LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Ramunė Šepetienė

KYLANČIOSIOS AORTOS DILATACINĖ PATOLOGIJA: *FIBRILINO-1* GENO POLIMORFIZMŲ IR TGF-BETA1 KONCENTRACIJOS KRAUJYJE TYRIMAS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai,
Medicina (06B)

Kaunas, 2017

Disertacija rengta 2012–2017 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje.

Mokslinė vadovė

prof. habil. dr. Vaiva Lesauskaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Medicinos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. habil. dr. Angelija Valančiūtė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Nariai:

prof. dr. Dainius Haroldas Pauža (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

prof. dr. Ramunė Morkūnienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

doc. dr. Gintaras Kalinauskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

prof. dr. Marleen Praet (Gento universitetas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B)

Disertacija ginama viešame Medicinos mokslo krypties tarybos posėdyje 2017 m. birželio 26 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Kardiologijos instituto posėdžių salėje.

Adresas: Sukilėlių 15, Kaunas LT-50140, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCE

Ramunė Šepetienė

DILATATIVE PATHOLOGY OF ASCENDING AORTA: A STUDY OF *FIBRILLIN-1* POLYMORPHISMS AND TGF-BETA1 CONCENTRATION IN HUMAN PLASMA

Doctoral dissertation
Biomedical Sciences,
Medicine (06B)

Kaunas, 2017

The Doctoral Dissertation was prepared in the Laboratory of Molecular Cardiology, Institute of Cardiology, Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2012–2017

Scientific Supervisor

Prof. Habil. Dr. Vaiva Lesauskaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

The Dissertation is defended at the Medical Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences

Chairperson

Prof. Habil. Dr. Angelija Valančiūtė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Members:

Prof. Dr. Dainius Haroldas Pauža (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Prof. Dr. Ramunė Morkūnienė (Lithuanian University of Health Sciences, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Assoc. Prof. Dr. Gintaras Kalinauskas (Vilnius University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

Prof. Dr. Marleen Praet (Ghent University, Biomedical Sciences, Medicine – 06B)

The Dissertation will be defended at the open session of the Medical Research Council of Lithuanian University of Health Sciences at12.00 a.m. on the 26th of June, 2017 at the Conference Hall of Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 15, LT-50140 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS 7
ĮVADAS 9
1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI 11
2. LITERATŪROS APŽVALGA 12
2.1. KADP patogenezė. Užląstelinis matriksas ir proteazės 12
2.2. KADP patogenezės molekuliniai mechanizmai 13
2.2.1. Fibrilinas-1 13
2.2.2. Marfano sindromas ir *FBN-1* mutacijos 15
2.2.3. TGF-β struktūra ir vaidmuo 16
3. DARBO METODIKA 21
3.1. Tiriamųjų imtys 21
3.1.1. Ligoniai, operuoti dėl kylančiosios aortos dilatacinės patologijos 21
3.1.2. Palyginamosios tiriamųjų imtys 22
3.1.2.1. Referentinė grupė 22
3.1.2.2. Tyrimo dalyvių klasteriai 23
3.2. Tyrimo metodai 23
3.3. Genetiniai tyrimai 24
3.3.1. *FBN1* geno polimorfizmo tyrimas 24
3.3.2. TGF- β1 koncentracijos nustatymas 25
3.4. Statistinė analizė 25
4. REZULTATAI 27
4.1. *FBN1 VNP* polimorfizmo ir KADP sąsajų tyrimas 27
4.2. Ligonių, operuotų dėl KADP, ir kontrolinės grupės asmenų kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos tyrimas 32
4.3. *FBN1 VNP* (*rs2118181, rs1059177)* ir kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos tyrimas 35
5. REZULTATŲ APTARIMAS 37
5.1. *FBN1* geno vieno nukleotido polimorfizmų sąsajos su KADP 37
5.2. TGF-β1 koncentracijos ir sąsajų su KADP tyrimas 39
5.3. TGF-β1 koncentracijos ir *FBN1* polimorfizmų (rs2118181, rs1059177) sąsajos 41
6. IŠVADOS 43
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS 44
8. AUTORIAUS PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS 59

8.1. *FBN1* polymorphisms in patients with the dilatative pathology of the ascending thoracic aorta. European journal of cardio-thoracic surgery. 2015, vol. 47, no. 4, p. e124–e130 62
8.2. Blood plasma TGF-β1 concentration in sporadic dilatative pathology of ascending aorta: more questions than answers. PloS One. 2015, vol. 10, no. 6, p. 1–7 69
8.3. Association between *fibrillin1* polymorphisms (rs2118181, rs10519177) and transforming growth factor β1 concentration in human plasma. Molecular medicine. 2015, vol. 21, p. 735–738 76
8.4. Krūtinės aortos aneurizmos ir disekacijos genetinės priežastys. Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas. 2015, t. 19, Nr. 1, p. 27–32 .. 80
9. SUMMARY 86
10. PRIEDAI 103
Bioetikos leidimo kopija 103
Tiriamojo sutikimas dalyvauti tyrime 105
Tiriamojo anketa-klausimynas 106
Klausimynas KADP pogrupiui nustatyti 107
11. CURRICULUM VITAE 108

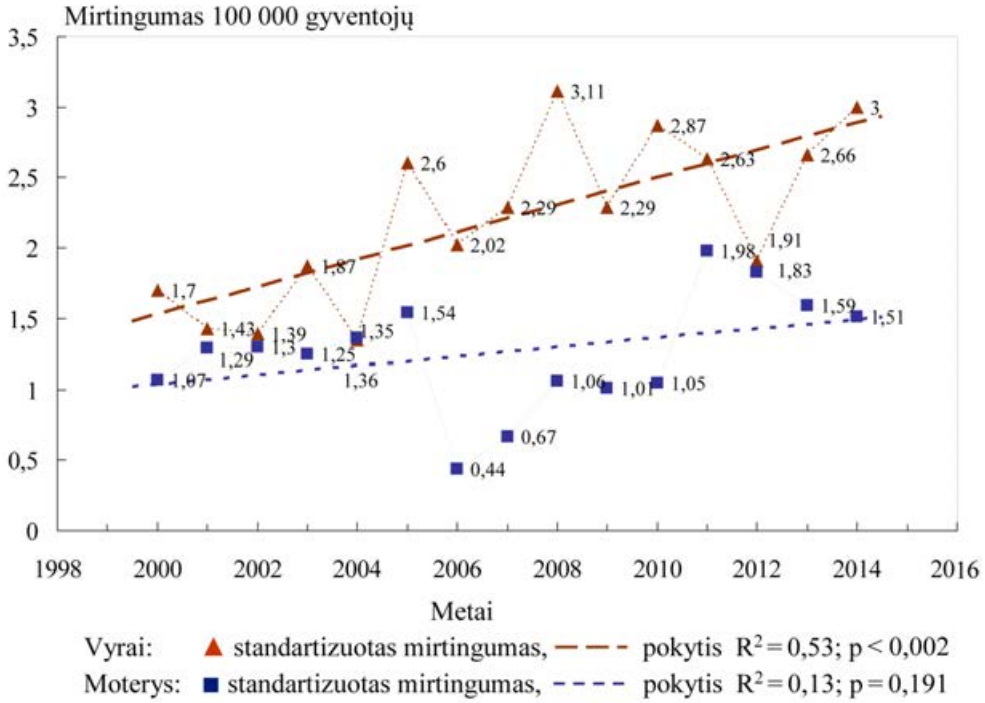
SANTRUMPOS

ACTA2 – aktino (sinonimai: alfa 2, aortos lygiųjų raumenų) genas
BMP – kaulų morfogenetinis baltymas (angl. *Bone Morphogenetic Protein*)
CINDI – *Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention* studija
Co-Smad – koreguliaciniai transmembraniniai molekuliniai tarpininkai (angl. *coregulatory* Smad)
EDTA – etilendiamino tetraacetatas
ERK – užląstelinėje terpėje signalą reguliuojančios kinazės (angl. *Extracellular signal-regulated kinases)*
ERK1/2 – už ląstelės ribų reguliuojama kinazė 1/2
FBN1 – Fibrilino-1 baltymas
FBN1 – *Fibrilino-1* genas
GWAS – išplėtinė genomo asociacijos studija (angl. *Genome Wide Association Study*)
HAPIEE – studija „Sveikatos netolygumai ir senėjimas pereinamojo laikotarpio visuomenėse“ (angl. ***H**ealth, **A**lcohol and **P**sychosocial factors **I**n **E**astern **E**urope study*)
KAA – kylančiosios aortos aneurizma
KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija
KSSS – Kauno sveiko senėjimo studija
LAP – su latencija susijęs peptidas (angl. *latency associated peptide*)
LLC – didysis latentinis kompleksas (angl. *large latent complex*)
LRL – lygiųjų raumenų ląstelė(ės)
LTBP – latentinis TGF-β surišantis baltymas (angl. *Latency-associated TGF-β binding protein*)
MMP – matrikso metaloproteinazė
mRNR – matricinė ribonukleino rūgštis
PAI-1 – plazminogeno aktyvatoriaus inhibitorius-1
PDS – postenozinė dilatacija dėl aortos vožtuvo stenozės
Phospho-Smad – fosforilinti transmembraniniai molekuliniai pernešėjai-tarpininkai (angl. *phsoph-Smad*)
RAD – retojo alelio dažnis (angl. *minor allele frequency*)
RAS – renino angiotenzino sistema
RGD – amino rūgščių **Arg-Gly-Asp** tripeptido akronimas
R-Smad – transmembraninių molekulinių tarpininkų (Smad) receptoriai
SAA – Stanfordo A aortos atsisluoksniavimas
SLC – mažas latentinis kompleksas (angl. *small latent complex*)

Smad	– transmembraniniai molekuliniai tarpininkai (angl. *homologous to Caenorhabditis elegans* (*sma* genai: SMAII) ir Drosophilla (*mad* genai; *mothers against decantaplegic* (*dpp*)
Smurf	– Smad reguliacijos, susijungiant su enzimu ubi-chitinaze, faktorius (angl. *Smad ubiquitination regulatory factor*)
ŠS	– šansų santykis
TGFBRI	– TGF-β pirmas receptorius
TGFBRII	– TGF-β antras receptorius
TGF-β	– transformuojančio augimo faktorius (angl. *tranforming growth factor-β*)
TIMP	– matrikso metaloproteinazių audinių inhibitoriai (angl. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*)
UM	– užląstelinis matriksas (angl. *extracellular matrix*)
uPA	– urokinazės tipo plazminogeno aktyvatorius
VNP	– vieno nukleotido polimorfizmas

ĮVADAS

Kylančiosios aortos dilatacinė patologija sudaro didelę širdies ir kraujagyslių ligų grupę, kurios pagrindinis gydymo metodas yra operacinis. Sergamumas šia patologija siekia 10,4 : 100 000 (Clouse, et al., 2004). Aortos išsiplėtimas yra gerai žinomas gyvybei pavojingos būklės – aortos atsisluoksniavimo veiksnys. Nurodoma, kad per paskutinį dešimtmetį kylančiosios aortos atsisluoksniavimo atvejų skaičius išaugo (Hiratzka, et al., 2010; Howard, et al., 2013). Lietuvoje (Statistikos departamentas prie LR Vyriausybės, 2015) vyrų mirtingumas dėl kylančiosios aortos dilatacinės patologijos didėja, pateikiami 1998–2015 metų duomenys (pav.)



Pav. *Lietuvos gyventojų standartizuotas mirtingumas dėl krūtinės aortos dilatacinės patologijos*

Krūtinės aortos dilatacinė patologija dažniausiai formuojasi be jokių simptomų, kol kliniškai pasireiškia staigiu aortos sienos atsisluoksniavimu. Daugeliu atvejų krūtinės aortos sporadinio plėtimosi priežastys lieka nežinomos, tik nedidelę dalį šios patologijos sąlygoja aterosklerozė, įvairios kilmės aortitai (Albornoz, et al., 2006), fibrilino geno mutacijos, sukeliančios

Marfano sindromą (MFS) (Franck, et al., 1995), įgimti kolageno struktūriniai pokyčiai, pasireiškiantys Ehler-Danlos sindromu (Pepin, et al., 2000), transformuojančio augimo faktoriaus-beta (TGF-β) mutacijos, sukeliančios Loeys- Dietz sindromą (Loeys, et al., 2005).

Genų ir jų mutacijų sąsajos su KADP formavimusi buvo atskleistos, nagrinėjant retų paveldimų ligų (Marfano, Loeys-Dietz, Ehler-Danlos ir kt.) sindromus, kuriems būdingi panašūs kylančiosios aortos sienos pakitimai. Tiriant aortos plėtimosi mechanizmus, kai yra Marfano sindromas, buvo atkreiptas dėmesys į padidėjusią TGFβ-1 koncentraciją kraujo plazmoje ir TGFβ-1 signalinį kelią, esant mutavusiam fibrilinui-1(Chaudhry, et al., 2007). Kita vertus, 2011 metais paskelbti LeMaire (LeMaire, et al., 2011) viso genomo išplėstinės asociacijos studijos (GWAS) duomenys parodė, kad yra sąsajos tarp *fibrilino-1* geno vieno nukleotido polimorfizmų (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517), nesukeliančių Marfano sindromo požymių, ir sporadinės kylančiosios aortos dilatacinės patologijos.

Šiame darbe mes tyrėme *FBN1* geno vieno nukleotido polimorfizmų (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) ir kraujo plazmos TGFβ-1 koncentracijos sąsajas su sporadine KADP, taip pat patikrinome hipotezę, kaip sveikų žmonių TGF-β1 koncentracija priklauso nuo tirtų *FBN1* geno VNP genotipų.

1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – įvertinti *FBN1* geno vieno nukleotido polimorfizmų (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) ir kraujo plazmos transformuojančio augimo faktoriaus-β1 (TGF-β1) koncentracijos sąsajas bei jų reikšmę kylančiosios aortos dilatacinės patologijos (KADP) susiformavimui.

Darbo uždaviniai:

1. Atliekant atvejo-kontrolės tyrimą, nustatyti sąsajas Lietuvos gyventojams tarp *FBN1* geno vieno nukleotido polimorfizmų (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) ir KADP susiformavimo.
2. Nustatyti ir įvertinti ligonių, operuotų dėl KADP, ir Kauno gyventojų atsitiktinės imties TGF-β1 koncentraciją kraujo plazmoje bei palyginti lyties ir amžiaus įtaką šio citokino koncentracijai.
3. Įvertinti *FBN1*geno vieno nukleotido polimorfizmų (VNP): rs2118181, rs10519177 genotipų ir TGF-β1 koncentracijos kraujo plazmoje sąsajas.

Darbo mokslinis naujumas

Tai pirmasis darbas, kuriame nustatytos *fibrilino-1* geno VNP (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) sąsajos su trimis KADP išraiškos fenotipais: aneurizma, postenozine dilatacija dėl aortos vožtuvo stenozės ir aortos atsisluoksniavimu. Ankstesniuose darbuose buvo nagrinėtos tik šių polimorfizmų sąsajos su kylančiosios aortos aneurizmos susiformavimu ir aortos atsisluoksniavimu (LeMaire, et al., 2011; Iakoubova, et al., 2014).

Pirmą kartą nustatyta sąsaja tarp sporadinės KADP formavimosi ir padidėjusios TGF-β1 koncentracijos kraujo plazmoje bei įvertinta amžiaus ir lyties įtaka šio citokino koncentracijai.

Šiame darbe pirmą kartą buvo nustatytos *FBN1* geno skirtingų polimorfizmų (rs2118181, rs10519177) sąsajos su TGF-β1 koncentracija.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. KADP patogenezė. Užląstelinis matriksas ir proteazės

Aortos sienos atsparumą tempimui ir elastingumą nulemia *tunica media*, sudaryta iš koncentriškų elastinių skaidulų ir lygiųjų raumenų ląstelių (LRL). LRL yra išsidėsčiusios išilgai tarp cirkuliarių elastinių skaidulų. Susitraukdamos pagal kraujo bangos pokyčius, LRL reguliuoja kraujo tėkmę ir pulso spaudimą aortoje.

LRL palaiko kraujagyslės sienos vientisumą ir padeda prisitaikyti prie hemodinamikos pokyčių. Vykstant mechaniniam šių ląstelių tempimui, didėja TGF-β1 raiška ir matrikso metaloproteazių (MMP) aktyvumas, vyksta užląstelinio matrikso baltymo sintezė (O'Callaghan, et al., 2000). Pagrindinį vaidmenį užląstelinio matrikso (UM) ardyme atlieka įvairios proteazės: MMP, chimazė, triptazė, katepsinai, serino elastazė, atsipalaidavusi iš neutrofilų, ir kiti enzimai. Eksperimentai, atlikti *in vitro*, parodė, kad elastazė ir kolagenazė inicijuoja kraujagyslės išsiplėtimą ir plyšimą (Dobrin, et al., 1984). Išsamios pilvo aortos aneurizmos formavimosi studijos buvo atliktos, tiriant laboratorinius gyvūnus (Allaire, et al., 2004; Anidjar, et al., 2003; Sakalihasan, et al., 2005). Taip buvo nustatyta, kad proteolizinis aktyvumas audiniuose priklauso nuo balanso tarp proteazių ir jų inhibitorių. MMP inhibitoriai, audinių plazminogeno aktyvatoriai (tPA) yra labiau išreikšti aterosklerozės pažeistoje negu išsiplėtusioje aortoje, vadinasi, UM ardymas dėl sumažėjusio inhibitorių poveikio gali sąlygoti aneurizmos formavimąsi (Defawe, et al., 2003). Tiriant KADP, buvo įrodyta, kad vyksta medijos LRL fenotipo pasikeitimas iš kontrakcinio į sintezinį, šioms pradedant sintezuoti MMP (Kamijima, et al., 1999; Lesauskaitė, et al., 2001). Mechanizmai, dėl kurių vyksta minėtas pokytis, lieka neaiškūs.

Yra žinoma, kad endopeptidazių šeimos, kuriai priklauso MMP, proteolizinių fermentų aktyvumas reguliuojamas atsilaisvinant propeptidui, skilus jungčiai tarp propeptido ir katalizės domeno. Šis procesas reguliuojamas trijuose lygmenyse: transkripcijos lygyje, aktyvuojant profermentus ir vykstant inhibicijai su TIMP (angl. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*) (Chakraborti, et al., 2003). Plazminas, MMP-2 ir MMP-9- yra pagrindiniai enzimai, sąlygojantys UM degradaciją. Nagrinėjant tumorogenezės mechanizmus, nustatyta, kad tiek klasikiniu, tiek alternatyviuoju TGF-β1 signalinimo keliu paleidžiamas transkripcinis ar potranskripcinis proteolizės aktyvinimo mechanizmas, reguliuojantis MMP raišką (Krstic, et al., 2014). Padidėjusi MMP raiška bei TIMP pakitęs aktyvumas nustatomas išsiplėtusios ar atsisluoksniavusios aortos sienoje, dėl to vyksta kolageno ar elas-

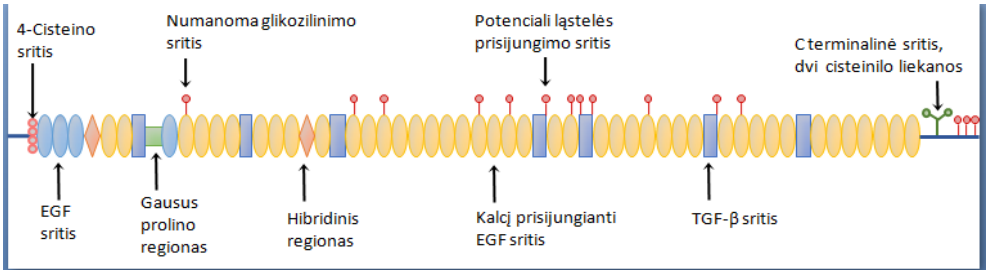
tino skaidulų degradacija (Ikonomidis, et al., 2008; Ishii, et al., 2000). Be to, padidėjusi MMP raiška sąlygoja latentinio TGF-β atskilimą nuo didžiojo latentinio komplekso (LLC – *large latent complex*) (Krstic, et al., 2014). Kadangi MMP dalyvauja UM ardyme ir remodeliavimosi procesuose, perteklinis TGF-β1 susikaupimas UM gali prisidėti prie mikrofibrilių proteolizės, taip skatindamas destrukcinius pokyčius aortos sienoje (žr. 2.2.2 skyrių.

Vadinasi, proteazių ir jų inhibitorių vaidmuo KADP patogenezėje yra įrodytas, tačiau galimi patogenezinių sąsajų mechanizmai su TGF-β signaliniu keliu yra mažai tirti.

2.2. KADP patogenezės molekuliniai mechanizmai

2.2.1. Fibrilinas-1

Fibrilino-1 (FBN-1) genas yra didelis, apie 200kb, 65 egzonų, lokalizuojasi 15q-21.1chromosomoje (Biery, et al., 1999; Pereira, et al., 1993). Jis koduoja fibrilino-1 baltymą, sudarytą iš 2871 amino rūgšties, jo masė 350 kDa ir sudėtyje yra daug cisteino. Fibrilino baltymą sudaro epidermio augimo faktoriaus domenai ir nedidelis kiekis transformuojančio augimo faktorių β1 surišančio proteino (TGFB1) (Smallridge, et al., 2003).



2.2.1.1 pav. *Fibrilino-1 struktūros schema*
(sudaryta pagal McGettrick, et al., 2000)

Pirmieji duomenys apie fibrilino baltymą ir jo reikšmę, formuojantis elastinėms skaiduloms, buvo paskelbti 1986 metais (Sakai, et al., 1986). Buvo nustatyta, kad fibrilinas yra pagrindinis mikrofibrilių struktūrinis komponentas. Pastarosios, formuojantis elastinėms skaiduloms, sudaro karkasą amorfiniam baltymui elastinui (Kielty, et al., 2002). Žinduolių organizmuose yra išskiriamos trys fibrilino formos. Būdami struktūriškai panašūs, fibrilinai skiriasi paplitimu audiniuose, pvz.: fibrilino-2 yra gausu kremzlės

audinyje, kai tuo tarpu, fibrilinas-1 vyrauja visuose trijuose aortos sienos sluoksniuose (Zhang, et al., 1994). Fibrilino-3 formos daugiausiai aptinkama smegenyse, o palyginus neseniai aprašyta (Gansner, et al., 2008) ir ketvirtoji fibrilino forma, labai panaši į antrąją, tik atrasta žuvies *Danio Rerio* organizme. Taigi, fibrilino baltymas yra svarbus normalios elastogenezės komponentas (Zhang, et al., 1995; Milewicz, et al., 2008). Elastinės skaidulos, organizmui senstant, natūraliai yra, taip pat jų sumažėja formuojantis keloidiniam audiniui ar esant kitoms patologinėms būklėms, pvz., vystantis plaučių emfizemai (Bailey, et al., 2001). Priklausomai nuo mikrofibrilių išsidėstymo tvarkos, kurią nulemia baltymų ir glikozaminoglikanų ar proteoglikanų jungtys, labai keičiasi audinių tvirtumo, atsparumo ir elastingumo savybės, kaip antai, skiriasi kaulo ir elastingos arterijos ar odos bei plaučių audinio rezistentiškumas (Jensen, et al., 2016).

Buvo nustatyta (Davis, et al., 1993), kaip vystantis aortos medijai, užląsteliniai elastino ir viduląsteliniai LRL kontraktiliniai pluoštai, suformavę kontraktilinius-elastinius vienetus, primenančius eglutės šakų formą, sugeba perduoti vienodą LRL susitraukimo jėgą bet kuria kryptimi. Fibrilinas, turėdamas arginino, glicino ir asparto rūgšties (RGD) sekų tripletus, prie kurių gali prisijungti integrinai, taip pat yra svarbus UM ir ląstelių tarpusavio sąveikai. Vėlesni tyrimai parodė, kad kraujagyslių LRL per integrinus ir citoskeleto baltymus (aktiną ir mioziną) perduoda mechaninių pokyčių informaciją ląstelės signaliniam keliui, kad, atsižvelgiant į kintantį mechaninį krūvį, būtų reguliuojama tiek UM komponentų sintezė, tiek ir citoskeleto pokyčiai (Schwarz, et al., 2010). Nustatyta, kad vykstant mechaniniam LRL tempimui, kuris yra būdingas hipertenzijai, šios ląstelės daugiau gamina fibronektino, kolageno, didėja MMP-2 aktyvumas bei TGF-β1 mRNR raiška (O'Callaghan, et al., 2000). Taigi, darni UM, integrinų ir LRL citoskeleto baltymų sąveika yra svarbus kraujagyslės sienos remodeliavimosi veiksnys. Fibrilinas, reguliuodamas užląstelinio endogeninio TGF β aktyvumą, taip pat daro įtaką viduląsteliniam TGF-β signaliniam keliui (žr. 2.2.3 skyrių).

Apibendrinant galima išskirti dvi fibrilino fiziologines funkcijas. Viena jų – fibrilinas, kaip atraminė struktūra, suteikianti audiniui integralumo, kita funkcija – reguliacinė, kai per signalinius kelius daroma įtaka kitoms ląstelėms (Ramirez, et al., 2010).

Taip pat fibrilinas reguliuoja ir kaulų morfogenetinio proteino (angl. *BMP – bone morphogenetic protein)*, priklausančio augimo faktorių šeimai, aktyvumą per tiesiogines nekovalentines jungtis tarp prodomeno ir N terminalinio regiono (Sengle, et al., 2008a). Nustatyta, kad BMP signalinio kelio pokyčiai gali sukelti piktybinius žarnyno navikus (Kodach, et al., 2008). Keliama prielaida, kad formuojantis Bareto sindromui, padidėjęs

BMP signalinio kelio aktyvumas yra svarbus veiksnys, vykstant stemplės daugiasluoksnio plokščiojo epitelio metaplazijai į vienasluoksnį stulpinį. (Milano, et al., 2007).

Nagrinėjant stuburinių šaltakraujų gyvūnų embrionų vystymąsi, išaiškinta fibrilino svarba embriogenezėje (Skoglund ir Keller, 2007; Gansner ir, kt., 2008) bei formuojantis įvairiems organams (Nistala, et al., 2010), tarp jų ir krūtinės aortai. Nustatyta, kad drauge su aortos sienos UM formavimusi ir brendimu vyksta LRL pokyčiai, keičiantis iš sintezinio į kontrakcinį ląstelių fenotipui (Kelleher, et al.2004).

Įvairios paveldimos jungiamojo audinio ligos, sąlygotos *fibrilino-1* geno mutacijų, pasireiškia fenotipų įvairove dėl skirtingų fibrilino baltymo pažeidimų, o tai tik įrodo fibrilino funkcinį įvairialypiškumą (Jensen, et al., 2016).

2.2.2. Marfano sindromas ir *FBN–1* mutacijos

Nuo 1991 metų, kai pirmą kartą aprašyta *FBN-1* mutacija, sukelianti Marfano sindromą, (Dietz, et al., 1991) yra atrasta daugiau nei 600 įvairių šio geno mutacijų, keičiančių baltymo struktūrą, Jos yra užregistruotos Pasaulinėje duomenų bazėje (UMD-FBN1, *žiūrėta 2015-11-10*). Dauguma mutacijų yra klaidžiosios (*missense*) ir negrįžtamos (*non-recurrent*). Pavyzdžiui, klaidžiosios *FBN1* mutacijos gali pažeisti fibrilino monomerų virsmą mikrofibrilėmis (Aoyama, et al.,1994). Mutacijos būna išsidėsčiusios per visą geną, o jų sankaupos tarp 24 ir 32 egzonų sukelia kliniškai sunkų MFS fenotipą, anksčiau vadintą „naujagimių MFS“ (Faivre, et al., 2009). Vis dėlto kai kurie pacientai, turintys sunkų MFS, neturi mutacijų šiame geno regione, o didelė dalis pacientų su minėtomis šio regiono mutacijomis turi klasikinį ar vidutiniškai išreikštą MFS (Milewicz, et al., 1995). Vadinasi, genotipo- fenotipo koreliacija yra ganėtinai variabili (Collod-Beroud, et al., 2003). Atsižvelgiant į tai, MFS diagnostika remiasi fenomorfologiniais požymiais. Nustatyta šių požymių triada (vienas ar du kardialiniai simptomai, aortos šaknies aneurizma ir *ectopia lentis*), kuria remiantis diagnozuojamas MFS, nors ir nėra šeiminės anamnezės (Ghento kriterijai, revizuoti 2010). Tiktai esant nepakankamai klinikinių duomenų, prireikia tirti genetinius žymenis ir suradus bent vieną iš minėtų 600 *FBN1* mutacijų, MFS diagnozė patvirtinama (Collod-Beroud, et al., 2003).

Kita vertus, yra nustatyta, kad gali būti *FBN1* mutacijos, nesukeliančios fenotipinių MFS požymių (Milewicz, et al., 1996). LeMaire su kolegomis 2011 metais atliko daugiapakopę išplėstinę genomo asociacijų tyrimo studiją (GWAS) ir nustatė *FBN1* penkis VNP, turinčius įtakos sporadinei KADP susiformuoti (LeMaire, et al., 2011). Visi jie (rs2118181,

rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) yra introne, t. y. nekoduojančioje *FBN-1* srityje. Nė vienam šios studijos tirtajam nebuvo diagnozuotas MFS ar kitas šeiminę ligos kilmę nurodantis sindromas (LeMaire et al., 2011).

FBN1 mutacijos pažeidžia LRL kontrakciją, sutrikdydamos mechaninio impulso perdavimą (Bunton, et al., 2001; Milewicz, et al., 2008). Yra žinomos ir kitų genų, reguliuojančių LRL susitraukimą, mutacijos, sukeliančios aortos aneurizmą ar aortos sienos atsisluoksniavimą. Tai gali būti mutacijos, esančios įvairiuose chromosomų lokusuose: *TAAD1*-5q13-14; *FAA1*-11q23-24; *TAAD2*-3p24-25; *TAAD3*-15q24-26; *TAAD4*-10q23-24; *MYH11*-16p12-13 (Milewicz, et al., 2008; Guo, 2001), pvz.:, *MYH11* koduoja lygiųjų raumenų ląstelių miozino sunkiąsias grandines, *ACTA2, TAAD4* – lygiųjų raumenų α-aktiną. Šių genų mutacijos gali sutrikdyti lygiųjų raumenų mechaninio impulso plitimą, dėl to gali sumažėti kontraktiliškumas, pakisti TGF-β veikimas ir lygiųjų raumenų diferenciacija (Akhurst, et al., 2004; Mizuguchi, et al., 2004; Loeys, et al., 2005).

Fibrilinas yra svarbi elastinių skaidulų sudėtinė dalis, atliekanti tiek atraminės struktūros funkciją, tiek ir reguliacinę, kai per signalinius kelius reguliuojama kitų ląstelių funkcija. *Fibrilino* geno mutacijos sukelia fenotipų įvairove pasižyminčias sindromines jungiamojo audinio ligas, tarp jų ir Marfano sindromą, kuriam būdinga KADP. Nauja tai, kad 2011 metais pirmą kartą buvo paskelbti duomenys apie *FBN1* geno polimorfizmus, kurie didino sporadinės KADP (aortos sienos atsisluoksniavimo ir aneurizmos) susiformavimo galimybę, kai nėra Marfano sindromo fenotipinių požymių (LeMaire, et al., 2011).

Duomenų trūkumas apie šių rezultatų atkartojamumą kitose populiacijose ar kitose tyrimo grupėse paskatino tirti *FBN1* geno polimorfizmo ir KADP sąsajas Lietuvos populiacijoje, į tiriamą grupę įtraukiant ligonius, operuotus dėl kylančiosios aortos sienos atsisluoksniavimo arba aneurizmos, kai yra ar nėra aortos vožtuvo stenozė. Duomenų apie *FBN1* geno polimorfizmo ir aortos aneurizmos, kai yra aortos vožtuvo stenozė, sąsajas literatūroje nepavyko rasti.

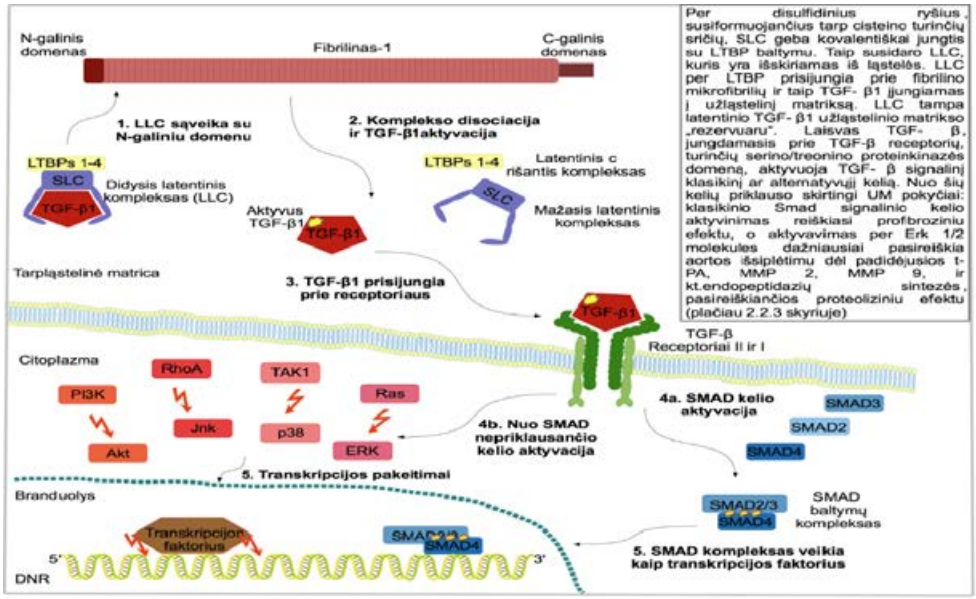
2.2.3. TGF-β struktūra ir vaidmuo

Tiriant asmenų, kuriems yra MFS, krūtinės aortos dilatacinės patologijos atsiradimo molekulinius mechanizmus, buvo atkreiptas dėmesys į TGF-β svarbą, formuojantis šiai patologijai.

Gausią TGF-β šeimą sudaro tirpūs baltymai, citokinai, įskaitant tris TGF-β izoformas (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), būdingas tik žinduoliams, kurios dalyvauja angiogenezėje, proliferacijoje, diferenciacijoje, apoptozėje,

žaizdų gijime ir aprašomos, vykstant UM remodeliavimuisi (Bertolino, et al., 2005; Feng, et al., 2005; Jones, et al., 2008). Trys TGF-β izoformos yra struktūriškai tarpusavyje panašios. Nors jas koduoja skirtingi genai, tačiau jos skiriasi tik keliomis amino rūgštimis. TGF-β izoformos jungiasi prie tų pačių receptorių. Skiriasi tik jų raiška skirtinguose audiniuose, pvz.: imuninės sistemos ląstelėse dominuoja pirmoji transformuojančio augimo faktoriaus izoforma-TGF-β1 (Li, et al., 2006). TGF-β2 pirmiausiai aprašyta, tiriant žmogaus glioblastomos ląsteles, kaip T limfocitų augimo supresorius ir pavadinta G-TsF (Flanders, et al., 1991). TGF-β3 buvo išskirta iš žmogaus rabdomiosarkomos ląstelių ir turi 80 proc. bendrų amino rūgščių sekų su pirmosiomis izoformomis (Proetzel, et al., 1995). Atlikta daug studijų, nagrinėjančių TGF-β vaidmenį kepenų, plaučių, miokardo fibrozei ir kitų ligų patogenezėje (Bataller, et al., 2005; Lijnen, et al., 2000; Bartram, et al. 2004).

Ląstelėje TGF-β1 yra sintetinamas kaip prepropolipeptidas, kuris praėjęs pro Golgi aparatą yra suskaldomas į brandų TGF-β1 ir su latencija susijusį peptidą (LAP – *latency associate peptide*). Brandaus TGF-β homodimerai ir LAP sudaro biologiškai neaktyvų kompleksą, vadinamą mažuoju latentiniu kompleksu (SLC – *small latent complex*). Per disulfidinius ryšius, susiformuojančius tarp cisteino turinčių sričių, SLC geba kovalentiškai jungtis su baltymu, vadinamu su latencija susijusiu TGF-β jungiančiuoju baltymu (LTBP – *Latency-associated TGF-β binding protein*). Taip susidaro didysis latentinis kompleksas (LLC – *large latent complex*), kuris yra išskiriamas iš ląstelės. LLC per LTBP prisijungia prie fibrilino mikrofibrilių ir taip TGF-β1 įjungiamas į užląstelinį matriksą (Denton, et al., 2003; Chaudhry et al., 2007; Ten Dijke, et al., 2007). Dėl to LLC tampa latentinio TGF-β1 užląstelinio matrikso „rezervuaru“ (Koli, et al., 2005). Taigi, fibrilinas-1 ne tik formuoja elastinių skaidulų mikrofibriles, bet ir, prisijungdamas LLC, dalyvauja užląstelinėje endogeninio TGF-β reguliacijoje (Ramirez, et al., 2010).



2.2.3.1 pav. *Fibrilino-1 ir TGF-β1 sąveika*

TGF-β tampa biologiškai aktyvus tik atsiskyręs nuo LAP. Vienas iš svarbiausių TGF-β aktyvacijos mechanizmų yra LLC proteolizinis suardymas. Tai gali atlikti MMP, chimazė, triptazė, katepsinai, serino elastazė (Dobrin, et al., 1984; Annes, et al., 2003), plazminas, plazminogeno aktyvatoriai, hialurono rūgštis (Pepper, et al., 2001), trombospondinas (Yehualaeshet, et al., 1999). In vitro stebėtą TGF β aktyvaciją sukėlė pH pokyčiai, karštis taip pat, minėtų proteazių veikimas (Annes, et al., 2003).

Atkreiptas dėmesys į integrinų svarbą, atpalaiduojant aktyvų TGF-β iš užląstelinio matrikso. Integrinai yra ląstelės membraną kertantys baltymai ir jungiantys ląstelę su užląsteliniu matriksu. 2008 metais buvo pasiūlyti du modeliai, kaip integrinai veikia, aktyvuodami latentinį TGF-β. (Wipf ir Hinz, 2008). Tai nuo proteazių priklausomas ir nepriklausomas keliai. Abiems mechanizmams svarbiausia, kad integrinai atpažįsta LAP – TGFβ-1 RGD sekas ir prie jų jungiasi. Būdamas šioje jungtyje integrinas pritraukia MT-1-MMP (angl. *membrane type-1 matrix metalloproteinase)*, MMP-2, MMP-9, kurios atskelia LAP ir atpalaiduoja aktyvų TGF-β1. Kai yra nuo proteazių nepriklausomas TGF-β1 atpalaidavimo kelias, integrinai taip pat atpažįsta RGD LAP seką, kaip dalį LLC, kuris yra prisijungęs prie UM fibrilino mikrofibrilių. Kai UM mechaniškai standus, ląstelės susitraukimo jėga per integriną perduodama LAP, tai sukelia latentino komplekso deformaciją ir aktyvaus TGFβ-1 atpalaidavimą. Nurodoma, jog turi būti keturios

sąlygos, kad vyktų TGFβ1 atpalaidavimas nuo proteazių nepriklausomu keliu:

1. Ląstelė turi turėti aktino citoskeletą, kad būtų generuojama susitraukimo jėga ar mechaninis pasipriešinimas;
2. Specifinis integrinas, kuris perduotų šią jėgą LLC;
3. LLC, prisijungęs prie UM;
4. Mechaniškai standus UM, kuris pasipriešina ląstelės tempimui, perduodamam per integriną LLC (Wipf ir Hinz, 2008; Munger ir Shepard., 2011).

