

М.И.Воевода¹, Ю.Л.Казаринова¹, В.Н.Максимов¹, И.В.Куликов^{1,2}, С.К.Малютина¹,
С.Ю.Никулина³, А.Г.Ромашенко², О.О.Исаченко³, А.А.Чернова³, В.А.Шульман³

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SP4 И КОННЕКСИНА-40 В ГЕНЕЗЕ СУПРАВЕНТРИКУЛЯРНЫХ АРИТМИЙ

¹НИИ терапии СО РАМН Новосибирск, ²ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, ³КГМУ, Красноярск

С целью изучения частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs1011168 гена транскрипционного фактора SP4 и гена коннексина-40 в популяции Западной Сибири, их ассоциации с суправентрикулярными нарушениями ритма обследованы 327 больных с суправентрикулярными аритмиями и 196 человек контрольной группы.

Ключевые слова: суправентрикулярные аритмии, генотип, полиморфизм, транскрипционный фактор SP4, коннексин 40, полимеразная цепная реакция.

To study the prevalence of genotypes and alleles of the rs1011168 polymorphism of SP4 transcription factor and the connexin 40 gene in the Western Siberia population and their correlation with supraventricular arrhythmias, 327 patients and 196 subjects of control group were examined.

Key words: supraventricular arrhythmias, genotype, polymorphism, SP4 transcription factor, connexin 40, polymerase chain reaction.

Среди спектра сердечно-сосудистых заболеваний наиболее изучены молекулярно-генетические основы атеросклероза, кардиомиопатий, артериальной гипертензии. В последнее время внимание привлекает поиск генетических маркеров заболеваний, ассоциированных с внезапной сердечной смертью. Точечные мутации генов калиевых, натриевых и кальциевых ионных каналов приводят к изменениям электрофизиологических свойств миокардиоцитов проводящей системы сердца, и характеризуются чрезвычайно высоким риском внезапной смерти. Однако, частота таких семейных форм нарушений ритма мала и объясняет только небольшую часть случаев внезапной смерти.

Одним из возможных путей решения этой проблемы становится изучение механизмов регуляции экспрессии генов, определяющих функционирование проводящей системы сердца. На животной модели показано, что для дифференцировки и специализации миокардиоцитов проводящей системы необходима экспрессия транскрипционного фактора NF1B. К первому месяцу жизни у мышей с «выключенным» геном обнаруживаются нарушения распределения коннексинов 40, 43, снижение артериальной васкуляризации миокарда [5]. При частичном снижении экспрессии гена структурных аномалий сердца не определяется, но сохраняется высокая частота внезапной смерти за счет развития фатальных желудочковых аритмий и нарушений атрио-вентрикулярной проводимости [1]. Этот эффект также объясняется и тем, что при отсутствии фактора NF1B в эмбриональном периоде возникает дефицит рецептора нейротропина trcC, определяющего специализацию миокардиоцитов атрио-вентрикулярного соединения [6].

Патогенетическим звеном нарушения внутриклеточной проводимости является снижение количества или изменение структуры белков коннексинов - специализированных мембранных структур, осуществляющих прямую связь с соседними клетками. У человека идентифицировано 20 видов коннексинов, в миокарде предсердий преобладающим является коннексин-40 (Cx40) [2]. Таким образом, многообразие коннекси-

нов придает специфические свойства межклеточным контактам для контроля потока молекулярной информации и определяет свойства проводящей системы сердца в норме и в патологии. У мышей с дефицитом белкового продукта гена Cx40 наблюдается замедление межпредсердного проведения, увеличивается риск развития предсердных аритмий и дисфункции синусового узла [4]. У человека, однонуклеотидные полиморфные маркеры (ОНП) в области промотора гена Cx40 (-44G>A), снижающие его активность, приводят к аномальному распределению гар-каналов, и, как следствие, к электрофизиологической гетерогенности. Этот эффект наблюдается у лиц с пароксизмами фибрилляции предсердий на фоне функционирования дополнительный путей проводящей системы, где миокард предсердий более уязвим к возникновению micro re-entry [3].

