

УДК 577.2

# Полиморфизм rs1800470 гена *TGFB1* связан с фиброзом миокарда у реципиентов сердца

О. Е. Гичкун<sup>1,2\*</sup>, О. П. Шевченко<sup>1,2</sup>, Р. М. Курабекова<sup>1</sup>, Н. П. Можейко<sup>1</sup>, А. О. Шевченко<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, 123182 Россия<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119435 Россия

\*E-mail: gichkunoe@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.06.2021

Принята к печати 27.09.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11469

**РЕФЕРАТ** В формировании фиброза миокарда участвует трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), уровень которого может зависеть от полиморфизма гена *TGFB1*. Фиброз миокарда трансплантированного сердца может приводить к его структурному и функциональному ремоделированию и последующей дисфункции. Проанализирована частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфных участков rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* у реципиентов сердца и их связь с фиброзом миокарда трансплантата. Среди реципиентов сердца реже, чем среди здоровых лиц, встречались носители генотипа CC ( $p = 0.023$ , ОШ = 0.12, 95% ДИ: 0.017–1.0) и чаще аллеля G ( $p = 0.023$ , ОШ = 7.76, 95% ДИ: 1.0–60.20) полиморфизма rs1800471 гена *TGFB1*. У пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) реже встречался генотип GG ( $p = 0.035$ , ОШ = 2.68, 95% ДИ: 1.061–6.793) и чаще аллель A ( $p = 0.035$ , ОШ = 0.37, 95% ДИ: 0.148–0.942) полиморфизма rs1800469, чем у пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП). У реципиентов сердца с генотипом AA полиморфизма rs1800470 гена *TGFB1* фиброз миокарда, верифицированный по результатам эндомиокардиальной биопсии, выявлялся чаще, нежели у носителей аллеля G (ОШ = 10.4, 95% ДИ: 1.152–94.538,  $p = 0.013$ ). Выявленные различия указывают на связь полиморфизма гена *TGFB1* с фиброзом миокарда трансплантата. Исследования на большей группе пациентов позволят охарактеризовать влияние генетических факторов на формирование фиброза миокарда трансплантированного сердца.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ген трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , однонуклеотидные полиморфизмы, фиброз миокарда, трансплантат сердца.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** TGF $\beta 1$  – трансформирующий фактор роста  $\beta 1$ ; ДКМП – дилатационная кардиомиопатия; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; ОШ – отношение шансов; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на фоне увеличения средней продолжительности жизни и снижения смертности от острых заболеваний в молодом и среднем возрасте отмечается увеличение количества больных с синдромом сердечной недостаточности. Трансплантация сердца является эффективным методом лечения терминальной сердечной недостаточности, способствующим улучшению прогноза и качества жизни обреченных больных. Наблюдаемое в последние годы увеличение продолжительности жизни реципиентов сердца достигнуто в основном за счет снижения смертности в раннем посттрансплантационном периоде. Один

из факторов, оказывающих негативное влияние на отдаленный прогноз после трансплантации сердца, – фиброз миокарда, развитие которого сопровождается нарушением структуры и функции сердечного трансплантата [1].

Фиброз миокарда сердечного трансплантата – это многофакторный процесс, к развитию и прогрессированию которого предрасполагает ряд клеточных и молекулярных факторов [2]. Исследования последних лет показали, что одним из патогенетических факторов фиброза является трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) – профибротический медиатор, вовлеченный в продукцию внеклеточного матрикса [3].

Получены данные о генетической детерминированности уровня TGFβ1 в периферической крови. Показано, что некоторые виды генетического полиморфизма гена *TGFB1* ассоциированы с тяжестью коронарного атеросклероза и предрасположенностью к инфаркту миокарда, и эта связь различается в разных этнических группах [4, 5].

Белок TGFβ1 кодируется геном *TGFB1*, расположенным на хромосоме 19. На сегодняшний день в гене *TGFB1* идентифицированы восемь однонуклеотидных полиморфизмов и один делеционно-инсерционный полиморфизм, влияющие на экспрессию и активность TGFβ1 [6]. Среди полиморфизмов гена *TGFB1*, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, выделяют три: rs1800469, локализованный в промоторной области; rs1800470 (замена лейцина на пролин в кодоне 10) и rs1800471 (замена аргинина на пролин в кодоне 25) расположены в кодирующем регионе. Данные о влиянии полиморфизмов гена *TGFB1* на отдаленные результаты трансплантации сердца и предрасположенность к развитию посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца – острого и хронического (болезнь коронарных артерий пересаженного сердца) отторжения трансплантата – немногочисленны и неоднозначны [7–9].