Šis nuo integrinų priklausomas kelias svarbus arterijų remodeliavimuisi, esant hipertenzijai (Heerkins, et al., 2007).

Laisvas TGF-β, jungdamasis prie TGF-β receptorių, turinčių serino / treonino proteinkinazės domeną, aktyvuoja TGF-β signalinį kelią. Šiuo metu yra žinomi du TGF-β signaliniai keliai – klasikinis arba kanoninis ir alternatyvusis. Klasikinį kelią gali aktyvuoti visos trys TGF-β izoformos. Jos dimerizuojasi ir jungiasi prie II tipo TGF-β receptoriaus (TGFBRII), kuris perduoda signalą fosforilindamas I tipo TGF-β receptorių (TGFBRI). Aktyvuotas TGFBRI fosforilina R-Smad receptorių (molekulinio signalo perdavėją, pavadintą pagal *Caenorhabditis elegans* homologą (*sma* genai: SMAII) ir Drosophilla (*mad* genai; *mothers against decantaplegic* (*dpp*)). R-Smad sąveikauja su Smad4 ir susiformuoja kompleksas, veikiantis kaip transkripcijos reguliatorius, kuris aktyvindamas ar slopindamas informacijos perdavimą į branduolį, veikia genų raišką (Feng, et al., 2005; Leivonen, et al., 2002). Yra daug svarstymų ir hipotezių dėl alternatyvaus TGF-β signalinio kelio, nepriklausomo nuo Smad. Šis alternatyvus perdavimas gali vykti įsijungiant ir klasikinio kelio mediatoriams ar signalas gali būti perduodamas tiesiogiai, aplenkiant TGFBRI receptorių (Yu, et al., 2002; Dumont, et al., 2003). Smad ir co-Smad (Smad4) aktyvumo trūkumas, pakitęs TGFBRI; R-Smad aktyvavimas kitais signaliniais mediatoriais, išvengiant tiesioginio kontakto su TGF-β receptoriais – taip pat gali aktyvuoti alternatyvųjį kelią, kuris dar nėra pakankamai suprastas dėl jo sudėtingumo ir įvairialypiškumo (Yakymovych, et al., 2001; Runyan, et al., 2004).

Dietz su kolegomis (Dietz, et al., 2005) įrodė perteklinioTGF-β1 svarbą, kai yra Marfano sindromas. Normaliomis sąlygomis fibrilino-LTBP sąveika sąlygoja TGF-β1 kaupimąsi UM. Homeostazė sutrikdoma, jei mutavęs fibrilinas-1 nebekontroliuoja TGF-β1 išsiskyrimo ir juo persipildo UM (Munger ir Shepard., 2011). Aktyvus TGF-β1, jungdamasis prie atitinkamų receptorių, gali sąlygoti atsako mechanizmus tiesioginiu klasikiniu, Smad2/3 priklausomu keliu ar alternatyviuoju (per Erk1/2) keliu. Tiktai skirtingų kelių aktyvinimas lemia skirtingus UM pokyčius: klasikinio Smad signalinio kelio aktyvinimas reiškiasi profibroziniu efektu, o aktyvavimas per Erk 1/2

molekules dažniausiai pasireiškia aortos išsiplėtimu dėl padidėjusios t-PA, MMP 2, MMP 9, ir kt. endopeptidazių sintezės, pasireiškiančios proteoliziniu efektu (Holm, 2011). Šis mechanizmas iš dalies paaiškina, kodėl žmonėms, turintiems MFS, esant didesnei TGF-β1 koncentracijai (Neptune, et al., 2003), plečiasi aorta (Milewicz, 2008).

Įvairių autorių, tyrusių ligonių, turinčių MFS, ir kontrolinės grupės asmenų kraujo TGF-β1 koncentraciją, duomenys pateikti 2.2.3.1 lentelėje. Visais atvejais tiek serumo, tiek kraujo plazmos TGF-β1 didesnė koncentracija buvo nustatoma ligoniams, turintiems MFS.

2.2.3.1 lentelė. *Ligonių, turinčių Marfano sindromą (MFS), ir kontrolinės* grupės *asmenų kraujo TGF-β1 koncentracijos palyginimas*

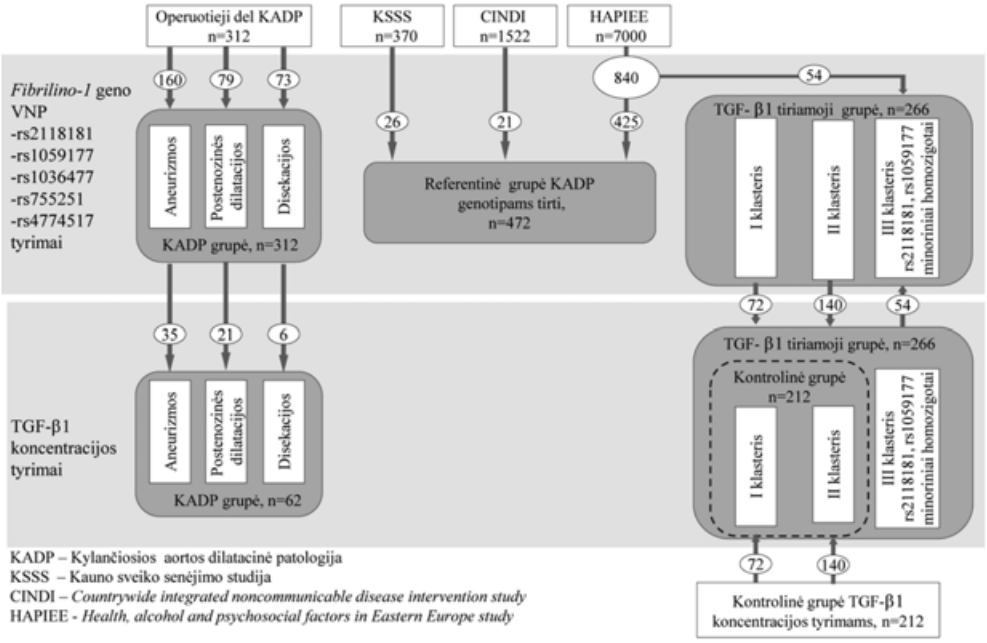
MFS grupė	**Kontrolinė grupė**	**Plazma / Serumas**	**Gamintojas/rinkinys**	**Nuoroda**
43,78 ng/ml disekacijų grupėje	25,7 ng/ml	Serumas	R&D Systems, Minneapolis, USA	Agg, et al, 2014
31,64 ng/ml anuloektazijų grupėje				
15 ng/ml MFS be širdies ir kraujagyslių sistemos gydymo	2,5 ng/ml	Plazma	R&D Systems, Minneapolis, USA	Matt, et al, 2009
44,4 ng/ml	Neturintiems genetinių požymių 32 ng/ml	Serumas	R&D Systems, Minneapolis, USA	Hillerbrand, et al, 2014
109 pg/ml	54 pg/ml	Plazma (?)	Bio-Rad, Richmond, Canada	Franken, et al, 2013
1,31 ng/ml	1,17 ng/ml	Plazma	Mesco Scale Discovery, Gaithesburg, MD, USA	Ogawa, et al, 2012

Atlikti tyrimai parodė, kad ligoniams, turintiems MFS, būdinga didesnė kraujo plazmos TGF-β1 koncentracija. Tai siejama su FBN1 pokyčiais, kai dėl baltymo mutacijos sutrinka TGF-β homeostazė. Yra nustatyta, kad *FBN1* VNP (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517), nesukeldami kitų MFS fenotipinių pokyčių, didina kylančiosios aortos aneurizmos ar atsisluoksniavimo galimybę. Iki dabar nėra duomenų, ar yra sąsajos tarp *FBN1* VNP (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) retųjų alelių, didinančių sporadinės KADP galimybę, ir kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos pokyčių.

3. DARBO METODIKA

Tyrimai vykdyti LSMU Medicinos akademijos Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje ir LSMU Medicinos akademijos Širdies, krūtinės ir kraujagyslių chirurgijos klinikoje, gavus bioetikos komiteto leidimą Nr. BE-2-12, išduotą 2012 03 07, pratęsimo leidimo Nr. P1-BE-2-12/2012, išduotas 2016 02 22, (žr. 1 priedą). Visi tiriamieji dėl sutikimo dalyvauti studijoje pasirašė asmens informavimo formą (žr. 2 priedą).

Tyrimų struktūra ir imtys pateikti 3.1 pav.



3.1 pav. *Tyrimų struktūra ir imtys*

3.1. Tiriamųjų imtys

3.1.1. Ligoniai, operuoti dėl kylančiosios aortos dilatacinės patologijos

Tyrime dalyvavo 338 ligoniai, kuriems buvo diagnozuota KADP ir atlikta kylančiosios aortos rekonstrukcinė operacija LSMU Širdies, krūtinės ir kraujagyslių klinikoje (2004–2014 m., n = 290) ir Vilniaus universiteto Santariškių klinikos Širdies chirurgijos centre (2013–2014 m., n = 48). Visais

atvejais buvo atliekamas histologinis aortos mėginių, paimtų operacijos metu, keičiant išsiplėtusios ar atsisluoksniavusios aortos dalį protezu, tyrimas.

Neįtraukimo į tyrimą kriterijai:

- aortitas (n = 14),
- Marfano sindromas (n = 4),
- kylančiosios aortos IV–V tipo aterosklerozinės pažeidimai (Stary, et al., 1995), (n = 6),
- kartotinė operacija po Rosso procedūros (n = 2).

Taigi, į tolimesnį tyrimą buvo įtraukti 312 pacientų (KADP grupė), kurie pagal KADP fenotipą sudarė kylančiosios aortos aneurizmos (KAA, n = 160), postenozinės dilatacijos dėl aortos vožtuvo stenozės (PDS, n = 79) ir Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo (SAA, n = 73) pogrupius. Klinikiniai ir demografiniai ligonių, operuotų LSMU Širdies, krūtinės ir kraujagyslių klinikoje, duomenys buvo paimti iš klinikos medicininių dokumentų išrašų (Forma Nr 027/a). Ligonių, operuotų Vilniaus universiteto Santariškių klinikos Širdies chirurgijos centre, duomenis pateikdavo operavęs chirurgas pagal klausimyną (žr. 4 priedą).

3.1.2. Palyginamosios tiriamųjų imtys

3.1.2.1. Referentinė grupė

Referentinė grupė (n = 472) buvo sudaryta, atsižvelgiant į KADP grupės struktūrą pagal lytį ir amžių. Ji buvo atrinkta iš gyventojų atsitiktinių imčių, surinktų vykdant tarptautinius projektus:

1. Atsitiktinė Kauno miesto gyventojų imtis, kurią sudarė 45–74 metų 840 asmenų. Ši imtis (n = 7000) buvo surinkta LSMU Kardiologijos instituto Populiacinių tyrimų laboratorijoje, vykdant tarptautinę HAPIEE (*Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe*) studiją. Atranka buvo atlikta pagal Kauno miesto gyventojų registro duomenis (Peasey, et al., 2006). Iš šios imties 425 asmenys buvo paimti referentinės grupės sudarymui.
2. Atsitiktinė Lietuvos kaimiškųjų rajonų 25–45 metų asmenų imtis (n = 1522). Ją surinko LSMU Kardiologijos instituto tyrėjai, vykdydami tarptautinę CINDI (*Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention*) studiją (Petkevičienė, et al. 2012). Iš šios studijos į mūsų tyrimą buvo įtraukas 21 asmuo.
3. Atsitiktinė vyresnių negu 65-erių metų asmenų imtis (n = 370). Ją surinko LSMU Geriatrijos klinikos ir Kardiologijos instituto Molekulinės kar-

diologijos laboratorijos tyrėjai, vykdydami tarptautinį projektą KSSS (Kauno sveiko senėjimo studija). Iš šios studijos 26 asmenys buvo įtraukti į mūsų referentinę grupę.

Duomenys apie referentinės grupės asmenų arterinį kraujo spaudimą buvo paimti iš HAPIEE, CINDI ir KSSS projektų epidemiologinio tyrimo duomenų. Hipertenzija buvo nustatoma, jei tikrinant sveikatą epidemiologinio tyrimo metu sistolinis kraujo spaudimas buvo ≥ 140 mm Hg ir / arba diastolinis kraujo spaudimas ≥ 90 mm Hg, arba asmuo pastarąsias dvi savaites vartojo vaistus nuo padidėjusio kraujospūdžio.

3.1.2.2. Tyrimo dalyvių klasteriai

Tyrimo dalyvių klasteriai suformuoti tirti TGF-β1 koncentraciją kraujo plazmoje (Sepetiene, et al.a, 2015).

Pirmąjį klasterį (I klasteris) sudarė LSMU studentai ir darbuotojai (n = 72, amžius nuo 23 iki 67 metų, mediana 49 metai). Antrąjį klasterį (II klasteris) sudarė Kauno Dainavos poliklinikos pacientai–savanoriai, kurie neturėjo širdies ir kraujagyslių ligų nusiskundimų (n=140, amžius nuo 41 iki 87 metų, amžiaus mediana 65 metai). I ir II klasterių tiriamieji sudarė TGF-βl koncentracijos kraujo plazmoje tyrimo kontrolinę grupę. Tiriamieji užpildė anketą, atsakydami į klausimus apie jų sveikatos būklę (žr. 3 priedą).

Įtraukimo kriterijai:

- asmenys, neturintys širdies ir kraujagyslių ligų nusiskundimų, išskyrus arterinę hipertenziją.

Neįtraukimo kriterijai:

- onkologinės ir autoimuninės ligos;
- preanalizės metu nustatytos mėginio neatitiktys (hemolizė, lipemija, plazmos paruošimo klaidos).

Trečią klasterį (III klasteris) sudarė asmenys, atrinkti iš atsitiktinės Kauno m. 45–74 metų gyventojų (n=840) imties, kurie turėjo *FBN1* rs 2118181 arba rs1059177 VNP retojo alelio homozigotinį genotipą (n = 54).

3.2. Tyrimo metodai

3.2.1. DNR išskyrimas iš kraujo silikagelio kolonėlių metodu

Referentinės grupės (žr. 3.1.2.1 skyrių) genominės DNR išskyrimas iš kraujo buvo atliktas, naudojant *Sorpoclean* silikagelio kolonėlių metodą pagal *Sorpo Diagnostics* standartinę metodiką (Lesauskaitė, et al., 2007).

3.2.2. DNR išskyrimas iš kraujo druskiniu metodu

Ligonių, operuotų dėl KADP, ir I bei II klasterių tirtųjų (žr. 3.1.2.2 skyrių) genominė DNR išskirta iš kraujo, naudojant druskinį metodą (Miller, et al., 1988).

3.2.3. DNR išskyrimas iš aortos audinio, naudojant proteinkinazę K

Ligonių, kuriems nebuvo paimtas kraujas prieš operaciją, genominė DNR išskirta iš į parafiną įlietų aortos sienos audinių, paimtų operacijos metu, pagal standartinę metodiką, naudojant proteinkinazę K. (Sepp, et al. 1994).

3.3. Genetiniai tyrimai

3.3.1. *FBN1* geno polimorfizmų tyrimas

FBN1 VNP (rs2118181, rs1059177, rs1036477, rs755251, rs4774517) genotipavimas atliktas 1411 tirtų asmenų (3.3.1.1lentelė).

3.3.1.1 lentelė. FBN1 geno polimorfizmo tyrimas

Tirtasis kontingentas	N
Ligoniai, operuoti dėl KADP	312
HAPIEE studija	840
CINDI studija	21
KSSS	26
I ir II klasteriai	212
Iš viso	1411

KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija;
HAPIEE – *Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe;*
CINDI – Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention;
KSSS – Kauno sveiko senėjimo studija.

VNP (**rs2118181, rs1059177, rs1036477, rs755251, rs4774517**) genotipuoti, naudojant komercinius *Applied Biosystem* rinkinius su molekuliniais žibukais pagal gamintojo (*Foster City, CA, USA*) instrukciją. Rinkinių žymos: C__16234705_10 (rs2118181)5, C___1865677_10 (rs1036477), C___8932690_10 (rs1059177), C__28032458_20 (rs4774517), C___113 2304_10 (rs755251). Genotipavimas atliktas Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje su ABI 7900HT tikro laiko PGR termocikleriu iš *Applied Biosystem (Foster City, CA, USA)* pagal standartinę me-

todiką, naudojant programas „Absoliutus gausinimas“ ir „Alelių nustatymas“. Tyrimo kontrolė vykdyta, atlikus sekoskaitos tyrimus Vilniaus Biotechnologijų centre.

3.3.2. TGF-β1 koncentracijos nustatymas

Kraujo plazmos TGF-β1 koncentracija nustatyta 328 asmenims (3.3.2.1 lentelė)

3.3.2.1lentelė. *TGF-β1 koncentracijos tyrimas*

Tirtasis kontingentas	N
Ligoniai operuoti dėl KADP	62
I ir II klasteriai	212
III klasteris	54
Iš viso	328

KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija.

Kraujo ėminiai iš KADP pacientų paimti prieš operaciją, o I ir II klasterių asmenų – atvykimo metu, taikant standartinę venos punkciją. Naudotas 3 ml vakuuminis mėgintuvėlis su 5,9 mg K2EDTA (gamintojas *Terumo*, Belgija) ir vienkartinė kraujo paėmimo sistema. Per 2 val po kraujo paėmimo, centrifuguojant 15 min 2500 rpm greičiu, atskirta plazma nuo forminių elementų, supilstyta į 2 ml *Eppendorf* tipo mėgintuvėlius ir užšaldyta šaldiklyje, –20°C temperatūroje. III klasterio asmenų kraujo plazma buvo atrinkta iš 840 HAPIEE studijos dalyvių, kurie turėjo *FBN1* rs 2118181 arba rs1059177 VNP retojo alelio homozigotinį genotipą. Kraujo plazma buvo surinkta, vykdant studijos dalyvių epidemiologinį tyrimą ir laikoma šaldiklyje –80 °C temperatūroje. Ji buvo atšildyta prieš pat TGF β1 koncentracijos tyrimą.

Plazmos mėginiai buvo tirti po du kartus pagal gamintojo metodiką, naudojant *eBioscience platinum (Bender Med Systems GmbH*, Austrija) žmogaus TGF-β1 ELISA komercinius rinkinius. Testo pagrindas – standartinė sumuštinio tipo enzimų imunosorbcijos reakcija. Sugertis buvo matuojama Stat-fax 4200 mikroplokštelių skaitytuvu esant 450 nm pirminiam bangos ilgiui. Kryžminės reakcijos tarp TGF-β2 ir TGF-β3, nurodant gamintojui, buvo mažesnės negu 0,01 proc.

3.4. Statistinė analizė

Neparametrinis Kruskal-Walis testas buvo naudojamas kiekybinių požymių skirstiniams palyginti. Geno polimorfizmų variantų pasiskirstymui (ka-

tegoriniai duomenys) taikytas χ^2 testas arba dvikryptis Fišerio kriterijus. Kiekvieno genotipo tikėtinas dažnis apskaičiuotas pagal Hardy-Weinberg dėsnį bei palygintas su nustatytuoju genotipų dažniu pagal χ^2 testą. Logistinė regresija taikyta įvertinti genotipų kombinacijoms ir šansų santykiui nusakyti tarp referentinės ir KADP. Genetinė ryšių analizė, taikant skirtingus paveldėjimo modelius, apskaičiuota, naudojant *SNPStats* programą:

- kodominantinis modelis – pagrindinio alelio homozigotai prieš heterozigotus ir pagrindinio alelio homozigotai prieš retojo alelio homozigotus;
- dominantinis modelis – pagrindinio alelio homozigotai prieš heterozigotus ir retojo alelio homozigotus;
- recesyvinis – retojo alelio homozigotai prieš heterozigotus ir pagrindinio alelio homozigotus;
- adityvinis – vieno arba dviejų alelių pridėtinis efektas prieš kito alelio homozigotus.

Akaike (AIC) informacijos kriterijus naudotas atrinkti labiausiai duomenis atitinkančiam paveldimumo modeliui, vertinant pagal mažiausią skaitinę išraišką. Spearman ranginė koreliacija taikyta patikrinti amžiaus įtaką kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijai. Daugybinės linijinės regresijos metodo pagalba buvo įvertinta lyties ir genotipo įtaka logaritmuotai TGF-β1 koncentracijai. Reikšmingumo vertė, koreguota Bonferroni, taikyta analizuojamiems *FBN1* VNP. Skaičiavimai atlikti statistinių duomenų paketu (SPSS, versija 22.0, Inc, Chicago, IL, USA).

4. REZULTATAI

4.1. *FBN1 VNP* polimorfizmo ir KADP sąsajų tyrimas

Ligonių, operuotų dėl KADP, ir referentinės grupės asmenų kinikiniai bei demografiniai duomenys pateikti 4.1.1 lentelėje.

4.1.1 lentelė. *Ligonių, operuotų dėl kylančiosios aortos dilatacinės patologijos, ir referentinės grupės asmenų demografiniai bei klinikiniai duomenys*

Požymis	**Kylančiosios aortos aneurizmų pogrupis n = 160**	**Postenozinės dilatacijos pogrupis n = 79**	**Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo pogrupis n = 73**	**Iš viso n=312**	**Referentinė grupė n = 472**
Amžius, metais Mediana (ribos)	60 (18-83)	65 [a] (27-81)	62 (24-84)	62 (18-84)	61 (25-83)
Lytis vyrai, n (proc.)	135 (84,4)	57 (72,2)	54 (74,0)	246 (78,8)	372 (78,8)
Hipertenzijos buvimas, n (proc.)	120 (75,0)	62 (78,5)	70 (95,9)[b]	252 (80,7)	352 (74,6)
Aortos vožtuvas Dviburis, n (proc.) Protezas, n (proc.) Nėra duomenų, n (proc.)	 79 (49,4)[c] 0 –	 58 (73,4) 0 –	 4 (5,5)[d] 3 (4,1) 7 (9,6)	 140 (44,9) 3 (0,9) 7 (2,2)	 – – 472 (100,0)

[a]p = 0,004 lyginant su referentine grupe (Kruskal-Wallis testas);
[b, c, d]p reikšmės gautos, taikant dvipusį tikslųjį Fišerio testą;
[b]p = 0,0001 lyginant su referentine grupe;
[c]p < 0,001 lyginant su postenozinės dilatacijos pogrupiu;
[d]p < 0,0001 lyginant su postenozinės dilatacijos pogrupiu.

PSD pogrupio pacientai buvo vyriausi KADP grupėje, jų amžius reikšmingai skyrėsi ir nuo referentinės tirtųjų grupės (p = 0,004). Dėl KADP dažniau buvo operuojami vyrai (78,8 proc.) negu moterys (21,2 proc.). Hipertenzija patikimai dažniau nustatyta ligoniams, operuotiems dėl SAA, lyginant su operuotais dėl KAA (p = 0,0001), PSD (p = 0,0015) ar referentinės grupės asmenimis (p = 0,0001).

Tirtų *FBN1* VNP genotipų pasiskirstymas atitiko Hardy-Weinberg dėsnį tiek KADP grupėje, tiek ir jos pogrupiuose, (p > 0,15). Genotipuotų *FBN1* VNP retųjų alelių dažniai (RAD) ir jų sąsajos su KADP pateikti 4.1.2 lentelėje.

4.1.2 lentelė. *Genotipuotų FBN1 VNP retųjų alelių dažniai (RAD) ir jų sąsajos su KADP*

VNP	Kylančiosios aortos aneurizmos pogrupis			Postenozinės dilatacijos pogrupis			Stanfordo A atsisluoksniavimo pogrupis			Referentinė grupė	
	RAD	**ŠS PI, 95 proc.**	**p**	**RAD**	**ŠS PI, 95 proc.**	**p**	**RAD**	**ŠS PI, 95 proc.**	**p**	**RAD**	**ŠS PI, 95 proc.**
rs2118181 rs1036477	0,16*	1,67 1,61–2,40	0,005	0,14	1,39 0,84–2,31	0,23	0,23**	2,59 1,67–4,01	<0,001	0,10	1,00
rs10519177 rs755251 rs4774517	0,28	1,25 0,94–1,66	0,13	0,24	1,01 0,68–1,49	0,98	0,40**	2,13 1,48–3,08	<0,001	0,24	1,00

VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija;
p- reikšmingumo lygmuo, koreguotas pagal Bonferoni kriterijų, $p < 0,01$;
ŠS – šansų santykis; PI – pasikliautinasis intervalas.
Lyginant su referentine grupe: *$p = 0,007$; **$p \leq 0,0001$.

Pacientai, operuoti dėl kylančios aortos aneurizmos arba dėl Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo, turėjo didesnį RAD *FBN1 VNP rs2118181 ir rs1036477* negu referentinės grupės asmenys (atitinkamai 0,16 ; 0,23 ir 0,10; p=0,005 ir p<0,001). Retieji *FBN1 VNP* rs1059177, rs755251 ir rs4774517 aleliai taip pat dažniau nustatyti ligoniams, operuotiems dėl SAA, lyginant su referentinės grupės asmenimis (atitinkamai 0,40 ir 0,24, P<0,0001). Taigi, retieji *FBN1 VNP rs2118181, rs1036477* aleliai buvo patikimai susiję tiek su kylančios aortos aneurizmos formavimusi (ŠS 1,67, PI 95 proc. 1,61–2,40), tiek su Stanfordo A aortos atsisluoksniavimu (ŠS 2,59, PI 95 proc. 1,67–4,01). *FBN1 VNP* rs1059177, rs755251 ir rs4774517 retieji aleliai buvo susiję tik su Stanfordo A aortos atsisluoksniavimu ir šios patologijos galimybę didino daugiau nei 2 kartus (ŠS 2,13, PI 95 proc., 1,48–3,08).

Analizuojant visų penkių *FBN1 VNP* genotipų pasiskirstymą, reikšmingi skirtumai nustatyti tik tarp Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo ir referentinės grupės tiriamųjų (4.1.3 lentelė).

4.1.3 lentelė. *FBN1 VNP (rs2118181, rs1036477, rs1059177, rs4774517, rs755251) genotipų pasiskirstymas KADP pacientams ir referentinės grupės tiriamiesiems*

Tirtieji asmenys, n	**Genotipas**	**Genotipų dažnis, n (proc.)**		
		rs2118181 rs1036477	**rs755251 rs1059177**	**rs4774517**
KAA, n = 160	AA	112, (70,4)	83, (52,5)	14, (8,9)
	GA	42, (26,4)	61, (38,6)	61, (38,6)
	GG	5, (3,2)	14, (8,9)	83, (52,5)
p		0,019	0,254	0,254
PDS, n = 79	AA	56, (74,7)	47, (59,5)	6, (7,6)
	GA	17, (22,7)	26, (32,9)	26, (32,9)
	GG	2, (2,6)	6, (7,6)	47, (59,5)
p		0,362	0,657	0,657
SAA, n = 73	AA	44, (60,3)	28, (39,4)	14, (19,7)
	GA	24, (32,9)	29, (40,9)	29, (40,9)
	GG	5, (6,8) $^{+}$	14, (19,7) $^{++}$	28, (39,4) $^{++}$
p		<0,001	<0,001	<0,001
Referentinė grupė, n = 472	AA	378, (80,1)	272, (57,6)	26, (5,5)
	GA	89, (18,9)	174, (36,9)	174, (36,9)
	GG	5, (1,0)	26, (5,5)	272, (57,6)

KAA – Kylančiosios aortos aneurizmų pogrupis: pacientai, kuriems nepavyko nustatyti genotipų rs2118181 (n = 1) ir rs1059177, rs4774517 (n = 2) toliau neanalizuoti. PDS – postenozinės dilatacijos dėl aortos vožtuvo stenozės pogrupis: 4 pacientai, kuriems nepavyko nustatyti genotipų, rs2118181 toliau neanalizuoti. SAA – Stanfordo A atsisluoksniavimo pogrupis: 2 pacientai, kuriems nepavyko nustatyti genotipų, rs1059177 ir rs4774517 toliau neanalizuoti.
p – reikšmingumo lygmuo, koreguotas pagal Bonferroni kriterijų p < 0,01;
++ reikšmingas skirtumas tarp SAA ir referentinės grupės tiriamųjų; KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija:

Skirtumas (p = 0,019) tarp rs2118181 ir rs1036477 genotipų aneurizmos pogrupyje, lyginant su referentine grupe, nepasiekė statistiškai reikalaujamos ribos, t. y., p < 0,01, kaip ir tarp postenozinės dilatacinės patologijos pogrupio ir referentinės imties (p = 0,36).

Nustatėme, kad ligoniai, operuoti dėl SAA ir turintys homozigotinį retojo alelio genotipą (*FBN1 VNP* rs1059177, rs755251 ir rs4774517), buvo jaunesni negu to paties pogrupio ligoniai, turintys heterozigotinį ar homozigotinį pagrindinio alelio genotipą (atitinkamai amžiaus mediana 57 m., ribos 24–80 m., mediana 65 m. ir ribos 32–84 m., p = 0,01). Kitų reikšmingų amžiaus skirtumų, grupuojant ligonius pagal KADP fenotipą ir tirtus *FBN1* VNP genotipus, nenustatėme.

Atlikta KADP fenotipų ir *FBN1 VNP* sąsajų analizė pagal paveldimumo modelius (4.1.4 lentelė).

Adityvinis modelis geriausiai tiko apibūdinti *VNP rs2118181 ir rs1036477* sąsajas su KAA (ŠS 1,7, PI 95 proc. 1,17–2,46) bei SAA (ŠS 2,64, PI 95 proc. 1,66–4,19), o recesyvinis modelis geriausiai apibūdino *VNP rs1059177, rs4774517, rs755251* ir SAA sąsajas (ŠS 4,31, PI 95 proc. 2,06–9,01).

4.1.4 lentelė. KADP ir genotipuotų FBN1 VNP sąsajos pagal paveldimumo modelius

VNP	Modelis	Kylančiosios aortos aneurizmos pogrupis				Postenozinės dilatacijos pogrupis				Stanfordo A atsisluoksniavimo pogrupis			
		ŠS	PI, 95proc.	p vertė	AIC	ŠS	PI, 95proc.	p vertė	AIC	ŠS	PI, 95proc.	p vertė	AIC
rs2118181 *rs1036477*	Dominantinis	1,75	1,15–2,64	0,008	702,00	1,31	0,74–2,32	0,352	440,41	2,61	1,54–4,45	<0,001	404,15
	Recesyvinis	2,96	0,83–10,43	0,092	706,20	3,04	0,558–16,56	0,199	439,85	10,27	2,46–42,93	0,001	403,31
	Adityvinis	1,70	1,17–2,46	0,005	700,98	1,36	0,82–2,27	0,239	439,93	2,64	1,66–4,19	<0,001	400,04
	Kodominatinis				702,90				441,43				400,89
	GA	1,65	1,08–2,54	0,022		1,22	0,67–2,22	0,509		2,23	1,27–3,90	0,005	
	GG	3,32	0,94–11,78	0,063		3,15	0,58–17,23	0,185		12,59	2,98–53,09	0,001	
rs10519177 *rs755251*	Dominantinis	1,25	0,87–1,80	0,239	704,09	0,89	0,55–1,45	0,642	457,37	1,93	1,15–3,24	0,013	398,67
	Recesyvinis	1,76	0,88–3,50	0,107	703,02	1,37	0,54–3,48	0,509	457,18	4,31	2,06–9,01	<0,001	391,46
	Adityvinis	1,27	0,95–1,70	0,111	702,96	0,97	0,66–1,45	0,904	457,57	2,03	1,38–2,98	<0,001	391,88
	Kodominatinis				704,47				458,69				391,62
	GA	1,16	0,78–1,70	0,459		0,83	0,50–1,40	0,488		1,48	0,84–2,59	0,174	
	GG	1,87	0,92–3,78	0,083		1,28	0,50–3,31	0,612		5,15	2,34–11,31	<0,001	
rs4774517	Dominantinis	1,25	0,87–1,80	0,239	704,09	0,89	0,55–1,45	0,642	457,37	1,93	1,15–3,24	0,013	398,67
	Recesyvinis	1,76	0,88–3,50	0,107	703,02	1,37	0.54–3.48	0,509	457,18	4,31	2,06–9,01	<0,001	391,46
	Adityvinis	1,27	0,95–1,70	0,111	702,96	0,97	0,66–1,45	0,904	457,57	2,03	1,38–2,98	<0,001	391,88
	Kodominatinis				704,47				458,69				391,62
	GA	1,16	0,78–1,70	0,459		0,83	0,50–1,40	0,488		1,48	0,84–2,59	0,174	
	AA	1,87	0,92–3,78	0,083		1,28	0,50–3,31	0,612		5,15	2,34–11,31	<0,001	

Koreguota pagal amžių, lytį ir hipertenziją, p- reikšmingumo lygmuo koreguotas pagal Bonferoni kriterijų, $p < 0,01$.
VNP – vieno nukleotido polimorfizmas; ŠS – šansų santykis; PI – pasikliautinasis intervalas; AIC – Akaikės informacijos kriterijus.

4.2. Ligonių, operuotų dėl KADP, ir kontrolinės grupės asmenų kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos tyrimas

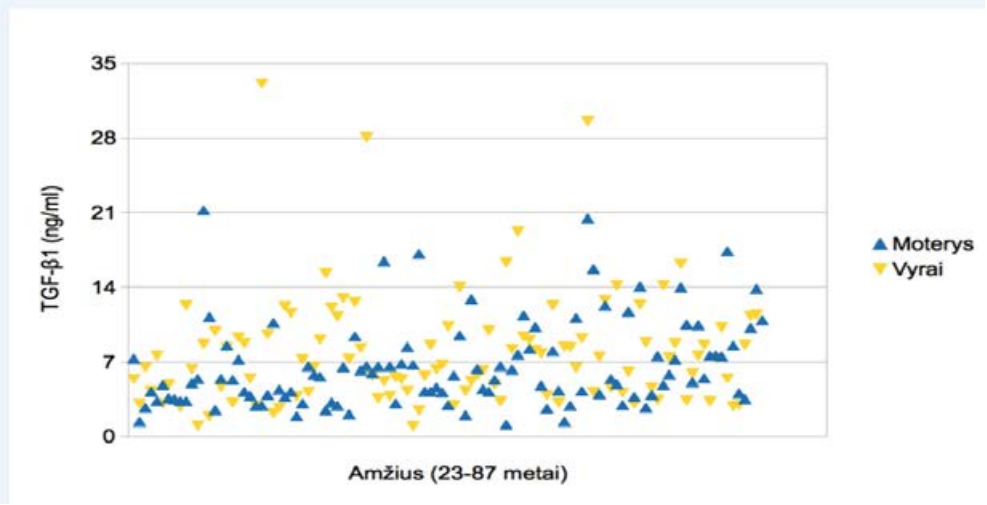
Demografiniai KADP ir tyrimo dalyvių (I ir II klasterių) duomenys pateikti 4.2.1 lentelėje.

4.2.1 lentelė. *KADP ir tyrimo dalyvių (I ir II klasterių) pasiskirstymas pagal amžių ir lytį*

Tiriamieji	Vyrai	Moterys	Amžius (metais) mediana (ribos)
KADP (n = 62)	49	13	59 (27–79)
Tyrimo dalyvių I ir II klasteriai (n = 212)	105	107	62 (23–87)

KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija.

Kontrolinės grupės (I ir II klasteriai) kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos pasiskirstymas pateiktas 4.2.1 pav.



4.2.1 pav. *Kontrolinės grupės (I ir II klasteriai) kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos pasiskirstymas pagal amžių ir lytį*

Mažiausia nustatyta TGF-β1 koncentracija buvo 1,0 ng/ml, o didžiausia – 33 ng/ml. Statistiškai patikimai (p = 0,017) didesnė TGF-β1 koncentracija kraujo plazmoje nustatyta vyrams (mediana 7,27 ng/ml, ribos 1,00–33,12 ng/ml), lyginant su moterimis (mediana 5,38 ng/ml, ribos 1,10–21,20 ng/ml).

Moterų TGF-β1 koncentracija kraujo plazmoje didėjo senstant (R = 0,338, p < 0,001), tačiau vyrams tokio dėsningumo nenustatėme (R = 0,105, p = 0,288).

Nustatėme, kad ligonių, operuotų dėl SAA, buvo didžiausia TGF-β1 koncentracijos mediana, lyginant su operuotais dėl kitų KADP fenotipų (KAA; PSD) ir kontroline TGF-β1 tyrimo grupe, tačiau šie skirtumai nebuvo statistiškai patikimi, matyt, dėl nedidelio tirtųjų skaičiaus KADP pogrupiuose. Tik apjungus visus ligonius, operuotus dėl įvairių KADP fenotipų į vieną grupę, nustatėme didesnę jų TGF-β1 koncentracijos medianą, lyginant su kontrolinės grupės tirtais asmenimis (atitinkamai mediana 7,7 ng/ml, ribos 2,1–25,3 ng/ml ir mediana 6,2 ng/ml, ribos 1,0–33,1 ng/ml, p = 0,01) (4.2.2 lentelė).

4.2.2 lentelė. *Ligonių, operuotų dėl KADP, ir kontrolinės grupės asmenų kraujo plazmos TGF-β1 koncentracija*

TGF–β1 koncentracija	**SAA, n = 6**	**PDS, n = 21**	**KAA, n = 35**	**KADP, iš viso n = 62**	**Kontrolinė grupė (I ir II klasteriai), n = 212**
Mediana (ribos) ng/ml	10,1 (6,6–17,6)	7,7 (2,1–22,0)	7,8 (2,3–25,3)	7,7 (2,1–25,3)*	6,2 (1,0–33,1)

KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija; SAA – Stanfordo A aortos atsisluoksniavimas; PDS – postenozinė dilatacija dė aortos vožtuvo stenozės; KAA – kylančiosios aortos aneurizma.
*p = 0,01 lyginant su kontroline grupe.