В связи с приведенными данными представляет значительный интерес исследование полиморфизма генов, кодирующих белки, определяющие структурное и функциональное состояние проводящей системы, и изучение его связи с различными нарушениями ритма. Целью работы явилось изучение частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs1011168 гена транскрипционного фактора SP4 человека, являющегося гомологом гена транскрипционного фактора мышей NF1b, и частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs35594137 гена коннексина-40 в популяции Западной Сибири, их ассоциации с суправентрикулярными нарушениями ритма, такими как синдром WPW с пароксизмальными атрио-вентрикулярными (АВ) тахикардиями, пароксизмальными АВ узловыми тахикардиями на фоне диссоциации АВ узла на зоны быстрого и медленно проведения, первичной и вторичной фибрилляцией предсердий, предсердными очаговыми тахикардиями, синдромом слабости синусового узла.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 327 человек с суправентрикулярными аритмиями, установленными на основа-

нии клинико-инструментальных методов диагностики, используемых в лечебно-профилактических учреждениях Новосибирска и Красноярска. Группа контроля представлена популяционной выборкой из 196 мужчин в возрасте 25-64 года - жителей Октябрьского района Новосибирска, обследованных в рамках программы ВОЗ MONICA (Мониторирование сердечно-сосудистых заболеваний и определяющих факторов риска).

На момент начала исследования данные по полиморфизму гена SP4 в мировой литературе отсутствовали, для выбора информативных полиморфных маркеров в этом гене провели анализ мировых баз данных по ОНП генома человека. В результате для дальнейших исследований был выбран ОНП маркер гена SP4 - NCBI SNP rs 1011168, расположенный в пятом интроне - замена А на Т в позиции 80807. По этому ОНП нами прогенотипировано: 81 человек с синдромом WPW, 52 человека с пароксизмальными атриовентрикулярными узловыми тахикардиями (ПРАВУТ), 59 человек с первичной фибрилляцией предсердий, 45 человек с вторичной фибрилляцией предсердий, 20 человек с предсердными очаговыми тахикардиями, 52 человека с синдромом слабости синусового узла (СССУ). Для анализа этого ОНП маркера была разработана методика генотипирования на основе аллель-специфической полимеразной цепной реакции, опубликованная нами ранее [9].

Для детекции ОНП маркера гена Sx40, локализованного в промоторе (замена G на A в позиции -44) выполнялась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция по методике M.Figouzi [3]. По этому полиморфизму прогенотипировано: 65 человек с синдромом WPW, 44 человека с ПРАВУТ, 55 человек с первичной фибрилляцией предсердий, 54 человек с вторичной фибрилляцией предсердий, 38 человек с предсердными очаговыми тахикардиями и 49 человек с СССУ, группа контроля - 122 человека. Для верификации методик генотипирования обоих ОНП часть образцов были секвенированы.

Проверка соответствия распределения частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга, сравнительный

анализ частот генотипов и аллелей вышеперечисленных ОНП в группах больных с частотами в контрольной группе выполнялись с использованием критерия χ^2 , двустороннего критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты генотипов по исследованным полиморфизмам генов SP4 (80807A>T) и Sx40 (-44G>A) в популяции Новосибирска находятся в равновесии Харди-Вайнберга. Известно, что изменения последовательности нуклеотидов в ДНК в регуляторной области гена могут приводить к изменению количества синтезируемого белка, не вызывая изменений структуры и функциональной активности белка. Изучаемый полиморфизм A80807T гена SP4 достаточно часто встречается в Западно-сибирской популяции, частота мутантного аллеля Т составляет 41% с преобладанием гетерозиготного генотипа (табл. 1). В нашем исследовании, у больных с синдромом WPW, отмечено статистически значимое увеличение частоты дикого аллеля А практически в 1,5 раза (отношение шансов 1,65; 95% доверительный интервал (ДИ) 1,11-2,45) по сравнению с неорганизованной популяцией, причем, главным образом, за счет увеличения удельного веса лиц с гомозиготным генотипом АА. И, наоборот, среди носителей гомозиготного генотипа по мутантному аллелю Т80807T синдром WPW встречается в 2,5 раза реже (отношение шансов 0,42; 95% ДИ 0,18-0,98).

Ранее нами было продемонстрировано, что носительство гомозиготного генотипа по дикому аллелю у таких больных ассоциировано с укорочением эффективного рефрактерного периода дополнительных путей проведения, что усугубляет прогноз заболевания [8]. Изменяя экспрессию генов, в том числе гена коннексина-40, транскрипционный фактор опосредованно определяет степень гетерогенности коннексонов межклеточных контактов и влияет на электрические свойства кардиомиоцитов. В группе с предсердными очаговыми тахикардиями, частоты аллелей полиморфизма A80807T сохраняют популяционные пропор-

Таблица 1.

