

А.В.Шабалин, И.А.Гусева, Ю.Л.Казаринова, И.В.Куликов, А.Г.Ромашенко, М.И.Воевода

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SP4 С ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ СИНДРОМА WPW

Новосибирская государственная медицинская академия, НИИ терапии СО РАМН, НИИ Цитологии и генетики СО РАН, ГУЗ Дорожная клиническая больница, г. Новосибирск

С целью изучения влияния полиморфизма гена SP4 на модуляцию экспрессии гена, кодирующего коннексин 40, в свою очередь влияющее на ультраструктурные особенности проводящей системы сердца и ее функциональное состояние обследованы 81 пациент с синдромом WPW в возрасте от 7 до 62 лет.

Ключевые слова: полиморфизм гена транскрипционного фактора SP4, синдром WPW, пароксизмальная реципрокная атриовентрикулярная тахикардия, эффективный рефрактерный период.

С целью изучения влияния полиморфизма гена SP4 на модуляцию экспрессии гена, кодирующего коннексин 40, в свою очередь влияющее на ультраструктурные особенности проводящей системы сердца и ее функциональное состояние обследованы 81 пациент с синдромом WPW в возрасте от 7 до 62 лет.

Ключевые слова: полиморфизм гена транскрипционного фактора SP4, синдром WPW, пароксизмальная реципрокная атриовентрикулярная тахикардия, эффективный рефрактерный период.

В основе идиопатических нарушений ритма в значительной части случаев лежат врожденные структурные аномалии проводящих путей. Наиболее частыми причинами среди них являются аномальные дополнительные проводящие пути (ДПП), проникающие в сократительный миокард и механизм продольной диссоциации атриовентрикулярного соединения. Существует мнение, согласно которому, помимо чисто анатомических особенностей строения проводящей системы миокарда, в развитии нарушений ритма имеет значение и изменение ее функциональных свойств. В качестве одного из ключевых молекулярных субстратов межклеточного проведения импульсов рассматриваются белки коннексины, участвующие в формировании специализированных мембранных структур, обеспечивающих прямую связь между клетками.

В клетках системы Гиса-Пуркинье человека наибольшую роль отводят коннексину-40, который обеспечивает высокую скорость проведения импульса к кардиомиоцитам [1]. В настоящее время имеются данные об ассоциации локального снижения экспрессии коннексина-40 в различных отделах предсердий с риском развития фибрилляции предсердий [3]. В экспериментах на модели «нокаутированных» мышей показано, что существенное снижение уровня коннексина-40 с нарушением его внутрисердечной локализации, обусловленное введением инактивирующей мутации в ген его транскрипционного фактора NF-1b, значительно увеличивает смертность животных, связанных с желудочковыми тахикардиями и атриовентрикулярными (АВ) блокадами при отсутствии морфологических изменений в сердце [2].

В связи с упомянутыми сведениями представляет значительный интерес исследование полиморфизма генов, кодирующих белки, определяющие структурное и функциональное состояние проводящей системы и изучение его связи с различными нарушениями ритма. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение ассоциации полиморфизма гена SP4 человека, локализованного на 7-й хромосоме в районе p21-p13, являющегося гомологом гена транскрипционного фактора мышей

NF1b, с электрофизиологическими показателями при синдроме WPW.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включили 81 пациента с синдромом WPW: 43 мужчины и 38 женщин. Возраст обследованных пациентов колебался в пределах от 7 до 62 лет, в среднем - $31,8 \pm 15,5$ лет. Критериями включения в исследование было отсутствие у пациентов врожденных и приобретенных пороков сердца, перенесенных в прошлом миокардита и перикардита любой этиологии, острого инфаркта миокарда, острого коронарного синдрома и нарушений функции щитовидной железы. Давность «аритмического анамнеза» составила от 1 года до 46 лет, в среднем - $11,5 \pm 10,9$ лет. Формы предвозбуждения желудочков были представлены манифестирующим синдромом WPW – у 41% больных, скрытым – у 37%, переходящим – у 17% и латентным – у 5% обследованных. У 86% (70 человек) обследованных регистрировали пароксизмальную реципрокную ортодромную атриовентрикулярную тахикардию, причем у 23% (16 человек) из них, в сочетании с пароксизмальной фибрилляцией предсердий. У 10% (8 человек) регистрировали пароксизмальную реципрокную антидромную тахикардию. У половины этих пациентов (4 человека) наблюдали пароксизмальную фибрилляцию предсердий. У 3 пациентов (4%) отметили изолированную пароксизмальную фибрилляцию предсердий.