Standartizavus pagal amžių ir lytį, nustatytos sąsajos tarp kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos ir KADP formavimosi (ŠS 1,084, PI 1,027–1,144, p = 0,004) .

Palyginome KADP ir tyrimo dalyvių (I ir II klasterių) turimus klinikinius duomenis (4.2.3 lentelė). Tiek pacientų, tiek tiriamųjų grupėse dažniausia patologija buvo hipertenzija.

4.2.3 lentelė. *Abiejų tiriamųjų grupių: KADP ir tyrimo dalyvių (I ir II klasterių) klinikiniai duomenys*

Demografiniai ir klinikiniai duomenys	**SAA, N = 6**	**PDS, n = 21**	**KAA, n = 35**	**KADP iš viso, n = 62**	**Kontrolinė grupė (I ir II klasteriai) (n = 212)**
Amžiaus metais mediana (ribos)	54 (46–59)	60 (27–75)	59 (30–78)	57 (27–78)	62 (23–87)
Vyrai, n (proc.)	4 (66,7 proc.)	15 (71,4 proc.)	30 (85,7 proc.)	49 (79,0 proc.)*	105 (49,5 proc.)
Moterys, n (proc.)	2 (33,3 proc.)	6 (28,6 proc.)	5 (14,3 proc.)	13 (21,0 proc.)*	107 (50.5 proc.)
Vainikinių širdies kraujagyslių liga, n (proc.)	2 (33,3 proc.)*	11 (52,4 proc.)*	14 (40,0 proc.)*	27 (43,5 proc.)*	1 (0,4 proc.)
Hipertenzija, n (proc.)	**4 (66,7 proc.)***	**14 (66,7 proc.)***	**30 (85,7 proc.)***	**48 (77,4 proc.)***	**71 (31,3 proc.)**
Prieširdžių virpėjimas, n (proc.)	2 (33,3 proc.)*	2 (9,5 proc.)*	6 (17,1 proc.)*	10 (16,1 proc.)*	–
Cukrinis diabetas, n (proc.)	–	1 (4,8 proc.)*		1 (1,6 proc.)	1 (0,4 proc.)
Šlapimo sistemos patologija, n (proc.)	–	–	4 (11,4 proc.)*	4 (6,5 proc.)*	2 (0,9 proc.)
Virškinimo sistemos patologija, n (proc.)	1 (16,7 proc.)*	3 (14,3 proc.)*	9 (25,7 proc.)*	13 (21,0 proc.)*	7 (3,1 proc.)
Judėjimo-atramos sistemos patologija, n (proc.)	–	–	–	–	6 (2,6 proc.)
Kvėpavimo sistemos patologija, n (proc.)	1 (16,7 proc.)	–	1 (2,9 proc.)	2 (3,2 proc.)*	2 (0,9 proc.)

KADP – kylančiosios aortos dilatacinė patologija; SAA – Stanfordo A aortos atsisluoksniavimas; PDS – postenozinė dilatacija dė aortos vožtuvo stenozės; KAA – kylančiosios aortos aneurizma

*Procentai skaičiuoti kiekvienam pogrupiui atskirai pagal kontrolinę grupę (tyrimo dalyvių I ir II klasterius).

4.3. *FBN1 VNP* (*rs2118181, rs1059177)* ir kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos tyrimas

Tyrimų grupę sudarė visų trijų klasterių (žr. 3.3.2 skyrių) tiriamieji, iš viso 266 asmenys.Vyrų kraujo plazmos TGF-β1 koncentracija buvo ženkliai didesnė negu moterų (atitinkamai, mediana 8,32 ng/ml, ribos 1,00–33,10 ng/ml ir mediana 5,81 ng/ml, ribos 1,10–27,30 ng/ml, p = 0,001).

Kraujo plazmos TGF-β1 koncentracija pagal *FBN1* VNP (rs2118181, rs1059177) genotipus pateikta 4.3.1 lentelėje.

4.3.1 lentelė. *Kraujo plazmos TGF-β1 koncentracija pagal FBN1 (VNP rs2118181, rs1059177) genotipus*

***FBN1* VNP genotipas**	**Genotipo dažnis n (proc.)**	**TGF-β1 koncentracija (ng/ml) Mediana (ribos)**
rs2118181		
AA	192 (71,4)	6,57 (1,00–33,12)
AG	64 (23,8)	7,81 (2,71–28,08)[a]
GG	13 (4,8)	9,78 (1,40–17,28)[b]
AG+GG	77 (28,6)	8,02 (1,40–28,10)
rs1059177		
AA	138 (51,3)	6,40 (1,00–33,12)[c]
AG	73 (27,1)	5,46 (1,90–28,08)[d]
GG	58 (21,6)	10,48 (1,40–27,29)
AG+GG	131 (48,7)	7,6 (1,40–28,08)

TGF-β1 koncentracijos mediana palyginta tarp tirtųjų, turinčių šiuos genotipus:
[a]rs2118181 AG ir AA, p=0,024.
[b]rs2118181 GG ir AA, p=0,094.
[c]rs1059177 AA ir GG, p<0,0001.
[d]rs1059177 AG ir GG, p<0,0001.

Nustatėme, kad *FBN1* VNP rs2118181 retasis alelis G didino TGF-β1 koncentracijos medianą: vieno G ir dviejų G alelių buvimas padidino TGF-β1 koncentracijos medianą atitinkamai 1,24 ng/ml ir 3,21 ng/ml lyginant su šio alelio neturinčiųjų (AA genotipas) mediana. Vienas rs1059177 retasis G alelis nedarė įtakos kraujo plazmos TGF-β1 koncentracijos medianai, bet G alelių pora padidino TGF-β1 koncentracijos medianą 4,08 ng/ml lyginant su turinčių AA genotipą.

Daugybinės linijinės regresijos analizė buvo atlikta, siekiant nustatyti vyriškos lyties, amžiaus, tirtų *FBN1* VNP genotipų, turinčių retąjį alelį G, įtaką logaritmuotai TGF-β1 koncentracijai (4.3.2 lentelė).

4.3.2 lentelė. *Daugybinė linijinės regresijos analizė logaritmuotoms TGF-β1 koncentracijoms*

***FBN1* VNP**	**Priklausomi kintamieji**	**Nestandartizuotas koeficientas B**	**p**	**Koreguotas R^2**
rs2118181	Konstanta Lytis (vyrų) Amžius Genotipas AG+GG	1,045 0,185 0,012 0,222	< 0,001 0,015 < 0,001 0,008	0,103
	Konstanta Lytis (vyrų) Amžius Alelis G	1,035 0,181 0,012 0,172	< 0,001 0,018 < 0,001 0,010	0,102
rs1059177	Konstanta Lytis (vyrų) Amžius Genotipas GG	1,053 0,158 0,011 0,397	< 0,001 0,034 < 0,001 < 0,001	0,146

Vyriška lytis, amžius ir *FBN1* VNP rs2118181 AG+GG genotipai arba vien tik G alelio buvimas yra reikšmingi kintamieji, sąlygojantys logaritmuotos TGF-β1 koncentracijos didėjimą (4.3.2 lentelė). Analizuodami *FBN1* VNP rs1059177 įtaką logaritmuotai TGF-β1 koncentracijai nustatėme, kad GG genotipas, vyriška lytis ir amžius yra reikšmingi kintamieji, didinantys kraujo plazmos TGF-β1 koncentraciją.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. *FBN1* geno vieno nukleotido polimorfizmų sąsajos su KADP

Genų ir jų mutacijų sąsajos su KADP formavimusi buvo atskleistos, nagrinėjant retų paveldimų ligų sindromus, kuriems būdingi panašūs kylančiosios aortos sienos pakitimai. 2011 metais publikuoti išsamūs genomo asociacijos tyrimai (GWAS), patvirtinantys *Fibrilino-1* geno penkių VNP (*rs2118181, rs1036477, rs1059177, rs4774517, rs755251)* sąsajas su sporadine KADP. Vėliau atlikta Jeilio universiteto mokslininkų studija iš dalies patvirtino LeMaire ir bendraautorių teiginius, nustatydama tik *FBN1 rs2118181* ryšį su krūtinės aortos atsisluoksniavimu. Norėdami patikrinti GWAS teiginius, nusprendėme ištirti jų atrinktus penkis *FBN1* geno polimorfizmus atvejo–kontrolės studijoje Lietuvos gyventojų populiacijoje. Mūsų studijoje KADP pacientai buvo suskirstyti į tris pogrupius pagal ligos fenotipą, t. y., kylančiosios aortos aneurizmos, kylančiosios aortos postenozinio išsiplėtimo dėl aortos vožtuvų patologijos ir Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo. Šie pogrupiai tyrime lyginti tarpusavyje ir su referentine grupe, kuri buvo sudaryta iš Lietuvos gyventojų atsitiktinių imčių, atrinktų vykdant epidemiologines studijas (HAPPIE, CINDI, KSSS). Demografiniai KADP pacientų duomenys (amžiaus mediana 62 metai, daugiau vyrų negu moterų) yra panašūs kaip LeMaire (2011) ir Iakoubovos (2014) atliktose studijose ir atitinka Tarptautinio ūminio aortos atsisluoksniavimo registro duomenis (Tsai, et al., 2009).

Analizuojant klinikinius duomenis, arterinė hipertenzija yra nurodoma kaip vienas iš svarbiausių aortos atsisluoksniavimo veiksnių (Tsai, et al., 2009), kurio reikšmė per paskutinius dešimtmečius yra ženkliai didėjanti (Chan, et al., 2014). Tai patvirtina ir mūsų rezultatai. Didžiausią hipertenzijos dažnį nustatėme Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo pogrupyje, lygindami su kitais pogrupiais, taip pat ir su referentine grupe.

Mūsų duomenys rodo, kad visi penki tirtieji *FBN1* VNP (rs2118181, rs1059177, rs1036477, rs755251, rs4774517) yra susiję su Stanfordo A aortos atsisluoksniavimu. Pacientams, operuotiems dėl minėtos patologijos, RAD reikšmingai didesnis, nei referentinės grupės tiriamiesiems, panašiai, kaip ir GWAS studijoje (LeMaire, et al., 2011). *FBN1* VNP rs2118181 ir rs1036477 nustatytos reikšmingos sąsajos RAD (ŠS 2,59, 95 proc., PI 1,67–4,01, $p < 0,001$) su Stanfordo A aortos atsisluoksniavimu. Priešingai Jeilio studijai (Iakoubova, et al., 2014) ir sutinkamai su GWAS teiginiais, mes nustatėme reikšmingas retųjų alelių rs1059177, rs755251, rs4774517 sąsajas (ŠS 2,13, 95 proc., PI 1,48–3,08, $p<0,001$) su Stanfordo A aortos atsisluoks-

niavimu ir abiejų: rs2118181, rs1036477 – su kylančiosios aortos aneurizmų pogrupiu (ŠS 1,67, 95 proc., PI 1,61–2,40, p = 0,005). **Taigi, mūsų duomenys patvirtino, kad visų tirtų *FBN1* VNP retieji aleliai yra Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo rizikos aleliai, o retieji rs2118181 ir rs1036477 aleliai yra kylančiosios aortos aneurizmos rizikos aleliai**. Visų tirtų VNP homozigotiniai rizikos alelių genotipai yra reikšmingai dažnesni Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo pogrupyje lyginant su referentine grupe. Analizuodami pacientų, kuriems įvyko Stanfordo A aortos atsisluoksniavimas, amžių, mes nustatėme, kad turintiems rs1059177, rs755251, rs4774517 homozigotinį rizikos alelių genotipą, aorta atsisluoksniavo jaunesniame amžiuje lyginant su turinčiais kitus genotipus (amžiaus mediana 57 ir 65 metai, p = 0,01). Vis dėl to, mūsų tiriamieji yra vyresni negu aprašyti Detaint su kolegomis (2010) studijoje, kurioje pateikti duomenys apie aortos atsisluoksniavimą, kai yra MFS. (35 metai, ribos tarp kvartilių 29–44 metai). Apskritai, aortos atsisluoksniavimas turi polinkį pasireikšti jaunesniems pacientams, kuriems nustatyti jungiamojo audinio defektai, negu sporadiniais atvejais (LeMaire, et al., 2011; Russel, et al., 2011).

Lygindami su referentine grupe mes nenustatėme reikšmingų skirtumų retųjų alelių ar genotipų pasiskirstymui kylančiosios aortos postenozinės dilatacijos pogrupyje. Dauguma, net 73,4 proc., kylančiosios aortos postenozinės dilatacijos pogrupio tiriamųjų turėjo dviburį aortos vožtuvą. Tai gali, bent jau iš dalies, paaiškinti sąsajų tarp *FBN1* VNP ir minėto pogrupio tiriamųjų nebuvimą. Galbūt kiti genetiniai faktoriai ar hemodinamikos pokyčiai turi didesnį poveikį kylančiosios aortos postenozinės dilatacijos susiformavimui negu *FBN1* mutacijos.

Pritaikę logistinę regresiją įvertinti VNP ir KADP sąsajas pagal paveldimumo modelius skirtinguose KADP pogrupiuose lyginant su referentine grupe, nustatėme, kad adityvinis modelis geriausiai tiko rs2118181 ir rs1036477 kylančiosios aortos aneurizmų bei Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo pogrupiams (atitinkamai, ŠS 1,70, 95 proc., PI 1,17–2,46; ŠS 2,64, 95 proc., PI 1,66–4,19). Tai paaiškina, kad kiekviena retojo alelio kopija sukelia riziką adityvine – pridėtine forma, vadinasi, homozigotinis retojo alelio genotipas dvigubai didina riziką lyginant su heterozigotine forma. Recesyvinis modelis geriausiai atspindėjo sąsajas tarp *rs1059177, rs4774517, rs755251* ir Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo pogrupio (ŠS 4,31, 95 proc., PI 2,06–9,01). Panaši duomenų analizė buvo publikuota ir Jeilio studijoje (Iakoubova, et al., 2014). Jie nustatė, kad VNP rs2118181 heterozigotinis genotipas didina aortos atsisluoksniavimo galimybę lyginant su turinčiais pagrindinio alelio homozigotinį genotipą (ŠS 1,82, 95 proc., PI 1,13–2,83), o adityvinis ir dominantinis modeliai geriausiai atspindėjo sąsajas su aortos atsisluoksniavimu. **Taigi, reikšmingos sąsajos tarp *FBN1***

VNP rs2118181 retojo alelio ir aortos atsisluoksniavimo buvo patvirtintos trijų nepriklausomų studijų: GWAS (LeMaire, et al., 2011), Jeilio (Iakoubova, et al., 2014) ir mūsų – LSMU.

Mūsų studija taip pat atkartojo GWAS nustatytas sąsajas tarp *FBN1* VNP rs2118181 ir kylančiosios aortos aneurizmos susiformavimo bei rs1059177 ir Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo. Priešingai negu GWAS, mes nenustatėme reikšmingų sąsajų tarp rs1059177 ir kylančiosios aortos aneurizmos susiformavimo.

Apibendrinant galima teigti, kad visose trijose studijose buvo nustatytos panašios sąsajos tarp rs rs2118181, rs1036477 ir Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo, tačiau skyrėsi Jeilio studijos kylančiosios aortos aneurizmos pogrupio duomenys. Iš viso nebuvo nustatyta ryšio tarp *FBN1* VNP (rs2118181, rs1059177) ir kylančiosios aortos aneurizmos susiformavimo (Iakoubova, et al., 2014). Galima daryti prielaidą, kad visų studijų aortos atsisluoksniavimo grupė buvo labiausiai kliniškai vienalytė, o kiti pogrupiai galėjo tarpusavyje skirtis pagal klinikinių duomenų įvairovę.

Remiantis mūsų atliktais tyrimais, pacientai, turintys *FBN1* VNP rs2118181 arba rs1036477 pagrindinio alelio homozigotinį genotipą, sudaro apie 60 proc., o rs1059177 arba rs755251 – 40 proc. Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo pogrupio tirtųjų (4.1.2 lentelė). Taip pat mes patikrinome, kokia pacientų, kurie buvo operuoti dėl aortos atsisluoksniavimo, dalis iš viso neturėjo rizikos alelių visuose penkiuose tirtuose *FBN1* VNP. Nustatėme, kad tokių buvo beveik trečdalis visų Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo pogrupio pacientų, t. y. jie turėjo visų tirtų *FBN1* VNP pagrindinių alelių homozigotinį genotipą. Vadinasi, šiems pacientams aorta atsisluoksniavo nesant *FBN1* rizikos alelių. Matyt, tai sąlygojo kiti mechanizmai, kai įvairūs klinikiniai ir biologiniai veiksniai gali tiek mažinti, tiek ir didinti aortos atsisluoksniavimo riziką.

Darbas turėjo keletą apribojimų. Referentinė grupė buvo surinkta iš atsitiktinės epidemiologinėse studijose dalyvavusių žmonių imties, kuriems nebuvo atliktas krūtinės ląstos ultragarsinis tyrimas, įvertinantis kylančiąją aortą. Taigi, mes neturėjome informacijos apie sveikųjų asmenų, turinčių rizikos alelius, aortos matmenis.

5.2. TGF-β1 koncentracijos ir sąsajų su KADP tyrimas

Marfano sindromo (Matt, et al., 2009) ir kitų genetinių sindromų (Hillebrand, et al., 2014), sąlygojančių KADP susiformavimą, tyrimai, atkreipė dėmesį į TGF-β1 signalinės sistemos reikšmę. Ištyrėme TGF-β1 koncentraciją sporadinės KADP pacientų ir sveikų asmenų kraujo plazmoje (žr. 3.1.2.2 Tyrimo dalyvių klasteriai). Pirmą kartą mes nustatėme TGF-β1 kon-

centracijos skirtumus, priklausomus nuo amžiaus ir lyties, t. y., TGF-β1 koncentracija vyrams senstant nekinta, o tuo tarpu moterims, minėto citokino koncentracija didėja, didėjant amžiui. Ši fenomeną galima paaiškinti folikulą stimuliuojančio hormono (FSH) poveikiu, aktyvuojančiu TGF-β1 signalinę sistemą (Zhang, et al., 2014; Gueripel, et al., 2003). FSH reguliuoja endometriumo atrofiją pomenopauzėje, blokuodamas TGFBRII receptorių ir jo veikimą per Smad2/3 signalinį kelią, FSH inhibicinis veiksmas gali slopinti TGF-β1 patekimą į ląstelę ir sąlygoti perteklinį jo kaupimąsi kraujo plazmoje (Zhang, et al., 2014).

Ankstesnių studijų, kuriose buvo tirta pacientų, turinčių MFS, TGF-β1 koncentracija kraujyje, duomenis pateikėme 2.2.3.1 lentelėje.

Atkreiptinas dėmesys, kad didesnė TGF-β1 koncentracija nustatyta, tiriant kraujo serumą. Tai galėjo vykti dėl to, kad kraujui krešant, TGF-β1 atsipalaiduoja iš trombocitų α granulių, kuriose yra gausu minėto citokino (Assoian, et al., 1996). Taigi, tiriant serumą, nustatomas visas, tiek atsipalaidavęs iš trombocitų, tiek esantis sisteminėje kraujotakoje TGF-β1 kiekis (Meyer, et al., 2012). **Vadinasi, serume nustatytą TGF-β1 koncentraciją reikia vertinti kritiškai. Dėl nevienodo trombocitų skaičiaus, kurio netgi nustatyta norma svyruoja nuo 180 × 10^9/l iki 320 × 10^9/l), ir esant stipriai tiesioginei priklausomybei nuo agregavusių trombocitų skaičiaus, TGF–β1 koncentracija kraujo serume gali reikšmingai skirtis (žr. 2.2.3.1 lentelę).**

Mūsų tyrime nustatytus TGF-β1 koncentracijos duomenis galima palyginti su publikuotais Matt ir kolegų (Matt, et al., 2009), nes tiek jie, tiek mes naudojome kraujo plazmą ir tyrėme pagal tą pačią ELISA metodiką (žr. 3.3.2 skyrių). Mūsų studijoje gauta didesnė TGF-β1 koncentracija sveikų asmenų grupėje tik paaiškina faktą, kaip kontrolinių imčių atranka lemia rezultatų skirtumus. Matt ir kolegų (2009) kontrolinės imties atrankos kriterijai buvo griežtesni: širdies ir kraujagyslių ligų nusiskundimų, įskaitant hipertenziją, uždegiminių ir autoimuninių ligų nebuvimas, jokių vaistų, galinčių paveikti užląstelinį matriksą, nevartojimas. Mūsų kontrolinė grupė (tyrimo dalyvių I ir II klasteriai) daugiau nei tris kartus didesnė už Matt ir kolegų (2009) referentinę grupę, ir trečdalis tirtųjų išsakė vienokius ar kitokius nusiskundimus dėl sveikatos, o 31 proc. tiriamųjų buvo nustatyta hipertenzija (žr. 4.2.3 lentelę).

Mokslininkai, tyrę tiek plazmą, tiek serumą, nustatė didesnę TGF-β1 koncentraciją MFS pacientams, turintiems KADP (Matt, et al., 2009; Hillebrand, et al., 2014; Agg, et al., 2014; Franken, et al., 2013). Mūsų duomenimis, KADP pacientai be fenotipinių MFS požymių, taip pat turėjo padidėjusią TGF-β1 koncentracija, lyginant su kontroline grupe (tyrimo dalyvių I ir II klasteriai). Pacientai, kuriems diagnozuota Stanfordo A aortos at-

sisluoksniavimas, turėjo didesnę TGF-β1 koncentraciją, lyginant su kitais KADP pogrupiais ar kontroline grupe. Tai gali būti aiškinama padidėjusia trombocitų aktyvacija, kai vyksta aortos sienos atsisluoksniavimas. Jos metu trombocitai atpalaiduoja TGF-β1, todėl didėja šio citokino kiekis kraujyje.

TGF-β1 koncentracijai nustatyti buvo atlikta citokino aktyvacija ir neutralizacija, paveikiant rūgštimi, po to šarmu, išlaikant metodikoje nurodytas ekspozicijas. Nustatant citokinus kraujyje imunoferementiniu metodu, labai svarbi preanalizė, rekomenduota dar Ludlam 1975 metais (Ludlam, et al., 1975), t. y., tinkama venos punkcija, nenaudojant turniketo (tai gali suaktyvinti trombocitus). Taip pat labai svarbu, nustatant citokino koncentraciją, lygia greta tirti ir granulių išsilaisvinimo iš trombocitų žymenis, pvz, IV trombocitų faktorių (Assoian, et al., 1996; Ogawa, et al., 2012). Taip būtų sumažintos preanalizės klaidos ir užtikrinta tyrimo kokybės kontrolę.

Mūsų atlikto tyrimo trūkumas buvo tas, kad lygia greta netyrėme granulių išsilaisvinimo iš trombocitų žymenų ir jo galimo poveikio galutinei TGF-β1 koncentracijai, taigi, neužtikrinome visiškos analizės kontrolės. Taip pat mūsų KADP pacientai turėjo 89 proc. gretutinių ar lydinčių ligų ir tai galėjo lemti didesnes TGF-β1 koncentracijas.

5.3. TGF-β1 koncentracijos ir *FBN1* polimorfizmų (rs2118181, rs1059177) sąsajos

Tai yra pirmoji atlikta studija, tyrusi *FBN1* VNP (rs2118181, rs1059177), turinčių sąsajas su sporadinės KADP formavimusi ir padidėjusios TGF-β1 koncentracijos kraujo plazmoje, ryšius.

Gauti duomenys patikimai įrodo, kad rs2118181 retasis alelis didina TGF-β1 koncentraciją, o kai yra rs1059177 – retųjų alelių pora. Pažymėtina, kad mūsų duomenimis, adityvinis retojo alelio modelis geriausiai nusako sąsajas tarp rs2118181 ir aneurizmos formavimosi (ŠS 1,70, 95 proc. PI 1,17–2,46) ar Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo (ŠS 2,64, 95 proc. PI 1,66–4,19), o recesyvinis modelis atitinka rs1059177 sąsajas su Stanfordo A aortos atsisluoksniavimu (ŠS 4,31, 95 proc. PI 2,06–9,01).

Chaudhry su kolegomis (Chaudhry, et al., 2007) įrodė, kad specifinė *FBN1* seka, koduojama 44-49 egzonų, tiesiogiai be jokių ląstelių- tarpininkų ar tarpinių mechanizmų reguliuoja endogeninio TGF-β1 veikimą. Tuo tarpu pakitęs fibrilino-1 baltymas nesugeba kontroliuoti TGF-β1 funkcijos ir atsiranda šio citokino perteklius, atsipalaiduojantis iš UM (Chaudhry, et al., 2007). Mutacijos *FBN1* geno domenuose didina proteolizinį jautrumą uždegiminiams enzimams (Ashworth, et al., 1999), dėl to suintensyvėja mikrofibrilių degradacija ir, kaip to pasekmė, atsiranda TGF-β1 koncentracijos pokyčių. Dar nežinoma, kaip *FBN1* VNP (rs2118181, rs1059177) gali veikti

fibrilino-1 ir TGF-β1 sąveiką. Abu VNP yra introniniuose *FBN1* geno regionuose (dbSNP, 2015). Galime daryti prielaidą, kad jie pažeidžia *FBN1 geno* matricinės *RNR (mRNR)* pirminio transkripto (*pre-mRNR*) termodinamines ir kinetines savybes, taip paveikdami *splaisingą* – tarpinį procesą tarp nurašymo (*transkripcijos*) ir perdavimo (*transliacijos*), kurio metu iš pirminės *mRNR* iškerpami intronai ir lieka tik baltymus koduojančios sekos – egzonai, susidaro brandi mRNR. Taigi, *splaisingo* klaidos gali sukelti jį koduojančio baltymo pažaidas (Liu, et al., 1996; Hutchinson, et al., 2001).

Akivaizdu, kad mūsų nustatytas ryšys tarp TGF-β1 ir *FBN1* VNP yra kiekybinis. Neturintis mutacijų fibrilinas-1 reguliuoja TGF-β1 kiekį, per latentinį TGF-β1 surišantį baltymą, esantį LLC komplekso sudėtyje (žr. 2.3.2 skyrių). Jei šita sąveika dėl FBN-1 pakitimų kaip nors sutrikdoma, nesurišto LTBP kiekis gali didėti. Savo darbe mes naudojome aktyvavimą rūgštimi, kad atskeltume TGF-β1 nuo LTBP komplekso ir išmatuotume visą TGF-β1 kiekį kraujo plazmoje. **Mes negalime atsakyti, ar TGF-β1 koncentracija padidėja dėl padidėjusio LTBP kiekio, ar dėl suaktyvėjusio LLC skilimo, tai abiem atvejais padidina laisvos TGF-β1 kiekį plazmoje. Didesnis kiekis laisvo TGF-β1, neprisijungusio prie LTBP, rodytų pakitusio fibrilino-1 sąveiką su LLC, jam jungiantis prie fibrilino mikrofibrilių, ir sumažėjusį aktyvios TGF -β1 kiekį. Aktyvios TGF-β1 formos padidėjusi koncentracija rodytų LTBP skilimo rezultatą. Taigi, KADP patogenezė išlieka neaiški.**

Šiame darbe mes nustatėme *FBN1* geno VNP (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) alelių dažnius bei genotipų pasiskirstymą ir sąsajas su trimis KADP išraiškos fenotipais: aneurizma, postenozine dilatacija dėl aortos vožtuvo stenozės ir aortos atsisluoksniavimu. Patvirtinome TG-β1 koncentracijos sąsajas su *FBN1* VNP (rs2118181, rs10519177) genotipais bei nustatėme amžiaus ir lyties įtaką šio citokino lygiui kraujo plazmoje.

IŠVADOS

1. Retieji *FBN1 VNP rs2118181 ir rs1036477* aleliai yra susiję su kylančiosios aortos aneurizmos ir Stanfordo A aortos atsisluoksniavimo formavimusi, didindami riziką atitinkamai: ŠS 1,67, PI 95 proc. 1,61–2,40 ir ŠS 2,59, PI 95 proc. 1,67–4,01; o retieji *FBN1 VNP* rs1059177, rs755251 ir rs4774517 aleliai susiję tik su Stanfordo A aortos atsisluoksniavimu didina riziką daugiau nei du kartus (ŠS 2,13, PI 95 proc., 1,48–3,08).
2. Kontrolinės grupės vyrų TGF-β1 kraujo plazmos koncentracija yra didesnė negu moterų (p = 0,001), tačiau su amžiumi moterų TGF-β1 koncentracija kraujo plazmoje didėja (R=0,338, p<0,001). KADP grupės pacientai turi didesnę TGF-β1 koncentraciją kraujo plazmoje negu kontrolinės grupės asmenys (atitinkamai mediana 7,7 ng/ml, ribos 2,1 iki 25,3 ng/ml ir 6,2 ng/ml, ribos 1,0 iki 33,1, p = 0,01). Nustatytos sąsajos tarp TGF-β1 koncentracijos ir KADP (ŠS 1,084, PI 95 proc. 1,027–1,144, standartizuota pagal amžių ir lytį).
3. Asmenys, turintys *FBN1* VNP rs2118181 heterozigotinį arba retojo alelio homozigotinį genotipą, turi statistiškai patikimai didesnę TGF-β1 koncentraciją kraujo plazmoje, kuri didėja, didėjant retojo alelio skaičiui. Kai yra *FBN1* VNP rs1059177, didžiausia TGF-β1 koncentracija kraujo plazmoje nustatyta turintiems retųjų alelių homozigotinį genotipą lyginant su turinčiais vieną retąjį alelį ar jo neturinčiais (p < 0,0001). Pastarųjų TGF-β1 koncentracija kraujo plazmoje tarpusavyje statistiškai patikimai nesiskyrė.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Agg, B., Benke, K., Szilveszter, B., Polos, M., Daroczi, L., Odler, B., et al. (2014). Possible extracardiac predictors of aortic dissection in Marfan syndrome. BMC cardiovascular disorders, 14(1), 15-26.
2. Akhurst, R. J. (2004). TGFbeta signaling in health and disease. Nature genetics, 36(8), 790-792.
3. Albornoz, G., Coady, M. A., Roberts, M., Davies, R. R., Tranquilli, M., Rizzo, et al. (2006). Familial thoracic aortic aneurysms and dissections—incidence, modes of inheritance, and phenotypic patterns. The Annals of Thoracic Surgery, 82(4), 1400-1405.
4. Allaire, E., Muscatelli-Groux, B., Guinault, A. M., Pages, C., Goussard, A., Mandet, et al. (2004). Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. Annals of surgery, 239(3), 417-427
5. Allaire, E., Muscatelli-Groux, B., Mandet, C., Guinault, A. M., Bruneval, P., Desgranges, P., et al. (2002). Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. Journal of vascular surgery, 36(5), 1018-1026.
6. Allaire, E., Schneider, F., Saucy, F., Dai, J., Cochennec, F., Michineau, S., et al. (2009). New insight in aetiopathogenesis of aortic diseases. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 37(5), 531-537.
7. Anderson, C.A. (2003). Ascending aortic aneurysms. Cardiac surgery in the adult. 2nd ed. McGraw-Hill, New York, NY; 1123–1148.
8. Anidjar, S., Salzmann, J. L., Gentric, D., Lagneau, P., Camilleri, J. P., Michel, J. B. (1990). Elastase-induced experimental aneurysms in rats. Circulation, 82(3), 973-981.
9. Annes, J. P., Munger, J. S., Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFβ activation. Journal of cell science, 116(2), 217-224.
10. Aoyama, T., Francke, U., Dietz, H. C., Furthmayr, H. (1994). Quantitative differences in biosynthesis and extracellular deposition of fibrillin in cultured fibroblasts distinguish five groups of Marfan syndrome patients and suggest distinct pathogenetic mechanisms. Journal of Clinical Investigation, 94(1), 130.
11. Ashworth, J. L., Kelly, V., Wilson, R., Shuttleworth, C. A., Kielty, C. M. (1999). Fibrillin assembly: dimer formation mediated by amino-terminal sequences. J Cell Sci, 112(20), 3549-3558.

12. Assoian, R. K., , Sporn, M. B. (1986). Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. The Journal of Cell Biology, 102(4), 1217-1223.
13. Bailey, A. J. (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. Mechanisms of ageing and development, 122(7), 735-755.
14. Balding, D. J. (2006). A tutorial on statistical methods for population association studies. Nature Reviews Genetics, 7(10), 781-791.
15. Barrett, P. M., , Topol, E. J. (2012). The fibrillin-1 gene: unlocking new therapeutic pathways in cardiovascular disease. Heart, heartjnl-2012.
16. Bartoli, M. A., Parodi, F. E., Chu, J., Pagano, M. B., Mao, D., Baxter, B. T., et al. (2006). Localized administration of doxycycline suppresses aortic dilatation in an experimental mouse model of abdominal aortic aneurysm. Annals of vascular surgery, 20(2), 228-236.
17. Bartram, U., Speer, C. P. (2004). The role of transforming growth factor β in lung development and disease. CHEST Journal, 125(2), 754-765.
18. Bax, D. V., Bernard, S. E., Lomas, A., Morgan, A., Humphries, J., Shuttleworth, C., et al (2003). Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by α5β1 and αvβ3 integrins. Journal of Biological Chemistry, 278(36), 34605-34616.
19. Bertolino, P., Deckers, M., Lebrin, F., ten Dijke, P. (2005). Transforming growth factor-β signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. CHEST Journal, 128(6_suppl), 585S-590S.
20. Bierie, B., Moses, H. L. (2010). Transforming growth factor beta (TGF-β) and inflammation in cancer. Cytokine, growth factor reviews, 21(1), 49-59.
21. Biery, N. J., Eldadah, Z. A., Moore, C. S., Stetten, G., Spencer, F., Dietz, H. C. (1999). Revised Genomic Organization ofFBN1and Significance for Regulated Gene Expression. Genomics, 56(1), 70-77.
22. Brautbar, A., LeMaire, S. A., Franco, L. M., Coselli, J. S., Milewicz, D. M., Belmont, J. W. (2010). FBN1 mutations in patients with descending thoracic aortic dissections. American Journal of Medical Genetics Part A, 152(2), 413-416.
23. Brinster DR, Rizzo RJ, Bolman RM III (2008). Ascending aortic aneurysm. New York: McGraw-Hill, 2008:1704.
24. Brooke, B. S., Habashi, J. P., Judge, D. P., Patel, N., Loeys, B., Dietz III, H. C. (2008). Angiotensin II blockade and aortic-root dilation in Marfan's syndrome. New England Journal of Medicine, 358(26), 2787-2795.

25. Bunton, T. E., Biery, N. J., Myers, L., Gayraud, B., Ramirez, F., Dietz, H. C. (2001). Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. Circulation research, 88(1), 37-43.
26. Carmeliet, P., Moons, L., Lijnen, R., Baes, M., Lemaitre, V., Tipping, P., et al (1997). Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. Nature genetics, 17(4), 439-444.
27. Chan. K.K., Rabkin. S.W. (2014).Increasing prevalence of hypertension among patients with thoracic aorta dissection: trends over eight decades – a structured meta-analysis. Am J Hypertens. 27(907) 17.
28. Chaudhry, S. S., Cain, S. A., Morgan, A., Dallas, S. L., Shuttleworth, C. A., Kielty, C. M. (2007). Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFβ1. J Cell Biol, 176(3), 355-367.
29. Cheifetz, S., Weatherbee, J. A., Tsang, M. L. S., Anderson, J. K., Mole, J. E., Lucas, et al. (1987). The transforming growth factor-β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. Cell, 48(3), 409-415.
30. Chung, A. W., Yang, H. C., Radomski, M. W., Van Breemen, C. (2008). Long-term doxycycline is more effective than atenolol to prievent thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and-9. Circulation research, 102(8), e73-e85.
31. Chung, A. W., Yeung, K. A., Sandor, G. G., Judge, D. P., Dietz, H. C., van Breemen, C. (2007). Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and-9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. Circulation research, 101(5), 512-522.
32. Clouse, W. D., Hallett, J. W., Schaff, H. V., Spittell, P. C., Rowland, C. M., Ilstrup, D., et al. (2004, February). Acute aortic dissection: population-based incidence compared with degenerative aortic aneurysm rupture. In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 79, No. 2, pp. 176-180). Elsevier.
33. Collod-Béroud, G., Le Bourdelles, S., Ades, L., Ala-Kokko, L., Booms, P., Boxer, M., et al. (2003). Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. Human mutation, 22(3), 199-208.
34. Curci, J. A., Petrinec, D., Liao, S., Golub, L. M., Thompson, R. W. (1998). Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic

aneurysms: a comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. Journal of vascular surgery, 28(6), 1082-1093.
35. Dai, J., Losy, F., Guinault, A. M., Pages, C., Anegon, I., Desgranges, P., et al. (2005). Overexpression of transforming growth factor-β1 stabilizes already-formed aortic aneurysms. Circulation, 112(7), 1008-1015.
36. Davis, E. C. (1993). Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 68(1), 89-99.
37. Defawe, O. D., Colige, A., Lambert, C. A., Munaut, C., Delvenne, P., Lapière, C. M.,et al. (2003). TIMP-2 and PAI-1 mRNA levels are lower in aneurysmal as compared to athero-occlusive abdominal aortas. Cardiovascular research, 60(1), 205-213.
38. Defawe, O. D., Colige, A., Lambert, C. A., Munaut, C., Delvenne, P., Lapière, C. M., et al. (2003). TIMP-2 and PAI-1 mRNA levels are lower in aneurysmal as compared to athero-occlusive abdominal aortas. Cardiovascular research, 60(1), 205-213.
39. Denton, C. P., Zheng, B., Evans, L. A., Shi-wen, X., Ong, V. H., Fisher, I., et al. (2003). Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II transforming growth factor β (TGFβ) receptor leads to paradoxical activation of TGFβ signaling pathways with fibrosis in transgenic mice. Journal of Biological Chemistry, 278(27), 25109-25119.
40. Détaint, D., Faivre, L., Collod-Beroud, G., Child, A. H., Loeys, B. L., Binquet, C., et al. (2010). Cardiovascular manifestations in men and women carrying a FBN1 mutation. European heart journal, ehq258.
41. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F., Wrana, J. L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-β receptor signalling and turnover. Nature cell biology, 5(5), 410-421.
42. Dickinson, M. E., Kobrin, M. S., Silan, C. M., Kingsley, D. M., Justice, M. J., Miller, et al. L. D. (1990). Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-β superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. Genomics, 6(3), 505-520.
43. Dietz, H. C. (2007). 2006 Curt Stern Award Address. The American Journal of Human Genetics, 81, 663.
44. Dietz, H. C., Cutting, G. R. (1991). Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. Nature, 352 (6333), 337.

