

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов *rs2289263* и *rs6494629* гена *SMAD3* с интракраниальными аневризмами

Султанова Р.И.¹, Хусаинова Р.И.^{1,2}, Лебедева Е.Р.^{3,4}, Бусыгина А.В.⁴, Хуснутдинова Э.К.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВПО Башкирский государственный университет, г. Уфа, ул. Заки Валиди 32, r-ka_@mail.ru

² ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа, пр. Октября, 71; 450054; факс: (3472) 35-61-00

³ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург ул. Репина 3

⁴ Международный центр лечения головных болей Европа-Азия, г. Екатеринбург, ул. Фурманова 67

Интракраниальная аневризма (ИА) — это гетерогенное заболевание многофакторной природы, приводящее к спонтаным субарахноидальным кровоизлияниям, в основе которого лежат патологические локальные выпячивания стенок артериальных сосудов мозга из-за изменений в строении сосудистой стенки. Проведен поиск ассоциаций полиморфных вариантов *rs2289263* и *rs6494629* гена *SMAD3* с развитием ИА с учетом наличия симптомокомплекса недифференцированной дисплазии соединительной ткани (НДСТ). Генотип **C*C* локуса *rs6494629* является маркером повышенного риска ИА у женщин с НДСТ ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,3$; OR = 2,38; 95% ДИ 1,03–5,48), Аллель **C* и генотип **C*C* полиморфного варианта *rs2289263* ассоциирован с ИА у мужчин с артериальной гипертензией (АГ) ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,5$; OR = 1,73, 95% ДИ 1,04–2,87 и $p = 0,03$; $\chi^2 = 4,4$; OR = 2,19, 95% ДИ 1,04–4,59 соответственно).

Ключевые слова: интракраниальные аневризмы, *SMAD3*, полиморфизм ДНК.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

The role of polymorphic variants of *rs 2289263* and *rs 6494629* with intracranial aneurysms

Sultanova R.I.¹, Khusainova R.I.^{1,2}, Lebedeva E.R.^{3,4}, Busygina A.B.⁴, Khusnutdinova E.K.^{1,2}

¹ Bashkir State University, Ufa, Zaki Validi, 32, r-ka_@mail.ru

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Prospekt Oktyabrya, 71, 450054; fax: (3472) 35-61-00

³ The Urals State Medical University, Yekaterinburg, Repina st. 3

⁴ International Headache Center «Europe-Asia», Yekaterinburg, Furmanova st. 67

Intracranial aneurysm (IA) — a heterogeneous multifactorial disease, resulting in spontaneous subarachnoid hemorrhage, which is based on pathological local diverticulum of walls in arterial blood vessels of the brain. A search for associations of *SMAD3* gene *rs2289263* and *rs6494629* polymorphic variants with the development of IA taking into account symptoms of undifferentiated connective tissue dysplasia (UCTD). The **C*C* genotype of *rs6494629* proved to be a marker of increased risk of IA with UCTD in women ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,3$; OR = 2,38; 95% CI 1,03–5,48), **C* allele and **C*C* genotype of *rs2289263* is associated with IA with arterial hypertension (AH) in men ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,5$; OR = 1,73, 95% CI 1,04–2,87 and $p = 0,03$; $\chi^2 = 4,4$; OR = 2,19, 95% CI 1,04–4,59, respectively).

Keywords: intracranial aneurysm, *SMAD3*, polymorphism of DNA.

Введение

Аневризмы сосудов головного мозга или интракраниальные аневризмы (ИА) — патологические локальные мешковидные выпячивания стенок артериальных сосудов мозга из-за изменений в строении сосудистой стенки, в первую очередь в области бифуркаций, которые могут быть приобретенными или врожденными. В различных странах мира распространенность заболевания колеблется от 1 до 8% [1]. ИА, вследствие их разрыва, приводят к особо тяжелым формам инсульта — субарахноидальным кровоизлияниям (САК), частота которых достигает 6 на 100 000 населения мира в год, и являются актуальной медицинской и социальной проб-

лемой [2]. Среди людей с САК 50% умирают, 25% становятся инвалидами в связи с потерей речи, зрения и координации движений, у оставшихся 25% повышен риск повторных инсультов [3, 4]. В России частота САК варьирует от 6 до 19,4 на 100 000 населения в год [5]. Этиология и патогенез ИА является предметом изучения в течение длительного времени. Доказана роль ряда факторов, таких, как артериальная гипертензия, курение, потребление алкоголя, кокаина, наличие сопутствующих заболеваний соединительной ткани, наследственная отягощенность [6–11].

Также одним из факторов риска может быть недифференцированная дисплазия соединительной ткани (НДСТ) — аномалии структуры соединительной ткани,

проявляющиеся в снижении содержания ее отдельных составных элементов или изменении их соотношения, характеризующаяся многообразием клинических проявлений, не укладывающихся в структуру наследственных синдромов дисплазии соединительной ткани (ДСТ). В основе патогенеза ИА и ДСТ лежат изменения структуры соединительной ткани [12, 13].