Цель настоящего исследования состояла в выявлении связи полиморфизмов rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* с фиброзом миокарда трансплантата у реципиентов сердца.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включено 110 случайно отобранных реципиентов, которым в Национальном медицинском исследовательском центре трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова в период с 2017 по 2019 год была выполнена трансплантация донорского сердца; все этнически русские, среди них мужчин – 99 (84%), средний возраст реципиентов составил  $44 \pm 14$  (от 16 до 70) лет. У 57 пациентов причиной развития терминальной сердечной недостаточности, определившей показания к трансплантации, была дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), у 53 – ишемическая болезнь сердца (ИБС). Срок наблюдения после трансплантации сердца до 4 ( $2.3 \pm 1.3$ ) лет.

Обследование и лечение пациентов проведены в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества. Эндомиокардиальную биопсию у реципиентов сердца выполняли по протоколу при плановом клинико-лабораторном обследовании или по показаниям; эндомиокардиальные биоптаты оценивали на основании результатов гистологического и иммуногистохимиче-

ского исследования. Для верификации фиброза сердечного трансплантата тонкие срезы ткани эндомиокарда окрашивали трихромом по Массону [10].

Геномную ДНК выделяли из периферической крови согласно протоколу с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Blood Mini Kit на автоматическом анализаторе QIAcube™ (Qiagen, Германия). Полиморфные варианты rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью зондов TaqMan (Applied Biosystems, США) на амплификаторе CFX96™ (Bio-Rad, США). Зонды с флуоресцентными метками по каналам VIC (аллель 1)/FAM (аллель 2) детектировали на каждом цикле амплификации. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения BioRad CFX manager 3.0 software.

Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных программ для научно-технических расчетов IBM SPSS STATISTICS 20 (IBM SPSS Inc., США). Для подтверждения независимого распределения аллелей в изучаемых полиморфизмах проверяли их соответствие закону Харди–Вайнберга [11]. Частоты генотипов или отдельных аллелей в различных группах сравнивали с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. Возможное влияние генотипа на признак оценивали, определяя отношение шансов и 95%-ные доверительные интервалы. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено геномное типирование полиморфных участков rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* у реципиентов сердца. Не выявлено отклонений в распределении аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов от равновесия Харди–Вайнберга в группе сравнения, в которую вошли здоровые лица (43), не отличающиеся значимо по полу и возрасту от группы реципиентов сердца. У реципиентов сердца равновесие Харди–Вайнберга для всех трех полиморфизмов не соблюдалось (табл. 1).

Таблица 1. Анализ данных на соответствие закону Харди–Вайнберга

Группы \ ОНП	rs1800469	rs1800470	rs1800471
Здоровые лица	$\chi^2 = 1.0$ $p = 0.31$	$\chi^2 = 0.02$ $p = 0.81$	$\chi^2 = 0.006$ $p = 0.93$
Реципиенты сердца	$\chi^2 = 4.32$ $p = 0.03^*$	$\chi^2 = 9.3$ $p = 0.002^*$	$\chi^2 = 5.73$ $p = 0.01^*$

\* $p < 0.05$  – не соответствует закону Харди–Вайнберга. ОНП – однонуклеотидный полиморфизм.

**Таблица 2.** Распределение генотипов и аллелей полиморфных участков гена *TGFB1* у реципиентов сердца и здоровых лиц

Генотип/ аллель	Реципиенты сердца, n (%)	Здоровые лица, n (%)	p
rs1800469			
AA	22 (20)	6 (14)	0.38
AG	42 (38)	16 (37)	0.91
GG	46 (42)	21 (49)	0.43
A	64 (58)	22 (51)	0.43
G	88 (80)	37 (86)	0.38
rs1800470			
AA	91 (83)	40 (93)	0.12
AG	14 (13)	3 (7)	0.30
GG	4 (4)	-	0.20
A	105 (96)	43 (100)	0.20
G	18 (17)	3 (7)	0.12
rs1800471			
GG	3 (3)	-	0.27
GC	14 (13)	1 (2)	0.051
CC	92 (84)	42 (98)	0.023*
G	17 (16)	1 (2)	0.023*
C	106 (97)	43 (100)	0.27

\* $p < 0.05$ .