45. Dietz, H. C., Loeys, B., Carta, L., Ramirez, F. (2005, November). Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. In American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics (Vol. 139, No. 1, pp. 4-9). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company.
46. Dillon, P. F., Aksoy, M. O., Driska, S. P., Murphy, R. A. (1981). Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science, 211*(4481), 495-497.
47. Dobrin, P. B., Baker, W. H., Gley, W. C. (1984). Elastolytic and collagenolytic studies of arteries: implications for the mechanical properties of aneurysms. Archives of Surgery, 119(4), 405-409.
48. Doyle, J. J., Gerber, E. E., Dietz, H. C. (2012). Matrix-dependent perturbation of TGFβ signaling and disease. FEBS letters, 586(14), 2003-2015.
49. Dumont, N., Bakin, A. V., Arteaga, C. L. (2003). Autocrine transforming growth factor-β signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. Journal of Biological Chemistry, 278(5), 3275-3285.
50. El-Hamamsy, I., Yacoub, M. H. (2009). Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. Nature Reviews Cardiology, 6(12), 771-786.
51. Everett, A. D., Tufro-McReddie, A., Fisher, A., Gomez, R. A. (1994). Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta 1 expression. Hypertension, 23(5), 587-592.
52. Faivre, L., Collod-Beroud, G., Callewaert, B., Child, A., Binquet, C., Gautier, E., et al. (2009). Clinical and mutation-type analysis from an international series of 198 probands with a pathogenic FBN1 exons 24–32 mutation. European Journal of Human Genetics, 17(4), 491-501.
53. Fatigati, V., , Murphy, R. A. (1984). Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. Journal of Biological Chemistry, 259(23), 14383-14388.
54. Feng, X. H., Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in TGF-β signaling through Smads. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 21, 659-693. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo Nature, 415 (2002), pp. 171–175
55. Flanders, K. C., Ludecke, G., Engels, S., Cissel, D. S., Roberts, A. B., Kondaiah, P. A. T., et al (1991). Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. Development, 113(1), 183-191.

56. Franken, R., den Hartog, A. W., de Waard, V., Engele, L., Radonic, T., Lutter, R., et al. (2013). Circulating transforming growth factor-β as a prognostic biomarker in Marfan syndrome. International journal of cardiology, 168(3), 2441-2446.
57. García-Alvarez, J., Ramirez, R., Checa, M., Nuttall, R. K., Sampieri, C. L., Edwards, D. R., et al. (2006). Tissue inhibitor of metalo-proteinase-3 is up-regulated by transforming growth factor-β 1 in vitro and expressed in fibroblastic foci in vivo in idiopathic pulmonary fibrosis. Experimental lung research, 32(5), 201-214.
58. Ghosh, A. K. (2002). Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. Experimental biology and medicine, 227(5), 301-314.
59. Guéripel, X., Benahmed, M., Gougeon, A. (2004). Sequential gonadotropin treatment of immature mice leads to amplification of transforming growth factor β action, via upregulation of receptor-type 1, Smad 2 and 4, and downregulation of Smad 6. Biology of reproduction, 70(3), 640-648.
60. Guo, D. C., Pannu, H., Tran-Fadulu, V., Papke, C. L., Robert, K. Y., Avidan, N., et al. (2007). Mutations in smooth muscle α-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. Nature genetics, 39(12), 1488-1493.
61. Guo, D., Hasham, S., Kuang, S. Q., Vaughan, C. J., Boerwinkle, E., Chen, H., et al. (2011). Familial thoracic aortic aneurysms and dissections. Circulation, 103(20), 2461-2468.
62. Halper, J., Kjaer, M. (2014). Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. In Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases (pp. 31-47). Springer Netherlands.
63. He, R., Guo, D. C., Estrera, A. L., Safi, H. J., Huynh, T. T., Yin, Z., et al. (2006). Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 131(3), 671-678.
64. Heerkens, E. H., Izzard, A. S., Heagerty, A. M. (2007). Integrins, vascular remodeling, and hypertension. Hypertension, 49(1), 1-4.
65. Hillebrand, M., Millot, N., Sheikhzadeh, S., Rybczynski, M., Gerth, S., Kölbel, T., et al. (2014). Total Serum Transforming Growth Factor-β1 Is Elevated in the Entire Spectrum of Genetic Aortic Syndromes. Clinical cardiology, 37(11), 672-679.

66. Hiratzka, L. F., Bakris, G. L., Beckman, J. A., Bersin, R. M., Carr, V. F., Casey, D. E., et al. Kouchoukos, N. T. (2010). 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with thoracic aortic disease. Journal of the American College of Cardiology, 55(14), e27-e129..
67. Holm, T. M., Habashi, J. P., Doyle, J. J., Bedja, D., Chen, Y., van Erp, C., et al. (2011). Noncanonical TGFβ signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. Science, 332(6027), 358-361.
68. Horiguchi, M., Ota, M., Rifkin, D. B. (2012). Matrix control of transforming growth factor-β function. Journal of biochemistry, 152(4), 321-329.
69. Howard, D. P., Banerjee, A., Fairhead, J. F., Perkins, J., Silver, L. E., Rothwell, P. M. (2013). Population-based study of incidence and outcome of acute aortic dissection and pre-morbid risk-factor control: 10-year results from the Oxford Vascular Study. Circulation, CIRCULATIONAHA-112.
70. Hutchinson, S., Wordsworth, P. B., Handford, P. A. (2001). Marfan syndrome caused by a mutation in FBN1 that gives rise to cryptic splicing and a 33 nucleotide insertion in the coding sequence. Human genetics, 109(4), 416-420.
71. Iakoubova, O. A., Tong, C. H., Rowland, C. M., Luke, M. M., Garcia, V. E., Catanese, J. J., et al. (2014). Genetic variants in FBN-1 and risk for thoracic aortic aneurysm and dissection. PloS one, 9(4), e91437.
72. Ihn, H. (2002). Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-β and CTGF. Current opinion in rheumatology, 14(6), 681-685.
73. Ikonomidis, J. S., Ruddy, J. M., Benton, S. M., Arroyo, J., Brinsa, T. A., Stroud, R. E., et al. (2012). Aortic dilatation with bicuspid aortic valves: cusp fusion correlates to matrix metalloproteinases and inhibitors. The Annals of Thoracic Surgery, 93(2), 457-463.
74. Ishii, T., Asuwa, N. (2000). Collagen and elastin degradation by matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in aortic dissection. Human pathology, 31(6), 640-646.
75. Yakymovych, I., ten Dijke, P., Heldin, C. H., Souchelnytskyi, S. (2001). Regulation of Smad signaling by protein kinase C. The FASEB Journal, 15(3), 553-555.
76. Yu, L., Hébert, M. C., Zhang, Y. E. (2002). TGF-β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-β responses. The EMBO journal, 21(14), 3749-3759.

77. Jones, J. A., Spinale, F. G., Ikonomidis, J. S. (2009). Transforming growth factor-β signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis. Journal of vascular research, 46(2), 119-137.
78. Kalluri, R., Han, Y. (2008). Targeting TGF-β and the extracellular matrix in Marfan's syndrome. Developmental cell, 15(1), 1-2.
79. Kelleher, C. M., McLean, S. E., Mecham, R. P. (2004). Vascular extracellular matrix and aortic development. Current topics in developmental biology, 62, 153-188.
80. Kessler, K., Borges, L. F., Ho-Tin-Noé, B., Jondeau, G., Michel, J. B., Vranckx, R. (2014). Angiogenesis and remodelling in human thoracic aortic aneurysms. *Cardiovascular research, 104*(1), 147-159.
81. Kielty, C. M., Sherratt, M. J., Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. Journal of cell science, 115(14), 2817-2828.
82. Kirsch, E. M., Radu, N. C., Gervais, M., Allaire, E., Loisance, D. Y. (2006). Heterogeneity in the remodeling of aneurysms of the ascending aorta with tricuspid aortic valves. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 132(5), 1010-1016.
83. Kodach, L. L., Wiercinska, E., De Miranda, N. F., Bleuming, S. A., Musler, A. R., Peppelenbosch, M. P., et al. (2008). The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. Gastroenterology, 134(5), 1332-1341.
84. Koli, K., Hyytiäinen, M., Ryynänen, M. J., Keski-Oja, J. (2005). Sequential deposition of latent TGF-β binding proteins (LTBPs) during formation of the extracellular matrix in human lung fibroblasts. Experimental cell research, 310(2), 370-382.
85. Kottler, U. B., Jünemann, A. G., Aigner, T., Zenkel, M., Rummelt, C., Schlötzer-Schrehardt, U. (2005). Comparative effects of TGF-β1 and TGF-β2 on extracellular matrix production, proliferation, migration, and collagen contraction of human Tenon's capsule fibroblasts in pseudoexfoliation and primary open-angle glaucoma. Experimental eye research, 80(1), 121-134.
86. Kropf, J., Schurek, J. O., Wollner, A., Gressner, A. M. (1997). Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1) in blood; assay development and comparison. Clinical Chemistry, 43(10), 1965-1974.
87. Krstic, J., Santibanez, J. F. (2014). Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. The Scientific World Journal, 2014.
88. Kwak, H. J., Park, M. J., Cho, H., Park, C. M., Moon, S. I., Lee, H. C., et al. (2006). Transforming growth factor-β1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular

signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. Molecular cancer research, 4(3), 209-220.
89. Lee, K. S., Seung-Hyun, H., Bae, S. C. (2002). Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-[beta] and bone morphogenetic protein. Oncogene, 21(47), 7156.
90. Leivonen, S. K., Chantry, A., Häkkinen, L., Han, J., Kähäri, V. M. (2002). Smad3 Mediates Transforming Growth Factor-β-induced Collagenase-3 (Matrix Metalloproteinase-13) Expression in Human Gingival Fibroblasts EVIDENCE FOR CROSS-TALK BETWEEN Smad3 AND p38 SIGNALING PATHWAYS. Journal of Biological Chemistry, 277(48), 46338-46346.
91. LeMaire, S. A., McDonald, M. L. N., Guo, D. C., Russell, L., Miller III, C. C., Johnson, R. J., et al. (2011). Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21. 1. Nature genetics, 43(10), 996-1000.
92. Lesauskaite V, Sinkunaite-Marsalkiene G, Tamosiunas A, Benetis R. Protective effects of angiotensin-converting enzyme I/I and matrix metalloproteinase-3 6A/6A polymorphisms on dilatative pathology within the ascending thoracic aorta. Eur J Cardiothorac Surg 2011; 40:23-7.
93. Lesauskaite, V., Epistolato, M. C., Castagnini, M., Urbonavicius, S., , Tanganelli, P. (2006). Expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors, and osteopontin in the wall of thoracic and abdominal aortas with dilatative pathology. Human pathology, 37(8), 1076-1084.
94. Lesauskaite, V., Sepetiene, R., Jariene, G., Patamsyte, V., Zukovas, G., Grabauskyte, et al. (2015). FBN1 polymorphisms in patients with the dilatative pathology of the ascending thoracic aorta. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, ezu520.
95. Lesauskaitė, V., Šinkūnaitė-Maršalkienė, G., Benetis, R., Grabauskas, V. J., Vaškelytė, J. J., Smalinskienė, A., et al. (2008). Matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism and dilatative pathology of ascending thoracic aorta. Medicina, 44(5), 386-391.
96. Lesauskaite, V., Tanganelli, P., Sassi, C., Neri, E., Diciolla, F., Ivanoviene, L., et al. (2001). Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. Human pathology, 32(9), 1003-1011.

97. Lijnen, P. J., Petrov, V. V., Fagard, R. H. (2000). Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-β 1. Molecular genetics and metabolism, 71(1), 418-435.
98. Liu, W., Qian, C., Comeau, K., Brenn, T., Furthmayr, H., Francke, U. (1996). Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. Human molecular genetics, 5(10), 1581-1587.
99. Loeys, B. L., Chen, J., Neptune, E. R., Judge, D. P., Podowski, M., Holm, T., et al. (2005). A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. Nature genetics, 37(3), 275-281.
100. Ludlam, C. A., Moore, S., Bolton, A. E., Pepper, D. S., Cash, J. D. (1975). The release of a human platelet specific protein measured by a radioimmunoassay. Thrombosis research, 6(6), 543-548.
101. Lutgens, E., Gijbels, M., Smook, M., Heeringa, P., Gotwals, P., Koteliansky, V. E., et al. (2002). Transforming growth factor-β mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 22(6), 975-982.
102. Matt, P., Schoenhoff, F., Habashi, J., Holm, T., Van Erp, C., Loch, D., et al. (2009). Circulating transforming growth factor-β in Marfan syndrome. Circulation, 120(6), 526-532.
103. McGettrick, A. J., Knott, V., Willis, A., Handford, P. A. (2000). Molecular effects of calcium binding mutations in Marfan syndrome depend on domain context. Human Molecular Genetics, 9(13), 1987-1994.
104. Meyer, A., Wang, W., Qu, J., Croft, L., Degen, J. L., Coller, B. S., et al. (2012). Platelet TGF-β1 contributions to plasma TGF-β1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload. Blood, 119(4), 1064-1074.
105. Milanković, I. L., Mijailović, N. V., Peulić, A. S., Nikolić, D., Končar, I., Exarchos, et al. (2015). Software and hardware systems for abdominal aortic aneurysm mechanical properties investigation. FME Transactions, 43(2), 161-167.
106. Milano, F., Van Baal, J. W., Buttar, N. S., Rygiel, A. M., De Kort, F., DeMars, C. J., et al. (2007). Bone morphogenetic protein 4 expressed in esophagitis induces a columnar phenotype in esophageal squamous cells. Gastroenterology, 132(7), 2412-2421.
107. Milewicz, D. M., Grossfield, J., Cao, S. N., Kielty, C., Covitz, W., Jewett, T. (1995). A mutation in FBN1 disrupts profibrillin processing and results in isolated skeletal features of the Marfan syndrome. Journal of Clinical Investigation, 95(5), 2373.

108. Milewicz, D. M., Guo, D. C., Tran-Fadulu, V., Lafont, A. L., Papke, C. L., Inamoto, et al. (2008). Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: focus on smooth muscle cell contractile dysfunction. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet, 9, 283-302.
109. Milewicz, D. M., Michael, K., Fisher, N., Coselli, J. S., Markello, T., Biddinger, A. (1996). Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. Circulation, 94(11), 2708-2711.
110. Mizuguchi, T., Collod-Beroud, G., Akiyama, T., Abifadel, M., Harada, N., Morisaki, et al. (2004). Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. Nature genetics, 36(8), 855-860.
111. Moiseeva, E. P. (2001). Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. Cardiovascular research, 52(3), 372-386.
112. Munger, J. S., Sheppard, D. (2011). Cross talk among TGF-β signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 3(11), a005017.
113. MWer, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids res, 16, 1215.
114. Nakamura, T., Lozano, P. R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., et al. (2002). Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. Nature, 415(6868), 171-175.
115. National centre for biotechnology information (NCBI); U.S. government-funded national resource for molecular biology information. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov.2015-03-04
116. Neptune, E. R., Frischmeyer, P. A., Arking, D. E., Myers, L., Bunton, T. E., Gayraud, et al,. (2003). Dysregulation of TGF-β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. Nature genetics, 33(3), 407-411.
117. Newman, J. H., Trembath, R. C., Morse, J. A., Grunig, E., Loyd, J. E., Adnot, S., et al. B. (2004). Genetic basis of pulmonary arterial hypertension. Journal of the American College of Cardiology, 43(12 Supplement), S33-S39.
118. Nistala, H., Lee-Arteaga, S., Smaldone, S., Siciliano, G., Carta, L., Ono, R. N., et al. (2010). Fibrillin-1 and-2 differentially modulate endogenous TGF-β and BMP bioavailability during bone formation. The Journal of cell biology, 190(6), 1107-1121.
119. O'Callaghan, C. J., Williams, B. (2000). Mechanical strain–induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells. Hypertension, 36(3), 319-324.
120. Ogawa, N., Imai, Y., Nishimura, H., Kato, M., Takeda, N., Nawata, K., et al. (2013). Circulating transforming growth factor β-1 level in

Japanese patients with Marfan syndrome. International heart journal, 54(1), 23-26.
121. Pannu, H., Chang, J., Lafont, A., Hasham, S. N., Sparks, E., Giampietro, P. F., et al. (2005). Mutations in transforming growth factor-β receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. Circulation, 112(4), 513-520.
122. Pardali, E., Goumans, M. J., ten Dijke, P. (2010). Signaling by members of the TGF-β family in vascular morphogenesis and disease. Trends in cell biology, 20(9), 556-567.
123. Parolari, A., Tremoli, E., Songia, P., Pilozzi, A., Di Bartolomeo, R., Alamanni, F., et al. (2013). Biological features of thoracic aortic diseases. Where are we now, where are we heading to: established and emerging biomarkers and molecular pathways. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, ezs647.
124. Peasey, A., Bobak, M., Kubinova, R., Malyutina, S., Pajak, A., Tamosiunas, A., et al. (2006). Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: rationale and design of the HAPIEE study. BMC Public Health, 6(1), 255.
125. Pepin, M., Schwarze, U., Superti-Furga, A., Byers, P. H. (2000). Clinical and genetic features of Ehlers–Danlos syndrome type IV, the vascular type. New England Journal of Medicine, 342(10), 673-680.
126. Pereira, L., D'Alessio, M., Ramirez, F., Lynch, J. R., Sykes, B., Pangilinan, T., et al. (1993). Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. Human molecular genetics, 2(7), 961-968.
127. Pereiralrz, L., Andrikopoulos, K., Tian, J. (1997). Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. Nature genetics, 17.
128. Petkevičienė, J., Klumbienė, J., Ramažauskienė, V., Kriaučionienė, V., Sakytė, E., Grabauskas, V. (2012). Diet and dyslipidemias in a Lithuanian rural population aged 25-64: the CINDI survey. Medicina (Kaunas, Lithuania), 48(4), 211-217.
129. Proetzel, G., Pawlowski, S. A., Wiles, M. V., Yin, M., Boivin, G. P., Howles, P. N., et al. (1995). Transforming growth factor-β3 is required for secondary palate fusion. Nature genetics, 11(4).
130. Ramanath, V. S., Oh, J. K., Sundt, T. M., , Eagle, K. A. (2009, May). Acute aortic syndromes and thoracic aortic aneurysm. In Mayo Clinic Proceedings (Vol. 84, No. 5, pp. 465-481). Elsevier.

131. Ramirez, F., Dietz, H. C. (2007). Fibrillin-rich microfibrils: Structural determinants of morphogenetic and homeostatic events. Journal of cellular physiology, 213(2), 326-330.
132. Ramirez, F., Sakai, L. Y. (2010). Biogenesis and function of fibrillin assemblies. Cell and tissue research, 339(1), 71.
133. Runyan, C. E., Schnaper, H. W., Poncelet, A. C. (2004). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway enhances Smad3-stimulated mesangial cell collagen I expression in response to transforming growth factor-β1. Journal of Biological Chemistry, 279(4), 2632-2639.
134. Saharinen, J., Taipale, J., Monni, O., Keski-Oja, J. (1998). Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-β-binding protein, LTBP-4. Journal of Biological Chemistry, 273(29), 18459-18469.
135. Sakai, L., Keene, D., Glanville, R., Morris, N., Bachinger, H. (1986) . Isolation and partial characterization of fibrillin, a component of extracellular microfibrils. Journal of cell biology, 103(5), A434-a434.
136. Sanderson, J. E. (1999). Evaluation of Diseases of the Aorta. Echocardiography in Adult Cardiac Surgery, 139.
137. Sangiorgi, G., Trimarchi, S., Mauriello, A., Righini, P., Bossone, E., Suzuki, T., et al. (2006). Plasma levels of metalloproteinases-9 and-2 in the acute and subacute phases of type A and type B aortic dissection. Journal of Cardiovascular Medicine, 7(5), 307-315.
138. Sengle, G., Charbonneau, N. L., Ono, R. N., Sasaki, T., Alvarez, J., Keene, D. R., et al. (2008). Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin. Journal of Biological Chemistry, 283(20), 13874-13888.
139. Sepetiene, R., Patamsyte, V., Zukovas, G., Jariene, G., Stanioniene, Z., Benetis, R., et al. (2015). Blood Plasma TGF-β1 Concentration in Sporadic Dilatative Pathology of Ascending Aorta: More Questions than Answers. PloS one, 10(6), e0129353.
140. Sepp, R., Szabo, I., Uda, H., Sakamoto, H. (1994). Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. Journal of clinical pathology, 47(4), 318-323.
141. Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T.,et al. (2011). Latent TGF-beta structure and activation. Nature, 474(7351), 343-349.
142. Sievers, H. H., Sievers, H. L. (2011). Aortopathy in bicuspid aortic valve disease–genes or hemodynamics? Or Scylla and Charybdis?
143. Sinha, S., Nevett, C., Shuttleworth, C. A., Kielty, C. M. (1998). Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-β binding proteins. Matrix biology, 17(8-9), 529-545.

144. Small, J. V., Gimona, M. (1998). The cytoskeleton of the vertebrate smooth muscle cell. Acta physiologica Scandinavica, 164(4), 341-348.
145. Smallridge, R. S., Whiteman, P., Doering, K., Handford, P. A., Downing, A. K. (1999). EGF-like domain calcium affinity modulated by N-terminal domain linkage in human fibrillin-1. Journal of molecular biology, 286(3), 661-668.
146. Suzuki, T., Trimarchi, S., Sawaki, D., Grassi, V., Costa, E., Rampoldi, V., et al. (2011). Circulating transforming growth factor-beta levels in acute aortic dissection. Journal of the American College of Cardiology, 58(7), 775-775.
147. Tang, P. C., Coady, M. A., Lovoulos, C., Dardik, A., Aslan, M., Elefteriades, J. A., et al. (2005). Hyperplastic cellular remodeling of the media in ascending thoracic aortic aneurysms. Circulation, 112(8), 1098-1105.
148. Ten Dijke, P., Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGFβ signalling in vascular development and disease. Nature reviews Molecular cell biology, 8(11), 857-869.
149. Tsai, T. T., Trimarchi, S., Nienaber, C. A. (2009). Acute aortic dissection: perspectives from the International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD). European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 37(2), 149-159.
150. Vale, R. D., Milligan, R. A. (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. Science, 288(5463), 88-95.
151. Vaninetti, S., Baccarelli, A., Romoli, R., Fanelli, M., Faglia, G., Spada, A. (2000). Effect of aging on serum gonadotropin levels in healthy subjects and patients with nonfunctioning pituitary adenomas. European journal of endocrinology, 142(2), 144-149.
152. Verrecchia, F., Mauviel, A. (2007). Transforming growth factor-beta and fibrosis. World journal of gastroenterology, 13(22), 3056-62.
153. UMD-FBN1, *žiūrėta 2015-11-10*
154. Wicks, S. J., Grocott, T., Haros, K., Maillard, M., Ten Dijke, P., Chantry, A. (2006). Reversible ubiquitination regulates the Smad/ TGF-β signalling pathway.
155. Wipff, P. J., Hinz, B. (2008). Integrins and the activation of latent transforming growth factor β1–an intimate relationship. European journal of cell biology, 87(8), 601-615.
156. Wipff, P. J., Rifkin, D. B., Meister, J. J., Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF-β1 from the extracellular matrix. The Journal of cell biology, 179(6), 1311-1323.

157. Wong, S. H., Hamel, L., Chevalier, S., Philip, A. (2000). Endoglin expression on human microvascular endothelial cells. European journal of biochemistry, 267(17), 5550-5560.
158. Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-b receptor. Nature, 370 (6488), 341-346
159. Xu, L. (2006). Regulation of Smad activities. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1759(11), 503-513.
160. Zhang, D., Li, J., Xu, G., Zhang, R., Zhou, C., Qian, Y., Qu, F. (2015). Follicle-stimulating hormone promotes age-related endometrial atrophy through cross-talk with transforming growth factor beta signal transduction pathway. Aging cell, 14(2), 284-287.
161. Zhang, H., Apfelroth, S. D., Hu, W., Davis, E. C., Sanguineti, C., Bonadio, J., et al. (1994). Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. The Journal of cell biology, 124(5), 855-863.
162. Zhang, H., Hu, W., Ramirez, F. (1995). Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. Journal of Cell Biology, 129(4), 1165.
163. Zhu, L., Vranckx, R., Van Kien, P. K., Lalande, A., Boisset, N., Mathieu, F., et al (2006). Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. Nature genetics, 38(3), 343-349
164. Zilberberg, L., Todorovic, V., Dabovic, B., Horiguchi, M., Couroussé, T., Sakai, L. et al. (2012). Specificity of latent TGF-β binding protein (LTBP) incorporation into matrix: Role of fibrillins and fibronectin. Journal of cellular physiology, 227(12), 3828-3836.

AUTORĖS PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

I. STRAIPSNIAI DISERTACIJOS TEMATIKA

1. Sepetiene, R., Patamsyte, V., Zukovas, G., Jariene, G., Stanioniene, Z., Benetis, R.,Tamosiunas, A., Lesauskaite, V. Association between fibrillin1 polymorphisms (rs2118181, rs10519177) and transforming growth factor β1 concentration in human plasma. Molecular medicine. 2015, vol. 21, p. 735-738.
2. Sepetiene, R., Patamsyte, V., Zukovas, G., Jariene, G., Stanioniene, Z., Benetis, R.,Tamosiunas, A., Lesauskaite, V. Blood plasma TGF-β1 concentration in sporadic dilatative pathology of ascending aorta: more questions than answers. PloS One. 2015, vol. 10, no. 6, p. 1-7.
3. Lesauskaite, V., Sepetiene, R., Jariene, G., Patamsyte, V., Zukovas, G., Grabauskyte, I., Stanioniene, Z., Sirmenis, R., Benetis, R. FBN1 polymorphisms in patients with the dilatative pathology of the ascending thoracic aorta. European journal of cardio-thoracic surgery. 2015, vol. 47, no. 4, p. e124-e130.
4. Šepetienė, R., Šimonytė, S., Lesauskaitė, V. Krūtinės aortos aneurizmos ir disekcijos genetinės priežastys. Genetic basis of thoraric aortic aneurysms and dissections / Ramunė Šepetienė, Sandrita Šimonytė, Vaiva Lesauskaitė. Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas. 2015, t. 19, Nr. 1, p. 27-32.

II. PRANEŠIMAI DISERTACIJOS TEMATIKA

1. Sepetiene, R. Association between FBN1 polymorphisms and TGF-β1 concentration within aneurysms and dissections of ascending thoracic aorta (oral presentation), Annual Congress on Rare Diseases & Orphan Drugs October 26–27, 2016 Chicago, USA (Sessions: Different types of Rare Diseases/ Clinical Research and Public Awareness Mystery Diagnosis of Rare Diseases, tesis at Journal of Genetic Syndromes & Gene Therapy , 2016, vol. 7, suppl. 5, p. 34-34.
2. Sepetiene, R. Cytokines and current research (oral presentation), International conference on autoimmunity “Explore the Research Challenges on Autoimmunity” : October 13-14, 2016, Manchester, UK. Sessions: Autoimmune Disease/Cytokines and Current Research/Autoimmunity and malignancy/ Tolerance of autoimmunity, tesis at Immunome Research, 2016, vol. 12, iss. 3, p. 33-33

3. Sepetiene, R., Patamsyte, V., Jariene, G., Zukovas, G., Stanioniene, Z., Tamosiunas, A., Benetis, R., Lesauskaite, V., Association between FBN1 polymorphisms (rs2118181, rs 10519177) and TGF-β1 concentration in human plasma, (oral and poster presentations) The Houston Aortic Symposium "Frontiers in Cardiovascular Diseases. The Eighth in the Series" : March 5, 6 & 7, 2015, Houston, Texas.
4. Basakirskaite, M.,; Sepetiene, R., Patamsyte, V., Zukovas, G., Jariene, G., Stanioniene, Z., Benetis R., Tamosiunas, A., Lesauskaite, V. Association between Fibrilin1 polymorphisms (rs2118181, rs10519177) and Transforming Growth Factor β-1 concentration in human plasma (poster presentation), VI Baltic Genetics Congress, September 30-October 3, 2015, Tartu, Estonia, tesis in book of Abstracts, 2015, p. 22.
5. Staneviciute, Z., Sepetiene, R., Patamsyte, V., Zukovas, G., Benetis, R., Lesauskaite, V. FBN1gene polymorphysms association with dilatative pathology of the ascending thoracic aorta (poster presentation), European Society of Human Genetics (ESHG). 2015 Glasgow, Scotland, UK, June 6-9, tesis at international conference abstracts and posters, 2015, 1 p, no. PM05.46/M.
6. Šepetienė, Ramunė; Patamsytė, Vaiva; Žukovas, Giedrius; Stanionienė, Zita; Benetis, Rimantas; Lesauskaitė, Vaiva. Krūtinės aortos dilatacinės patologijos (KADP) morfogenezė: fibrilino-1 vieno nukleotido polimorfizmų (VNP) ir TGF-β1 koncentracijos kraujo plazmoje tyrimas (žodinis pranešimas) VIII nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“ 2015 m. balandžio 10 d, Kaunas Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, tezių knyga, 2015, p. 111-112.
7. Šepetienė, Ramunė. Kylančiosios aortos dilatacinės patologijos morfogenezė: Fibrilino-1(FBN1) geno polimorfizmų ir transformuojančio augimo faktoriaus beta (TGF-beta1) sąsajų tyrimas (žodinis pranešimas), Jaunųjų mokslininkų konferencijos „BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“ 2015 m. gruodžio 10 d, Lietuvos mokslų akademijos Biologijos, medicinos ir geomokslų skyrius. Vilnius, pranešimų tezės, 2015, p. 13-13.
8. Patamsyte, V., Sepetiene, R., Grabauskyte, I., Lesauskaite, V., Citokine TGF-β1 – a potential diagnostic biomarker for Cardiovascular patients (poster presentation), XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society “50th anniversary of FEBS“, June 18-20, 2014, Birštonas, Lithuania : Abstracts book p. 21-22.
9. Šepetienė, Ramunė; Jarienė, Giedrė; Patamsytė, Vaiva; Stanionienė, Zita; Lesauskaitė, Vaiva. Kylančiosios aortos dilatacinės patologijos morfogenezė: transformuojančio augimo faktoriaus beta (TGF-beta1) koncentracijos tyrimas (žodinis pranešimas), VII nacionalinė dokto-

rantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“ : konferencijos pranešimų tezės 2014 m. balandžio 09 d, Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, tezių knyga, 2014, p. 86-87, Nr. 8.

10. Jariene, G., Sepetiene, R., Zukovas, G., Juskaite, E., Stanionienė, Z., Benetis, R., Lesauskaite, V., Development of sporadic dilatative pathology of ascending thoracic aorta (DPATA): impact of Fibrillin-1(FBN1) polymorphysms (rs1036477, rs10519177, rs755251, and rs2118181) (poster presentation), ESHG – European Human Genetics Conference 2013 : June 8–11, 2013, Paris, France, abstract book, 2013, vol. 21, suppl. 2, June, p. 70-71,
11. Jariene, G., Sepetiene, R., Zukovas; Plesnyte, K., Juskaite, E., Baronas, K., Sinkunaite-Marsalkiene, G., Benetis, R., Stanioniene, Z., Simonyte, S., Lesauskaite, V. *FBN1* rs1036477 rs2118181 gene polymorphism associated with dilatative pathology of thoracic aorta (poster presentation), The Houston Aortic Symposium Frontiers in Cardiovascular Diseases. March 22–24, 2012, Houston, Texas
12. Jariene, G., Sepetiene, R., Zukovas; Plesnyte, K., Juskaite, E., Baronas, K., Sinkunaite-Marsalkiene, G., Benetis, R., Stanioniene, Z., Simonyte, S., Lesauskaite Influence of MMP-3 and FBN1 to ascending thoracic aortae dilatation pathology (poster presentation), 4th Joint Scandinavian Conference in Cardiothoracic Surgery, 16–18 ofAugust 2012. Final Program and Abstract Book, 2012, Vilnius, Lithuania, p. 76.

III. KITOS PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI

1. Biesevičienė, M., Lesauskaitė, V., Vaškelytė, J. J., Mizarienė, V., Vasiljevaite, K., Šepetienė, R. Krūtinės aortos dilatacija – genetinių rizikos veiksnių paieška ir sąsajos su aortos biomechanikos rodikliais. Lietuvos bendrosios praktikos gydytojas. 2017, t. 21, Nr. 4.
2. Šepetienė, R. Imunohematologo požiūris į vaisiaus hemolizinės ligos laboratorinę diagnostiką. Laboratory medicine. 2012, t. 14, Nr. 2(54), p. 95-98.
3. Derkač, I.,; Janulevičienė, I., Šepetienė, R., Laurinavičiūtė, G., Veličkienė, D., Genų CEP 135 ir NPY2R polimorfizmų bei ragenos popamatinio nervinio rezginio tankio vertinimas pacientams, sergantiems greitai progresuojančia bei įprastos eigos diabetine retinopatija. X nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas – sveikatai“ : konferencijos tezių knyga : 2017 balandžio 07 d. Kaunas, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2017. p. 28-29.

European Journal of Cardio-Thoracic Surgery 47 (2015) e124–e130
doi:10.1093/ejcts/ezu520 Advance Access publication 12 January 2015

ORIGINAL ARTICLE

Cite this article as: Lesauskaite V, Sepetiene R, Jariene G, Patamsyte V, Zukovas G, Grabauskyte I *et al*. *FBN1* polymorphisms in patients with the dilatative pathology of the ascending thoracic aorta. Eur J Cardiothorac Surg 2015;47:e124–e30.

FBN1 polymorphisms in patients with the dilatative pathology of the ascending thoracic aorta

Vaiva Lesauskaite[a,*], Ramune Sepetiene[a], Giedre Jariene[a], Vaiva Patamsyte[a], Giedrius Zukovas[b], Ingrida Grabauskyte[a], Zita Stanioniene[a], Raimondas Sirmenis[c] and Rimantas Benetis[a,b]

[a] Institute of Cardiology of the Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
[b] Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
[c] Heart Surgery Center, Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, Vilnius, Lithuania

* Corresponding author. Head of Laboratory of Molecular Cardiology, Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickevičiaus 9, LT-44307 Kaunas, Lithuania. Tel: +37-037-327204; fax: +37-037-220733; e-mail: vaiva.lesauskaite@lsmuni.lt (V. Lesauskaite).

Received 4 September 2014; received in revised form 28 November 2014; accepted 10 December 2014

Abstract

OBJECTIVES: To investigate polymorphisms of the fibrillin-1 (*FBN1*) gene (namely, rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs755251 and rs4774517) in a case-control study for dilatative pathology of the ascending thoracic aorta (DPATA) from Lithuanians.

METHODS: We studied 312 patients who had undergone aortic reconstructive surgery for DPATA. These patients were sub-divided according to the phenotypes of their DPATA into (i) ascending aortic aneurysm ($n = 160$), (ii) post-stenotic dilatation of the ascending aorta due to aortic valve stenosis ($n = 79$) and (iii) Stanford A dissection ($n = 73$). The reference group ($n = 472$) was recruited from a random sample screened within epidemiological studies of the Lithuanian population. *FBN1* polymorphisms were studied by real-time polymerase-chain-reaction amplification.

RESULTS: Patients within the aortic dissection sub-group had significantly higher minor allele frequencies in all five *FBN1* single nucleotide polymorphism (SNPs) studied versus reference group subjects ($P < 0.0001$). Minor allele frequencies in SNPs rs2118181, rs1036477 were significantly higher in those with aortic aneurysm when compared with the reference group ($P = 0.007$). Thus, minor alleles of *FBN1* SNPs studied were significantly associated with aortic dissection with odds ratios (ORs) 2.59–2.13, $P < 0.001$, while SNPs rs2118181 and rs1036477 with an increased risk of ascending aortic aneurysm [OR 1.67, confidence interval (CI) 95% 1.61–2.40]. The association of *FBN1* genotypes with each phenotype of DPATA was assessed using logistic regression models adjusted for gender, age and hypertension. The additive model best fitted SNPs rs2118181 and rs1036477 in association with the ascending aortic aneurysm sub-group (OR 1.70, CI 95% 1.17–2.46) or the Stanford A dissection sub-group (OR 2.64, CI 95% 1.66–4.19). A recessive model fitted best the association between SNPs rs10519177, rs755251, rs4774517 and Stanford A dissection (OR 4.31, CI 95% 2.06–9.01). There were no significant associations between all studied *FBN1* SNPs and post-stenotic or bicuspid aortic dilatation.

CONCLUSIONS: Our study provides evidence for the following: (i) *FBN1* SNPs rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs4774517, rs755251 may increase susceptibility to aortic dissections and (ii) *FBN1* SNPs rs2118181, rs1036477 to the formation of aortic aneurysms. Thus, these SNPs might be considered as biomarkers for identifying patients at risk for ascending aortic aneurysm and aortic dissection.

Keywords: Thoracic aorta • Aneurysm • Dissection • *Fibrillin-1* • Polymorphisms

INTRODUCTION

The aetiology and pathogenesis of dilatative pathology within the ascending thoracic aorta (DPATA) remain under discussion. In most cases, the causes leading to such pathology of the aortic wall remain unclear. Only in certain cases is the condition caused by aortitis, atherosclerosis or inherited as a single gene mutation. In these cases, the mutations are in the fibrillin (*FBN*) genes (e.g. Marfan syndrome) [1]; inherited collagen mutations (e.g. Ehler–Danlos syndrome) [2]; by mutations of the transforming growth factor-beta gene causing Loeys–Dietz syndrome [3] or by actin gene mutations [4]. Evidence has shown that *FBN1* mutations may predispose one to DPATA in the absence of phenotypic characteristics of Marfan syndrome [5, 6]. Recently, published data from the genome-wide association study (GWAS) identified novel associations of *FBN1* SNPs at chromosome 15q21.1: namely, rs1036477, rs2118181, rs10519177, rs4774517, rs755251, with sporadic DPATA [7]. These data extend knowledge of the molecular pathways leading to sporadic thoracic disease, and may connect it with a model of Marfan syndrome.

© The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery. All rights reserved.

The aim of our case-control study was to evaluate the association of single nucleotide polymorphism (SNPs) identified in GWAS [7] within different phenotypes of DPATA in a population sample from Lithuania.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

The study included 338 patients who underwent the aortic reconstruction after diagnosis of DPATA at the Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery of the Lithuanian University of Health Sciences (LUHS), Kaunas, from 2004 to 2014 and at the Heart Surgery Center of Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos from 2012 to 2014, in Vilnius, Lithuania. The diagnosis of DPATA and type of aortic valves (bicuspid or tricuspid) had been confirmed by transthoracic echocardiography [8] before surgery and by direct inspection during surgical repair. History of hypertension was assessed by the review of each patient's medical history. Histopathological investigation was carried out of all aortic specimens obtained during surgery. The patients with aortitis ($n = 14$), Marfan syndrome ($n = 4$), severe atherosclerosis showing ulcerating plaques of the ascending aorta ($n = 6$) and reoperated patients after Ross procedure ($n = 2$) have been excluded from further study, leaving 312 in the final study sample. These patients were sub-divided into sub-groups according to the phenotypes of their DPATA into (i) ascending aortic aneurysm ($n = 160$), (ii) post-stenotic dilatation of the ascending aorta due to aortic valve stenosis ($n = 79$) and (iii) Stanford A dissection ($n = 73$).