Гемодинамическая нагрузка на сосуды также является фактором, играющим важную роль в патогенезе аневризм [14–17]. Среди факторов, влияющих на гемодинамическую нагрузку, доминирует артериальное давление (АД). Стенка аневризмы утрачивает трехслойное строение, присущее артерии, в ней, как правило, нет мышечного слоя, отсутствует (или сильно недоразвита) внутренняя мембрана и присутствует рубцовая (фиброзная) ткань. Постоянное повышение АД, а также его периодические подъемы могут привести к разрыву измененной стенки сосуда и развитию САК.

Поиск эффективных способов прогнозирования возникновения ИА до развития САК является актуальной проблемой здравоохранения. Существуют очевидные доказательства, что предрасположенность к аневризмам имеет значительный генетический компонент. Выявление генетических маркеров заболевания направлено на идентификацию локусов, участвующих во всех звеньях патогенеза аневризм.

За последние годы, с использованием методов полногеномного анализа ассоциации ИА с сотнями тысяч полиморфных вариантов различных генов (GWAS), основанных на использовании программы NapMap в сочетании с техникой биочипов высокого разрешения, была обнаружена ассоциация ИА с полиморфными вариантами генов, продукты которых вовлечены в сигнальные пути трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), участвующие в регуляции процессов эмбрионального развития, пролиферации, дифференцировки, адгезии и апоптозе различных клеток. TGF- β передает свои сигналы в клетку через белки Smad, являющиеся цитоплазматическими медиаторами.

Однако, несмотря на достигнутый прогресс в изучении заболевания, до сих пор не выявлены генетические маркеры с высокой диагностической значимостью, позволяющие проводить пресимптоматическую ДНК-диагностику заболевания и профилактические и лечебные мероприятия до разрыва аневризм.

Целью данной работы является: изучение роли полиморфных вариантов *rs2289263* и *rs6494629* гена *SMAD3* в патогенезе аневризм сосудов головного мозга у жителей из Волго-Уральского региона России с учетом симптомокомплекса НДСТ и АГ.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 311 больных ИА и 284 практически здоровых индивидов в качестве контрольной выборки, русской эт-

нической принадлежности, проживающих в Волго-Уральском регионе России. Все участники исследования являлись пациентами региональным сосудистого центра нейрохирургии на базе нейрохирургического отделения ГКБ №40, г. Екатеринбург. Все 595 человек обследованы на наличие признаков артериальной гипертензии (АГ) и НДСТ в соответствии со стандартами, разработанными Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (WMA) «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования». Исследование выполнено с одобрением локальными биоэтическими комитетами.

В исследование включены пациенты, у которых диагностирована аневризма, а также пациенты после разрыва аневризмы и хирургического лечения. Исследуемые выборки тестированы по специально составленному протоколу, включающему сведения об этнической принадлежности, количестве аневризм, их локализации, наследственном статусе, потреблении алкоголя, курении. Критериями исключения были: наличие веретенообразных или фузиформных аневризм, наличие сопутствующих заболеваний и состояний, которые могут predispose к сосудистой патологии (атеросклероз, наследственные заболевания соединительной ткани).

Возраст больных варьировал от 2 до 76 лет, средний возраст составил $48 \pm 3,1$ года (табл. 1).

Наличие признаков НДСТ оценивали по числу внешних маркеров у больных с ИА и контрольной группы. Фенотипические маркеры включали в себя: повышенную растяжимость кожи в надключичной области (4 см и более), видимые сосуды лица и груди, варикозные вены на ногах, грыжи живота, плоскостопие, сколиоз, деформации грудной клетки, пародонтоз, гипермобильность суставов и стрии живота. Среди больных с ИА число маркеров не менее трех имели 62,8% и 11,8% чел. из контрольной группы ($p < 0,0001$, OR = 12,5, 95% ДИ = 7,45–21,1). Среднее число маркеров дисплазии оказалось равным 3,07 в группе больных с аневризмами и 1,17 в контрольной группе, поэтому наличие дисплазии соединительной ткани констатировали у лиц, имеющих не менее трех маркеров дисплазии.

АГ обнаружена у 57,8% больных аневризмами, в контроле АГ выявлена у 9% ($p < 0,0001$, OR = 13,38, 95% ДИ 7,64–23,4). Максимальная встречаемость АГ отмечена в возрасте от 41 до 50 лет (65,8%). Длительность АГ до диагностики аневризмы составила в большинстве случаев 5–10 лет.

Генотипирование локуса *rs6494629* гена *SMAD3* было проведено с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом с использованием эндонуклеазы *HpaII* (Fermentas), согласно протоколу производителя. Разделение фрагментов ДНК после амплификации и рестрикции проводили путём электрофореза в 7% полиакриламидном геле (ПААГ), окрашивали раствором 5% бромистого этидия

и визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете с использованием видеогельдокументирующей системы «Geldokulant» (Франция).

Генотипирование локуса *rs2289263* проводили методом ПЦР «в реальном времени» с использованием TaqMan системы и разработанных нами праймеров и зондов, несущих флуорофор и тушител, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента, на ДНК-амплификаторе «CFX96 Touch Deep Well Real-time PCR Detection System» (Bio-Rad), обладающей возможностью детекции и анализа флуоресценции по конечной точке с помощью встроенных средств программного обеспечения (Bio-Rad CFX Manager V1.6.541.1028).