Частоты генотипов и аллелей гена транскрипционного фактора SP4 в популяции мужчин Новосибирска и у лиц с суправентрикулярными аритмиями, n (%)

	Популяция	Синдром WPW	ПРАВУТ	Фибрилляция предсердий		Очаговые ПТ	СССУ
				первичная	вторичная		
Генотипы							
A80807A	71 (36,6)	40(49,5)*	19 (36,5)	28 (47,4)	13 (28,9)	10 (50,0)*	17 (34,0)
A80807T	89(45,4)	34 (41,5)*	25 (48,1)	25 (42,4)	22 (48,9)	3 (15,0)*	22 (44,0)
T80807T	36 (18,4)	7 (8,6)*	8 (15,4)	8 (15,4)	10 (22,2)	7 (35,0)*	11 (22,0)
Аллели							
Аллель А	231 (59)	114 (70)**	63	81	48	23 (57)	56 (56)
Аллель Т	161 (41)	48 (30)**	41	37	42	17 (43)	44 (44)
Сравнение							
Гомозиготы T80807T	36 (18,4)	7 (8,6)*	8 (15,4)	8 (13,1)	10 (22,2)	7 (35,0)	11 (22)
Носители аллеля А	160	74 (91,4)*	44 (84,6)	53 (86,9)	35 (77,8)	13 (65,0)	49 (78)

здесь и далее, *- p<0,05; **- p< 0,01

ции, но при анализе частот генотипов обнаружено достоверное повышение доли гомозигот по мутантному аллелю за счет убывания частоты гетерозигот. В работе V.T.D.Nguyen-Tran et al. [1] на животной модели было продемонстрировано действие дефицита фактора HF1B: в основе наблюдаемых аритмий (неустойчивой желудочковой тахикардии, синусовой брадикардии и атриовентрикулярных блокад) лежали разные проявления нарушения автоматизма миокардиоцитов. Эти обстоятельства и наши данные позволяют предположить, что полиморфизм A80807T, косвенно воздействуя на мембраны миокардиоцитов, способен изменять чувствительность клеток к диастолической деполяризации. По-видимому, изучаемый полиморфизм не оказывает прямого влияния на формирование дополнительных путей проведения, но воздействует на функционирование проводящей системы сердца, причем носительство гетерозиготного генотипа, оказывает протективное действие.

У больных с первичной фибрилляцией предсердий отмечается статистически значимое увеличение частоты мутантного аллеля А полиморфизма -44G->А Сх40 за счет увеличения удельного веса гомозиготного генотипа и снижения частоты гетерозигот (табл. 2). Риск развития первичной фибрилляции предсердий в неорганизованной популяции среди носителей гомозиготного генотипа по мутантному аллелю в 4 раза выше (95% ДИ 1,59-10,43), чем у лиц с носительством дикого аллеля. Аналогично результатам M.Figouzi [3], выявлена ассоциация этого полиморфизма с возникновением micro re-entry в предсердиях, как первичного электрофизиологического дефекта. Можно предположить, что при мутантном гомозиготном генотипе активность промотора гена снижается, что отражается на количестве белка, особенно, если учесть короткие сроки жизни коннексина-40 (приблизительно 2 часа). При гетерозиготном генотипе активность промотора гена носит усредненный характер. Возникающая анизотропия, вследствие неравномерности распределения межклеточных щелевых контактов, предрасполагает к появлению зон с однонаправленным блокированием импульса, гетерогенной рефрактерностью клеток и

отсутствию зон с восстановленной возбудимостью в пределах миокарда предсердий. Другой эффект наблюдается у лиц с синдромом WPW и с предсердными очаговыми тахикардиями - отмечается тенденция к увеличению частоты дикого аллеля на фоне достоверного снижения удельного веса лиц с гетерозиготным генотипом. По-видимому, у обладателей гетерозиготного генотипа срабатывает фактор «усреднения» электрофизиологических параметров миокардиоцитов, определяя относительно благоприятный прогноз не только в плане развития micro re-entry, но и других аритмий. Так, в популяции Нидерландов, частота встречаемости гетерозигот составляет 31%, а гомозигот по мутантному аллелю - 6% [7]. В Западно-сибирской популяции количество гетерозигот достигает 50%, а гомозигот по мутантному аллелю 7,4% (табл. 2).