For this DPATA study, we evaluated a control reference group ($n = 472$) matched by age and gender to the DPATA study patients (Table 1). A frequency-matching design was used during construction of the reference group. The reference group was recruited from a random sample of the population of Kaunas screened within the international HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe) study [9], World Health Organisation CINDI (Countrywide Integrated Non-communicable Diseases Intervention) programme [10] and the Kaunas Healthy ageing study. The latter study included inhabitants of Kaunas aged 65 years and older. They were randomly selected from the population registry of Kaunas.

Information on hypertension (e.g. systolic blood pressure >140 mmHg and/or diastolic blood pressure >90 mmHg; whether the person had taken antihypertensive drugs within the prior 2 weeks) was taken from the epidemiological screening data.

Ethical approval was obtained from the Ethics Committee of the Lithuanian Health Science University (No: BE-2-12) and all subjects provided written informed consent for participation in the study.

Determination of genotypes

Genomic DNA was isolated as previously described [11]. The genotyping of *FBN1* SNPs rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs4774517, rs755251 was performed according to the manufacturer's instructions by using commercially available kits from Applied Biosystem (Foster City, CA, USA): C_16234705_10 (rs2118181), C_1865677_10 (rs1036477), C_8932690_10 (rs10519177), C_28032458_20 (rs4774517), C_1132304_10 (rs755251). Genotyping was carried out by using ABI 7900HT real-time PCR Thermocycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) at the laboratory of Molecular Cardiology of the Institute of Cardiology of the LUHS.

Statistical analysis

The non-parametric Kruskal–Wallis test was used for the comparison of age between groups. Mean aortic diameter was compared by *t*-test for independent samples. χ^2 test or two-tailed Fisher's exact test was applied to analyse categorical data. χ^2 test was used to test deviation of genotype distribution from the Hardy–

Table 1: Demographic and clinical characteristics of study participants

Characteristics	Aneurysm ($n = 160$)	Post-stenotic dilatation ($n = 79$)	Stanford A dissection ($n = 73$)	Total ($n = 312$)	Reference ($n = 472$)
Age, years					
Min/max/median	18/83/60	27/81/65[a]	24/84/62	18/84/62	25/83/61
Gender					
Male, *n* (%)	135 (84.4)	57 (72.2)	54 (74.0)	246 (78.8)	372 (78.8)
Hypertension					
Yes, *n* (%)	120 (75.0)	62 (78.5)	70 (95.9)[b]	252 (80.7)	352 (74.6)
Aortic valve					
Bicuspid, *n* (%)	79 (49.4)[c]	58 (73.4)	4 (5.5)[d]	140 (44.9)	–
Prosthesis, *n* (%)	0	0	3 (4.1)	3 (0.9)	–
No data, *n* (%)	–	–	7 (9.6)	7 (2.2)	472 (100.0)
Diameter (mm, mean ± SD)					
Aortic sinuses	45.5 ± 7.2[e]	40.3 ± 7.5	44.2 ± 9.1[f]	43.8 ± 8.0	–
Ascending aorta	48.4 ± 8.8	47.4 ± 5.9	50.3 ± 11.1	48.5 ± 8.7	–

[a]$P = 0.004$ versus reference group, accepted as statistically significant (Kruskal–Wallis test).
[b]$P = 0.0001$ versus reference group, accepted as statistically significant (the two-tailed Fisher's exact test).
[c]$P < 0.001$ versus post-stenotic dilatation group, accepted as statistically significant (the two-tailed Fisher's exact test).
[d]$P < 0.0001$ versus post-stenotic dilatation group, accepted as statistically significant (the two-tailed Fisher's exact test).
[e]$P < 0.001$ versus post-stenotic dilatation group, accepted as statistically significant (*t*-test for independent samples).
[f]$P < 0.01$ versus post-stenotic dilatation group, accepted as statistically significant (*t*-test for independent samples).

Weinberg equilibrium, which predicts how gene frequencies will be transmitted from generation to generation in the absence of disturbing factors. Consistency of genotypes with Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) indicates that the population from which the subjects are selected is attributed to random mating, and is sufficiently large, while deviations from Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.05$) among control subjects can be due to inbreeding, population stratification or selection [12]. Allelic association odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) was used for each *FBN1* SNP's minor allele to determine the odds for development of an ascending aortic aneurysm, post-stenotic dilatation or aortic dissection. The association of genotypes with each phenotype of DPATA was assessed using logistic regression models adjusted for gender, age and hypertension. The ORs (95% CI) for polymorphisms were calculated using recessive (wild-type homozygous + heterozygous versus minor allele homozygous), dominant (wild-type homozygous versus heterozygous + minor allele homozygous), codominant (wild-type homozygous versus heterozygous; wild-type homozygous versus minor allele homozygous) and additive inheritance models. For multiple comparisons of the *FBN1* SNPs studied, we used a significance value corrected by the Bonferroni approach. This adjustment was done for *FBN1* SNPs (rs218181, rs1036477, rs10519177, rs755251 and rs4774517), resulting in a 'corrected' significance threshold of $\alpha = 0.01$ (0.05/5) for genetic data.

Akaike information criterion (AIC) was used to choose the inheritance model that best fitted the data. The model with the lowest AIC value was judged to fit best. Statistical analyses were done using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) statistical package (version 12.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

The clinical and demographic characteristics of study participants are given in Table 1. Patients in the post-stenotic dilatation sub-group were the oldest. They were significantly older ($P = 0.004$) than reference group subjects as well. A history of hypertension was more commonly reported in patients within the Stanford A dissection sub-group than in the other two sub-groups with aortic pathology or for the reference group. Males outnumbered females in all the study groups. The patients within the post-stenotic dilatation sub-group had a bicuspid aortic valve significantly more often than patients from either the aneurysm or Stanford A dissection sub-groups. They also have significantly smaller mean diameter of aortic sinuses in comparison with the aneurysm or aortic dissection sub-groups.

The distribution of genotypes was consistent with Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.15$) in all the groups studied. Minor allele frequency (MAF) and allelic association ORs are presented in Table 2. Patients operated upon due to ascending thoracic aorta aneurysms or Stanford A dissections had significantly higher minor allele frequencies in *FBN1* SNPs rs2118181 and rs1036477 than in reference group subjects (0.16 and 0.23 vs 0.10, $P \leq 0.007$, respectively). Minor allele frequencies in SNPs rs10519177, rs755251 and rs4774517 were also significantly higher in those with Stanford A dissections when compared with those in the reference group (0.40 vs 0.24, $P < 0.0001$, respectively). Thus minor alleles of SNPs rs2118181 and rs1036477 appeared to be associated significantly with an increased risk of ascending thoracic aortic aneurysm (OR 1.67, CI 95% 1.61–2.40) or Stanford A aortic dissection (OR 2.59, CI 95% 1.67–4.01), while SNPs rs10519177, rs755251 and rs4774517 were only associated significantly with Stanford A aortic dissection (OR 2.13, CI 95% 1.48–3.08).

Analysis of the distribution of genotypes in all five *FBN1* SNPs investigated detected only significant differences between Stanford A dissection and in reference group subjects (Table 3). The difference ($P = 0.019$) between distribution of rs2118181, rs1036477 genotypes in aneurysm sub-group and in reference group subjects did not reach the adjusted significance threshold ($P < 0.01$). There were no significant differences in the distribution of genotype frequency in patients with post-stenotic dilatation and in the reference group. In addition, we compared the ages of patients operated upon due to aortic pathology with respect to the studied genotypes. Homozygous carriers of the minor alleles (rs10519177, rs755251 and rs4774517) were younger individuals than those who were heterozygous or wild-type homozygous (range, 24–80 years, median age, 57 vs range, 32–84 years, median age, 65 years, $P = 0.01$, respectively) in the Stanford A dissection sub-group. There were no other significant differences in age with regard to the genotypes and phenotype of aortic pathology.

Finally, we analysed associations between phenotypes of DPATA and investigated *FBN1* SNPs by inheritance models (Table 4). The additive model fitted best for SNPs rs2118181 and

Table 2: Minor allele frequency (MAF) of genotyped fibrillin-1 (*FBN1*) SNPs and associations between phenotypes of dilatative pathology within ascending thoracic aorta and reference group

SNPs	Aneurysm group		Post-stenotic dilatation group		Stanford A dissection group		Reference group	
	MAF	OR (CI, 95%)	MAF	OR (CI, 95%)	MAF	OR (CI, 95%)	MAF	OR (CI, 95%)
rs2118181 rs1036477	0.16[a]	1.67 (1.61–2.40) $P = 0.005$	0.14	1.39 (0.84–2.31) $P = 0.20$	0.23[b]	2.59 (1.67–4.01) $P < 0.001$	0.10	1.00
rs10519177 rs755251 rs4774517	0.28	1.25 (0.94–1.66) $P = 0.13$	0.24	1.01 (0.68–1.49) $P = 0.98$	0.40[b]	2.13 (1.48–3.08) $P < 0.001$	0.24	1.00

Bonferroni-corrected significance threshold $P < 0.01$.
OR: odds ratio; CI: confidence interval.
[a]$P = 0.007$ versus MAF in reference group.
[b]$P < 0.0001$ versus MAF in reference group.

Table 3: *FBN1* SNP's (rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs4774517, rs755251) genotype distribution among DPATA patients and reference group subjects from the Lithuanian population

Investigated group, *n*	Genotype	Genotype frequency, *n* (%)		
		rs2118181 rs1036477	rs755251 rs10519177	rs4774517
Aneurysm (*n* = 160)	AA	112 (70.4)	83 (52.5)	14 (8.9)
	GA	42 (26.4)	61 (38.6)	61 (38.6)
	GG	5 (3.2)	14 (8.9)	83 (52.5)
P-value		0.019	0.254	0.254
Post-stenotic dilatation (*n* = 79)	AA	56 (74.7)	47 (59.5)	6 (7.6)
	GA	17 (22.7)	26 (32.9)	26 (32.9)
	GG	2 (2.6)	6 (7.6)	47 (59.5)
P-value		0.362	0.657	0.657
Stanford A dissection (*n* = 73)	AA	44 (60.3)	28 (39.4)	14 (19.7)
	GA	24 (32.9)	29 (40.9)	29 (40.9)
	GG	5 (6.8)	14 (19.7)	28 (39.4)
P-value		<0.001	<0.001	<0.001
Reference (*n* = 472)	AA	378 (80.1)	272 (57.6)	26 (5.5)
	GA	89 (18.9)	174 (36.9)	174 (36.9)
	GG	5 (1.0)	26 (5.5)	272 (57.6)

Aneurysm group: patients with missing values on rs2118181 (*n* = 1) and rs10519177, rs4774517 (*n* = 2) were excluded from analysis. Post-stenotic dilatation group: 4 patients with missing value on rs2118181 were excluded from analysis. Stanford A dissection group: 2 patients with missing values on rs10519177 and rs4774517 were excluded from analysis. *P*-value versus reference group after Bonferroni correction (<0.01).
DPATA: dilatative pathology of ascending thoracic aorta.

Table 4: Associations between DPATA phenotypes and genotyped *FBN1* SNPs (*rs2118181*, *rs1036477*, *rs10519177*, *rs4774517*, *rs755251*)

SNPs	Model	Aneurysm				Post-stenotic dilatation				Stanford A dissection			
		OR	CI, 95%	*P*-value	AIC	OR	CI, 95%	*P*-value	AIC	OR	CI, 95%	*P*-value	AIC
rs2118181	Dominant	1.75	1.15–2.64	0.008	702.00	1.31	0.74–2.32	0.352	440.41	2.61	1.54–4.45	<0.001	404.15
rs1036477	Recessive	2.96	0.83–10.43	0.092	706.20	3.04	0.56–16.56	0.199	439.85	10.27	2.46–42.93	0.001	403.31
	Additive	1.70	1.17–2.46	0.005	700.98	1.36	0.82–2.27	0.239	439.93	2.64	1.66–4.19	<0.001	400.04
	Codominant				702.90				441.43				400.89
	GA	1.65	1.08–2.54	0.022		1.22	0.67–2.22	0.509		2.23	1.27–3.90	0.005	
	GG	3.32	0.94–11.78	0.063		3.15	0.58–17.23	0.185		12.59	2.98–53.09	0.001	
rs10519177	Dominant	1.25	0.87–1.80	0.239	704.09	0.89	0.55–1.45	0.642	457.37	1.93	1.15–3.24	0.013	398.67
rs755251	Recessive	1.76	0.88–3.50	0.107	703.02	1.37	0.54–3.48	0.509	457.18	4.31	2.06–9.01	<0.001	391.46
	Additive	1.27	0.95–1.70	0.111	702.96	0.97	0.66–1.45	0.904	457.57	2.03	1.38–2.98	<0.001	391.88
	Codominant				704.47				458.69				391.62
	GA	1.16	0.78–1.70	0.459		0.83	0.50–1.40	0.488		1.48	0.84–2.59	0.174	
	GG	1.87	0.92–3.78	0.083		1.28	0.50–3.31	0.612		5.15	2.34–11.31	<0.001	
rs4774517	Dominant	1.25	0.87–1.80	0.239	704.09	0.89	0.55–1.45	0.642	457.37	1.93	1.15–3.24	0.013	398.67
	Recessive	1.76	0.88–3.50	0.107	703.02	1.37	0.54–3.48	0.509	457.18	4.31	2.06–9.01	<0.001	391.46
	Additive	1.27	0.95–1.70	0.111	702.96	0.97	0.66–1.45	0.904	457.57	2.03	1.38–2.98	<0.001	391.88
	Codominant				704.47				458.69				391.62
	GA	1.16	0.78–1.70	0.459		0.83	0.50–1.40	0.488		1.48	0.84–2.59	0.174	
	AA	1.87	0.92–3.78	0.083		1.28	0.50–3.31	0.612		5.15	2.34–11.31	<0.001	

Adjusted by age, gender and hypertension. Bonferroni-corrected significance threshold $P < 0.01$.
DPATA: dilatative pathology of ascending thoracic aorta; OR: odds ratio; CI: confidence interval; AIC: Akaike information criterion.

rs1036477 association with the ascending thoracic aortic aneurysm sub-group (OR 1.70, CI 95% 1.17–2.46) or the Stanford A dissection sub-group (OR 2.64, CI 95% 1.66–4.19). A recessive model fitted best in describing the association between SNPs rs10519177, rs755251 rs4774517 and Stanford A dissection (OR 4.31, CI 95% 2.06–9.01). We also grouped all patients studied to tricuspid and bicuspid aorta sub-groups (Table 5). The codominant model fitted best for SNPs rs2118181 and rs1036477 association with dilated tricuspid aorta sub-group. So, in the tricuspid aorta sub-group, homozygous carriers of minor alleles had more than eight times higher odds for DPATA than wild-type homozygous carriers (OR 8.38, CI 95% 2.71–25.95, $P < 0.001$). Significant associations were described also by dominant, recessive and additive models. An additive model fitted best in

Table 5: Associations between DPATA with tricuspid and bicuspid aortic valves and genotyped *FBN1* SNPs

SNPs	Model	Tricuspid				Bicuspid			
		OR	CI, 95%	*P*-value	AIC	OR	CI, 95%	*P*-value	AIC
rs2118181	Dominant	1.96	1.31–2.93	0.001	695.91	1.61	1.03–2.53	0.038	627.35
rs1036477	Recessive	7.49	2.43–23.11	<0.001	693.01	1.02	0.19–5.43	0.986	631.55
	Additive	2.03	1.43–2.86	<0.001	690.69	1.49	0.99–2.24	0.058	628.06
	Codominant				689.90				629.16
	GA	1.65	1.08–2.53	0.022		1.65	1.04–2.61	0.033	
	GG	8.38	2.71–25.95	<0.001		1.13	0.21–6.07	0.886	
rs10519177	Dominant	1.19	0.83–1.72	0.347	709.55	1.34	0.91–1.97	0.142	638.45
rs755251	Recessive	3.26	1.80–5.91	<0.001	685.86	1.13	0.49–2.63	0.778	640.53
	Additive	1.41	1.07–1.86	0.015	684.54	1.24	0.90–1.70	0.185	638.87
	Codominant				687.65				640.44
	GA	0.91	0.61–1.36	0.646		1.35	0.90–2.01	0.147	
	GG	3.14	1.70–5.81	<0.001		1.28	0.54–3.03	0.577	
rs4774517	Dominant	1.19	0.83–1.72	0.347	709.55	1.34	0.91–1.97	0.142	638.45
	Recessive	3.26	1.80–5.91	<0.001	685.86	1.13	0.49–2.63	0.778	640.53
	Additive	1.41	1.07–1.86	0.015	684.54	1.24	0.90–1.70	0.185	638.87
	Codominant				687.65				640.44
	GA	0.91	0.61–1.36	0.646		1.35	0.90–2.01	0.147	
	AA	3.14	1.70–5.81	<0.001		1.28	0.54–3.03	0.577	

Adjusted by age, gender and hypertension. Bonferroni-corrected significance threshold $P < 0.01$
DPATA: dilatative pathology of ascending thoracic aorta; OR: odds ratio; CI: confidence interval; AIC: Akaike information criterion.

describing the association between SNPs rs10519177, rs755251, rs4774517 and DPATA with tricuspid aortic valves (OR 1.41, CI 95% 1.07–1.86, $P = 0.015$), but it did not reach Bonferroni-corrected significance threshold ($P < 0.01$), while significant association was described by the recessive model (OR 3.26, CI 95% 1.80–5.91, $P < 0.001$). In bicuspid aorta, sub-group-dominant model fitted best in describing association between *FBN1* SNPs rs2118181 and rs1036477 and DPATA (OR 1.61, CI 95% 1.03–2.53, $P = 0.038$). It also did not reach Bonferroni-corrected significance threshold ($P < 0.01$).

DISCUSSION

Attention to the *FBN1* SNPs (rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs4774517, rs755251) was generated by GWAS, which identified these five SNPs to be associated with sporadic thoracic aortic aneurysms and dissection [7]. Recently, however, a Yale study published data that could only replicate 'in part' these data from the GWAS [13]. The Yale study found only an association of *FBN1* rs2118181 with thoracic aortic dissection.

In order to further investigate the GWAS study, we studied *FBN1* SNPs (rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs4774517, rs755251) in a case-control sample from Lithuania. Our study included patients with different 'sub-group' phenotypes of DPATA; these were namely, (i) chronic ascending aortic aneurysm without dissection, (ii) aortic dilatation associated with valvular stenosis and (iii) Stanford A dissection and compared these sub-groups with a reference group constructed from randomly gathered samples of the Lithuanian population that had been prescreened by epidemiological studies. Demographic characteristics (median age 62 years, males outnumbered females) of those patients studied with DPATA are similar to those reported in overviews [7, 14] or in the International Registry of Acute Aortic Dissection [15]. Among clinical factors, arterial hypertension is indicated as the most common clinical risk condition for aortic dissection [15] and over the last 8 decades its prevalence has been increasing in these patients [16]. According to our data, the highest prevalence of hypertension was registered among patients with Stanford A aortic dissection in comparison with other patients with DPATA or with reference group subjects as well.

It is well-known that a bicuspid aortic valve is associated with the formation of an ascending aortic aneurysm [14]. Our results are in line with these data. Almost half of the patients operated on for ascending aortic aneurysms and three-fourths of the patients with aortic dilatation as a result of valvular stenosis were found to possess bicuspid aortic valves. According to our data, the association between *FBN1* SNPs studied and DPATA depends on the type of aortic valve. We did not find significant association between these SNPs and bicuspid aorta dilatation. So, it can be suggested that other than the *FBN1* SNPs studied, signalling pathways and genetic mechanisms might be involved in the morphogenesis of bicuspid aorta dilatation.

Our data demonstrated that all five *FBN1* SNPs studied were associated with a Stanford A dissection. Those patients operated on for Stanford A dissections had an MAF significantly higher than reference group subjects. In a manner similar to the GWAS data [7], rs2118181 and rs1036477 were most significantly associated with Stanford A dissection (minor allele association OR 2.59, 95% CI 1.67–4.01, $P < 0.001$). In contrast to the Yale study [13] and in line with GWAS, we also identified significant association of the minor alleles, rs10519177, rs4774517 and rs755251 (OR 2.13, 95% CI 1.48–3.08, $P < 0.001$) with Stanford A aortic dissections and both rs2118181 and rs1036477 with ascending thoracic aortic aneurysms (OR 1.67, 95% CI 1.61–2.40, $P = 0.005$). Thus, our data show that the minor alleles of all five *FBN1* SNPs we investigated might be considered as risk alleles for Stanford A aortic dissection, while the minor alleles, rs2118181 and rs1036477, are also risk alleles for the development of ascending thoracic aortic aneurysms. Homozygous carriers of risk alleles in all five SNPs we

investigated were significantly more common in the Stanford A dissection sub-group than in the reference group. Moreover, for homozygous carriers of the risk alleles rs10519177, rs4774517, rs755251, Stanford A aortic dissections developed at a significantly younger age than for carriers of other genotypes (median age 57 years vs 65 years, $P = 0.01$), but at an older age than reported for patients with Marfan syndrome (35 years, interquartile range 29–44 years) [17]. In general, aortic dissection tends to occur at a younger age in patients with connective tissue disorders than in sporadic cases [18]. We did not find significant differences in the distribution of minor alleles or genotypes in patients with post-stenotic dilatation and the reference sample. Most of the patients with post-stenotic dilatation had bicuspid aortic valves (73.4%). This might in part explain a lack of association between *FBN1* SNPs studied and post-stenotic dilatation. Perhaps, however, other genetic factors or haemodynamic forces have greater impact on the development of post-stenotic dilatations of the ascending aorta rather than *FBN1* mutations.

Finally, we applied logistic regression to evaluate the association between the risk genotypes (codominant model) or risk variant carrier status (dominant, recessive and additive models) with different sub-group phenotypes of DPATA versus the reference group. The additive model was the best fit for the SNPs rs2118181 and rs1036477 in association with ascending thoracic aortic aneurysms or Stanford A dissections (OR 1.70, CI 95% 1.17–2.46 and OR 2.64, CI 95% 1.66–4.19, respectively). This implies that each copy of the minor allele modifies the risk in additive form, that is, those homozygous for the minor allele have double the risk than someone who is heterozygous. The recessive model best fitted the association between the SNPs rs10519177, rs755251, rs4774517 and Stanford A dissections (OR 4.31, CI 95% 2.06–9.01). This implies that homozygous carriers of the minor allele have more than 4-fold higher odds to develop a Stanford A dissection. Similar data analysis was done in the Yale study [13]. They found only significant association between rs2118181 risk genotypes (wild-type homozygous versus heterozygous), risk variant carrier status (dominant and additive models) with aortic dissections. So, a significant association between *FBN1* SNPs rs2118181 minor alleles with aortic dissection was demonstrated by three studies—GWAS [7], Yale study [13] and by our data. Our study also replicated GWAS [7] data, indicating significant association between *FBN1* SNPs rs2118181 with aortic aneurysms and rs10519177 with Stanford A aortic dissections. However, we did not find significant association between rs10519177 and non-dissecting aneurysms, as it had been reported in GWAS [7]. It might be summarized that all three studies obtained similar results for the Stanford A aortic dissection group and the most striking differences were in the non-dissecting aortic aneurysm group. The Yale study did not find an association between those with *FBN1* SNPs (rs2118181, rs10519177) and non-dissecting aneurysms at all [16]. It might be speculated that the aortic dissection group in all three studies is more clinically homogenous in comparison with the non-dissecting aneurysm group. So, more detailed clinical data on the patients with non-dissecting aneurysms are required to compare the results of these studies.

According to our data frequency of rs2118181, rs1036477 and rs10519177, rs4774517, rs755251 wild-type homozygous genotypes were ~60 and 40% in the Stanford A aortic dissection sub-group, respectively (Table 3). In addition, we checked the number of patients with aortic dissection that were free from the risk alleles in all the five SNPs that we genotyped. Almost one-third of the patients with aortic dissection (31%) were wild-type homozygous in all genotyped *FBN1* SNPs. This suggests that for these patients, aortic dissection developed in the absence of a risk allele. These data stress once more that aortic aneurysms and/or dissections represent a complex pathological process and various clinical and biological factors might either increase or decrease their respective risks [19].

The study has some limitations. Reference group was constructed from a random sample of the population without pre-screening by thransthoracic echocardiography to evaluate ascending aorta. So, we have no information about aortic measurements in risk allele carriers from the reference group, nor survey data of these subjects. Clinically advanced patients with DPATA were included in the study. Thus, our data reflect an association of *FBN1* SNPs with clinically advanced DPATA.

The role of the biomarkers in thoracic aortic aneurysms is still under debate for routine patient screening, identification of patients at risk or prediction of clinical course of aortic aneurysm [20]. Our study provides further evidence that *FBN1* SNPs *rs2118181*, *rs1036477*, *rs10519177*, *rs4774517*, *rs755251* may increase susceptibility to aortic dissections and *FBN1* SNPs rs2118181 and rs1036477 to the formation of aortic aneurysms. Thus, these SNPs might be considered as biomarkers for identifying patients at risk for ascending aortic aneurysm and aortic dissection. The aortic dissection development in the absence of these risk alleles stresses that aortic dissection is a complex pathological process and various clinical and biological factors might impact its respective risk.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank George Markelonis for editorial help.

Funding

Financial support for the study was provided by the Research Council of Lithuania for National Research Programme 'Chronic Noncommunicable Diseases' (Agreement No. LIG 05/2012).

Conflict of interest: none declared.

REFERENCES

[1] Aoyama T, Francke U, Dietz HC, Furthmayr H. Quantitative differences in biosynthesis and extracellular deposition of fibrillin in cultured fibroblasts distinguish five groups of Marfan syndrome patients and suggest distinct pathogenetic mechanisms. J Clin Invest 1994;94:130–7.

[2] Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. Clinical and genetic features of Ehlers–Danlos syndrome type IV, the vascular type. N Engl J Med 2000;342:673–80.

[3] Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. Nat Genet 2005;37:275–81.

[4] Guo DC, Pannu H, Tran-Fudulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N *et al.* Mutations in smooth muscle α-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. Nat Genet 2007;39:1488–93.

[5] Milewicz DM, Michael K, Fisher N, Coselli JS, Markello T, Biddinger A. Fibrillin-1 (FBN1) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. Circulation 1996;94:2708–11.

[6] Brautbar A, LeMaire SA, Franco LM, Coselli JS, Milewicz DM, Belmont JW. FBN1 mutations in patients with descending thoracic aortic dissections. Am J Med Genet A 2010;152:413–6.

[7] LeMaire SA, McDonald ML, Guo DC, Russell L, Miller CC 3rd, Johnson RJ *et al.* Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21.1. Nat Genet 2011;43:996–1000.

[8] Evangelista A, Flachskampf FA, Erbel R, Antonini-Canterin F, Vlachopoulos C, Rocchi G *et al.* European Association of Echocardiography; Echocardiography in aortic diseases: EAE recommendations for clinical practice. Eur J Echocardiogr 2010;11:645–58.
[9] Peasey A, Bobak M, Kubinova R, Malyutina S, Pajak A, Tamosiunas A *et al.* Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: rationale and design of the HAPIEE study. BMC Public Health 2006;6:2551.
[10] Petkevičienė J, Klumbienė J, Ramažauskienė V, Kriaučionienė V, Sakytė E, Grabauskas V. Diet and dyslipidemias in a Lithuanian rural population aged 25–64: the CINDI survey. Medicina (Kaunas) 2012;48:211–7.
[11] Lesauskaite V, Sinkunaite-Marsalkiene G, Tamosiunas A, Benetis R. Protective effects of angiotensin-converting enzyme I/I and matrix metalloproteinase-3 6A/6A polymorphisms on dilatative pathology within the ascending thoracic aorta. Eur J Cardiothorac Surg 2011;40:23–7.
[12] Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. Nat Rev Genet 2006;7:781–91.
[13] Iakoubova OA, Tong CH, Rowland CM, Luke MM, Garcia VE, Catanese JJ *et al.* Genetic variants in FBN1 and risk for thoracic aortic aneurysm and dissection. PLoS One 2014; doi:10.1371/journal.pone.0091437.
[14] Brinster DR, Rizzo RJ, Bolman RM III. Ascending Aortic Aneurysm. New York: McGraw-Hill, 2008:1704.
[15] Tsai TT, Trimarchi S, Nienaber CA . Acute aortic dissection: perspectives from the International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD). Eur J Vasc Endovasc Surg 2009;37:149–59.
[16] Chan KK, Rabkin SW. Increasing prevalence of hypertension among patients with thoracic aorta dissection: trends over eight decades—a structured meta-analysis. Am J Hypertens 2014;27:907–17.
[17] Détaint D, Faivre L, Collod-Beroud G, Child AH, Loeys BL, Binquet C *et al.* Cardiovascular manifestations in men and women carrying a FBN1 mutation. Eur Heart J 2010;31:2223–9.
[18] LeMaire SA, Russell L. Epidemiology of thoracic aortic dissection. Nat Rev Cardiol 2011;8:103–13.
[19] Sievers HH, Sievers HL. Aortopathy in bicuspid aortic valve disease—genes or hemodynamics? or Scylla and Charybdis? Eur J Cardiothorac Surg 2011;39:803–4.
[20] Parolari A, Tremoli E, Songia P, Pilozzi A, Di Bartolomeo R, Alamanni F *et al.* Biological features of thoracic aortic diseases. Where are we now, where are we heading to: established and emerging biomarkers and molecular pathways. Eur J Cardiothorac Surg 2013;44:9–23.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Blood Plasma TGF- β1 Concentration in Sporadic Dilatative Pathology of Ascending Aorta: More Questions than Answers

Ramune Sepetiene[1]*, Vaiva Patamsyte[1], Giedrius Zukovas[2], Giedre Jariene[1], Zita Stanioniene[1], Rimantas Benetis[1,2], Vaiva Lesauskaite[1]

1 Institute of Cardiology of the Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Sukileliu 17, Kaunas, Lithuania, **2** Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 2, Kaunas, Lithuania

* sepetiene@yahoo.co.uk

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Sepetiene R, Patamsyte V, Zukovas G, Jariene G, Stanioniene Z, Benetis R, et al. (2015) Blood Plasma TGF- β1 Concentration in Sporadic Dilatative Pathology of Ascending Aorta: More Questions than Answers. PLoS ONE 10(6): e0129353. doi:10.1371/journal.pone.0129353

Academic Editor: Hiromi Yanagisawa, UT-Southwestern Med Ctr, UNITED STATES

Received: January 6, 2015

Accepted: May 7, 2015

Published: June 23, 2015

Copyright: © 2015 Sepetiene et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data are included within the manuscript.

Funding: Funding was provided by the Research Council of Lithuania for National Research Programme "Chronic Noncommunicable Diseases" (Agreement No LIG 05/2012).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Transforming growth factor β1 (TGF- β1) is a cytokine that participates in a broad range of cellular regulatory processes and is associated with various diseases including aortic aneurysm. Increased TGF- β1 levels are associated with Marfan syndrome (MFS) caused by *FBN1* mutations and subsequent defects in signaling system. We studied TGF- β1 levels in 62 patients with sporadic, non syndromic, dilatative pathology of ascending aorta (DPAA) and in reference group subjects (n = 212). An initial screening of 212 reference individuals identified TGF- β1 gender discrepancies and age-dependent cytokine increase in women. Patients with DPAA had increased levels of TGF- β1 in comparison to reference group subjects (median 7.7 ng/ml, range 2.1–25.3, and median 6.2 ng/ml, range 1.0–33.1, respectively). There is a significant association between TGF-β1 concentration and DPAA (OR 1.084, CI 1.027–1.144, p = 0.004) but the mechanisms of cause and effect have not been established yet. Slightly increased TGF-β1 concentrations in patients with sporadic DPAA in comparison to the reference subjects show a potential use of TGF-β1 as a biomarker for the disease. However, cytokine dependence on age, gender, and other unknown factors among individuals with no cardiovascular complains reduces its specificity for DPAA. We would also like to raise awareness regarding the choice of methods when measuring TGF-β1 levels with an emphasis on preanalytical phase and the choice of sample.

Introduction

Marfan syndrome (MFS) is caused by mutations in the fibrillin-1 encoding gene *FBN1*. It has been discovered that fibrillin-1 regulates the bioavailability of transforming growth factor –β1 (TGF-β1) [1]. The latter is a member of TGF- β pluripotent cytokine family involved in tissue morphogenesis and homeostasis [2]. Moreover, an altered TGF-β signaling contributes significantly to the pathology of MFS [1]. In humans, circulating total TGF- β1 concentrations are elevated in patients with MFS in comparison to control individuals; in addition, correlation

between circulating TGF-β1 levels and aortic root diameters in MFS mutant *Fbn1*(C1039G/+) and wild-type mice is observed [3]. Recent studies demonstrate that Smad-independent TGF-β signaling has an essential function in aneurysm morphogenesis in MFS mice [4].

Hillebrand et al. (2014) demonstrated that TGF-β1 increase was observed not only in MFS patients, but also in other genetic aortic syndromes [5]. Considering the role of *FBN1* polymorphisms for sporadic thoracic aneurysm and dissection [6,7] we analysed TGF-β1 concentrations in blood plasma from patients with sporadic dilatative pathology of ascending aorta and reference group subjects.

Methods

Study subjects

The study included 62 patients (median age 59 years, range 27–79) operated at the Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery of the Lithuanian University of Health Science (LUHS) in 2013–2014 years due to (a) ascending aortic aneurysm (AAA) (n = 35), (b) post-stenotic dilatation (PSD) of the ascending aorta due to aortic valve stenosis (n = 21), and (c) Stanford A dissection (SAD), acute event (n = 6). Clinical characteristics of study subjects are presented in Table 1. PSD group featured 19 individuals (90%) with bicuspid aortic valve, one individual (5%) with a pseudobicuspid valve and the remaining one (5%) with a tricuspid aortic valve. The diagnosis was confirmed by transthoracic echocardiography before the surgery and/or by direct inspection during surgical repair. Clinical information on concomitant or intercurrent diseases was assessed by reviewing each patient's medical history. Only 11% of the patients had no other apart from DPAA. Most commonly reported concomitant or intercurrent diseases are presented in Table 1. Histopathological investigation was carried out on all aortic specimens obtained during surgery. Exclusion criteria were phenotypic features of Marfan syndromes, aortitis and ulcerating atherosclerosis of the ascending aorta.

A reference group was recruited from a randomised cluster sampling of local population (n = 212). One cluster consisted of students and staff volunteers from LUHS (n = 72, median age 49 years, range 23–67) and the second cluster consisted of volunteers (n = 140, median age 65 years, range 41–87) appointed to their physician in Dainavos outpatient's clinic (Kaunas).

Table 1. Concomitant or intercurrent diseases in patients with dilatative pathology of ascending aorta (DPAA) and in Reference group subjects.

Concomitant or intercurrent diseases	DPAA (n = 62), n (%)			Reference group (n = 212), n (%)
	SAD n = 6	PSD n = 21	AAA n = 35	
Age (years)	54 (46–59)	60 (27–75)	59 (30–78)	62 (23–87)
Gender	M = 4 (66.7%)	M = 15 (71.4%)	M = 30 (85.7%)	M = 105 (49.5%)
	F = 2 (33.3%)	F = 6 (28.6%)	F = 5 (14.3%)	F = 107 (50.5%)
Coronary artery disease	2 (33.3%)*	11 (52.4%)*	14 (40.0%)*	1 (0.4%)
Hypertension	4 (66.7%)*	14 (66.7%)*	30 (85.7%)*	71 (31.3%)
Atrial fibrillation	2 (33.3%)*	2 (9.5%)*	6 (17.1%)*	-
Diabetes mellitus	-	1 (4.8%)*	-	1 (0.4%)
Urinary system pathology	-	-	4 (11.4%)*	2 (0.9%)
Gastrointestinal and biliary system pathology	1 (16.7%)*	3 (14.3%)*	9 (25.7%)*	7 (3.1%)
Locomotion system pathology	-	-	-	6 (2.6%)
Respiratory system pathology	1 (16.7%)*	-	1 (2.9%)*	2 (0.9%)

*percentage is calculated for each subgroup cases

SAD—Stanford A dissection; PSD—Post Stenotic Dilatation; AAA—Ascending Aortic Aneurysm

doi:10.1371/journal.pone.0129353.t001

All volunteers completed questionnairs on the state of their health. Overall majority (63.9%) had no complains about their health state. Most commonly reported diseases are presented in Table 1. Neither of the included subjects reported having cancer or autoimmune diseases, associated with increased TGF-β1 level.[8]

Ethical approval was obtained from the Ethics Committee of the Lithuanian Health Science University (No: BE-2-12) and all subjects provided written informed consent for participation in the study.

TGFß1 quantitative detection

Blood samples from DPAA patients were obtained before the surgery and our reference group gave blood at the time of arrival. Blood was collected using 3ml Venosafe blood collection tubes containing 5.9 mg K2EDTA (Terumo Europe, Belgium). Plasma was obtained within 2 hours by spinning for 15 min at 2500 rpm, aliquoted and stored frozen at -20°C. Plasma samples were tested in duplicate using eBioscience Platinum (Bender Med Systems GmbH, Austria) human TGF-β1 ELISA kit based on standard sandwich enzyme-linked immune-sorbent assay technology according to manufacturers' instructions. Absorbance was measured using Stat-fax 4200 microplate reader using 450 nm as a primary wave length. Manufacturers indicated cross reactivity with TGF-β2 and TGF-β3 was less than 0.01%.

Statistical analysis

Non-parametric Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis. Spearman's rank order correlation was used to evaluate the effects of age and gender on TGF-β1 levels. The association of TGF- β1 concentration with DPAA was assessed using logistic regression model adjusted for gender and age. Statistical significance was set at $p = 0.05$.

Results

The reference group ($n = 212$) consisted of 105 males and 107 females (Table 1). Overall distribution of TGF-β1 values is shown in Fig 1. The lowest TGF-β1 concentration was 1.0 ng/ml and the highest was 33 ng/ml. Coefficient variation of results did not exceed the 4% detection limit of human TGF-β1 determined to be on average 8.6 ng/ml by six independent assays (Human TGF-β1 platinum ELISA product information and manual). Investigation of the reference group indicated higher TGF-β1 concentration ($p = 0.017$) in males (median 7.27 ng/ml, range 1.00–33.12) compared to females (median 5.38 ng/ml, range 1.10–21.20) (Table 2). TGF-β1 level showed a tendency to increase with age in women ($R = 0.338$, $p<0.001$) but was steady in men ($R = 0.105$, $p = 0.288$) throughout lifetime. These results indicate that age and gender can be confounding effects when comparing TGF-β1 levels between the study groups.