Характеристика использованных локусов гена *SMAD3* представлена в табл. 2.

Результаты исследования

Распределение частот генотипов всех изученных локусов соответствует равновесию Харди—Вайнберга ($p > 0,05$), что свидетельствует о достаточной генетической гетерогенности исследуемой выборки и об отсутствии ошибок при формировании выборок и проведении генотипирования. Частота минорного аллеля в общей

выборке составила 0,414 для локуса *rs6494629* и 0,433 для полиморфизма *rs2289263*. Подробная характеристика изученных локусов представлена в табл. 3.

В ходе исследования проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов *rs2289263* и *rs6494629* гена *SMAD3* между выборками больных и контроля, а также в группах сравнения с учетом гендерных различий, наличия признаков НДСТ и АГ.

При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов локуса *rs2289263* между общими группами больных и контроля не выявлено статистически значимых различий. В обеих группах наблюдались сопоставимые частоты аллелей исследуемого локуса (таб. 4) и небольшое повышение частоты гетерозиготного генотипа $*A^*C$ у больных по сравнению с контролем (0,514 и 0,446, соответственно).

При разделении исследуемой выборки в зависимости от гендерной принадлежности оказалось, что у мужчин с ИА аллель $*C$ встречается чаще (0,602) по сравнению с соответствующим контролем (0,559), однако различия не достигают статистической значимости. При этом у женщин наблюдается противоположная тенденция — аллель $*C$ чаще встречается в контрольной группе.

Таблица 1

Основные характеристики исследуемых групп по возрасту

Группы	n м/ж	Возраст			Мужчины			Женщины		
		M ± m	Min	Max	M ± m	Min	Max	M ± m	Min	Max
Пациенты	310 152/158	48,31 ± 0,72	2	76	45,68 ± 1,03	13	71	50,85 ± 0,98	2	76
Контроль	283 127/156	35,08 ± 0,64	16	59	36,38 ± 0,97	16	58	34,03 ± 0,85	16	59
ИА + НДСТ	108 57/51	48,11 ± 1,1	19	75	44,79 ± 1,56	19	66	51,82 ± 1,39	30	75
ИА + АГ	101 47/54	49,23 ± 1,1	17	75	47,57 ± 1,44	25	63	50,67 ± 1,62	17	75
Контроль с НДСТ	9 6/3	34,11 ± 2,57	21	42	34,17 ± 3,89	21	42	34 ± 2	30	36
Контроль с АГ	17 12/5	42,65 ± 2,43	16	57	42,58 ± 3,44	16	57	42,8 ± 1,36	39	45

Примечание. «+» означает наличие синдрома, «-» отсутствие синдрома, n — количество индивидов, M ± m — среднее значение ± стандартная ошибка, Min — минимум, Max — максимум.

Таблица 2

Характеристика исследованных локусов

Ген	Локус	Последовательность праймеров (5' → 3')	Метод детекции	Ссылка
<i>SMAD3</i>	<i>rs6494629</i>	catcttctcctcctctggccata cttagcgaaggaaaccagca	ПЦР/ПДРФ HpaII	Paradowska-Gorycka et al., 2014.
<i>SMAD3</i>	<i>rs2289263</i>	FJ — ggctctttctccatttctc RJ — gacaccctttcaactctg FAM-caaatCaAcCccgcta-BHQ-1 VIC-caaatCaAcCccgcta-BHQ-2	ПЦР в реальном времени	Собственная разработка

Мы провели поиск ассоциаций исследованных локусов с наличием признаков НДСТ и АГ в отдельности, а так же в сочетании с аневризмами сосудов головного мозга для выявления их возможной роли в формировании отдельных фенотипов, и их коморбидных состояний.

При анализе выборки с признаками НДСТ, без учета наличия ИА, установлено, что у мужчин с НДСТ статистически значимо чаще встречается генотип *C*C (0,434) по сравнению с контрольной группой мужчин без признаков НДСТ (0,227), ($p = 0,004$, $\chi^2 = 7,9$; OR = 1,9, 95% ДИ 1,22—2,96). У женщин наблюдается обратная тенденция.

При сравнении частот аллелей локуса *rs2289263* гена *SMAD3* в группе мужчин с АГ, аллель *C оказался аллелем риска ($p = 0,02$, $\chi^2 = 5,04$; OR = 1,15, 95% ДИ 1,01—1,30), аллель *A, соответственно, оказался протективным (OR = 0,69, 95% ДИ 0,50—0,96). Частота генотипа *C*C также оказалась статистически значимо выше у больных и составила 0,407, по сравнению с группой контроля, где его частота оказалась равной 0,267 ($p = 0,04$, $\chi^2 = 3,84$; OR = 1,54, 95% ДИ 1,0—2,37).

Таким образом, исследование локуса *rs2289263* гена *SMAD3* показало его значимость у мужчин с ИА в коморбидном состоянии с АГ, а также в группе мужчин только с АГ.

Анализ полиморфного локуса *rs6494629* гена *SMAD3* не выявил статистически значимых различий по частотам аллелей и генотипов между общими выборками (табл. 5).