Отклонение от закона Харди–Вайнберга в группе реципиентов сердца может быть связано с сердечно-сосудистой патологией, хотя нельзя исключить и влияния небольшого размера выборки, что необходимо проверить на более многочисленной выборке.

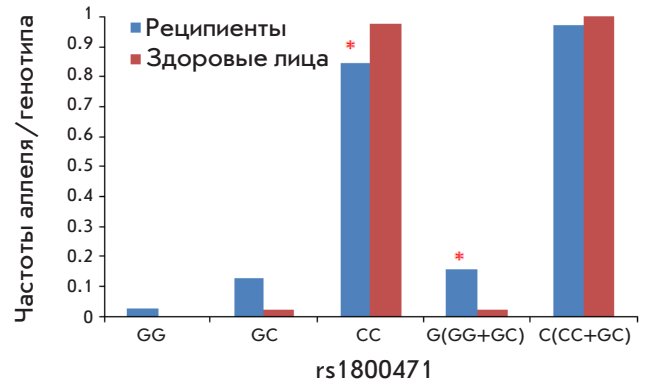
Распределение аллелей и генотипов гена *TGFB1* у реципиентов сердца и в группе сравнения представлены в табл. 2.

Сравнительный анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизмов rs1800469, rs1800470 гена *TGFB1* не выявил различий между здоровыми лицами и реципиентами сердца. Однако обнаружены различия в распределении аллелей и генотипов полиморфизма rs1800471 гена *TGFB1* (рис. 1).

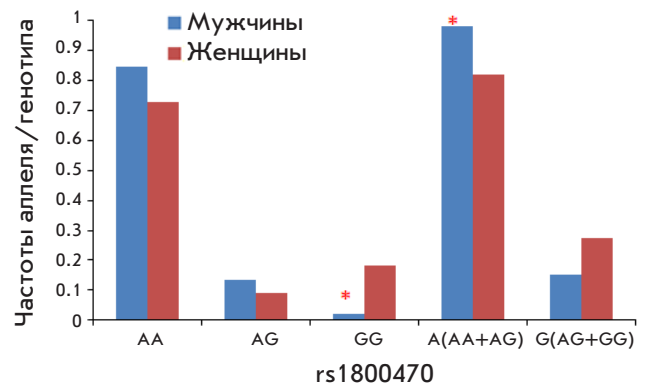
Среди реципиентов сердца носители генотипа CC rs1800471 гена *TGFB1* встречались реже, чем среди здоровых лиц ( $p = 0.023$ , ОШ = 0.12, 95% ДИ: 0.017–1.0), а аллель G – чаще (в составе генотипов GG и GC) ( $p = 0.023$ , ОШ = 7.76, 95% ДИ: 1.0–60.2).

Анализ связи частот распределения исследованных полиморфизмов с демографическими и клиническими характеристиками реципиентов сердца позволил выявить статистически значимые ассоциации с полом, диагнозом и фиброзом миокарда трансплантированного сердца.

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма rs1800470 гена *TGFB1* у мужчин и женщин в группе реципиентов сердца различалось статистически значимо (рис. 2).



**Рис. 1.** Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800471 гена *TGFB1* у реципиентов сердца и здоровых лиц. \* $p < 0.05$  в сравнении со здоровыми лицами



**Рис. 2.** Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800470 гена *TGFB1* у мужчин и женщин, \* $p < 0.05$  в сравнении с женщинами

У мужчин – реципиентов сердца, носительство генотипа GG встречалось реже, чем у женщин ( $p \leq 0.05$ ). Сравнение частот отдельных аллелей показало, что частота носительства аллеля A rs1800470 гена *TGFB1* у мужчин выше ( $p = 0.007$ , ОШ = 10.6, 95% ДИ: 1.34–85.01). Не выявлено различий в распределении генотипов и аллелей полиморфизмов rs1800469, rs1800471 гена *TGFB1* у мужчин и женщин.