Patients with Stanford A dissection had slightly higher TGF-β1 concentration, but there were no significant differences in TGF-β1 concentration between patients with various phenotypes of DPAA or between each phenotype and the reference group subjects. Overall, patients with DPAA had significantly higher TGF-β1 concentration than the reference group (Table 3). Differences in TGF-β1 values between DPAA males (median 7.60 ng/ml) and the reference male population (median 7.27 ng/ml) were not statistically significant ($p = 0.135$) whereas concentration between females in DPAA (median 8.80 ng/ml) and the reference group (median 5.38 ng/ml) were confidently higher ($p = 0.004$). Finally, we analyzed association between TGF-β1 concentration and DPAA which resulted in odds ratio (OR) 1.084 (95% confidence interval 1.027–1.144, $p = 0.004$).

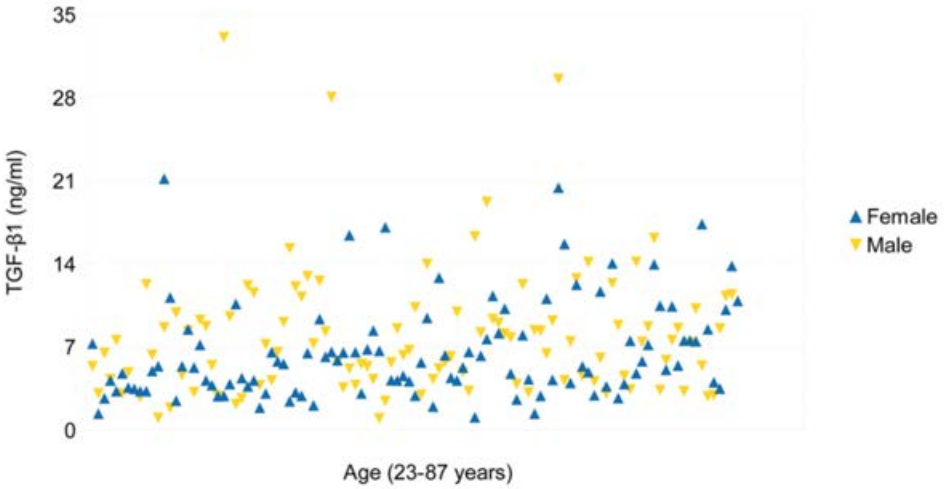


Fig 1. TGF-β1 concentration in the reference group according to the gender and age.

doi:10.1371/journal.pone.0129353.g001

Discussion and Conclusions

Recent studies draw attention to the role of TGF-β1 signaling system for aortic dilatation in MFS [3] or other genetic aortic syndromes [5]. We analyzed blood plasma TGF-β1 concentration in patients with sporadic dilatative pathology of ascending aorta and in the reference group subjects. For the first time we reported irregularity of TGF-β1 concentration in blood plasma caused by age and gender in subjects from the reference group. TGF-β1 concentration in males did not change with age and was significantly higher in comparison to females, while TGF-β1 concentration in females showed a significant increase due to older age. The latter phenomenon might be attributed to TGF-β1 signaling system activation by follicle-stimulating hormone (FSH) [9, 10]. It is well known that levels of FSH in females increase at perimenopausal age and decline only in the eighth/ninth decade [11]. FSH regulates post-menopausal endometrial atrophy by blocking TGF-β1 receptor II and blocking Smad2/3 activation pathway. FSH inhibitory action could compromise the ability of TGF-β1 to enter a cell and lead to an accumulation of TGF-β1 in blood plasma [9].

We gathered information on TGF-β1 concentrations in Marfan syndrome patients with DPAA and controls from previous studies and summarized it in Table 4. Higher TGF-β1

Table 2. Age and gender distribution among DPAA and Reference groups.

Group	Male	Female	Age (yrs) median (range)
DPAA (N = 62)	49	13	59 (27–79)
Reference (N = 212)	105	107	62 (23–87)

DPAA—Dilatative pathology of ascending aorta

doi:10.1371/journal.pone.0129353.t002

Table 3. TGF-β1 concentration in patients with variuos phenotypes of dilatative pathology of ascending thoracic and reference group subjects.

TGF-β1	Stanford A dissection, n = 6	Post stenotic dilatation, n = 21	Aneurysm n = 35	Total n = 62	Reference group, n = 212
Median range) ng/ml	10.1 (6.58–17.6)	7.7 (2.1–22.0)	7.8 (2.3–25.3)	7.7 (2.1–25.3)*	6.2 (1.0–33.1)

*p = 0,010 versus Reference group

doi:10.1371/journal.pone.0129353.t003

concentrations were reported in studies where blood serum was used. This phenomenon could be attributed to the presence of platelets which contain β-granules rich in TGF-β1 [12]. TGF-β1 concentration in serum accounts for both, the amount of cytokine in the systemic circulation and the amount released from platelet α-granules during clotting process [13]. TGF-β1 concentration detected in serum should be referred critically due to the strong positive correlation between platelet count and the serum concentration of TGF-β1 [14]. TGF-β1 variation among studies (Table 4) illustrates the importance of the blood sample used for testing and should always be taken into account when comparing results from different studies.

Our estimation of circulating TGF-β1 levels can be compared with the results reported by Matt and colleagues [3] since both studies used human blood plasma to obtain measurements. We obtained higher TGF-β1 values in the reference group compared to the latter study which could be attributed to the selection of the study subjects. Our reference group was three times larger and over a third of participants reported their health complains (Table 1). Some individuals with extremely high TGF-β1 values were not excluded from further analysis in order to evaluate TGF-β1 specificity in a real-life situation. This could partially explain why the cytokine values in our reference group were higher than the ones reported by Matt et al. [3].

Studies using both human blood plasma and serum indicate increased TGF-β1 values in Marfan patients with DPAA [3, 5, 14, 15]. We show that non-marfanoid patients with DPAA also have elevated plasma levels of TGF-β1 compared to the reference group. Patients with Stanford A dissection have particularly high TGF-β1 concentrations in comparison to patients with other phenotypes of DPATA. Such an increase could be caused by the liberation of TGF-β1 into the plasma from activated platelets during acute aortic rupture. Thus, we conclude that platelet activation might have an impact on the TGF-β1 concentration in blood plasma.

Standard methodical steps are used when measuring TGF-β1 concentration including acid activation and neutralisation with subsequent incubation and washing application to obtain

Table 4. Data on TGF-β1 concentration in patients with DPATA and controls.

Marfan Syndrome	Control group	Plasma/ Serum	Assay/kit	Reference
43.78 ng/ml in dissection group	25.7 ng/ml	Serum	R&D Systems, Minneapolis, USA	Agg *et al*., 2014 [12]
31.64 ng/ml in annuloaortic ectasia group				
15 ng/ml in MFS without cardiovascular therapy	2.5 ng/ml	Plasma	R&D Systems, Minneapolis, USA	Matt *et al*., 2009 [3]
44.4 ng/ml	Without genetic aortic syndrome 32 ng/ml	Serum	R&D Systems, Minneapolis, USA	Hillerbrand *et al*., 2014 [5]
109 pg/ml	54 pg/ml	Plasma (?)	Bio-Rad, Richmond, Canada	Franken *et al*., 2013 [13]
1.31 ng/ml	1.17 ng/ml	Plasma	Mesco Scale Discovery, Gaithesburg, MD, USA	Ogawa *et al*., 2012 [14]

doi:10.1371/journal.pone.0129353.t004

active TGF-β1. Unfortunately, none of the commercially available tests have been evaluated by standardised method comparison methodology [16]. To avoid misevaluation of cytokine levels strict preanalytical procedures are recommended: (i) special venipuncture without a tourniquet [17] and (ii) detection of markers for platelet degranulation (e.g. platelet factor 4) simultaneously with TGF-β1 [12, 18] in order to reduce errors in preanalytical phase. The choice of experimental design could explain the discrepancies among the results reported in the Marfan studies (Table 4). Our study limitation is the fact that we did not carry out simultaneous measurements of markers for platelet degranulation so the effect of platelet activation on TGF-β1 concentration in blood plasma was not controlled analytically. Secondly, patients with DPAA had high prevalence (89%) of concomitant or intercurrent diseases which also might have an impact on higher levels of TGF-β1.

We reported a significant association between TGF-β1 concentration and DPAA but the mechanisms of cause and effect have not been established yet. Slightly increased TGF-β1 concentration in patients with sporadic DPAA in comparison to the reference subjects requires further investigation to establish its role in sporadic DPAA pathogenesis. We would also like to raise awareness regarding the choice of methods when measuring TGF-β1 levels with an emphasis on preanalytical phase and the choice of sample.

Acknowledgments

Financial support for the study was provided by the Research Council of Lithuania for National Research Programme "Chronic Noncommunicable Diseases" (Agreement No LIG 05/2012).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RS VP GJ VL. Performed the experiments: RS VP. Analyzed the data: RS VP ZS VL. Contributed reagents/materials/analysis tools: RS VP GZ GJ ZS RB VL. Wrote the paper: RS VP VL.

References

1. Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA, et al. (2007) Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. J Cell Biol 176: 355–367. PMID: 17242066
2. Barrett PM., Topol EJ (2012) The fibrillin-1 gene: unlocking new therapeutic pathways in cardiovascular disease. Heart 99: 83–90. doi: 10.1136/heartjnl-2012-301840 PMID: 22942299
3. Matt P, Schoenhoff F, Habashi J, Holm T, Van Erp C, et al. (2009) Circulating transforming growth factor-β in Marfan syndrome. Circulation 120: 526–532. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841981 PMID: 19635970
4. Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, Bedja D, Chen Y, et al. (2011) Noncanonical TGFβ signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. Science 332: 358–361. doi: 10.1126/science.1192149 PMID: 21493862
5. Hillebrand M, Millot N, Sheikhzadeh S, Rybczynski M, Gerth S, et al. (2014)Total serum transforming growth factor-β1 is elevated in the entire spectrum of genetic aortic syndromes. Clin Cardiol 37 (11): 672–9. doi: 10.1002/clc.22320 PMID: 25113270
6. LeMaire SA, McDonald ML, Guo DC, Russell L, Miller CC 3rd, et al. (2011) Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and dissections spanning FBN1 at 15q21.1. Nat Genet 43:996–1000. doi: 10.1038/ng.934 PMID: 21909107
7. Lesauskaite V, Sepetiene R, Jariene G, Patamsyte V, Zukovas G et al. (2014) *FBN1* polymorphisms in patients with the dilatative pathology of the ascending thoracic. urJ Cardiothorac Surg, in press.
8. Bierie B, Moses HL (2010) "Transforming growth factor beta (TGF-β) and inflammation in cancer." *Cytokine & growth factor reviews* 21.1: 49–59
9. Zhang D, Li J, Xu G, Zhang R, Zhou C, et al. (2014) Follicle-stimulating hormone promotes age-related endometrial atrophy through cross-talk with transforming growth factor beta signal transduction pathway. Aging Cell. Available: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/acel.12278/full. Accessed 2014 Dec 16.

10. Gueripel X, Benahmed M, Gougeon A (2003) Sequential gonadotropin treatment of immature mice leads to amplification of transforming growth factor beta action, via upregulation of receptor-type 1, Smad 2 and 4, and downregulation of Smad 6. Biol Reprod 70:640–648. PMID: 14585817

11. Vaninetti S, Baccarelli A, Romoli R, Fanelli M, Faglia G et al. (2000) Effect of aging on serum gonadotropin levels in healthy subjects and patients with nonfunctioning pituitary adenomas. Eur J Endocrinol 142:144–149. PMID: 10664522

12. Assoian RK, Sporn MB (1986) Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. J Cell Biol 102: 1217–1223. PMID: 3457014

13. Meyer A, Wang W, Qu J, Croft L, Degen JL, et al. (2012). Platelet TGF-β1 contributions to plasma TGF-β1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload. Blood, 119(4): 1064–1074. doi: 10.1182/blood-2011-09-377648 PMID: 22134166

14. Agg B, Benke K, Szilveszter B, Polos M, Daroczi L, et al. (2014) Possible extracardiac predictors of aortic dissection in Marfan syndrome. BMC Cardiovasc Disord 14: 47. Available: http://www.biomedcentral.com/1471-2261/14/47. Accessed 2014 Dec 16. doi: 10.1186/1471-2261-14-47 PMID: 24720641

15. Franken R, den Hartog AW, de Waard V, Engele L, Radonic T, et al. (2013) Circulating transforming growth factor-β as a prognostic biomarker in Marfan syndrome. Int J Cardiol 168: 2

16. Kropf J, Schurek JO, Wollner A, Gressener AM (1997) Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in blood; assay development and comparison. Clin Chem 43: 1965–1974. 441–2446. PMID: 9342020

17. Ludlam CA, Moore S, Bolton AE, Pepper DA, Cash JD (1975) The release of a human platelet specific protein measured by a radioimmunoassay. Thromb Res 6: 543–548. PMID: 1154329

18. Ogawa N, Imai Y, Nishimura H, Kato M, Takeda N, et al. (2013) Circulating Transforming Growth Factor β-1 Level in Japanese Patients With Marfan Syndrome. Int Heart J 54: 23–26. PMID: 23428920

Molecular Medicine

Association between *Fibrillin1* Polymorphisms (rs2118181, rs10519177) and Transforming Growth Factor β1 Concentration in Human Plasma

Ramune Sepetiene,[1] Vaiva Patamsyte,[1] Giedrius Zukovas,[2] Giedre Jariene,[1] Zita Stanioniene,[1] Rimantas Benetis,[1,2] Abdonas Tamosiunas,[1] and Vaiva Lesauskaite[1]

[1]Institute of Cardiology of the Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania; and [2]Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery, Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

Transforming growth factor (TGF)-β1 is a cytokine that participates in a broad range of cellular regulatory processes and is associated with various diseases including aortic aneurysm. Increased TGF-β1 levels are linked to Marfan syndrome (MFS) caused by *fibrillin1* (*FBN1*) mutations and subsequent defects in signaling system. *FBN1* single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs2118181 and rs1059177 do not cause MFS but are associated with dilative pathology of aortic aneurysms (DPAAs). TGF-β1 and *FBN1* SNPs rs2118181 and rs1059177 are potential biomarkers for early diagnosis of DPAA. We investigated the relationship between TGF-β1 levels in human blood plasma and *FBN1* rs2118181 and rs1059177 in 269 individuals. The results showed a quantitative dependence of SNP genotype and TGF-β1 concentration. Presence of a single rs2118181 minor allele (G) increased the amount of TGF-β1 by roughly 1 ng/mL. Two copies of *FBN1* rs1059177 minor allele (G) were required to have an additive effect on TGF-β1 levels. We found higher TGF-β1 concentrations in men compared with women ($p = 0.001$). A strong correlation between TGF-β1 levels and *FBN1* SNPs suggests that a single nucleotide substitution in *FBN1* sequence might reduce bioavailability or binding properties of fibrillin-1 and have an effect on TGF-β1 activation and cytokine concentration in blood plasma. By establishing the relationship between TGF-β1 and *FBN1* SNPs rs2118181 and rs1059177, we provide evidence that their combination might be used as molecular biomarkers to identify patients at risk for sporadic ascending aortic aneurysm and aortic dissection.

Online address: http://www.molmed.org
doi: 10.2119/molmed.2015.00102

INTRODUCTION

FBN1 mutations are associated with the development of dilative pathology of ascending aorta (DPAA) (1). It has been shown that fibrillin-1 regulates the bioavailability of transforming growth factor (TGF)-β1 (2). TGF-β1 is a member of the TGF-β family of solubile proteins, cytokines, and, together with other TGF-β isoforms, works through the same signaling systems encompassing various cellular processes such as angiogenesis, proliferation, differentiation, apoptosis, wound healing and modification of extracellular matrix (3). Cellular and molecular mechanisms of aortic dilation have been investigated in the Marfan syndrome (MFS), where aortic aneurysm is one of the main features of a multisystem disorder. Increased TGF-β1 signaling has been associated with defective fibrillin-1 in the pathology of MFS (2). Genome-wide association study identified *FBN1* SNPs rs2118181 and rs10519177 to be associated with sporadic DPAA (4). The data were in part replicated by two independent studies (5,6), therefore strengthening the idea that these SNPs contribute to the molecular pathways leading to the sporadic thoracic disease. To uncover the mechanism of sporadic DPAA and to identify potential biomarkers, we investigated the association between TGF-β1 concentration in blood plasma and *FBN1* SNPs rs2118181 and rs10519177.

Address correspondence to *Ramune Sepetiene, Sukileliu 17, Kaunas, Lithuania LT 50161. Phone (mobile): +370-612-31784; Fax: +370-37-302872; E-mail: sepetiene@yahoo.co.uk.*
Submitted May 5, 2015; Accepted for publication August 18, 2015; Published Online (www.molmed.org) August 24, 2015.

The Feinstein Institute for Medical Research North Shore LIJ
Empowering Imagination. Pioneering Discovery.®

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

A study group was recruited from three cluster samples of Kaunas population (n = 275). The first cluster consisted of student and staff volunteers from Lithuanian University of Health Sciences (LUHS) (n = 70, age range 18–55 years, mean 48, median 49); the second cluster was composed of volunteers (n = 151, age 55 years and older, mean 64, median 65) appointed to their physician in Dainavos outpatient's clinic

Table 1. Distribution of *FBN1* SNPs rs2118181 and rs10519177 genotypes in study samples.

	rs2118181			rs10519177		
Study subjects	AA	AG	GG	AA	AG	GG
I Cluster (n = 70)	53 (75.7%)	15 (21.4%)	2 (2.9%)	40 (57.2%)	25 (35.7%)	5 (7.1%)
II Cluster (n = 151)	125 (80.8%)	25 (16.5%)	1 (0.7%)	97 (64.2%)	45 (29.8%)	9 (6.0%)
χ^2, p		2.62, $p = 0.27$			1.02, $p = 0.60$	
Total (n = 221)	178 (80.5%)	40 (18.1%)	3 (1.4%)	137(62.0%)	70 (31.7%)	14 (6.3%)
Reference (n = 840)	663 (78.9%)	167 (19.9%)	10 (1.2%)	496 (59.0%)	297 (35.4%)	47 (5.6%)
χ^2, p		0.38, $p = 0.82$			1.11, $p = 0.58$	

(Kaunas). *FBN1* SNPs rs2118181 and rs10519177 genotype frequencies did not differ significantly between the two clusters. Because of the low number of homozygous minor allele carriers of *FBN1* SNPs rs2118181 (n = 3) and rs10519177 (n = 14), a third cluster (n = 54, age range 46–72 years, mean 62, median 64) was added that consisted of homozygous minor allele carriers (n = 10, rs2118181, and n = 44, rs10519177) (Table 1). It was selected from a reference sample of the population (n = 840, age range 45–73 years, mean and median 60) screened within the international HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial factors In Eastern Europe) study (7). None of the study subject reported having aortic dilation.

Ethical approval was obtained from the Ethics Committee of the Lithuanian Health Science University (number BE-2-12), and all subjects provided written informed consent for participation in the study.

Determination of Genotypes

Genomic DNA was isolated from potassium EDTA blood as described (8). Genotyping of *FBN1* SNPs rs2118181 and rs10519177 was performed according to the manufacturer's instructions by using commercially available kits from Applied Biosystems: C_16234705_10 (rs2118181), and C_8932690_10 (rs10519177) and ABI 7900HT real-time PCR Thermocycler (Applied Biosystems). All testing procedures were performed at the laboratory of Molecular Cardiology of the Institute of Cardiology of the Lithuanian University of Health Sciences.

TGF-β1 Quantitative Detection

Blood samples were obtained by using 3-mL Venosafe™ blood collection tubes containing 5.9 mg K2EDTA (Terumo Europe, Belgium). Plasma was obtained by centrifuging blood samples for 15 min at 3,506*g* within 2 h after phlebotomy. Plasma samples were aliquoted and stored at –20°C. All samples were tested in duplicate with an eBioscience Platinum human TGF-β1 ELISA commercially available kit (Bender Med Systems) based on standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technology according to the manufacturers' instructions. Absorbance was measured by using a Stat-fax 4200 microplate reader (Awareness Technology) at 450 nm OD (optical density). TGF-β1 concentration was automatically calculated by using a log-log linear regression. According to manufacturers' instructions, cross-reactivity with TGF-β2 and TGF-β3 was <0.01%.

Statistical Analysis

A nonparametric Kruskal-Wallis test was used for statistical analysis. The relationship between age and cytokine levels was calculated by using a two-tailed Spearman rank correlation coefficient (R). Multiple linear regression was used to estimate the effect of gender (male), age (years) and genotype on the logarithmically transformed TGF-β1 values.

RESULTS

Our study population consisted of 141 male and 128 female subjects. Six samples were rejected from further TGF-β1 testing because of the preanalytical errors. TGF-β1 concentrations differed significantly ($p = 0.001$) between men (median 8.32 ng/mL, range 1.00–33.10) and women (median 5.81 ng/mL, range 1.10–27.30) and showed dependency on age ($R = 0.236$, $p < 0.001$). Genotype distribution and corresponding TGF-β1 values are presented in Table 2. Median TGF-β1 concentrations for each genotype showed quantitative association. The presence of one and two rs2118181 G alleles led to a 1.24 and 3.21 ng/mL increase in median TGF-β1 concentrations, respectively. A single copy of rs10519177 G allele did not seem to cause an increase in TGF-β1, but the presence of two minor allele copies coincided with a 4.08 ng/mL increase in TGF-β1 levels.

A multiple linear regression analysis was adopted to investigate an association between gender, age, *FBN1* genotypes and TGF-β1 values (Table 3). Gender, age and rs2118181 AG + GG genotypes or a single-allele G presence were all significant variables to predict log-transformed TGF-β1 values ($p < 0.05$). An additive effect of G allele correlated to the observed TGF-β1 values in Table 2. We did the same testing for rs10519177 and found that the presence of GG genotype in addition to the gender and age was a significant variable for TGF-β1 values as well ($p < 0.05$).

DISCUSSION

This is the first report on the association between previously defined *FBN1* SNPs (rs2118181 and rs10519177) linked with sporadic thoracic aorta aneurysm and dissection (6) and TGF-β1

Table 2. Genotype frequencies and corresponding TGF-β1 values.

FBN1 SNPs	Genotype	Genotype frequency, n (%)	TGF-β1 concentration (ng/mL), minimum/medium/maximum
rs2118181			
	AA	192 (71.4)	1.00/6.57/33.12
	AG	64 (23.8)	2.71/7.81/28.08[a]
	GG	13 (4.8)	1.40/9.78/17.28[b]
	AG + GG	77 (28.6)	1.40/8.02/28.10
rs10519177			
	AA	138 (51.3)	1.00/6.40/33.12[c]
	AG	73 (27.1)	1.90/5.46/28.08[d]
	GG	58 (21.6)	1.40/10.48/27.29
	AG + GG	131 (48.7)	1.40/7.6/28.08

[a]TGF-β1 concentration compared with rs2118181 AG versus AA genotypes, $p = 0.024$.
[b]TGF-β1 concentration compared with rs2118181 GG versus AA genotypes, $p = 0.094$.
[c]TGF-β1 concentration compared with rs10519177 AA versus GG genotypes, $p < 0.0001$.
[d]TGF-β1 concentration compared with rs10519177 AG versus GG genotypes, $p < 0.0001$.

concentration in blood plasma of study subjects who were not aware of aortic dilation. Our data demonstrated that presence of rs2118181 minor allele significantly increased median TGF-β1 values, whereas such effect in rs10519177 was achieved only by homozygous carriers of two minor alleles. Moreover, these regularities correspond to the earlier reported associations between DPAA phenotypes and the genotyped *FBN1* SNPs (6). According to these data, an additive minor allele model fitted best in describing the association between rs2118181 and aneurysm (odd ratio [OR] 1.70, 95% confidence interval [CI] 1.17–2.46) or Stanford A dissection (OR 2.64, 95% CI 1.66–4.19), whereas a recessive model described the association between rs10519177 and Stanford A dissection (OR 4.31, 95% CI 2.06–9.01).

Chaudhry *et al.* (2) demonstrated that specific *FBN1* sequence encoded by exons 44–49 directly regulates endogenous TGF-β1 functionality without affecting cells or any other intermediate mechanisms, whereas abnormal fibrillin-1 with deficient functionality causes an excessive amount of active TGF-β1 to be released from the extracellular matrix (2). Mutations in *FBN1* domains increase proteolytic sensitivity to inflammatory enzymes (9) causing a degradation of microfibrills and subsequent changes in TGF-β1 bioavailability. It is yet unknown how *FBN1* SNPs (rs2118181, rs10519177) might affect the fibrillin-1 and TGF-β1 interaction. Both SNPs are in intronic regions of the *FBN1* (10). Thus, it might be speculated that they alter *FBN1* pre-mRNA thermodynamic and kinetic properties and affect splicing events. *FBN1* splicing errors have been shown to cause protein alteration: (a) elimination of an entire exon resulting in a loss of an entire protein domain (11) and (b) activation of alternative splice sites causing an addition of 11 amino acids to the protein (12).

It is obvious that the relationship between TGF-β1 and *FBN1* SNPs is quantitative. Unaltered fibrillin-1 activates TGF-β1 through interactions between latent TGF-β binding proteins (LTBPs 1–4) and the N terminus of fibrillin-1 (13). If this interaction is somehow disturbed because of changes in fibrillin-1 availability, the amount of LTBPs would increase. In our experiments, we used acid activation to release TGF-β1 from the LTBP complex to measure total TGF-β1 level in blood plasma. Therefore, we do not know whether TGF-β1 increase is due to higher levels of LTBP or increased levels of active TGF-β1. More LTBPs would indicate defective fibrillin-1 interaction with LTBPs and reduced activation of TGF-β1. Higher levels of active TGF-β1 would indicate an increase in the activation process through LTBPs and fibrillin-1 interactions.

The pathogenesis of DPAA remains unclear. It is unknown if a fibrillin-LTBPs junction is needed to protect the large

Table 3. Multiple linear regression analysis for logarithmically transformed TGF-β1 values.

FBN1 SNP	Dependent variables	Unstandardized coefficients B	*p*	Adjusted R^2
rs2118181	Constant	1.045	<0.001	0.103
	Gender (male)	0.185	0.015	
	Age	0.012	<0.001	
	Genotype AG + GG	0.222	0.008	
	Constant	1.035	<0.001	0.102
	Gender (male)	0.181	0.018	
	Age	0.012	<0.001	
	Allele G	0.172	0.01	
rs10519177	Constant	1.053	<0.001	0.146
	Gender (male)	0.158	0.034	
	Age	0.011	<0.001	
	Genotype GG	0.397	<0.001	

latent complex from proteolytic activation or whether *FBN1* functions more directly in controlling assembly or stability of latent TGF-β1 complexes (14). Second, the balance between the need for TGF-β1 in normal development and suppression of its activity in the treatment of disease should be considered (15).

CONCLUSION

Our study for the first time demonstrates the association between TGF-β1 levels in blood plasma and *FBN1* SNPs rs2118181 and rs10519177. We suggest that TGF-β1 levels in blood plasma in combination with *FBN1* SNPs might serve as a biomarker to identify patients at risk for sporadic ascending aortic aneurysm and aortic dissection.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for the study was provided by the Research Council of Lithuania for National Research Programme "Chronic Noncommunicable Diseases" (Agreement No LIG 05/2012).

DISCLOSURE

The authors declare that they have no competing interests as defined by *Molecular Medicine*, or other interests that might be perceived to influence the results and discussion reported in this paper.

REFERENCES

1. Milewicz DM, *et al.* (1996) Fibrillin-1 (*FBN1*) mutations in patients with thoracic aortic aneurysms. *Circulation.* 94:2708–11.
2. Chaudhry SS, *et al.* (2007) Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFβ1. *J. Cell Biol.* 176:355–367.
3. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. (2010) Signaling by members of the TGF-β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* 20:556–67.
4. LeMaire SA, *et al.* (2011) Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for thoracic aortic aneurysms and aortic dissections spanning FBN1 at 15q21. 1. *Nat. Genet.* 43:996–1000.
5. Iakoubova OA, *et al.* (2014) Genetic variants in FBN-1 and risk for thoracic aortic aneurysm and dissection. *PLoS One.* 17;9:e91437.
6. Lesauskaite V, *et al.* (2015) FBN1 polymorphisms in patients with the dilatative pathology of the ascending thoracic aorta. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 47:e124–30.
7. Peasey A, *et al.* (2006) Determinants of cardiovascular and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: rationale and design of the HAPIEE study. *BMC Public Health.* 6:255.
8. Lesauskaite V, *et al.* (2007) Matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism and dilatative pathology of ascending thoracic aorta. *Medicina (Kaunas).* 44:386–91.
9. Ashworth JL, Kelly V, Wilson R, Shuttleworth CA, Kielty CM. (1999) Fibrillin assembly: dimer formation mediated by amino-terminal sequences. *J. Cell Sci.* 112:3549–3558.
10. dbSNP: Database for Short Genetic Variations [Internet]. (1998 –). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information. [updated 2015 Nov 24; cited 2016 Jan 8]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
11. Liu W, Qian C, Comeau K, Brenn T, Furthmayr H, Francke U. (1996) Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembley and cause severe Marfan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5:1581–1587.
12. Hutchinson S, Wordsworth BP, Handford PA. (2001) Marfan syndrome caused by a mutation in FBN1 that gives rise to cryptic splicing and a 33 nucleotide insertion in the coding sequence. *Hum. Genet.* 109:416–20.
13. Doyle JJ, Gerber EE, Dietaz HC. (2012) Matrix-dependent perturbation of TGFβ signalling in disease. *FEBS Lett.* 586:2003–15.
14. Pannu H, *et al.* (2005) Mutations in transforming growth factor-β receptor type II cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections. *Circulation.* 112:513–20.
15. Zilberberg L, *et al.* (2012) Specificity of latent TGF-β binding protein (LTBP) incorporation into matrix: Role of fibrillins and fibronectin. *J. Cell Physiol.* 12:3828–36.

Cite this article as: Sepetiene R, *et al.* (2015) Association between *Fibrillin1* polymorphisms (rs2118181, rs10519177) and transforming growth factor β1 concentration in human plasma. *Mol. Med.* 21:735–8.

Krūtinės aortos aneurizmos ir disekacijos genetinės priežastys

GENETIC BASIS OF THORARIC AORTIC ANEURYSMS AND DISSECTIONS

Ramunė Šepetienė[1], Sandrita Šimonytė[1, 2], Vaiva Lesauskaitė[1, 3, 4]
[1]LSMU MA Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorija,
[2]LSMU VA Mikrobiologijos ir visurologijos institutas, [3]LSMU MA Patologinės anatomijos klinika, [4]Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Santrauka

Kylančiosios aortos atsisluoksniavimas – tai gyvybei grėsminga krūtinės aortos aneurizmos komplikacija, kurios genetinės priežastys ilgą laiką sietos su Marfano sindromu. Įvairios studijos nustatė genetinius krūtinės aortos aneurizmos ir disekacijos lokusus: 15q-21.1 (*FBN1*), 5q13-14 (*TAAD1*), 11q23 (*FAA1*), 3p24-25 (*TAAD2*) ir 16p12.2-13.13 chromosomose. Toks genetinis heterogeniškumas lemia įvairius šios patologijos formavimosi patogenezinius mechanizmus. *TGFBR2* geno, esančio 3p24-25 lokuse, mutacijos sutrikdo transformuojančio augimo veiksnio (TGF-beta1) signalo perdavimą, o *FBN1* mutacijos lemia perteklinį TGF beta1 aktyvumą.

Reikšminiai žodžiai: aorta, aneurizma, disekacija, transformuojantis augimo veiksnys (TGF-beta1), fibrilino-1 genas *(FBN1)*, Marfano sindomas (MFS).

Summary

Dissection of ascending aorta is a dangerous complication of thoracic aorta aneurysms. Its genetic background was related to the Marfan syndrome (MFS). Recently, various studies have identified genetic loci (15q-21.1 (*FBN1*), 5q13-14 (*TAAD1*), 11q23 (*FAA1*), 3p24-25 (*TAAD2*), and 16p12.2-13.13) associated with thoracic aorta aneurysm. The genetic heterogeneity causes different pathogenetic mechanisms triggering the aortic pathology formation. Mutations in the *TGFBR2* gene (3p24-25 locus) leads to dysregulation of TGF-beta1 signaling, while *FBN1* mutations might up-regulate it.

Key words: aorta, aneurysms, dissections, transforming growth factor-beta (TGF-beta1), fibrilin-1 *(FBN1)*, Marfan syndrom (MFS).

ĮVADAS

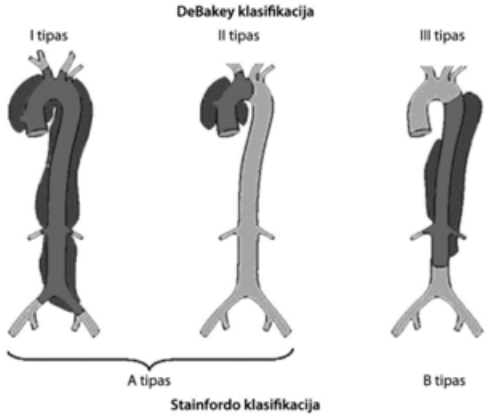
Kylančiosios aortos atsisluoksniavimas – tai gyvybei grėsminga krūtinės aortos aneurizmos komplikacija. Didžiausias mirtingumas nuo aortos aneurizmų ir disekacijų (AAD) nustatytas Šiaurės šalyse, pvz., Švedijoje (13,5/100 tūkst. gyventojų) ir Norvegijoje (12,1/100 tūkst. gyventojų), mažiausias – Azijos šalyse ir Pietų Amerikoje. Nuo aortos aneurizmos JAV kasmet miršta iki 15 000 žmonių ir užima 13 vietą pagal mirtingumo priežastis vyresnių nei 55 metų žmonių grupėje [1]. Remiantis oficialiais Higienos instituto Sveikatos informacijos centro duomenimis, Lietuvoje 2013 m. vyrų standartizuotas sergamumas nuo krūtinės aortos aneurizmos ir disekacijos (TLK-01, I17.1 ir I17.2) 100 000 gyventojų buvo 6,2, o moterų – 0,7 [2].

Aortos aneurizma (AA) yra aortos sienelės užląstelinės matricos (UM) remodeliavimosi rezultatas [3]. Plečiantis aortai, vyksta kolageno ir elastino, kurie yra elastinio tipo arterijų sienelės pagrindiniai komponentai, patologinis remodeliavimasis. Jį sąlygoja padidėjusi matrikso metaloproteazių raiška (MMP). Priežastys, sukeliančios matrikso metaloproteazių raiškos didėjimą, kol kas nežinomos. Šiuo metu atkreiptas dėmesys į transformuojančio augimo faktorius (TGF-beta1) vaidmenį. Tai vienas iš didelės ligandų ir receptorių šeimos atstovų, kuriuos gamina įvairų tipų ląstelės [4, 5]. Nustatyta, kad TGF-beta1 dalyvauja vykstant ląstelių proliferacijai, diferencijacijai, apoptozei, angiogenezei, jis veikia kaip uždegimo mediatorius [6]. Geriausiai ištirta TGF-beta1 funkcija yra jungiamojo audinio sintezės skatinimas (pvz., kolageno), formuojantis fibrozei [5]. Įrodyta, kad jis gali veikti priešingai, t. y. ardyti UM [7, 8]. Pastaruoju metu tiriama TGF-beta1 signalo perdavimo mechanizmų reikšmė aortos aneurizmos morfogenezei. Bandoma išsiaiškinti, kaip šis augimo faktorius dalyvauja UM ardymo procese.

Ramunė Šepetienė 1999 m. baigė Medicinos universiteto (nuo 2010 m. – LSMU) Medicinos laboratorijos gydytojos rezidentūrą. 2001 m. specializavosi Suomijoje, Kuopio universitetinėje ligoninėje imunohematologijos srityje. Iki 2005 m. dirbo UAB „Binational Plasma" laboratorijos vedėja. 2005–2009 m. dirbo Kembridžo (Jungtinė Karalystė) Patvirtinančių kraujo tyrimų serologijos laboratorijoje. 2009–2011 m. – Karalienės Elžbietos ligoninėje, bendrojoje Biochemijos, hematologijos ir imunologijos klinikoje. 2012 m. stažavosi Bristolio universiteto Kraujo genotipavimo tarptautinėje laboratorijoje. Nuo 2012 m. dirba LSMU, Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje. Doktorantūros tema: „Fibrilino-1 geno polimorfizmo ir TGF-beta raiškos sąsajų su kylančios aortos dilatacine patologija tyrimas". El. paštas: sepetiene@yahoo.co.uk

Sandrita Šimonytė 2000 m. baigė VDU ir įgijo biologijos magistro laipsnį. 2004 m. apgynė disertaciją „Metalų jonų poveikis pelių atsparumui *Listeria monocytogenes* infekcijai". 2006 m. stažavosi Tainanio National Cheng Kung universitete Taivanyje. 2007 m. laimėjo Danijos vyriausybės (CIRIUS) stipendiją ir dirbo Arhuso universitetinės ligoninės Biocheminės patologijos laboratorijoje. Spaudoje paskelbė 59 publikacijas. Mokslinių tyrinėjimų ir domėjimosi sritys: širdies ir kraujagyslių ligų genetiniai epidemiologiniai tyrimai. Nuo 2011 m. – LSMU VA Mikrobiologijos ir visurologijos instituto docentė. El. paštas: sandrita.simonyte@lsmuni.lt

Vaiva Lesauskaitė 1983 m. su pagyrimu baigė KMI gydomąjį fakultetą, 1989 m. apgynė medicinos mokslų kandidato disertaciją (nostrifikuota kaip daktaro disertacija) „Jaunų žmonių aortos, vainikinių arterijų aterosklerozės ir veiksnių, susijusių su jos vystymusi, tyrimas". 1997 m. apgynė habilitacijos darbą „Jaunų žmonių aterosklerozė: aortos ir vainikinių makromorfometrinio ir histomorfometrinio tyrimo duomenys". Spaudoje paskelbė 92 straipsnius. Mokslinių tyrinėjimų ir domėjimosi sritys: širdies ir kraujagyslų ligų genetiniai epidemiologiniai tyrimai, farmakogenetika, aortos dilatacinės patologijos morfogenezės tyrimai, programuotos ląstelių mirties reikšmės širdies ir kraujagyslių ligų ir jų komplikacijų (širdies nepakankamumas, kardiomiopatijos, IŠL, krūtinės ir pilvo aneurizmos) morfogenezei tyrimai. Nuo 1998 m. iki dabar LSMU MA Patologinės anatomijos klinikos profesorė. Vadovauja LSMU Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijai. Nuo 2009 m. LSMU prorektorė mokslui. El. paštas: vaiva.lesauskaite@lsmuni.lt



1 pav.
Aortos disekacijos klasifikacija pagal pažeidimo lokalizaciją (Anderson, 2009)

Šiame straipsnyje apžvelgsime TGF-beta1 signalo perdavimo kelius, jo dalyvavimą UM remodeliavimesi ir aptarsime molekulinius mechanizmus, lemiančius krūtinės aortos aneurizmos ir disekacijos vystymąsi.