При разделении исследуемой выборки по полу у мужчин с ИА и НДСТ, а также у мужчин с ИА и АГ, частота аллеля *T оказалась несколько выше, чем в группе конт-

роля. Подобная тенденция наблюдается при сравнении частот генотипов, однако различия не достигают статистической значимости.

При исследовании локуса *rs6494629* гена *SMAD3* у женщин, частота генотипа *C*C оказалась значительно выше в группе женщин с ИА в сочетании с НДСТ, составляя 0,293, тогда как в группе контроля она не превысила 0,148, различия достигают статистической значимости ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,3$). Генотип *C*C *rs6494629* гена *SMAD3* оказался маркером повышенного риска ИА у женщин с ДСТ (OR = 2,38; 95% ДИ 1,03—5,48).

Нами также проведен сравнительный анализ изученных локусов между выборками больных с ИА в сочетании с АГ и обнаружено, что частота аллеля *C локуса *rs2289263* гена *SMAD3* в группе мужчин с ИА и АГ оказалась значительно выше (0,638), чем в группе контроля (0,505). Аллель *C оказался фактором риска для развития ИА у мужчин, имеющих АГ ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,5$; OR = 1,73, 95% ДИ 1,04—2,87), аллель *T оказался протективным ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,5$; OR = 0,58, 95% ДИ 0,35—0,96). Частота генотипа *C*C в этой же группе пациентов составила 0,426, тогда, когда в группе контроля не превышала 0,252, генотип *C*C оказался маркером повышенного риска для мужчин с ИА и АГ ($p = 0,03$; $\chi^2 = 4,4$; OR = 2,19, 95%, ДИ 1,04—4,59).

Таким образом, генотип *CC локуса *rs2289263* гена *SMAD3* является маркером повышенного риска развития как НДСТ и АГ в отдельности, так и в коморбидном состоянии у мужчин, тогда как локус *rs6494629* является значимым при развитии ИА у женщин с симптомокомплексом НДСТ.

Таблица 3

Характеристики исследуемых локусов в общей выборке и в группах сравнения

№	Локус	Ген	H _{pred}	H _{obs}	HW _{pval}	MAF
Общая выборка						
1	rs6494629	SMAD3	0,482	0,485	0,909	0,414
2	rs2289263		0,472	0,491	0,3864	0,433
Пациенты с ИА и НДСТ						
3	rs6494629	SMAD3	0,488	0,514	0,3727	0,421
4	rs2289263		0,495	0,478	0,5885	0,450
Пациенты с ИА и АГ						
5	rs6494629	SMAD3	0,512	0,488	0,4546	0,424
6	rs2289263		0,481	0,494	0,494	0,447
Контроль						
7	rs6494629	SMAD3	0,486	0,446	0,1917	0,416
8	rs2289263		0,489	0,495	0,9077	0,452

Примечание. H_{obs} — наблюдаемая гетерозиготность, H_{pred} — ожидаемая гетерозиготность, HW_{pval} — показатель χ^2 для оценки соответствия равновесию Харди–Вайнберга (при уровне $p > 0,05$), MAF — частота минорного аллеля.

Таблица 4

Распределение частот аллелей и генотипов локуса *rs2289263* гена *SMAD3* в группах сравнения

