1–3. DOI: 10.1016/j.ahj.2010.10.008.

13. Preuss M., König I.R., Thompson J.R. et al. Design of the Coronary ARtery Disease Genome-Wide Replication And Meta-Analysis (CARDIoGRAM) Study: a genome-wide association meta-analysis involving more than 22 000 cases and 60 000 controls. *Cardiovasc. Genet.* 2010; 3: 475–483. DOI: 10.1161/CIRCGENETICS.109.899443.

УДК 616.33-006.6-003.24-003.2

© 2017 Ахметзянов Ф.Ш. и соавторы

## ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОГЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ РАКА ПРОКСИМАЛЬНОГО ОТДЕЛА ЖЕЛУДКА

*Фоат Шайхутдинович Ахметзянов<sup>1,2\*</sup>, Харшал Ашук Каулгуд<sup>1,2</sup>,  
Давид Маркович Рувинский<sup>2</sup>, Фарида Фоатовна Ахметзянова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>Республиканский клинический онкологический диспансер, г. Казань, Россия

Поступила 16.03.2017; принята в печать 12.05.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-674

**Цель.** Изучить лимфогенное метастазирование рака проксимального отдела желудка для определения объёма оперативного вмешательства как по стенке желудка, так и по лимфатическим путям.

**Методы.** Проанализированы данные лимфогенного метастазирования у 185 больных раком проксимального отдела желудка без перехода на пищевод, которым в 1982–2014 гг. в двух хирургических отделениях Республиканского клинического онкологического диспансера (г. Казань) выполнены гастроспленэктомии с расширенной лимфодиссекцией D2. Диагноз у всех пациентов до операции был морфологически верифицирован.

**Результаты.** При раке проксимального отдела желудка (в пределах ангиологических сегментов IV и V) поражение лимфатических узлов метастазами рака происходит во всех субсегментах лимфатической системы желудка. У 105 (56,7%) из 185 больных обнаружены метастазы в лимфатические узлы. Существует довольно чёткая закономерность: поражение лимфатических узлов метастазами в основном происходит в группах №3а, 3б и