AA KLASIFIKACIJA IR PATOGENEZĖ

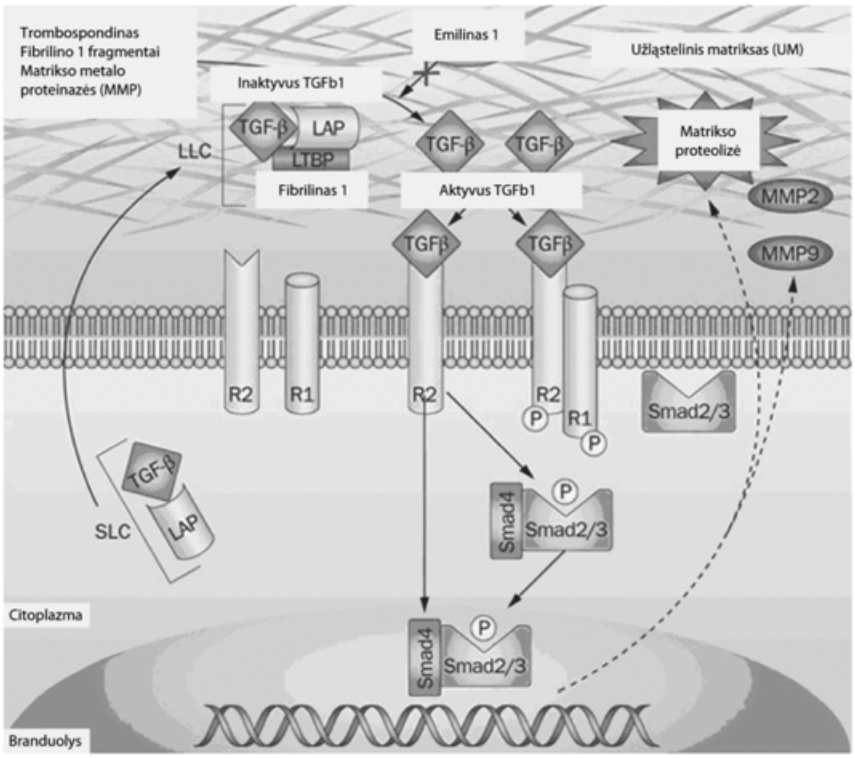
Aortos aneurizma ir disekacija (AAD) yra dažniausios aortos patologijos. Dažniau formuojasi pilvo aortos aneurizma, rečiau – kylančiosios aortos. Nurodoma, kad pagrindinė aortos disekacijos priežastis yra aortos intimos įplyša toje vietoje, kurioje susidaro didžiausi slėgio ir jo svyravimo skirtumai sistolės ir diastolės metu [3]. Didžiausius hidrodinaminius ir kinetinės energijos svyravimus patiria kylančioji aorta. Dažniausiai ji plyšta šoninėje užpakalinėje sienelėje virš dešiniosios vainikinės arterijos žiočių. Per įplyšusią intimą į aortos sienelę patenka cirkuliuojantis kraujas, kuris perskiria mediją, t. y. aortos sienelė atsisluoksniuoja [9, 10].

Klinikinėje praktikoje aortos atsisluoksniavimas klasifikuojamos pagal plyšimo vietą ir išplitimą (1 pav.) Dažniausiai naudojamos Stanfordo (1976) ir DeBakey (1982) klasifikacijos. L.G.Svensson 1999 m. pasiūlė etiopatogenezinę aortos disekacijos klasifikaciją, kurioje ji suskirstyta į penkis tipus: 1 – aortos atsisluoksniavimas su intimos atlapu; 2 – intramuralinė hematoma be intimos atlapo; 3 – tik intimos pažeidimas be hematomos; 4 – aortos sienos penetruojanti aterosklerozinė opa su hematoma; 5 – jatrogeninės arba trauminės kilmės atsisluoksniavimas [10].

Daugiau kaip 95 proc. visų aortos disekacijų įvyksta arba su kylančiosios aortos pažeidimu keli centimetrai nuo aortos vožtuvo (A tipo disekacija), arba nusileidžiančiojoje aortoje, kai pažeidimas neišplinta į kylančiąją aortą (B tipo disekacija) [11].

Nustatyta, kad kylančiosios ir pilvo aortos morfogenezė skiriasi [12]. Dažniausia pilvo aortos aneurizmos priežastis yra aterosklerozė. Šios rūšies aneurizmų medijoje gausu jungiamojo audinio ir imuninio atsako ląstelių. Kai yra kylančiosios aortos aneurizma, gali būti nustatomos medijos nekrozės zonos arba cistinės medijos degeneracijos židiniai. Pastarieji aortos pokyčiai ypač būdingi Marfano sindromo sukeltam aortos išsiplėtimui [13]. Tiek medijos nekrozė, tiek didesnė cistinė medijos degeneracija dažniau būna atsisluoksniavusių aortų sienelėje.

Eksperimentiškai ir kliniškai nustatyta, kad svarbų vaidmenį, formuojantis aneurizmai, atlieka matrikso metaloproteinazės (MMP) [3, 14]. MMP sudaro didelę nuo Zn ir Ca jonų priklausomą 27 proteazių šeimą, dalyvaujančią UM ardymo procese. Jas pradeda gaminti aortos medijos lygiųjų raumenų ląstelės (LRL), kai jų fenotipas pakinta iš kontrakcinio į sintezinį [15]. Kraujagyslių sienelėje MMP aktyvumas reguliuojamas ne tik transkripcijos, transliaci-



2 pav.
Užląstelinio matrikso (UM) suardymas, formuojantis aneurizmai (El-Hamamsy I and Yacoub MH, 2009)

jos lygyje, jis taip pat tiesiogiai priklauso nuo endogeninių audinių inhibitorių TIMP (angl. *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*) sintezės. Normaliai šie mechanizmai glaudžiai susiję ir palaiko UM homeostazę. Formuojantis aneurizmai ši pusiausvyra sutrinka dėl padidėjusios MMP sintezės arba mažesnio TIMP aktyvumo.

TGF-β SIGNALO PERDAVIMAS

Žinoma, kad transformuojantis augimo faktorius beta1 (TGF-beta1) sekretuojamas biologiškai neaktyvios formos ir UM saugomas latentiniame komplekse (LLC), kurį sudaro TGF-beta1 homodimeras su peptidu (LAP) ir TGF-β surišantis baltymas (LTBP-1) (2 pav.) [16].

Vykstant klasikiniam TGF-beta signalo perdavimo keliui, TGF-beta (TGF-beta1, TGF-beta2 ir TGF-beta3) dimerizuojasi (jungiasi homodimerai) ir jungiasi su receptorių TGF-β RI ir TGF-βRII kompleksu, pasižyminčiu serino, treonino kinazės aktyvumu. Ligandui prisijungus prie TGF-βRII, pastarasis fosforilina TGF-β RI, kuris fosforilina ir aktyvina receptorių Smad-2 (R-Smad-2). Šis, jungdamasis su Smad-4, formuoja kompleksą, kuris keliauja į branduolį. Ten jis jungiasi su transkripcijos veiksniais ir aktyvina arba slopina įvairių genų transkripciją. Šis klasikinis TGF-beta1 kelias, apimantis Smad signalo perdavimo kaskadą, yra siejamas ne tik su veiksniais, lemiančiais UM gausėjimą (pvz., kolageno, elastino), bet ir su UM ardymo slopinimu (pvz., TIMP-1, TIMP-3). TGF-beta1 signalo perdavimo kelią reguliuoja įvairûs aktyvintojai, slopintojai ir transkripcijos terminatoriai, pvz., proteoglikanas dekorinas, jungdamasis su TGF-beta1, slopina pastarojo gebą jungtis su TGF-β RI ir TGF-β RII. TGF-beta1 signalo perdavimas susijęs su UM suardymu ir dalyvaujant MMP. TGF-beta1 sužadina plazminogeno aktyva-

toriaus ir p38 mitogeno aktyvintos proteino kinazės sintezę, lemiančią MMP gamybą. Tačiau TGF-beta1 gali sužadinti endogeninių proteazių inhibitorius tokius kaip (PAI-1), veikiančius plazminogeno aktyvatorius arba TIMP [17].

Yra hipotezės [18, 19], kad egzistuoja nuo Smad nepriklausomas, t. y. alternatyvus TGF-beta1 signalo perdavimo kelias, kuriame signalai gali būti perduodami per TGF-β RII nedalyvaujant TGF-β RI, per TGF-β RI nepriklausomai nuo Smad aktyvinimo, Smad-2 aktyvinimas be Smad-4 ir Smad-2 aktyvinimas dalyvaujant TGF-beta1 be TGF-beta receptoriu aktyvinimo. Nustatyta, kad sutrikdytas TGF-beta signalo perdavimas susijęs su įvairiomis kraujagyslių patologijomis, pvz., aterosklerozė, pirminė plaučių hipertenzija ir aortos aneurizma.

GENETINIAI SINDROMAI, LEMIANTYS KAAD

Viena iš aortos aneurizmos formavimosi priežasčių yra Marfano sindromas (MFS). Tai autosominiu dominantiniu būdu paveldima jungiamojo audinio liga, kuri pažeidžia akis, skeletą, širdies ir kraujagyslių sistemą. MFS sukelia 15q-21.1 chromosomoje esančio fibrilino-1 *(FBN1)* geno mutacijas. FBN1 yra 350 kDa daug cisteino turintis glikobaltymas, kuris yra pagrindinis 10–12 nm mikrofibrilių komponentas. *FBN1* nustatyta daugiau nei 600 mutacijų [20].

Imunohistocheminiai tyrimai parodė, kad ligonių, turinčių Marfano sindromą, fibroblastai sintezuoja mikrofibriles, kurių sudėtyje yra mažesnis fibrilino kiekis. Analizuojant FBN1 pelių modeliuose, nustatytas ryšys tarp mikrofibrilių kiekio mažėjimo ir MFS. Pasirodė, kad fibrilino-1 neturinčios pelės turėjo didesnį TGF-beta1 aktyvumą audiniuose nei laukinio tipo pelės. Be to, MFS pelių modeliuose, TGF-beta1 signalo perdavimo slopinimas apsaugo nuo plaučių parenchimos ir mitralinio vožtuvo anomalijų bei aortos dilatacijos [21].

Marfano sindromas diagnozuojamas pagal klinikinius požymius. Įdomu tai, kad 10 proc. visų sergančiųjų MFS neturėjo *FBN1* geno mutacijų. Todėl prieš dešimtmetį įvardytas MFS heterogeniškumas ir nustatytas antrasis MFS lokusas (MFS2) 3p25-24.2 chromosomoje [22]. Šis lokusas nustatytas tiriant vieną prancūzų šeimą. Nustatyta *TGFBR2* geno mutacija, sukelianti splaisingo pažaidą kinazės domene yra šios šeimos ligos priežastis [23].

Vėliau tirtos devynios MFS sergančios šeimos neturėjo *FBN1* geno mutacijų, tačiau trys iš jų turejo *TGFBR2* geno taškines pažaidas. Kai Japonijoje buvo nustatytas MFS sergantis pacientas, turintis pažaidą 3p24.1 chromosomoje, iškelta hipotezė apie *TGFBR2* geno ir MFS2 lokuso ryšį. Naudojant *in vitro* sistemą, nustatyta, kad šios pažaidos, susijusios su receptoriaus viduląsteliniu serino-treonino kinazės domenu, mažino receptoriaus signalo perdavimą, kurį sužadindina TGF-beta1. Tiriant pelių modelius su MFS nustatyta kylančiosios aortos dilatacija ir didelis TGF-beta1 signalo perdavimo aktyvumas, kai tuo tarpu jo sumažėjimas siejamas su aneurizmų formavimusi esant MFS2 [24].

In vivo tyrimai su pelėmis parodė, kad angiotenzino II receptoriaus antagonistas lozartanas, kuris blokuoja TGF-beta1 aktyvumą, gali mažinti arba slopinti aortos aneurizmos formavimąsi sergant Marfano sindromu [22].

Kitas genetinis sindromas, turintis panašius į MFS klinikinius požymius ir sukeliantis krūtines aortos aneurizmą ir disekaciją (KAAD) jauname amžiuje, pavadintas Loeys-Dietz sindromu (LDS). Heterozigotinės mutacijos, nustatytos abiejuose *TGFBR1* ir *TGFBR2* genuose, todėl buvo manoma, kad susilpnėjąs TGF-beta1 signalo perdavimas gali sukelti LDS [25]. *Išskyrus tam tikras specifines pažaidas, susijusias su TGFBR1* ir *TGFBR2,* visos kitos nustatytos taškinės mutacijos pažeidžia aminorūgštis funkciškai svarbiame receptoriaus viduląsteliniame kinazės domene. Įdomu tai, kad ištirti pacientų audiniai turėjo didesnį kolageno ir jungiamojo audinio augimo faktorių bei fosforilinto Smad2 kiekį, o tai gali būti susiję su padidėjusiu TGF-beta1 aktyvumu šiuose audiniuose. *TGFBR1* ir *TGFBR2* mutacijos, kai yra LDS, nustatytos kartu su įvairiomis kraujagyslių (įgimta širdies liga, aneurizma, arterijų disekacija) ir *skeleto anomalijomis,* taip pat kraniofacialiniais požymiais (vilko gomuriu, didelis atstumas tarp akių ir *kraniosinostoze) bei protiniu atsilikimu [24].*

IV tipo Ehlers-Danlos sindromas (kraujagyslių EDS) pirmiausia pažeidžia odą ir stambiąsias arterijas, tai lemia vėlesnę aortos medijos degeneraciją ir disekaciją. Ligą sukelia III prokolageno geno (*COL3A1*) viename alelių atsiradusi 3,3 kb DNR delecija ir lizilhidroksilazės stygius odoje ir kraujagyslių sienelėje [26]. Dėl to sumažėjus arterijų ir aortos sienelės kolageno tinklui ir išplonėjus intimos-medijos sluoksniui, didėjantis spaudimas sukelia kraujagyslės disekaciją. EDS diagnozę sunkina šių ligonių fenotipinis panašumas su turinčiais LDS. Tiriant 52 šeimas, kuriose yra LDS, sukeltas *TGFBR1* ir *TGFBR2* mutacijų, buvo nustatyti ir EDS turintys ligoniai. Jie neturėjo *COL3A1* geno mutacijų ir kraniofacialinių simptomų, būdingų LDS. Įdomu tai, kad 12 asmenų, kuriems buvo EDS, turėjo *TGFBR1* arba *TGFBR2* mutacijas. Jie buvo priskirti antro tipo LDS. Iškelta hipotezė, kad EDS sergantys pacientai dėl *COL3A1* geno mutacijų gali turėti didesnį TGF-beta1 aktyvumą

ir taip kompensuoti kolageno III sumažėjimą aortos sienelėje [25].

ŠEIMINĖ KAAD

Dauguma ligonių, kuriems yra KAAD, neturi genetiniams sindromams, pvz., MFS, LDS arba EDS būdingų simptomų. Tiriant šeimas, kurių nariams buvo KAAD, nustatyta, kad 11-19 proc. pacientų turėjo pirmos eilės giminaičių, kuriems taip pat buvo KAAD. Tai įrodė genetinį polinkį sirgti šia liga [19]. Pacientų amžiaus vidurkis su šeimine KAAD istorija yra 56,8 metų. Tai statistiškai jaunesnis amžius, lyginant su sporadine KAAD (64,3 metų), tačiau vyresnis nei MFS sergančių pacientų (24,8 metų). Ši liga paveldima autosominiu dominantiniu būdu, pasižymi sumažėjusiu fenotipiniu skvarbumu (paveldimas defektyvus genas, tačiau aortos patologija nesusiformuoja) ir įvairia raiška [27].

Neseniai nustatyti šeši genetiniai lokusai, lemiantys šeiminę KAAD: 11q23.3-q24 (*FAA1*); 5q13-q14 (*TAAD*1); 3p24-25 (*TAAD2*), 16p13.13-p13.12 (*PDA*), 9q33-q34 (*AAT*5) ir 10q22-q24 (*ACTA2*) [28].

TAAD1 genetinis lokusas dažniausiai nustatomas tarp sergančiųjų šeimine KAAD. Pilvo ir krūtinės aortų aneurizmos siejamos su *FAA1* lokusu, kuris nustatytas tiriant vieną didelę šeimą. Jau įrodyta, kad defektyvus *TGFBR2* genas yra *TAAD2* lokuse. Nustatyta, kad *TGFBR2* geno mutacijos nėra pagrindinis veiksnys, sukeliantis šeiminę KAAD, nes tik 4 iš 80 nesusijusių šeimų (5 proc.) turėjo šio geno mutacijas. Ketvirtas lokusas 16p13.13-p13.12 nustatytas tiriant vieną prancūzų šeimą, kurios nariams buvo KAAD. Šis lokusas taip pat siejamas su atviruoju arteriniu lataku. Jame rastos lygiųjų raumenų ląstelių kontrakcinio baltymo miozino sunkiosios grandinės (*MYH11*) mutacijos. Tiriant pacientų aortas, nustatyta, kad medijos pažeistos vietos turėjo sumažėjusį lygiųjų raumenų ląstelių kiekį [19, 28].

Pastaruoju metu įrodyta, kad lygiųjų raumenų ląstelių kontrakcinės savybės apsaugo aortos struktūrą ir padeda išvengti KAAD, todėl labai svarbi jų ciklinė sąveika su alfa aktinu (ACTA2) ir MYH11. Nustatyta, kad *ACTA2* taškinės mutacijos sukelia iki 14 proc. paveldimų KAAD. Šios mutacijos pažeidžia lygiųjų raumenų aktino filamentus ir tai sumažina šių ląstelių kontrakciją [28].

ANEURIZMŲ FORMAVIMOSI MECHANIZMAI DALYVAUJANT TGF-beta1

Molekuliniai aneurizmų morfogenezės tyrimai parodė, kad dažniausiai jų formavimasis yra susijęs su slopinamosiomis receptoriaus TGF-β R aktyvumą kinazės domeno mutacijomis (ypač su TGF-β RII). Be to, tyrimai taip pat rodo padidėjusį TGF-beta signalo perdavimą. Iškelta hipotezė, kad TGF-beta1 signalo perdavimo stimuliacija susijusi su kraujagyslių UM proteolize. Pastaruoju metu šią paradoksalią situaciją mokslininkai bando pagrįsti *in vitro* ir *in vivo* studijomis ir atsakyti (1), kaip sumažėjęs TGF-β R kinazės aktyvumas gali sustiprinti TGF-beta1 signalo perdavimą ir (2) kaip TGF-beta1 signalo perdavimo stimuliacija gali lemti užląstelinio matrikso ardymą formuojantis aneurizmai.

TGF-β SIGNALO PERDAVIMO STIMULIACIJA ESANT MUTUOTIEMS RECEPTORIAMS

Norėdami geriau suprasti TGF-beta1 signalo perdavimą, kai formuojasi fibrozė, mokslininkai panaudojo transgeninę pelę, kuri turėjo TGF-β RII receptorių be kinazės domeno. Manyta, kad transgenas turės dominantinį neigiamą poveikį pelėms ir bus nustatytas TGF-beta1 signalo perdavimo slopinimas. Stebėtina, tačiau nustatyta pelių odos ir plaučių fibrozė, o išskirtuose transgeniniuose fibroblastuose rastas padidėjęs TGF-beta1 signalo perdavimas ir Smad2/3 fosforilinimas. Lyginant su laukinio tipo ląstelėmis, transgeniniai fibroblastai greičiau proliferavo, daugiau gamino UM baltymų ir didesnį TGF-beta1 aktyvumą veikiančių mediatorių kiekį (Smad3, Smad4, Smad7, jungiamojo audinio augimo faktorių (CTGF) ir plazminogeno aktyvumo inhibitorių (PAI-1)). Manoma, kad didesnį TGF-beta1 signalo aktyvumą, stebimą esant įvairioms aneurizmoms, dėl receptorių heterozigotinių mutacijų, gali sukelti ligando ir receptorių (kaip endoglinas arba β -glinas), panačių į TGF-β R komplekso susidarymas [29].

Pastaruoju metu nustatyta, kad endocitozė ir TGF-β R recirkuliacija arba suardymas yra labai svarbus TGF-beta1 signalo reguliavimo mechanizmas. Yra du nepriklausomi endocitozės – klatrino ir kaveolino keliai – kurie reguliuojami dėka specifinių baltymų sąveikos [30]. Klatrino kelias siejamas su receptoriaus recirkuliacija ir TGF-beta1 signalo perdavimu, o kaveolino kelias sukelia receptoriaus degradaciją ir nutraukia signalo perdavimą. Nustatyta, kad receptoriaus aktyvinimo Smad „inkaras" (SARA), sąveikaudamas su TGF-β RII plazminėje membranoje padeda atsijungti TGF-β R kompleksui į alternatyvų nuo klatrino priklausomą endocitozės kelią ir sukelia receptoriaus recirkuliaciją arba padeda receptoriaus kompleksui sąveikauti su Smad2. Šis procesas sukelia receptoriaus recirkuliaciją plazmos membranoje. Procesui vykstant kitu keliu, Smad7 sąveikauja su TGF-β R kompleksu ir „įjungia" kaveolino endocitozės kelią, kuriame dalyvauja E3 ligazės Smurf1 ir Smurf2 (Smad reguliuojantys faktoriai). Tai sukelia TGF-β R

degradaciją ir TGF-β signalo perdavimo baigtį. Panašu, kad nustatytos TGF-β RII mutacijos aneurizmų atveju lėmė sąveiką su SARA ar Smad7, taip apsaugodamos nuo kaveolino kelio ir aktyvindamos TGF-beta signalo perdavimą [17, 30].

Įvairių studijų patvirtintas TGF-beta1 signalo perdavimo sužadinimas esant mutavusiems receptoriams ne tik parodo aortos plėtimosi morfogenezės sudėtingumą, bet atkreipia dėmesį, kad svarbu tęsti pradėtus molekulinius signalo perdavimo tyrimus. Šios žinios gali sudaryti pagrindą molekuliniams vaistų taikinių tyrimams bei sudaryti prielaidas kurti iš esmės naujus aortos plėtimosi gydymo metodus.

LITERATŪRA

1. Pasaulio sveikatos organizacijos duomenys. Prieiga per internetą: www.who.int
2. Higienos instituto Sveikatos informacijos centro duomenys. Prieiga per internetą: http://www.hi.lt/content/sic.html
3. *Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK.* Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. Curr Probl Surg. 2002; 39(2):110–230.
4. *Bobik A.* Transforming growth factor-β s and vascular disorders. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26:1712–20.
5. *Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al.* Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 1986; 83(12):4167–71.
6. *Dennler S, Goumans MJ, Ten Dijke P.* Transforming growth factor β signal transduction. J Leukoc Biol. 2002; 71(5): 731–40.
7. *Kim ES, Kim MS, Moon A.* TGF-β -induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. Int J Oncol. 2004; 25(5):1375–82.
8. *Selvamurugan N, Kwok S, Alliston T, Reiss M, Partridge NC.* Transforming growth factor-β 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2. J Biol Chem. 2004; 279(18):19327–34.
9. *Macura KJ, Corl FM, Fishman EK, Bluemke DA.* Pathogenesis in acute aortic syndromes: aortic dissection, intramural hematoma and penetrating atherosclerosis aortic ulcer. AJR Am J Roentgenol. 2003; 181(2):309-16.
10. *Erbel R, Alfonso F, Boileau C, Dirsch O, Eber B, Haverich A, et al.* Diagnosis and management of aortic dissection. Recommendations of the Task Force on Aortic Dissection, European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2001; 22(18):1642-81.
11. *Anderson CA.* Ascending aortic aneurysms. In: Cohn LH, editor. Cardiac surgery in adult. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 2009. p. 1123-48.
12. *Lesauskaite V, Epistolato MC, Castagnini M, Urbonavicius S, Tanganelli P.* Expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors, and osteopontin in the wall of thoracic and abdominal aortas with dilatative pathology. Hum Pathol. 2006; 37(8):1076-84.
13. *Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, Bedja D, Chen YC, Erp C, et al.* Noncanonical TGFβ signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. Science. 2011; 332(6027):358-61.
14. *Barbour JR, Spinnale FG, Ikonomidis JS.* Proteinase systems and thoracic aortic aneurysm progression. J Surg Res. 2007; 139(2):292-307.
15. *Lesauskaite V, Tanganelli P, Sassi C, Neri E, Diciolla F, Ivanoviene L, et al.* Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. Hum Pathol. 2001; 32(9):1003-11.
16. *El-Hamamsy I, Yacoub MH.* Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. Nat Rev Cardiol. 2009; 6(12):771-86.
17. *Jones JA, Spinale FG, Ikonomidis JS.* Transforming growth factor-β signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis. J Vasc Res. 2008; 46(2):119-37.
18. *Pannu H, Tran-Fadulu V, Milewicz DM.* Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and aortic dissections. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2005; 139C(1):10-6.
19. *Pannu H, Avidan N, Tran-Fadulu V, Milewicz DM.* Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: potential relevance to abdominal aortic aneurysms. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1085:242-55.
20. The FBN1 mutations database. Available at: http://www.umd.be:2030/
21. *Katzke S, Booms P, Tiecke F, Palz M, Pletschacher A, Türkmen S, et al.* TGGE screening of the entire FBN1 coding sequence in 126 individuals with marfan syndrome and related fibrillinopathies. Hum Mutat. 2002; 20(3):197-208.
22. *Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, et al.* Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. Science. 2006; 312(5770):117-21.
23. *Dietz H, Francke U, Furthmayr H, Francomano C, De Paepe A, Devereux R, et al.* The question of heterogeneity in Marfan syndrome. Nat Genet. 1995; 9(3):228-31.
24. *Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, et al.* Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. Nat Genet. 2004; 36(8):855-60.
25. *Loeys B, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. Nat Genet. 2005; 37(3):275-81.
26. *Boutouyrie P, Germain DP, Fiessinger JN, Laloux B, Perdu J, Laurent S.* Increased carotid wall stress in vascular Ehlers-Danlos syndrome. Circulation. 2004; 109(12):1530-5.
27. *Coady MA, Davies RR, Roberts M, Goldstein LJ, Rogalski MJ, Rizzo JA, et al.* Familial patterns of thoracic aortic aneurysms. Arch Surg.1999; 134(4):361-7.
28. *Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, et al.* Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. N Engl J Med. 2006; 355(8):788-98.
29. *Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A.* Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors. Eur J Biochem. 2000; 267(17):5550-60.
30. *Di Guglielmom GM, Roy CL, Goodfellow AF, Wrana JL.* Distinct endocytic pathways regulate TGF-β receptor signalling and turnover. Nat Cell Biol. 2003; 5(5):410–21.

Gauta: 2014 11 21
Priimta spausdinti: 2015 01 05

SUMMARY

1. INTRODUCTION

Dilatative pathology of ascending aorta (DPAA) represents a significant cardiovascular disease group, which the main method of treatment is surgical. The incidence of this pathology reaches 10.4: 100 000. Aortic dilatation is a well-known condition for life-threatening aortic dissection.

It is indicated that in the last decade cases of aortic dissection has increased from 2.0-3.5: 100 000 to 4.3:100 000. In Lithuania male mortality due to DPAA is increasing during the last year period from 1998 to 2015 (according to the data of Lithuanian Statistics Department).

DPAA usually develops without any symptoms before clinically manifested sudden aortic wall dissection. In most cases of sporadic thoracic aortic expansion causes remain unknown, only a small part of this disease is determined of atherosclerosis or aortitis of various origin; *Fibrillin-1* (*FBN1*) gene mutation that cause Marfan syndrome; congenital collagen structural changes causing Ehler-Danlos syndrome or Transforming Growth Factor- beta (TGF-β) mutations manifesting Loeys- Dietz syndrome. Gene mutations and their interface with the DPAA formation were disclosed with examination of rare hereditary diseases (Marfan, Loeys-Dietz, Ehler-Danlos, etc.).These syndromes are characterized by similar changes in the aortic wall. An altered TGF-β signaling pathway due to the mutated FBN1 was identified within examination of the aortic expansion mechanisms for Marfan syndrome diagnostics. Genome wide association study (GWAS) published by LeMaire with colleagues (2011) showed that *fibrillin-1* mutations are important not only for Marfan syndrome formation, but found the interface with sporadic DPAA development.

In this study, we investigated *FBN1* SNPs (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) correlation with TGF-β1 concentration within sporadic DPAA and *FBN1* SNPs interfaces with TGF-β1 concentrations in healthy people without DPAA.

Aim of the study

To evaluate an impact of *FBN1* gene single nucleotide polymorphisms (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) and Transforming growth factor beta1 (TGF-β1) concentration interfaces for sporadic dilatative pathology of ascending aorta formation.

Objectives of the study

1. To evaluate an impact of *FBN1* single nucleotide polymorphysms (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) for sporadic dilatative pathology of ascending aorta formation.

2. To evaluate TGF-β1 concentration in blood plasma in patients with DPAA and Kaunas random population group and to assess impact of gender and age on TGF-β1 concentration in the latter group.

3. To evaluate correlation among *FBN1* single nucleotide polymorphysms (rs2118181, rs10519177, rs1036477, rs755251, rs4774517) and TGF-β1 concentration in blood plasma.

The scientific novelty of the study

This scientific study allows an integrated assessment of the molecular mechanisms of the DPAA morphogenesis. This is the first work in which, using molecular genetics and immunoassay methods, an interface of sporadic DPAA with *FBN1* gene single nucleotide polymorphisms and TGF-β1 concentration is considered.

GWAS has shown that Fibrillin-1 mutations are important not only for Marfan syndrome formation, but for sporadic DPAA to occure as well. The investigation of three DPAA expression phenotypes: aneurysms, postenotic dilatations due to aortic valve stenosis and dissections is novel. Previous works were limited with the aneurysms and dissections only.

This is the first work to investigate the cytokine TGF-β1 concentration and its interface with the *FBN1* gene polymorphisms of different genotypes and the DPAA of different phenotypes (aneurysms, postenotic dilatations due to aortic valve stenosis and dissections). The first set of TGF-β1 concentration differences in healthy people of the reference group, depending on age and gender, was established. The findings demonstrate the clinical value of molecular and biochemical markers for the early DPAA diagnostics, checking the hypothesis that *FBN1* polymorphisms increase the possibility of the sporadic DPAA occurrence and are associated with increased TGF-β1 concentration in blood plasma.

2. MATERIALS AND METHODS OF THE STUDY

Study population

DPAA group

The study included 338 patients who underwent the aortic reconstructive surgery in the Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Surgery at Lithuanian University of Health Sciences (from 2004 to 2014 years), n=290 and at Clinic of Cardiac Surgery Centre of Vilnius University (from 2013–2014 years), n=48. In all cases histological investigation of the aorta tissue was performed from the samples taken during the operation.

Exclusion criteria for the study were:

- Aortitis (n=14),
- Marfan syndrome (n=4),
- Atherosclerotic lesions, IV–V types (n=6),
- Repeatedly operated after Rosso procedure (n= 2).

Thus, 312 patients were included to further study (DPAA group) which was divided to ascending aortic aneurysm (AAA, n=160), postenotic dilatation due to aortic valve stenosis (PDS, n=79) and Stanford A aortic dissection (SAD, n =73) subgroups.

Samples of Study population and structure are discribed in Fig.1.

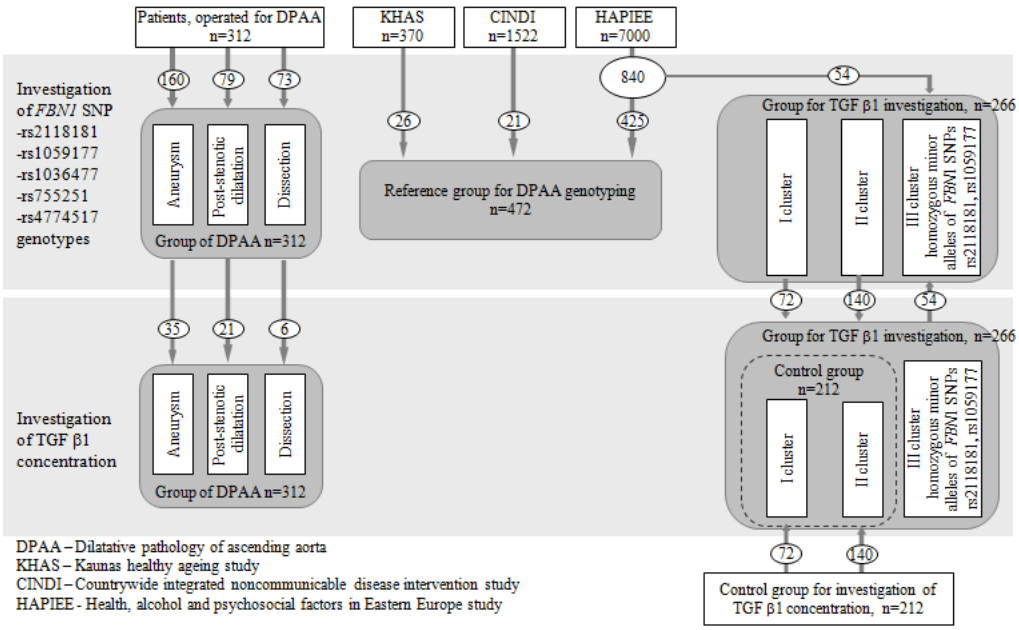


Fig. 1. *Samples of Study population and structure*

Reference group

The reference group (n=472) was drawn up, taking into account the DPAA group structure by gender and age. The group selected from the random population, collected in international projects:

1. Random Kaunas population sample of 840 individuals from 45 to 74 years. It was drawn up from random sample (n=7000) collected in the Laboratory of Population studies of Institute of Cardiology, LUHS, under International HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial Factors in Eastern Europe) study.
2. A sample (n=21) from Lithuanian rural areas of random individuals with 25-45 year-old (n=1522). It was gathered by researchers of Institute of Cardiology, LUHS, under the international CINDI (Countrywide Integrated Noncommunicable Disease Intervention) study.
3. A sample (n=26) of older than 65-year-old random individuals from total amount of the participants (n=370). It was gathered by researchers of Geriatric Cardiology Clinic and Laboratory of Molecular Cardiology of Institute of Cardiology LUHS, under the international project "HEALTHY AGING IN KAUNAS".

The data on the reference group of individuals arterial blood pressure was taken from epidemiological records of HAPIEE, CINDY and HEALTHY AGEING IN KAUNAS projects. Hypertension was determined during the health check within the epidemiological study. Individuals with systolic blood pressure ≥140 mm Hg and/or diastolic blood pressure ≥90 mm Hg, or the person taking the medication for high blood pressure for the last two weeks were presumed to have hypertensia.

Clusters of study participants

The clusters of study participants were formed to investigate TGF-β1 concentration in blood plasma.

LUHS students and staff (n=72, aged 23 to 67 years, median 49 years) formed the first cluster (cluster I). The second cluster (cluster II) consisted from Kaunas Dainava outpatient's clinic patient's – volunteers without cardiovascular complaints (n=140, aged 41 to 87 years, median age 65 years). I and II clusters composed a control group for TGF-β1 concentration in plasma test. Inclusion criteria: persons with no cardiovascular complaints other than hypertension. Exclusion criteria: oncology and autoimmune diseases and preanalytical discrepancies identified during the sample prieparation for TGF-β1 testing (hemolysis, lipemia, plasma preparation errors).

The third cluster (cluster III) consisted of individuals 45–74 years old population (n=840) randomly selected under International HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial Factors in Eastern Europe) study. Inclusion criterion to this sample (n=54) – individuals with homozygous minor alleles of *FBN1* SNPs rs 2118181 or rs1059177.

Methods of analysis

Genomic DNA from blood for reference group was performed using silica gel column method *Sorpoclean by Sorpo Diagnostics* standard methodology (Lesauskaite et al., 2007).

Genomic DNA from DPAA patients, I and II cluster of the study was isolated using standardized saline method (Miller, et al., 1988).

DPAA Genomic DNA for those patients which blood samples were unavailable was isolated from paraffin embeded aortic wall tissue using standard method (Sepp et al. 1994).

Genetic analysis

Genotyping of *FBN1* SNPs (rs2118181, rs1059177, rs1036477, rs755251, rs4774517) was carried out for 1411 persons (Table 3.3.1.1.).

FBN1 SNPs (rs2118181, rs1059177, rs1036477, rs755251, rs4774517) were genotyped by TaqMan allelic discrimination Assay-By-Design (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) instructions. Collections Tags: C__16234705_10 (rs2118181) 5 C___1865677_10 (rs1036477), C___8932 690_10 (rs1059177), C__28032458_20 (rs4774517), C___1132304_10 (rs755251). Genotyping performed in Laboratory of Molecular Cardiology of Institute of Cardiology using ABI 7900HT Real-time PCR thermocycler from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). To doublecheck the genotyping results 15 samples were sequenced at the Biotechnology Sequence Centre, Vilnius, Lithuania. The results obtained were the same, confirming the data reproduction and accuracy.

TGF-β1 testing

328 individuals were tested for TGF-β1 concentration in blood plasma (Table 3.2.1)

Blood samples from DPAA patients were taken before the operation, samples from individuals of I and II clusters at the time of arrival, using standard venipuncture. 3 ml of vacuum tubes with 5.9 mg K2EDTA (manufacturer Terumo, Belgium) and a single blood collection system were used. Within 2 hours after the blood collection plasma was separated from the formed elements by centrifugation for 15 min at 2500 rpm, aliquoted up in 2 ml Eppendorf-type tube and frozen at –20°C. Plasma from individuals

of III cluster was selected from participants, n=840, of HAPIEE study who had *FBN1* rs 2118181 or rs1059177 minor allele homozygous genotype. The blood plasma was collected during the ongoing study and kept in a freezer at –80°C. It has been defrosted straight before the TGF-β1 analysis.

Plasma samples were tested in duplicate using eBioscience Platinum (Bender Med Systems GmbH, Austria) human TGF-β1 commercial ELISA kits, according to the manufacturer's procedure. Test basis- standard sandwich-type enzyme immunosorbtion reaction. Absorbance was measured by Stat-Fax 4200 microplate reader at 450 nm and the primary wavelength. Cross-reactions between TGF-β2 and TGF-β3 according to the manufacturer was less than 0.01 proc.