Популяции Выборки	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
		*А	*С	*А*А	*А*С	*С*С
Больные с ИА	311	(264) 0,415	(364) 0,585	(58) 0,186	(142) 0,457	(111) 0,357
Контроль	284	(257) 0,452	(311) 0,548	(59) 0,208	(139) 0,429	(86) 0,303
Мужчины с ИА	152	(130) 0,428	(174) 0,572	(31) 0,204	(68) 0,447	(53) 0,349
Контроль мужчины	126	(120) 0,476	(132) 0,524	(27) 0,214	(66) 0,537	(33) 0,262
Женщины с ИА	159	(120) 0,403	(190) 0,597	(27) 0,170	(74) 0,465	(58) 0,365
Контроль женщины	157	(137) 0,436	(177) 0,564	(32) 0,204	(73) 0,465	(52) 0,331
НДСТ (+) в целом	117	(102) 0,436	(132) 0,564	(22) 0,188	(58) 0,496	(37) 0,316
НДСТ (–) в популяции	241	(218) 0,452	(264) 0,548	(51) 0,212	(116) 0,481	(74) 0,307
НДСТ (+) у женщин	54	(50) 0,463	(58) 0,537	(10) 0,185	(30) 0,556	(14) 0,259
НДСТ (–) у женщин	98	(85) 0,434	(111) 0,566	(20) 0,204	(45) 0,459	(33) 0,337
НДСТ (+) у мужчин	53	(52) 0,491	(74) 0,509	(12) 0,226	(28) 0,583	(23) 0,434 p = 0,004, $\chi^2 = 7,9$ OR = 1,9, (1,22-2,96)
НДСТ (–) у мужчин	132	(133) 0,504	(131) 0,496	(31) 0,235	(71) 0,538	(30) 0,227
АГ (+) в целом	118	(100) 0,424	(136) 0,576	(22) 0,186	(56) 0,475	(40) 0,339
АГ (–) в целом	240	(220) 0,458	(260) 0,542	(51) 0,213	(118) 0,492	(71) 0,296
АГ (+) у женщин	59	(57) 0,483	(61) 0,517	(14) 0,237	(29) 0,492	(16) 0,271
АГ (–) у женщин	93	(78) 0,419	(108) 0,581	(16) 0,172	(46) 0,495	(31) 0,333
АГ (+) у мужчин	59	(43) 0,364 p = 0,02, $\chi^2 = 5,04$ OR = 0,69, (0,50-0,96)	(72) 0,636 p = 0,02, $\chi^2 = 5,04$ OR = 1,15, (1,01-1,30)	(8) 0,136	(27) 0,458	(24) 0,407 p = 0,04, $\chi^2 = 3,84$ OR = 1,54, (91,0-2,37)
АГ (–) у мужчин	146	(142) 0,486	(150) 0,514	(35) 0,240	(72) 0,493	(39) 0,267
НДСТ + ИА	108	(95) 0,440	(121) 0,560	(21) 0,194	(53) 0,491	(34) 0,315
Контроль	174	(162) 0,466	(186) 0,534	(37) 0,213	(88) 0,506	(49) 0,282
НДСТ + ИА у женщин	51	(48) 0,471	(54) 0,529	(10) 0,196	(28) 0,549	(13) 0,255
Контроль женщины	79	(68) 0,430	(90) 0,569	(14) 0,177	(40) 0,506	(25) 0,316
НДСТ+ ИА у мужчин	57	(46) 0,412	(67) 0,588	(11) 0,193	(25) 0,439	(21) 0,368
Контроль мужчины	95	(94) 0,495	(96) 0,505	(23) 0,121	(48) 0,253	(24) 0,126
АГ + ИА	101	(85) 0,421	(117) 0,466	(19) 0,188	(47) 0,465	(35) 0,347
Контроль	175	(162) 0,579	(188) 0,534	(37) 0,211	(88) 0,503	(50) 0,286
АГ + ИА у женщин	54	(51) 0,472	(57) 0,527	(12) 0,222	(27) 0,500	(15) 0,278
Контроль женщины	79	(68) 0,430	(90) 0,569	(14) 0,177	(40) 0,506	(25) 0,316
АГ + ИА у мужчин	47	(34) 0,361 p = 0,03, $\chi^2 = 4,5$ OR = 0,58, (0,35-0,96)	(60) 0,638 p = 0,03, $\chi^2 = 4,5$ OR = 1,73, (1,04-2,87)	(7) 0,149	(20) 0,426	(20) 0,426 p = 0,03, $\chi^2 = 4,4$ OR = 2,19 (1,04-4,59)
Контроль мужчины	95	(94) 0,495	(96) 0,505	(23) 0,242	(48) 0,505	(24) 0,252

Примечание. НДСТ (+) в целом — все индивиды с наличием признаков НДСТ > 3, НДСТ (–) — все индивиды с отсутствием признаков НДСТ. АГ (+) в целом — все индивиды с АГ, АГ (–) — с отсутствием артериальной гипертензии, частота аллелей и генотипов в скобках приведена в абсолютном значении.

Распределение частот аллелей и генотипов локуса *rs6494629* гена *SMAD3* в исследуемых выборках