В других работах по изучению полиморфизма -44G->А продемонстрировано, что в сочетании с мутациями в гене SCN5A, кодирующем натриевые ионные каналы, носительство редкого гомозиготного генотипа предрасполагает к угнетению функции автоматизма в миокардиоцитах предсердий, «остановке предсердий» [7]. У больных с предсердными очаговыми тахикардиями, в основе которых лежит аномальный автоматизм, по-видимому снижено «нейтрализующее» действие мутантного аллеля. Повышение концентрации катехоламинов и ионов Са при интактной проводимости щелевых контактов, способно поддерживать аномальную автоматическую активность миокардиоцитов предсердий. Значимого эффекта изучаемого полиморфизма на функцию нормального автоматизма, например при синдроме СССУ, в настоящем исследовании не обнаружено.

Таким образом, изученные генетические маркеры могут быть использованы для диагностики предрасположенности к развитию первичной фибрилляции предсердий, предсердных очаговых тахикардий и для прогноза течения синдрома WPW. В популяции преобладают гетерозиготные генотипы по полиморфизмам генов SP4 и Сх40, которые являются протективными в отношении развития суправентрикулярных тахиаритмий.

Таблица 2.

Частоты генотипов и аллелей гена Сх40 в популяции мужчин Новосибирска и лиц с суправентрикулярными аритмиями, n (%)

	Популяция	Синдром WPW	ПРАВУТ	Фибрилляция предсердий		Очаговые ПТ	СССУ
				первичная	вторичная		
Генотипы							
-44GG	52 (42,6)	42 (64,6)**	25 (56,8)	25 (45,5)**	23 (42,6)	24 (63,3)*	26 (53,1)
-44GA	61 (50,0)	14 (21,5)**	15 (34,1)	18 (32,7)**	23 (42,6)	10 (26,3)*	20 (40,8)
-44AA	9 (7,4)	9 (13,9)**	4 (9,1)	12 (21,8)**	8 (14,8)	4 (10,5)*	3 (6,1)
Аллели							
Аллель G	165 (67,6)	98 (75,4)	65 (73,8)	68 (61,8)	69 (63,9)	58 (76,3)	72 (73,5)
Аллель А	79 (32,4)	32 (24,6)	23 (26,2)	42 (38,2)	39 (36,1)	18 (23,7)	26 (26,5)
Сравнение							
Гомозиготы -44AA	9 (7,4)	9 (13,9)	4 (9,1)	12 (21,8)**	8 (14,8)	4 (10,5)	3 (6,1)
Носители аллеля G	113 (92,6)	56 (86,1)	40 (90,9)	43 (78,2)**	46 (85,2)	34 (89,5)	46 (93,9)

ЛИТЕРАТУРА

1. Nguyen-Tran V.T.D., Kubalak S.W.; Minamisawa S.; Fiset S. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages // *Cell*. -2000. - Vol. 102. - P. 671-682.
2. Willecke K, Elberger J, Degen J et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome // *Biol Chem*.- 2002.-Vol.383.-P.725-737
3. Firouzi M, Ramanna H, Kok B et al. Association of Human Connexin40 Gene Polymorphisms With Atrial Vulnerability as a Risk Factor for Idiopathic Atrial Fibrillation// *Circulation Research*.- 2004.-Vol.95.-P.e29
4. Hagendorff A; Schumacher B; Kirchhoff S et al. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin 40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation.// *Circulation*.- 1999.-Vol.99(11).-P.1508-15
5. Hewett K, Norman L.W., Sedmera D. et al. Knockout of the neural and heart expressed gene HF-1b results in apical deficits of ventricular structure and activation// *Cardiovascular research*.-2005.-Vol.67.-P.548-560
6. Amand TR, Lu JT, Chien KR. Defects in cardiac conduction system lineages and malignant arrhythmias: developmental pathways and disease// *Novartis Found Symp*, 2003.- PMID: 12956335 [PubMed - indexed for MEDLINE]
7. Groenewegen W.A, Firouzi M, Bezzina C.R. et al. A Cardiac Sodium Channel Mutation Cosegregates With a Rare Connexin40 Genotype in Familial Atrial Standstill.// *Circ. Res*.- 2003.-Vol. 92.-P.14-22
8. Шабалин А.В., Гусева И.А., Казаринова Ю.Л. и др. Ассоциация полиморфизма транскрипционного фактора SP4 с электрофизиологическими характеристиками синдрома WPW.// *Вестник аритмологии*.-2003.- №31.-С.44-46
9. Никулина С.Ю., Шульман В.А., Чернова А.А. и др. Клинико-генетические аспекты синдрома слабости синусового узла // *Вестник аритмологии*.- 2008.-№ 54.- С. 5-9.