Statistical analysis

Nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare distributions of quantitative traits. χ^2 test or two-way Fisher's exact test(categorical data) were applied to check an interface of gene polymorphisms variants. The expected frequency for each genotype calculated according to the Hardy-Weinberg's law and compared with established genotype frequencies under χ^2 test. Logistic regression was used to evaluate the genotype combinations defining the odds ratio among the Reference and the DPAA group and the subgroups. Genetic analysis of the link, using different inheritance patterns was calculated by SNPStats program:

- codominant model- wild type allele homozygotes vs heterozygotes and wild type allele homozygotes vs minor allele homozygotes;
- dominant model- wild type allele homozygote vs heterozygotes and homozygotes;
- recessive model- minor allele homozygotes vs wild type allele homozygotes and heterozygotes;
- additive model means one or two alleles additive effect vs the other allele homozygote.

Akaike (AIC) information criterion was used to select the best data corresponding to the model of heredity in terms of the lowest numerical expression. Spearman rank correlation was applied to the analysis of age on the plasma concentrations of TGF-β1. Multiple linear regression evaluated the gender and genotype effect on log-transformed concentrations of TGF-β1. Significance value by Bonferroni adjustment was applied to analyze *FBN1* SNPs. Calculations carried out using statistical package (SPSS, version 15.0, Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTS

3.1. Study of interface among *FBN1* SNPs and DPAA

The clinical and demographic characteristics of study participants are reported in Table 3.1.1.

Table 3.1.1. *Demographic and clinical characteristics of study participants*

Characteristics	Aneurysm n = 160	Post–stenotic dilatation n = 79	Stanford A dissection n = 73	Total n=312	Reference n = 472
Age in years Median (range)	60 (18–83)	65[a] (27–81)	62 (24–84)	62 (18–84)	61 (25–83)
Gender Male, n (%)	135 (84.4)	57 (72.2)	54 (74.0)	246 (78.8)	372 (78.8)
Hypertension Yes, n (%)	120 (75.0)	62 (78.5)	70 (95.9)[b]	252 (80.7)	352 (74.6)

[a]P=0.004 versus reference group, accepted as statistically significant (Kruskal-Wallis test).
[b]P=0.0001 versus reference group, accepted as statistically significant (the two-tailed Fisher's exact test).

Patients in the post-stenotic dilatation subgroup were the oldest. They were significantly older (p=0.004) than reference group subjects as well. A history of hypertension was more commonly reported in patients within the Stanford A dissection subgroup than in the other two subgroups with aortic pathology or for the reference group. Males outnumbered females in all study groups. The patients within the post-stenotic dilatation subgroup commonly had a bicuspid aortic valve significantly more often than patients from either the aneurysm or Stanford A dissection subgroups.

The distribution of genotypes was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium (p>0.15) in all the groups studied. Minor allele frequency (MAF) and allelic association ORs are presented in Table 3.1.2.

Table 3.1.2. *Minor allele frequency (MAF) of genotyped FBN1 SNPs and associations with phenotypes of dilatative pathology within ascending thoracic aorta*

SNPs	Aneurysm group		Post–stenotic dilatation group		Stanford A dissection group		Reference group	
	MAF	**OR CI, 95%**	**MAF**	**OR CI, 95%**	**MAF**	**OR CI, 95%**	**MAF**	**OR CI, 95%**
rs2118181 *rs1036477*	0.16[a]	1.67 1.61–2.40 p=0.005	0.14	1.39 0.84–2.31 p=0.20	0.23[b]	2.59 1.67–4.01 p<0.001	0.10	1.00
rs10519177 *rs755251* *rs4774517*	0.28	1.25 0.94–1.66 p=0.13	0.24	1.01 0.68–1.49 p=0.98	0.40[b]	2.13 1.48–3.08 p<0.001	0.24	1.00

Bonferroni corrected significance threshold P<0.01.
OR – odds ratio; CI – confidence interval.
[a]P=0.007 versus MAF in reference group.
[b]P<0.0001 versus MAF in reference group.

Patients operated upon due to the ascending thoracic aorta aneurysms or Stanford A dissections had significantly higher minor allele frequencies in *FBN1* SNPs rs2118181 and rs1036477 than in reference group subjects (0.16 and 0.23 vs 0.10, $p \leq 0.007$, respectively). Minor allele frequencies in SNPs rs10519177, rs755251, and rs4774517 were also significantly higher in those with Stanford A dissections as compared to those in the reference group (0.40 vs 0.24, $p<0.0001$, respectively). Thus minor alleles of SNPs rs2118181 and rs1036477 appeared to be associated significantly with an increased risk of the ascending thoracic aortic aneurysm (OR 1.67, CI 95% 1.61–2.40) or Stanford A aortic dissection (OR 2.59, CI 95% 1.67–4.01), while SNPs rs10519177, rs755251, and rs4774517 were only associated significantly with Stanford A aortic dissection (OR 2.13, CI 95% 1.48-3.08). Analysis of the distribution of genotypes in all five *FBN1* SNPs investigated detected only significant differences between homozygous carriers of minor alleles in patients operated upon due to a Stanford A dissection and in reference group subjects (Table 3.1.3).

Table 3.1.3. *FBN1 SNP's (rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs4774517, rs755251) genotype distribution among DPATA patients and reference group subjects from the Lithuanian population*

Investigated group, n	**Genotype**	**Genotype and allele frequency, n (%)**		
		rs2118181 rs1036477	***rs755251 rs10519177***	***rs4774517***
Aneurysm n=160	AA	112 (70.4)	83 (52.5)	14 (8.9)
	GA	42 (26.4)	61 (38.6)	61 (38.6)
	GG	5 (3.2)	14 (8.9)	83 (52.5)
P value		0.019	0.254	0.254
Post-stenotic dilatation n=79	AA	56 (74.7)	47 (59.5)	6 (7.6)
	GA	17 (22.7)	26 (32.9)	26 (32.9)
	GG	2 (2.6)	6 (7.6)	47 (59.5)
P value		0.362	0.657	0.657
Stanford A dissection n=73	AA	44 (60.3)	28 (39.4)	14 (19.7)
	GA	24 (32.9)	29 (40.9)	29 (40.9)
	GG	5 (6.8)	14 (19.7)	28 (39.4)
P value		< 0.001	< 0.001	< 0.001
Reference n472	AA	378 (80.1)	272 (57.6)	26 (5.5)
	GA	89 (18.9)	174 (36.9)	174 (36.9)
	GG	5 (1.0)	26 (5.5)	272 (57.6)

Aneurysm group: patients with missing values on rs2118181 (n=1) and rs10519177, rs4774517 (n=2) were excluded from analysis. Post-stenotic dilatation group: 4 patients with missing value on rs2118181 were excluded from analysis. Stanford A dissection group: 2 patients with missing values on rs10519177 and rs4774517 were excluded from analysis. p-value versus reference group after Bonferroni correction (<0.01). DPATA: Dilatative pathology of ascending thoracic aorta.

The difference (p=0.019) between distribution of rs2118181, rs1036477 genotypes in aneurysm sub-group and in reference group subjects did not reach the adjusted significance threshold (p<0.01). There were no significant differences in the distribution of genotype frequency in patients with post-stenotic dilatation and in the reference group. In addition, we compared the ages of patients operated upon due to aortic pathology with respect to the studied genotypes.

Homozygous carriers of the minor alleles (rs10519177, rs755251 and rs4774517) were younger individuals than those who were heterozygous or wild-type homozygous (range, 24–80 years, median age, 57 vs range, 32–84 years, median age, 65 years, p = 0.01, respectively) in the Stanford A dissection sub-group. There were no other significant differences in age with regard to the genotypes and phenotype of aortic pathology.

Finally, we analysed associations between phenotypes of DPATA and investigated *FBN1* SNPs by inheritance models (Table 3.1.4).

The additive model fitted best for SNPs rs2118181 and rs1036477 association with the ascending thoracic aortic aneurysm sub-group (OR 1.70, CI 95% 1.17–2.46) or the Stanford A dissection sub-group (OR 2.64, CI 95% 1.66–4.19). A recessive model fitted best in describing the association between SNPs rs10519177, rs755251 rs4774517 and Stanford A dissection (OR 4.31, CI 95% 2.06–9.01).

Table 3.1.4. *Associations between DPATA phenotypes and genotyped FBN1 SNPs (rs2118181, rs1036477, rs10519177, rs4774517, rs755251)*

SNPs	Model	Aneurysm				Post-stenotic dilatation				Stanford A dissection			
		OR	**CI, 95%**	**p value**	**AIC**	**OR**	**CI, 95%**	**p value**	**AIC**	**OR**	**CI, 95%**	**p value**	**AIC**
rs2118181 rs1036477	Dominant	1.75	1.15–2.64	0.008	702.00	1.31	0.74–2.32	0.352	440.41	2.61	1.54–4.45	0.000	404.15
	Recessive	2.96	0.83–10.43	0.092	706.20	3.04	0.558–16.56	0.199	439.85	10.27	2.46–42.93	0.001	403.31
	Additive	1.70	1.17–2.46	0.005	700.98	1.36	0.82–2.27	0.239	439.93	2.64	1.66–4.19	0.000	400.04
	Co-dominant				702.90				441.43				400.89
	GA	1.65	1.08–2.54	0.022		1.22	0.67–2.22	0.509		2.23	1.27–3.90	0.005	
	GG	3.32	0.94–11.78	0.063		3.15	0.58–17.23	0.185		12.59	2.98–53.09	0.001	
rs10519177 rs755251	Dominant	1.25	0.87–1.80	0.239	704.09	0.89	0.55–1.45	0.642	457.37	1.93	1.15–3.24	0.013	398.67
	Recessive	1.76	0.88–3.50	0.107	703.02	1.37	0.54–3.48	0.509	457.18	4.31	2.06–9.01	0.000	391.46
	Additive	1.27	0.95–1.70	0.111	702.96	0.97	0.66–1.45	0.904	457.57	2.03	1.38–2.98	0.000	391.88
	Co–dominant				704.47				458.69		0.84–2.59		391.62
	GA	1.16	0.78–1.70	0.459		0.83	0.50–1.40	0.488		1.48	2.34–11.31	0.174	
	GG	1.87	0.92–3.78	0.083		1.28	0.50–3.31	0.612		5.15		0.000	
rs4774517	Dominant	1.25	0.87–1.80	0.239	704.09	0.89	0.55–1.45	0.642	457.37	1.93	1.15–3.24	0.013	398.67
	Recessive	1.76	0.88–3.50	0.107	703.02	1.37	0.54–3.48	0.509	457.18	4.31	2.06–9.01	0.000	391.46
	Additive	1.27	0.95–1.70	0.111	702.96	0.97	0.66–1.45	0.904	457.57	2.03	1.38–2.98	0.000	391.88
	Co-dominant				704.47				458.69				391.62
	GA	1.16	0.78–1.70	0.459		0.83	0.50–1.40	0.488		1.48	0.84–2.59	0.174	
	AA	1.87	0.92–3.78	0.083		1.28	0.50–3.31	0.612		5.15	2.34–11.31	0.000	

Adjusted by age, gender and hypertension. Bonferroni-corrected significance threshold $p < 0.01$.
DPATA: Dilatative pathology of ascending thoracic aorta; OR: odds ratio; CI: confidence interval; AIC: Akaike information criterion.

The additive model fitted best for SNPs rs2118181 and rs1036477 association with the ascending thoracic aortic aneurysm sub-group (OR 1.70, CI 95% 1.17–2.46) or the Stanford A dissection sub-group (OR 2.64, CI 95% 1.66–4.19). A recessive model fitted best in describing the association between SNPs rs10519177, rs755251 rs4774517 and Stanford A dissection (OR 4.31, CI 95% 2.06–9.01).

Our data demonstrated that all five *FBN1* SNPs studied were associated with a Stanford A dissection. Those patients operated on for Stanford A dissections had a minor allele frequency significantly higher than reference group subjects. In a manner similar to the GWAS data (Le Maire, et al, 2011)) rs2118181 and rs1036477 were most significantly associated with Stanford A dissection(minor allele association OR 2.59, 95% CI 1.67–4.01, p=0.000). In contrast to the Yale study (Iakoubova, et al, 2014) and in line with GWAS we also identified significant association of the minor alleles, rs10519177, rs4774517 and rs755251 (OR 2.13, 95% CI 1.48–3.08, p= 0.000) with Stanford A aortic dissections and both rs2118181 and rs1036477 with ascending thoracic aortic aneurysms (OR 1.67, 95% CI 1.61–2.40, p=0.005). Thus, our data show that the minor alleles of all five *FBN1* SNPs we investigated might be considered as risk alleles for Stanford A aortic dissection, while the minor alleles, rs2118181 and rs1036477, are also risk alleles for development of ascending thoracic aortic aneurysms.

According to our data frequency of rs2118181, rs1036477 and rs10519177, rs4774517, rs755251 wild-type homozygous genotypes were approximately 60% and 40% in the Stanford A aortic dissection subgroup, respectively (Table 3.1.3). In addition we checked the number of patients with aortic dissection that were free from the risk alleles in all five SNPs that we genotyped. Almost one third of the patients with aortic dissection (31%) were wild-type homozygous in all genotyped *FBN1* SNPs. This suggests that for these patients aortic dissection developed in the absence of a risk allele. These data stress once more that aortic aneurysms and/or dissections represent a complex pathological process and various clinical and biological factors might either increase or decrease their respective risks.

3.2. Study of TGF-β1 concentration in blood plasma among DPAA patients and the control group

Control group for TGF- β1 concentration consisted of I and II clusters.

Table 3.2.1. *Age and gender distribution among DPAA and Control group*

Group	Male	Female	Age (yrs) median (range)
DPAA (N=62)	49	13	59 (27–79)
Control group (N=212)	105	107	62 (23–87)

DPAA – Dilatative pathology of ascending aorta.

Overall distribution of TGF-β1 values of control group is shown in Fig. 3.2.1.

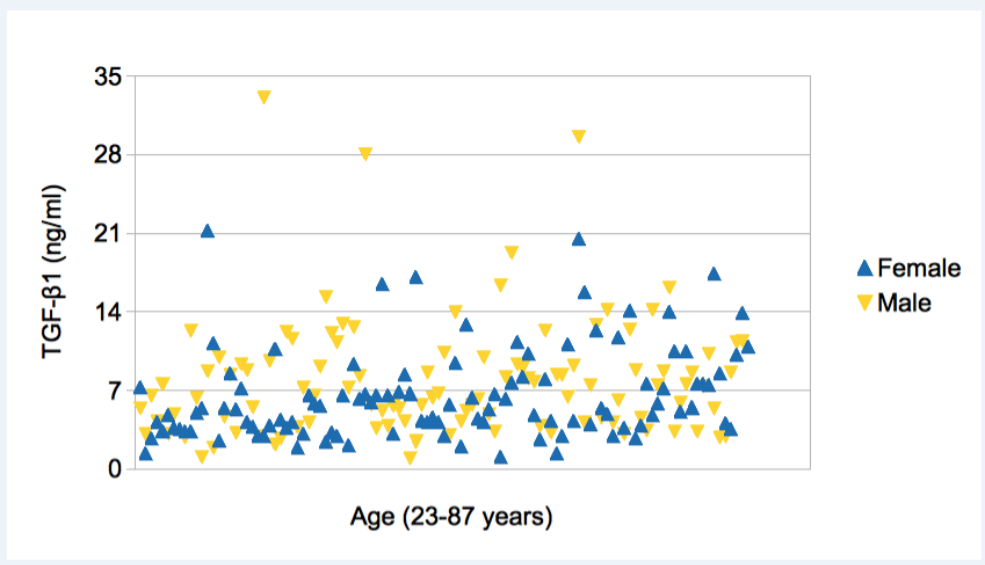


Fig. 3.2.1. *Overall distribution of TGF–β1 values according age and gender (I and II clusters)*

The lowest TGF-β1 concentration was 1.0 ng/ml and the highest was 33 ng/ml. Investigation of the control group indicated higher TGF-β1 concentration (p=0.017) in males (median 7.27 ng/ml, range 1.00–33.12) compared to females (median 5.38 ng/ml, range 1.10-21.20).

TGF-β1 level showed a tendency to increase with age in women (R=0.338, p<0.001) but was steady in men (R=0.105, p=0.288) throughout lifetime. These results indicate that age and gender can be confounding effects when comparing TGF-β1 levels between the study groups.

Patients with Stanford A dissection had slightly higher TGF-β1 concentration, but there were no significant differences in TGF-β1 concentration between patients with various phenotypes of DPAA or between each phenotype and the reference group subjects. Overall, patients with DPAA had

significantly higher TGF-β1 concentration than the control group (Table 3.2.2). Differences in TGF-β1 values between DPAA males (median 7.60 ng/ml) and male population of the control group (median 7.27 ng/ml) were not statistically significant (p=0.135) whereas concentration between females in DPAA (median 8.80 ng/ml) and the control group (median 5.38 ng/ml) were confidently higher (p=0.004). Finally, we analyzed association between TGF-β1 concentration and DPAA which resulted in odds ratio (OR) 1.084 (95% confidence interval 1.027–1.144, p=0.004).

Table 3.2.2. *TGF-β1 concentration in patients with variuos phenotypes of dilatative pathology of ascending thoracic and control group subjects*

TGF-β1	**Stanford A dissection, n=6**	**Post stenotic dilatation, n=21**	**Aneurysm, n=35**	**Total, n=62**	**Control group, n=212**
Median range) ng/ml	10.1 (6.58–17.6)	7.7 (2.1–22.0)	7.8 (2.3–25.3)	7.7 (2.1–25.3)*	6.2 (1.0–33.1)

*p=0,010 versus Reference group.

For the first time we reported irregularity of TGF-β1 concentration in blood plasma caused by age and gender in subjects from the reference group. TGF-β1 concentration in males did not change with age and was significantly higher in comparison to females, while TGF-β1 concentration in females showed a significant increase due to older age. The latter phenomenon might be attributed to TGF-β1 signal system activation by follicle-stimulating hormone (FSH). It is well known that levels of FSH in females increase at perimenopausal age and decline only in the eighth/ninth decade.

We show that non-marfanoid patients with DPAA also have elevated plasma levels of TGF-β1 compared to the reference group. Patients with Stanford A dissection have particularly high TGF-β1 concentrations in comparison to patients with other phenotypes of DPATA. Such an increase could be caused by the liberation of TGF-β1 into the plasma from activated platelets during aortic rupture. Thus, we conclude that platelet activation might have an impact on the TGF-β1 concentration in blood plasma.

3.3. Study of *FBN1 SNPs* (*rs2118181, rs1059177)* and correlation of TGF– β1 concentration in blood plasma

Our final study population consisted of 266 subjects (all three clusters, see Part 2. Materials and Methods of study). TGF-β1 concentrations differed significantly (p=0.001) between men (median 8.32 ng/ml, range 1.00–33.10)

and women (median 5.81 ng/ml, range 1.10–27.30) and showed dependency on age (R=0.236, p<0.001). Genotype distribution and corresponding TGF-β1 values are presented in Table 3.3.1.

Median TGF-β1 concentrations for each genotype showed quantitative association. The presence of one and two rs2118181 G alleles led to 1.24 and 3.21 ng/ml increase in median TGF-β1 concentration, respectively. A single copy of rs10519177 G allele did not seem to cause an increase in TGF-β1 but the presence of two minor allele copies coincided with a 4.08 ng/ml increase in TGF-β1 levels.

Table 3.3.1. *Genotype frequencies and corresponding TGF-β1 values*

***FBN1* SNPs Genotype**	**Genotype frequency n (proc.)**	**TGF–β1 concentration (ng/ml) min/ med/ max**
rs2118181		
AA	192 (71.4)	1.00/ 6.57/ 33.12
AG	64 (23.8)	2.71/ 7.81/ 28.08[a]
GG	13 (4.8)	1.40/ 9.78/ 17.28[b]
AG+GG	77 (28.6)	1.40/ 8.02/ 28.10
rs10519177		
AA	138 (51.3)	1.00/ 6.40/ 33.12[c]
AG	73 (27.1)	1.90/ 5.46/ 28.08[d]
GG	58 (21.6)	1.40/ 10.48/ 27.29
AG+GG	131 (48.7)	1.40/ 7.6/ 28.08

[a]TGF-β1 concentration compared to rs2118181 AG vs AA genotypes, p=0.024.
[b]TGF-β1 concentration compared to rs2118181 GG vs AA genotypes, p=0.094.
[c]TGF-β1 concentration compared to rs10519177 AA vs GG genotypes, p<0.0001.
[d]TGF-β1 concentration compared to rs10519177 AG vs GG genotypes, p<0.0001.

Table 3.3.2. *Multiple linear regression analysis for logarithmically transformed TGF-β1 values*

***FBN1* SNP**	**Dependent variables**	**Unstandardised Coefficients B**	**p value**	**Adjusted R^2**
rs2118181	Constant	1.045	<0.001	0.103
	Gender (male)	0.185	0.015	
	Age	0.012	<0.001	
	Genotype AG+GG	0.222	0.008	
	Constant	1.035	<0.001	0.102
	Gender (male)	0.181	0.018	
	Age	0.012	<0.001	
	Allele G	0.172	0.010	
rs10519177	Constant	1.053	<0.001	0.146
	Gender (male)	0.158	0.034	
	Age	0.011	<0.001	
	Genotype GG	0.397	<0.001	

A multiple linear regression analysis was adopted to investigate an association between gender, age, *FBN1* genotypes and TGF-β1 values (Table 3.3.2). Gender, age and rs2118181 AG+GG genotypes or a single allele G presence were all significant variables to predict log-transformed TGF-β1 values ($p<0.05$). An additive effect of G allele correlated to the observed TGF-β1 values in Table 3.3.1. We did the same testing for rs10519177, and found that the presence of GG genotype in addition to the gender and age was significant variable for TGF-β1 values as well ($p<0.05$).

This is the first study on the association between previously defined *FBN1* SNPs (rs2118181 and rs10519177) linked with sporadic thoracic aorta aneurysm and dissection and TGF-β1 concentration in blood plasma of study subjects who were not aware of aortic dilatation. Our data demonstrated that presence of rs2118181 minor allele significantly increased median TGF-β1 values, while such effect in rs10519177 was achieved only by homozygous carriers of two minor alleles. It is obvious that the relationship between TGF-β1 and *FBN1* SNPs is quantitative. Unaltered fibrillin-1 activates TGF-β1 through interactions between latent TGF-β binding proteins (LTBPs 1-4) and the N terminus of fibrillin-1. If this interaction is somehow disturbed due to changes in fibrillin-1 availability the amount of LTBPs would increase. In our experiments we used acid activation to release TGF-β1 from LTBPs complex to measure total TGF-β1 level in blood plasma. Therefore, we do not know whether TGF-β1 increase is due to higher levels of LTBP or increased levels of active TGF-β1. More LTBPs would indicate defective fibrillin-1 interaction with LTBPs and reduced activation of TGF-β1. Higher levels of active TGF-β1 would indicate an increase in the activation process through LTBPs and fibrillin-1 interactions.

CONCLUSIONS

1. Minor alleles of *FBN1* SNPs rs2118181 and rs1036477 are clearly linked to aortic aneurysms and Stanford A aortic dissection, increasing their risk of formation with OR 1.67, 95% CI 1.61 to 2.40; OR 2.59, 95% CI 1.67 to 4.01, respectively. Meanwhile, minor alleles of *FBN1* SNPs rs1059177, rs755251 and rs4774517 are associated only with Stanford A aortic dissection, increasing the risk (OR 2.13, 95% CI, 1.48 to 3.08). These SNP‘s might be considered as biomarkers for identifying patients at risk for ascending aortic aneurysm and aortic dissection.

2. TGFβ-1 concentration level in blood plasma for males was significantly higher than for women ($p = 0.001$). TGF-β1 level showed a tendency to increase with age in women ($R=0.338$, $p<0.001$) but was steady in men ($R=0.105$, $p=0.288$) throughout lifetime. Significant difference in TGF-β1 concentration (median 7,7 ng/ml, range 2,1–25,3 ng/ml and median 6,2 ng/ml, range 1,0–33,1, p=0,01, respectively) was asigned comparing the entire DPAA group with the control group. Increased TGF-β1 concentration leads to the formation of DPAA (OR 1,084, CI 1.027 to 1.144, $p = 0.004$).
3. Carriers of heterozygous or homozygous genotypes for minor allele of FBN1 SNP rs2118181 have had a significantly higher TGF-β1 concentration in blood plasma in comparison to wild type allele homozygotes. Increased TGF-β1 concentration was found for carriers with homozygous minor allele genotype of rs1059177 compared to heterozygous and homozygous wild type allele carriers ($p <0.0001$). Minor alleles of *FBN1* SNP rs2118181 or pair of rs1059177 minor alleles increase TGF-β1 concentration in plasma.

PRIEDAI

1 priedas

KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

LSMUL KK Eivenių 2, Centrinis korpusas 71 kab., 50009 Kaunas, tel. +370 37 326168; faks. +370 37 326901, e-mail: rezid@med.kmu.lt

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININĮ TYRIMĄ

2012-03-07 Nr. BE-2-12

Biomedicininio tyrimo pavadinimas:	**„Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška“.**
Protokolo Nr.:	**1**
Data:	**2012-02-27**
Versija:	**1**
Pagrindinis tyrėjas:	**Prof. habil. Dr., J. Vaškelytė**
Biomedicininio tyrimo vieta: Įstaigos pavadinimas: Adresas:	**LSMU Kardiologijos klinika** **LSMU Širdies, krūtinės ir kraujagyslių chirurgijos klinika, širdies chirurgijos skyrius, LSMU Kardiologijos Instituto Molekulinės kardiologijos lab.** **Eivenių g. 2, LT- 50009 Kaunas; Sukilėlių pr. 17, LT-50009, Kaunas.**

Išvada:
Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio, įvykusio **2012 m. kovo 7 d.** (protokolo Nr. 30/2012) sprendimu pritarta biomedicininio tyrimo vykdymui.

Mokslinio eksperimento vykdytojai įsipareigoja: (1) nedelsiant informuoti Kauno Regioninį biomedicininių Tyrimų Etikos komitetą apie visus nenumatytus atvejus, susijusius su studijos vykdymu, (2) iki sausio 15 dienos – pateikti metinį studijos vykdymo apibendrinimą bei, (3) per mėnesį po studijos užbaigimo, pateikti galutinį pranešimą apie eksperimentą.

Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto nariai			
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis	Dalyvavo posėdyje
1.	Doc. Irena Marchertienė	anesteziologija	taip
2.	Doc. Romaldas Mačiulaitis	klinikinė farmakologija	taip
3.	Prof. Nijolė Dalia Bakšienė	pediatrija	taip
4.	Prof. Irayda Jakušovaitė	filosofija	taip
5.	Dr.Eimantas Peičius	filosofija	taip
6.	Laima Vasiliauskaitė	psichoterapija	ne
7.	Gintaras Česnauskas	chirurgija	ne
8.	Zelmanas Šapiro	terapija	ne
9.	Jurgita Laurinaitytė	bioteisė	ne

Kauno regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininių tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkė

KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Irena Marchertienė

KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, LT 44307 Kaunas., tel. +370 37 32 68 89; e-mail: kaunorbtek@lsmuni.lt

PRITARIMAS
BIOMEDICININIO TYRIMO PAPILDYMUI/PRATĘSIMUI

2016-02-22 Nr. P1-BE-2-12/2012

Biomedicininio tyrimo pavadinimas: **„Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška" (leidimas atlikti biomedicininį tyrimą išduotas 2012-03-07 leidimo nr. BE-2-12).**	
Pagrindinis tyrėjas:	**Prof. habil. Dr., J. Vaškelytė**
Biomedicininio tyrimo vieta:	**LSMUL VšĮ Kauno klinikos** Eivenių g. 2, LT-50009 Kaunas LSMU MA Kardiologijos institutas Sukilėlių pr. 15, LT-50009 Kaunas

Peržiūrėti šie [√] su minėtu tyrimu susiję dokumentai:

[√] Biomedicininio tyrimo: „Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška" pagrindinio tyrėjo prašymas dėl leidimo papildyti/pakeisti biomedicininį tyrimą.

[√] Paraiška biomedicininiam tyrimui: „Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška".

[√] Biomedicininio tyrimo: „Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška" protokolas nr. 2, versija 2, 2016-01-29.

[√] Biomedicininio tyrimo: „Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška" asmens informavimo forma ir informuoto asmens sutikimo forma 2016-02-10, versija 2.

[√] Biomedicininio tyrimo: „Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška" vykdymo ataskaitos santrauka.

[√] Papildomai į biomedicininį tyrimą: „Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška" įtraukiamos tyrėjos CV: Ramunės Šepetienės.

[√] Papildomai pridėtas biomedicininio tyrimo: „Kylančios aortos patologija: dilatacijos molekulinių, seruminių bei biomechanikos žymenų paieška" pirminis protokolas nr. 1, versija 1, 2012-02-13.

[√] **Nutarta:**

[√] Pritarti biomedicininio tyrimo pakeitimams atitinkantiems pateiktus dokumentus ir išduoti pritarimą tyrimo papildymui/pratęsimui.

Kauno regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto nariai		
Nr.	Vardas, Pavardė	Veiklos sritis
1.	Prof. Romaldas Mačiulaitis	Klinikinė farmakologija
2.	Prof. Edgaras Stankevičius	Fiziologija, farmakologija
3.	Doc. Eimantas Peičius	Filosofija
4.	Dr. Ramunė Kasperavičienė	Kalbotyra
5.	Med. dr. Jonas Andriuškevičius	Chirurgija
6.	Agnė Krušinskaitė	Teisė
7.	Prof. Skaidrius Miliauskas	Pulmunologija, vidaus ligos
8.	Med. dr. Rokas Bagdonas	Chirurgija
9.	Eglė Vaižgelienė	Visuomenės sveikata

Kauno regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas dirba vadovaudamasis etikos principais nustatytais biomedicininių tyrimų Etikos įstatyme, Helsinkio deklaracijoje, vaistų tyrinėjimo Geros klinikinės praktikos taisyklėmis.

Pirmininkas Prof. Edgaras Stankevičius

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS KAUNO REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS

2 priedas

Asmens informavimo forma

Paskutiniu metu žmonės dažniau serga širdies ir kraujagyslių bei kitomis lėtinėmis ligomis. Yra žinoma, kad galimybė susirgti širdies ir kraujagyslių ligomis, didele dalimi priklauso nuo įvairių rizikos veiksnių, tokių kaip rūkymas, riebus maistas, mažas fizinis aktyvumas, nervinis stresas ir kt. Ne mažiau svarbūs, bet mažiau ištirti yra paveldimi ar įgimti veiksniai. Nustačius šių veiksnių reikšmę būtų galima tinkamai parinkti profilaktikos priemones, gydymą bei prognozuoti ligos eigą. Šiuo metu LSMU KK Širdies, krūtinės ir kraujagyslių chirurgijos klinikoje ir LSMU Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje atliekami paveldimų širdies ir kraujagyslių ligų veiksnių tyrimai.

Jums savanoriškai sutikus dalyvauti moksliniame tyrime, būtų naudojami Jūsų demografiniai (amžius, lytis, išsilavinimas, profesija ir kt.) ir klinikiniai duomenys. Jums, nejaučiant skausmo, venos punkcijos metu paimama iš venos 3 ml kraujo ar operacijos metu gydymo tikslais pašalintas audinys bei 1 mm x 5 mm sveikos aortos sienelės ėminys, įgimtiems veiksniams nustatyti. Vėliau (po 6 mėn, 1 metų), Jus asmeniškai telefonu pakviesime atvykti širdies echoskopiniam tyrimui Jums patogiu laiku.

Tęsiant tyrimą, gali būti aptikti nauji galimi širdies ir kraujagyslių bei kitų lėtinių ligų rizikos veiksniai, kuriuos norėsime ištirti. Tikimės, jog sutiksite, kad Jūsų kraujo pavyzdžiai būtų saugomi ir ateityje naudojami lėtinių ligų tyrimo projektuose, galbūt ir genetiniuose tyrimuose.

Mes garantuojame, kad Jūsų asmeniniai duomenys nebus skelbiami. Visa asmeninė ir medicininė informacija bus saugoma kaip to reikalauja „Asmens duomenų apsaugos“ įstatymas ir prieinama tik studijoje dalyvaujantiems tyrėjams. Taip pat primename, kad Jūs bet kuriuo metu galite pasitraukti iš studijos ir turite teisę pareikalauti sunaikinti visus Jūsų turimus duomenis.

SUTIKIMAS

- Aš patvirtinu, kad perskaičiau ir supratau aukščiau pateiktą informaciją, turėjau galimybę užduoti klausimų ir apsispręsti ar aš noriu dalyvauti tyrime.
- Aš suprantu, kad mano dalyvavimas yra savanoriškas ir galiu bet kuriuo metu pasitraukti iš studijos be jokios priežasties.
- Aš suprantu, kad tam tikros mano medicininių dokumentų dalys gali būti peržiūrėtos atsakingų Širdies chirurgijos klinikos ir Kardiologijos instituto asmenų ir tai yra susiję su mano dalyvavimu tyrime. Šiems asmenims aš duodu leidimą prieiti prie mano medicininių duomenų, ir suprantu, kad ši informacija bus konfidenciali.
- Aš sutinku, kad mano duoti kraujo ar aortos pavyzdžiai galėtų būti analizuojami, tiriant širdies ir kraujagyslių bei kitas lėtines ligas, taip pat ir genetiniams tyrimams.
- Aš suprantu, kad paskelbtuose tyrimo rezultatuose nebus jokių konkrečių mano asmeninių duomenų.

Aš, _____, perskaičiau aukščiau pateiktą tekstą ir sutinku dalyvauti tyrime.

Parašas _____ Data _____

Pateikiančio sutikimą asmens vardas ir pavardė: _____

Parašas _____ Data _____

3 priedas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Medicinos akademija, Kardiologijos Institutas

Molekulinės kardiologijos laboratorija, Sukilėlių 17, Kaunas

Profilaktinio patikrinimo anketa

1.	Dalyvio lytis, gimimo data Ūgis, svoris	
2.	Savos sveikatos būklės vertinimas (gera, l. gera, bloga)	
3.	Ar Jūs kada nors sirgote miokardo infarktu, insultu?	
4.	Ar turite padidėjusio arterinio kraujospūdžio ligą?	
5.	Kaip dažnai matuojatės kraujospūdį?	
6.	Ar šeimoje, giminėje kas nors serga širdies ir kraujagyslių ligomis? Jei taip, kokiomis.	
7.	Ar vartojate kokius nors vaistus? Jei taip, kokius.	
8.	Kokiomis ligomis esate sirgę? Kokių operacijų turėję?	
9.	Ar turite žalingų įpročių? Jei taip, kokie.	
10.	Ar Jūsų darbas susijęs su padidinta įtampa, stresu?	
11.	Ar reguliariai sportuojate, mankštinatės?	
12.	Ar Jums priimtina sveikos mitybos sąvoka? (daugiau daržovių, mažiau mėsos)	

Jei pageidaujate gauti informaciją apie atliktus Jūsų širdies ir kraujagyslių sistemos genetinius tyrimus, nurodykite savo telefono numerį arba el.pašto adresą.

Anketos pildymo data: Dalyvio parašas:

4 priedas

KLAUSIMYNAS KADP POGRUPIUI NUSTATYTI

ID numeris.....

Vyras ..... Moteris Gimimo data.....

Anamnezės duomenys:

Marfano sindromo fenotipiniai požymiai: yra nėra

Aortos vožtuvas: dviburis triburis protezas pseudodviburis

Hipertenzija yra nėra

Diabetas yra nėra

IŠL nėra MI AP

VA stenozių skaičius .....

Randas po MI yra nėra

Reumatas yra nėra

Aortos vožtuvo kalcinozė yra nėra

Aortos vožtuvo stenozė yra nėra

Aortos protezas yra nėra

Aortos aterosklerozė yra nėra

PA aneurizma yra nėra

Ūgis .....Svoris..... Kūno paviršiaus plotas.....

Ultragarsinio tyrimo ar KT duomenys:

Ao žiedas .....

Ao šaknis .....

Ao sinotub. j. .....

Ao kylanti .....

Ao lankas .....

Ao ties sin .....

Diagnozė .....

Pastabos.....

CURRICULUM VITAE

Name, Surname: Ramunė Šepetienė
Address: Lithuanian University of Health Sciences,
Sukilėlių 15, LT-50157, Kaunas, Lithuania
E-mail: ramune.sepetiene@lsmuni.lt
Mobile phone: +370 612 31784
Work phone: +370 37 302873

Medical education:

1990–1996 Studies at Kaunas University of Medicine, Medical Doctor diploma at Kaunas University of Medicine, Kaunas, Lithuania

1996–1997 Resident of internal medicine at Šakiai District Hospital, Šakiai, Lithuania

1997–1999 Resident of Laboratory Medicine at Kaunas University of Medicine, Kaunas, Lithuania

Postgraduate education:

2012 08 01 until now
PhD student at Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

2006 05 02–2008 05 10
Specialist Practitioner in Transfusion service, obtained sertificate from BBTS and NICE, London, UK

Professional experience:

2014 01 10 present Laboratory Medicine Doctor in Clinical Laboratory of Dainava Outpatients‘ Clinic, Kaunas, Lithuania

2012 01 12 present Junior researcher in Laboratory of Molecular Cardiology, Institute of Cardiology of Lithuanian University of Health Sciences

2009 11 04–2011 11 05
HCPC registered Biomedical Scientist in Laboratory of Biochemistry, Hematology and Transfusion at Queen Elizabeth Hospital, Pathology Department,UK

2006 03 03–2009 10 04
HCPC registered Biomedical Scientist in RCI Reference Laboratory of NHSBT, Cambridge, UK

1999 03 03–2005 11 03
Head of Laboratory Department of Lithuanian-USA Joint

stock Company Binational Plasma, Kaunas, Lithuania

1997 06 10–1999 07 12
Medicine Doctor for Emergency Care at Šakiai District Hospital, Sakiai, Lithuania

Traineeship:

2013 01 28–2013 02 10
Molecular Diagnostics, International Genotyping Laboratory in Bristol, UK

2008 06 10–2008 07 12
Department of Hematology, Addenbrooke‘s Hospital, Cambridge, UK

2006 09 11–2006 10 14
Immunohematology section for blood typing at Colindale RCI, UK

2002 02 01–2002 02 22
Hematology and Transfusion Department, Kuopio University Hospital, Finland

Positions in professional societies:

Since 2016 Member of Kaunas Region Society of Cardiology
Since 2015 Member of Laboratory Medicine Society of Lithuania
Since 2006 Member of European Society of Hematology
Since 2005 Member of British Blood Transfusion Society