Популяции Выборки	n	Частоты аллелей		Частоты генотипов		
		*С	*Т	*С*С	*С*Т	*Т*Т
Больные с ИА	311	(256) 0,412	(366) 0,588	(48) 0,154	(160) 0,514	(103) 0,331
Контроль	284	(237) 0,416	(333) 0,584	(55) 0,192	(127) 0,446	(103) 0,361
Мужчины с ИА	152	(121) 0,398	(183) 0,602	(21) 0,138	(79) 0,520	(52) 0,342
Контроль мужчины	127	(112) 0,441	(142) 0,559	(27) 0,213	(58) 0,457	(42) 0,330
Женщины с ИА	159	(135) 0,425	(183) 0,575	(27) 0,170	(81) 0,509	(51) 0,321
Контроль женщины	157	(125) 0,398	(189) 0,602	(28) 0,178	(69) 0,439	(60) 0,382
НДСТ (+) в целом	116	(95) 0,409	(137) 0,591	(18) 0,155	(59) 0,509	(39) 0,336
НДСТ (–) в целом	242	(208) 0,430	(276) 0,570	(42) 0,174	(124) 0,512	(76) 0,314
НДСТ (+) у женщин	54	(47) 0,435	(61) 0,565	(11) 0,204	(25) 0,463	(18) 0,333
НДСТ (–) у женщин	98	(84) 0,429	(112) 0,571	(17) 0,173	(50) 0,510	(31) 0,316
НДСТ (+) у мужчин	63	(49) 0,389	(77) 0,611	(7) 0,111	(35) 0,556	(21) 0,333
НДСТ (–) у мужчин	143	(124) 0,434	(162) 0,566	(25) 0,175	(74) 0,517	(44) 0,307
АГ (+) в целом	118	(97) 0,411	(139) 0,589	(18) 0,153	(61) 0,517	(39) 0,331
АГ (–) в целом	241	(207) 0,429	(275) 0,571	(42) 0,174	(123) 0,510	(76) 0,315
АГ (+) у женщин	59	(53) 0,449	(65) 0,551	(11) 0,186	(31) 0,525	(17) 0,288
АГ (–) у женщин	98	(83) 0,423	(113) 0,577	(17) 0,173	(49) 0,500	(32) 0,327
АГ (+) у мужчин	59	(44) 0,373	(74) 0,627	(7) 0,119	(30) 0,508	(22) 0,373
АГ (–) у мужчин	159	(137) 0,431	(181) 0,569	(27) 0,170	(83) 0,522	(49) 0,308
НДСТ + ИА	108	(86) 0,398	(130) 0,601	(15) 0,139	(56) 0,519	(37) 0,343
Контроль	184	(155) 0,421	(213) 0,579	(32) 0,177	(91) 0,495	(61) 0,332
НДСТ + ИА у женщин	58	(58) 0,500	(58) 0,500	(17) 0,293 p = 0,03, $\chi^2 = 4,3$ OR = 2,38, (1,03-5,48)	(24) 0,414	(17) 0,293
Контроль женщины	81	(65) 0,401	(97) 0,599	(12) 0,148	(41) 0,506	(28) 0,436
НДСТ+ ИА у мужчин	57	(62) 0,368	(72) 0,632	(15) 0,088	(32) 0,561	(20) 0,351
Контроль мужчины	102	(90) 0,392	(114) 0,598	(20) 0,196	(50) 0,490	(32) 0,314
АГ + ИА	101	(84) 0,416	(118) 0,584	(16) 0,158	(52) 0,515	(33) 0,328
Контроль	176	(152) 0,432	(200) 0,568	(33) 0,188	(86) 0,488	(57) 0,324
АГ + ИА у женщин	54	(48) 0,383	(60) 0,617	(11) 0,204	(26) 0,481	(17) 0,315
Контроль женщины	79	(63) 0,399	(95) 0,601	(13) 0,165	(37) 0,468	(29) 0,367
АГ + ИА у мужчин	47	(36) 0,383	(58) 0,617	(5) 0,106	(26) 0,553	(16) 0,340
Контроль мужчины	96	(89) 0,464	(103) 0,536	(20) 0,208	(49) 0,510	(27) 0,281

Примечание. НДСТ (+) в целом — все индивиды с наличием признаков НДСТ > 3, НДСТ (–) — все индивиды с отсутствием признаков НДСТ. АГ (+) в целом — все индивиды с АГ, АГ (–) — с отсутствием артериальной гипертензии, частота аллелей и генотипов в скобках приведена в абсолютном значении.

Обсуждение результатов исследования

В настоящее время известно несколько различных белков Smad, которые подразделяются на три типа: активируемые рецептором R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 и Smad8), образуют комплексы с так называемым общим Smad-белком (Smad4), а также ингибиторные I-Smad (Smad6 и Smad7). Канонический сигнальный ка-

скад включает фосфорилирование TGF- β -рецептора I типа, активирование Smad2 и Smad3, их гетеромеризацию с участием Smad4 и проникновение гетеромерного комплекса внутрь ядра, где он выполняет функцию транскрипционных факторов для разных генов [19, 20]. Таким образом, белки SMAD являются важным компонентом TGF- β -каскада.

Ген *SMAD3* локализован на хромосоме 15 в области q22, состоит из 9 экзонов и кодирует белок, состоящий из 425 аминокислот. Полиморфные варианты *rs2289263* и *rs6494629* гена *SMAD3* расположены в 1 интроне. Среди Smad белков, Smad3 играет центральную роль в регуляции экспрессии коллагена, поддержании внеклеточного матрикса и фиброзообразовании [21, 22]. Xiaohua Dai, Jianbin Shen с соавт. (2015) показали, что потеря SMAD3 резко увеличивает утолщение стенки брюшной аорты. Гистологические анализы на модельных мышах показывают значительное ремоделирование сосудистой стенки с фрагментацией плотной соединительной ткани [23].

Идентифицировано более 20 патогенных мутаций в гене *SMAD3* (включая миссенс-мутации, нонсенс-мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и вызывающие нарушения в сайтах сплайсинга) [24–33]. Большинство мутаций сосредоточено в экзоне 6 и выявлено у американцев европейского происхождения [34]. По данным Fitzgerald K.K. с соавторами (2014) и Burke C. с соавторами (2015) доказана роль мутаций в гене *SMAD3* в развитии аневризм аорты [35, 36]. Ingrid M.B.H. van de Laar и др. (2011) описали 8 мутаций гена *SMAD3* в семьях с синдромом аневризмы-остеоартрита из Бельгии, Нидерландов, Испании и США. В 2 случаях мутации приводили к сдвигу рамки считывания, в результате которых происходило нарушение функции передачи сигнала TGFβ/Smad сигнального каскада [37]. По данным литературы, потеря белка SMAD3 приводит к утолщению стенок сосудов, способствует ремоделированию сосудистой стенки, реорганизации коллагенового волокна и инфильтрации лейкоцитов, подавляя воспаление при аневризме брюшной аорты на модельных мышах [23].