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SP4 И КОННЕКСИНА-40 В ГЕНЕЗЕ
СУПРАВЕНТРИКУЛЯРНЫХ АРИТМИЙ

*М.И.Воевода, Ю.Л.Казаринова, В.Н.Максимов, И.В.Куликов, С.К.Малютина,
С.Ю.Никулина, А.Г.Ромашченко, О.О.Исаченко, А.А.Чернова, В.А.Шульман*

С целью изучения частоты генотипов и аллелей полиморфизма rs1011168 гена SP4 и гена коннексина-40 (Cx40), их ассоциации с суправентрикулярными нарушениями ритма обследованы 327 больных и 196 человек контрольной группы. Проводили генотипирование на основе аллель-специфической полимеразной цепной реакции. У больных с синдромом WPW, отмечено статистически значимое увеличение частоты дикого аллеля А гена SP4 практически в 1,5 раза (отношение шансов 1,65; 95% доверительный интервал (ДИ) 1,11-2,45) по сравнению с неорганизованной популяцией, причем, главным образом, за счет увеличения удельного веса лиц с гомозиготным генотипом АА. И, наоборот, среди носителей гомозиготного генотипа по мутантному аллелю Т80807Т синдром WPW встречается в 2,5 раза реже (отношение шансов 0,42; 95% ДИ 0,18-0,98). В группе с предсердными очаговыми тахикардиями, частоты аллелей полиморфизма А80807Т сохраняли популяционные пропорции, но при анализе частот генотипов обнаружено достоверное повышение доли гомозигот по мутантному аллелю за счет убывания частоты гетерозигот. У больных с первичной фибрилляцией предсердий отмечалось статистически значимое увеличение частоты мутантного аллеля А полиморфизма -44G->А Cx40 за счет увеличения удельного веса гомозиготного генотипа и снижения частоты гетерозигот. Риск развития первичной фибрилляции предсердий в неорганизованной популяции среди носителей гомозиготного генотипа по мутантному аллелю был в 4 раза выше (95% ДИ 1,59-10,43), чем у лиц с носительством дикого аллеля. Таким образом, изученные генетические маркеры могут быть использованы для диагностики предрасположенности к развитию первичной фибрилляции предсердий, предсердных очаговых тахикардий и для прогноза течения синдрома WPW.

ROLE OF SP4 TRANSCRIPTION FACTOR AND CONNEXIN 40 IN PATHOGENY OF SUPRAVENTRICULAR
ARRHYTHMIAS

*M.I. Voevoda, Yu.L. Kazarinova, V.N. Maksimov, I.V. Kulikov, S.K. Malyutina, S.Yu. Nikulina, A.G. Romashchenko,
O.O. Isachenko, A.A. Chernova, V.A. Shulman*

To study the prevalence of genotypes and alleles of the rs1011168 polymorphism of SP4 gene and the connexin 40 gene (Cx40) and their association with supraventricular arrhythmias, 327 patients and 196 subjects of control group were examined. The genotypes were determined by the allele-specific polymerase chain reaction. The patients with the WPW syndrome were characterized by a statistical a significant almost 1.5 fold prevalence of the wild allele A of SP4 gene (OR: 1.65; 95% CI: 1.11 2.45) as compared with the general population, mostly because of an increased portion of subjects with the homozygous genotype AA. On the contrary, in the subjects with homozygous genotype of the mutant allele T8087T, WPW syndrome is 2.5 times less frequent (OR: 0.42; 95% CI: 0.18 0.98). In the patients with focal atrial tachycardias, the prevalence of alleles of the A80807T polymorphism did not differ from that in the general population; however, the analysis of genotype pattern showed a significantly increased prevalence of mutant allele homozygous subjects because of a decrease in the heterozygote prevalence. In patients with primary atrial fibrillation, a statistically significant rise in prevalence of the mutant allele A of 44G->A Cx40 polymorphism due to an increase in the frequency of the homozygous genotype and decrease in prevalence of heterozygous genotypes. The risk of development of primary atrial fibrillation in the general population in carriers of the homozygous genotype and mutant allele was 4 times higher (95% CI: 1.59 10.43) than in those with the wild-type allele. Thus, the above genetic markers can be used for the diagnostics of predisposition to supraventricular arrhythmias.