При сравнительном анализе распределения аллелей и генотипов полиморфизмов гена *TGFB1* в зависимости от заболевания, приведшего к развитию сердечной недостаточности и последующей трансплантации донорского сердца, установлено, что у пациентов с ДКМП генотип GG rs1800469 встречался чаще, чем у пациентов с ИБС ( $p = 0.03$ , ОШ = 2.68, 95% ДИ: 1.061–6.793) (рис. 3).

Частота встречаемости аллеля A у пациентов с ИБС выше, чем с ДКМП ( $p = 0.01$ , ОШ = 0.37, 95% ДИ: 0.148–0.942).

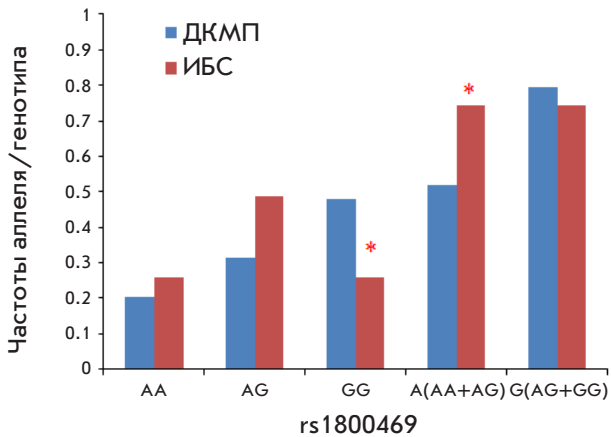


Рис. 3. Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800469 гена *TGFBI* у пациентов с ДКМП и ИБС, \* $p < 0.05$  в сравнении с ДКМП

При исследовании эндомикардиального биоптата у 49 из 110 реципиентов сердца верифицирован фиброз интерстиция миокарда трансплантата. Окраска позволяла четко различать соединительную ткань, которая (в зависимости от ее зрелости) окрашивалась в различные оттенки синего и отличалась от других тканей миокарда. При анализе учитывали все виды фиброза: диффузный, очаговый и диффузно-очаговый.

На рис. 4 представлены примеры гистологических препаратов биоптата трансплантированного сердца, в котором обнаружены фибротические изменения.

Сравнительный анализ распределения частот и генотипов позволил выявить различия во встречаемости генотипа AA полиморфизма rs1800470

гена *TGFBI* у реципиентов с фиброзом миокарда и без такового (рис. 5).

У реципиентов сердца с генотипом AA полиморфизма rs1800470 гена *TGFBI* фиброз наблюдался чаще, нежели у носителей аллеля G (ОШ = 10.4, 95% ДИ: 1.152–94.538,  $p = 0.013$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании проанализировано распределение аллелей и генотипов трех функционально значимых полиморфных участков гена *TGFBI* у пациентов с трансплантированным сердцем. У реципиентов сердца выявлены отличия по частоте встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs1800471 гена *TGFBI* в сравнении со здоровыми лицами. В ряде работ показано, что аллель G rs1800471 связан с более высоким уровнем экспрессии гена и повышением уровня цитокина  $TGF\beta 1$  в крови. Дисрегуляция сигнального пути  $TGF\beta 1$ , возникающая в результате мутации, может быть связана с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [12, 13].

При анализе предрасположенности к первичному заболеванию, приведшему к развитию терминальной сердечной недостаточности и трансплантации сердца, в настоящем исследовании наблюдали значимую ассоциацию ишемической болезни сердца с однонуклеотидным полиморфизмом rs1800469. Схожие данные получены Барсовой и соавт. [4], которые обнаружили положительную ассоциацию аллеля *TGFBI*\*-509T (rs1800469) с предрасположенностью к раннему инфаркту миокарда (пациенты до 50 лет). Механизмы, лежащие в основе ассоциации полиморфизма с развитием терминальной