Существует несколько исследований роли полиморфных вариантов гена *SMAD3* в развитии многофакторных заболеваний соединительной ткани. В исследовании GWAS Ruigrok Y.M. предположил значимую роль TGFβ-сигнального пути в целом и генов SMAD-белков в патогенезе ИА. В доступной литературе отсутствуют данные об изучении локусов *rs2289263* и *rs6494629* у больных с ИА. По данным исследователей из Польши, генотип **T*T rs6494629* оказался маркером повышенного риска развития ревматоидного артрита [25]. Имеются данные, что полиморфные варианты *rs2289263* и *rs6494629* связаны с остеоартритом коленного сустава в европейских популяциях [39]. Однако в результате изучения однонуклеотидного полиморфизма *rs6494629* в популяции китайцев не выявлено каких-либо ассоциаций [40]. Эти несоответствия или противоречивые результаты в различных исследованиях могут быть обусловлены такими факторами, как малый размер выборки, особенности генетической структуры изученных популяций.

В нашем исследовании выявлены ассоциации генотипа **C*C* локуса *rs2289263* гена *SMAD3* с развитием НДСТ и АГ в отдельности и при сочетании с ИА и АГ. Аллель **C* оказался маркером риска для мужчин с ИА и АГ.

ИА наиболее часто диагностируются в возрасте от 41 до 50 лет, что составляет 39,7% от возрастной группы в нашем исследовании. В этой группе наблюдается максимальная встречаемость АГ — 65,8%. Эти факты наводят на мысль о том, что высокая частота разрывов аневризм в этом возрасте может быть обусловлена частой встречаемостью АГ, которая оказывает потенцирующее влияние на развитие аневризм.

Полиморфный вариант *rs6494629* гена *SMAD3* оказался ассоциирован с развитием ИА у женщин с НДСТ.

В группе больных с множественными фенотипическими маркерами ДСТ выявлена достоверно более частая встречаемость десквамации (отслаивания) эндотелия, что значительно ослабляет протекторные свойства стенки сосуда. Таким образом, больные с интракраниальными аневризмами имеют характерные особенности строения соединительной ткани, которые подтверждаются наличием симптомокомплекса НДСТ у больных с ИА.

Следовательно, АГ и НДСТ являются фоновыми состояниями, предрасполагающими к развитию ИА. Выявленные ассоциации показывают значимость полиморфных локусов гена *SMAD3* в формировании предрасположенности к ИА. Полученные нами результаты являются первыми шагами в исследовании роли TGFβ-сигнального пути в патогенезе ИА и необходимо продолжить исследования с привлечением большего количества генов каскада TGFβ.

Список литературы

1. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. Unruptured intracranial aneurysms — risk of rupture and risks of surgical intervention New England Journal of Medicine — 1998. — V.339(24). P.1725-1733.
2. Van Gijn J. Cerebral vasoconstriction, headache and sometimes stroke: one syndrome or many. Brain. 2007. V.130(Pt 12). P.3060-2.
3. D.G. Peters, A.B. Kassam, E. Feingold et al. Molecular Anatomy of an Intracranial Aneurysm Coordinated Expression of Genes Involved in Wound Healing and Tissue Remodeling. Stroke. 2001. V.32. P.1036-1042.
4. Pope FM, Nichols AC, Narcisi P, Bartlett J, Neil-Dwyer G, Doshi B. Some patients with cerebral aneurysms are deficient in type III collagen. Lancet. 1981. V.1. P.973-975.
5. Лебедев ВВ, Гельфенбейн МС, Евзиков ГЮ, Белозеров ГЕ. Микронейрохирургическое лечение при окклюзионных поражениях цереброваскулярной системы. В кн.: Диагностика и хирургическое лечение острых нарушений мозгового кровообращения по ишемическому типу. Материалы городского семинара нейрохирургов. Москва, 1996, 22 с., с.9-13.
6. Mattei M, Hubert C, Altheic-Cetas et al. Angiotensin-I-converting enzyme gene is on chromosome 17. Cytogenet. Cell. Genet. 1989. V. 51. P. 1041.
7. Neil-Dwyer G, Bartlett JR., Nicholls AC., Narcisi P, Pope FM. Collagen deficiency and ruptured cerebral aneurysms: a clinical and biochemical study. J. Neurosurg. 1983. V.59. P.16 -20.
8. Ostergaard JR, Oxlund H. Collagen type III deficiency in patients with rupture of intracranial saccular aneurysms. J. Neurosurg. 1987. V. 67. P. 690-696.

9. Pope FM, Nichols AC, Narcisi P, Bartlett J, Neil-Dwyer G, Doshi B. Some patients with cerebral aneurysms are deficient in type III collagen. *Lancet*. 1981. V.1. P.973-975.
10. Shievink WI. Genetics and aneurysm formation. *Neurosurg Clin N Am*. 1998. V.9. P.485- 495.
11. Teunissen LL, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*. 1996. V.27(3). P.544-549.
12. Кадурина ТИ. Наследственные коллагенопатии (клиника, диагностика, лечение и диспансеризация). СПб.: Невский диалект, 2000. 272 с.
13. Нечаева ГИ, Друк ИВ., Перспективы реализации здоровьесберегающих технологий в группе пациентов с дисплазиями соединительной ткани. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2009. №6. с. 64-68.
14. Ostergaard JR, Oxlund H. Collagen type III deficiency in patients with rupture of intracranial saccular aneurysms. *J. Neurosurg*. 1987. V.67. P.690-696.
15. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy // *Annu Rev Biochem*. 1995. V.64. P. 403-34.
16. Schievink WI. Marfan syndrome and intracranial aneurysms. *Stroke*. 1999. V.30. P.2767-2768.
17. Shievink WI. Genetics of intracranial aneurysms. *Neurosurgery*. 1997. V.40. P.651- 663.
18. Paradowska-Gorycka A, Romanowska-Prychnicka K, Hala-dyj E, et.al., Association of the Smad3 and NFATc2 gene polymorphisms and their serum levels with susceptibility to rheumatoid arthritis in Polish cohorts. *Clin Exp Immunol*. 2015. V.179 (3). P.444-453.
19. Gleizes PE, Munger JS, Nunes I. et al. TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem. Cells*. 1997.V.15(3). P.190-197.
20. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005. V.19 (23). P.2783-2810.
21. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18, 2004. P.816-827.
22. Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *International journal of experimental pathology*. 2004.V.85. P.47-64.
23. Dai X, Shen J, Annam NP et al., SMAD3 deficiency promotes vessel wall remodeling, collagen fiber reorganization and leukocyte infiltration in an inflammatory abdominal aortic aneurysm mouse model. *Sci Rep*. 2015.
24. IMBH van de Laar, RA. Oldenburg, G. Pals et al., Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nature Genetics*. 2011. V. 43(2). P.121-126.
25. MBH van de Laar, D. van der Linde, EHG. Oei et al., Phenotypic spectrum of the SMAD3-related aneurysmsosteoarthritis syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2012. V.49(1). P.47-57.
26. Aubart M, Gobert D, Aubart-Cohen F. et al., Early-onset osteoarthritis, Charcot-Marie-Tooth like neuropathy, autoimmune features, multiple arterial aneurysms and dissections: an unrecognized and life threatening condition. *PLoS ONE*. 2014. V. 9(5).
27. Martens T, I Van Herzele, F De Ryck et al., Multiple aneurysms in a patient with aneurysms-osteoarthritis syndrome, *The Annals of Thoracic Surgery*. 2013. V.95(1). P. 332-335.
28. Proost D, Vandeweyer G, Meester JA et al., Performant mutation identification using targeted next-generation sequencing of 14 thoracic aortic aneurysm genes. *Human Mutation*, 2015.
29. Panesi P, Foffa I, Sabina S, Ait L et. al. Novel TGFBR2 and known missense SMAD3 mutations: two Case reports of thoracic aortic aneurysms. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2015. V.99.(1). P.303-305.
30. Berthet E, Hanna N, Giraud C et al. Acase of rheumatoid arthritis associated with SMAD3 gene mutation: a new clinical entity? *The Journal of Rheumatology*. 2015. V. 42(3). P.556.
31. Fitzgerald KK, Bhat AM, Conard K, et. al. Novel SMAD3 mutation in a patient with hypoplastic left heart syndrome with significant aortic aneurysm. *Case Reports in Genetics*. V.2014. Article ID 591516. P. 4.
32. Campens L, Callewaert B, Mosquera LM et al., Gene panel sequencing in heritable thoracic aortic disorders and related entities inverted question mark results of comprehensive testing in a cohort of 264 patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015. V.10(1). P.9.
33. Wischmeijer A, L Van Laer, Tortora G et al., Thoracic aortic aneurysm in infancy in aneurysms-osteoarthritis syndrome due to a novel SMAD3 mutation: further delineation of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 2013. V.161(5). P.1028-1035.
34. Regalado ES, Guo D-C, Villamizar C et al., Exome sequencing identifies SMAD3 mutations as a cause of familial thoracic aortic aneurysm and dissection with intracranial and other arterial aneurysms, *Circulation Research*, 2011. V.109(6). P.680-686.
35. Fitzgerald KK, Bhat AM, Conard K, et. al.: Novel SMAD3 Mutation in a Patient with Hypoplastic Left Heart Syndrome with Significant Aortic Aneurysm. *Case Rep Genet*. 2014. 591516.
36. Burke C, Shalhoub S, Starnes BW. Endovascular repair of an internal mammary artery aneurysm in a patient with SMAD-3 mutation. *J. Vasc. Surg*. 2015. V.62(2). P.486-488.
37. I. van de Laar, D. van der Linde, E. HG Oei, et. al Phenotypic spectrum of the SMAD3-related aneurysmsosteoarthritis syndrome. *J. Med Genet*. 2012. V.49(1). P.47-57.
38. Ruigrok YM, Rinkel GJ. From GWAS to the clinic: risk factors for intracranial aneurysms. *Genome Med* 2010. V.2. P.61.
39. Valdes AM, Spector TD, Tamm A, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010. V.62. P.2347-52.
40. Su S-L, Yang H-Y, Lee H-S, et al. Gene-gene interactions between TGF-β/Smad3 signalling pathway polymorphisms affect susceptibility to knee osteoarthritis. *BMJ Open*. 2015. V.5:007931.