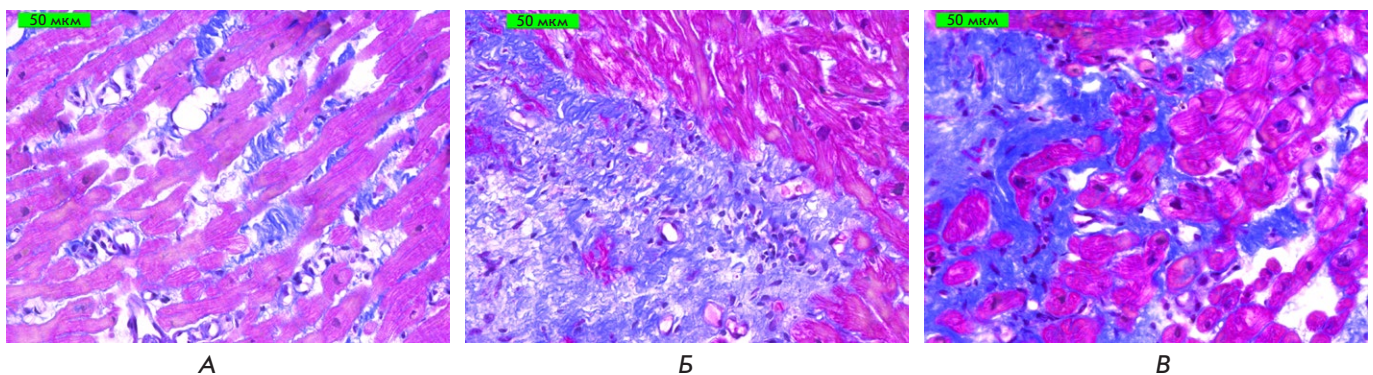


Рис. 4. Гистологические препараты эндомикардиальных биоптатов. Окраска трихромом по Массону  $\times 400$  (синим цветом окрашена соединительная ткань, розовым – кардиомиоциты). А – диффузное разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани с единичными клетками фибропластического ряда, очаговая белковая зернистая дистрофия кардиомиоцитов. Б – очаговое разрастание неоформленной соединительной ткани с единичными клетками соединительно-тканного ряда, умеренная белковая дистрофия кардиомиоцитов. В – диффузно-очаговое разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой отмечается пролиферация клеток соединительно-тканного ряда. Очаговая белковая дистрофия кардиомиоцитов



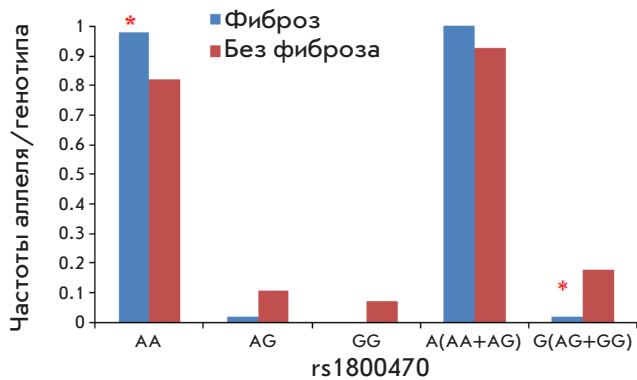


Рис. 5. Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800470 гена *TGFβ1* у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата и без такового, \* $p < 0.05$  в сравнении с реципиентами без фиброза

стадии сердечной недостаточности, пока остаются неясными. Возможно, полиморфизм rs1800469, изменяя сродство транскрипционных факторов к промотору, подавляет экспрессию *TGFβ* и активирует таким образом провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли  $\alpha$  и интерлейкин-1, что может способствовать прогрессированию ИБС [4]. В ряде исследований получены противоречивые данные: так в группе немецких пациентов не выявлена ассоциация полиморфизма 509C/T с ИБС [14]. Liu и соавт. провели метаанализ восьми исследований и показали статистически значимую связь rs1800469 (TT) с повышенным риском развития ИБС [15].

Анализируя предрасположенность к фиброзу миокарда у реципиентов сердца, мы выявили значимые ассоциации данного признака с полиморфным участком rs1800470. Известно, что аллель А данного полиморфизма связан с высоким уровнем *TGFβ1* в пе-

риферической крови. *TGFβ1* – мощный стимулятор продукции внеклеточного матрикса, гиперпродукция которого связана с фибротическими нарушениями и развитием фиброза миокарда. В работе Leask A. показано, что *TGFβ*, при его добавлении в культуру фибробластов *in vitro*, индуцирует экспрессию генов, связанных с продукцией внутриклеточного матрикса, и таким образом способствует увеличению накопления матрикса и сопутствующему подавлению матриксной металлопротеиназы за счет повышения уровня ингибиторов экспрессии ее гена [16].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании выявлены различия во встречаемости аллелей и генотипов гена *TGFβ1*: rs1800471 у реципиентов сердца и здоровых лиц, rs1800469 – у пациентов с ДКМП и ИБС, rs1800470 – у пациентов с фиброзом миокарда трансплантированного сердца и без такового. Полученные результаты позволяют предполагать участие гена *TGFβ1* и его полиморфизмов в формировании предрасположенности к фиброзу миокарда у реципиентов сердца. Дальнейшие исследования на большем количестве пациентов позволят получить более подробные характеристики влияния одонуклеотидных полиморфизмов на формирование фиброза в трансплантированном сердце. ●

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование проведено при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-2598-2020.7 для государственной поддержки ведущих научных школ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готье С.В., Захаревич В.М., Халилулин Т.А., Шевченко А.О., Попцов В.Н., Ахмадзай Р.Л., Гольц А.М., Закирьянов А.Р., Колоскова Н.Н., Захаревич Н.Ю. и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21. № 2. С. 7–15.
2. Wynn T.A. // J. Pathol. 2008. V. 214. № 2. P. 199–210.
3. Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R., Cramer R., Duan S., Eiwegger T., Eljaszewicz A., Ferstl R., et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2016. V. 138. № 4. P. 984–1010.
4. Barsova R.M., Titov B.V., Matveeva N.A., Favorov A.V., Sukhinina T.S., Shahnovich R.M., Ruda M.Ia., Favorova O.O. // Acta Naturae. 2012. V. 4. № 2. P. 74–79.
5. Brusentsov D.A., Nikulina S.Yu., Shesternya P.A., Chernova A.A. // Rus. J. Cardiology. 2018. V. 23. № 10. P. 43–47.
6. Martellosi Cebinelli G.C., Paiva Trugilo K., Badaró Garcia S., Brajão de Oliveira K. // Eur. Cytokine Netw. 2016. V. 27. № 4. P. 81–89.
7. van Setten J., Warmerdam E.G., Groot O.Q., De Jonge N., Keating B., Asselbergs F.W. // Transplant. Direct. 2019. V. 5. № 2. P. 1–6.
8. Densent C.G., Hutchinson I.V., Yonan N., Brooks N.H. // Transplant. Immunol. 2004. V. 13. № 3. P. 211–217.
9. Ge Y.Z., Wu R., Lu T.Z., Jia R.P., Li M.H., Gao X.F., Jiang X.M., Zhu X.B., Li L.P., Tan S.J., et al. // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. P. e93938.
10. Готье С.В., Шевченко А.О., Попцов В.Н. Пациент с трансплантированным сердцем. Руководство для врачей по ведению пациентов, перенесших трансплантацию сердца. М.–Тверь: Изд-во «Триада», 2014. 144 с.
11. Namipashaki A., Razaghi-Moghadam Z., Ansari-Pour N. // Cell J. 2015. V. 17. № 2. P. 187.
12. Rao M., Guo D., Jaber B.L., Tighiouart H., Pereira B.J., Balakrishnan V.S. // Kidney Int. 2004. V. 66. P. 419–427. [PubMed: 15200451].
13. Nikolova P.N., Ivanova M.I., Mihailova S.M., Myhailova A.P., Baltadjieva D.N., Simeonov P.L., Paskalev E.K., Naumova E.J. // Transplant. Immunol. 2008. V. 18. № 4. P. 344–348.
14. Koch W., Hoppmann P., Mueller J., Schömig A., Kastrati A. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006. V. 26. № 5. P. 1114–1119.
15. Liu K., Liu X., Gu S., Sun Q., Wang Y., Meng J., Xu Z. // Oncotarget. 2017. V. 8. № 37. P. 62463–62469.
16. Leask A. // Circ. Res. 2010. V. 106. P. 1675–1680.