У всех пациентов регистрировали такие клинические особенности заболевания, как возраст манифестации тахикардии, частоту приступов тахикардии в месяц на протяжении последнего года, среднюю частоту сердечных сокращений (ЧСС) во время пароксизма тахикардии. Всем больным проводили чреспищеводное электрофизиологическое исследование (ЭФИ) с использованием комплекса «Элкарт» (ТОО «Электропульс», г. Томск) с оценкой состояния функции проведения АВ соединения и проведения через ДПП с определением их эффективных рефрактерных периодов (ЭРП). Эхокардиографические (ЭхоКГ) показатели получали с помощью

эхокардиографа «UltraMark-9» (Канада). Оценивали ряд анатомических особенностей сердца (наличие пролапса митрального клапана, добавочных хорд), определяли размеры левого предсердия (ЛП), конечный диастолический (КДР) и систолический размеры (КСР) левого желудочка (ЛЖ), фракцию выброса (ФВ) и толщину задней стенки (ЗС) ЛЖ. Для всех пациентов рассчитывали индекс массы тела Кетле ($ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост}^2 (\text{м}^2)$).

В связи с тем, что на момент проведения исследования, данные по полиморфизму гена SP4 в мировой литературе отсутствовали, поиск информативных полиморфных маркеров в этом гене провели методом анализа мировых баз данных по однонуклеотидным полиморфным маркерам (ОНПМ) генома человека.

В результате этого анализа для дальнейших исследований был выбран ОНПМ гена SP4 - NCBI SNP rs 1011168, локализующийся в пятом интроне, определяемый заменой А на Т в позиции 80807 и характеризующийся достаточно высокой частотой обеих аллелей в представленной в базе данных выборке хромосом. Для анализа полиморфизма этого ОНПМ была разработана методика генотипирования на основе аллель-специфической полимеразной цепной реакции. В реакции использовали следующие олигонуклеотидные праймеры: 1) 5'-aaatgaggacaatgaaaagcaca-3'-прямой (А) 2) 5'-gcctaagctgctactatttcagtg3'- обратный (А - com) 3) 5'-catttctcaattgctgctataga-3' -обратный (Т) 4) 5'-actgttgcctttgttgcca-3' -прямой (Т - com). Праймеры 1 и 2 использовали для амплификации аллеля А80807 и праймеры 3 и 4 – аллеля Т80807.

Оба аллеля амплифицировались одновременно в одной реакционной смеси. В случае гомозигот детектировался продукт размером 275 н.п. для аллельного варианта А и 171 н.п. - для Т. Гетерозиготный генотип идентифицировали по одновременному наличию продуктов обоих размеров. ПЦР-продукт, получаемый с пары праймеров 2 и 4, имел размер 400 п.н. и детектировался при всех аллельных вариантах. ПЦР смесь объемом 12,5 мкл включала: 75 мМ Трис-НСI (рН 9,0), 20 мМ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,01 % Tween-20, каждый из четырех указанных выше праймеров в концентрации 1,5 мкМ, 0,2 мМ раствор каждого из четырех dNTP, 2,5 мМ MgCl_2 , 2,5 единицы Taq-полимеразы, 0,2-0,5мкг ДНК.

Режим амплификации был следующим: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин., затем 30 циклов - с денатурацией в течение 45 сек при 95°C, отжиг в течение 45 сек при 67°C и синтез в течение 45 сек при 72°C. Детекцию ПЦР продукта проводили методом гель-электрофореза в 4% полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием.

Сравнение средних значений электрофизиологических показателей в случае разных генотипов проводили после стандартизации по контролируемым независимым количественным и категориальным переменным с помощью процедуры «General Linear Model» пакета статистических программ SPSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

В выборке обследованных пациентов с синдромом WPW выявили 40 гомозигот по распространен-

ному аллелю (А80807) (49,4%), 34 гетерозигот (42%) и 7 гомозигот (8,6%) по более редкому аллелю (Т80807). Частота более редкого аллеля (Т80807) составила 29%.

Для изучения связи полиморфизма гена SP4 с электрофизиологическими характеристиками синдрома WPW все обследованные пациенты были разделены на две группы в зависимости от генотипа по анализируемому ОНПМ. В первую были включены гомозиготы по более распространенному аллелю (40 человек), во вторую – гетеро- и гомозиготные носители более редкого аллеля (41 человек).

Сравнение средних значений показателей проводимости атриовентрикулярного соединения и дополнительных проводящих пучков, а также их эффективных рефрактерных периодов в этих двух группах проводили с помощью процедуры общего линейного анализа (GLM) на модели, включающей в качестве независимых факторов изученные клинические, эхокардиографические и электрофизиологические параметры, значимо влияющих на уровень анализируемого показателя. Перечень таких параметров для каждого показателя приведен в примечании к табл. 1. Стандартизованные средние значения анализируемых показателей в двух генотипических классах, приведены в табл. 1. Как следует из таблицы, обнаружены достоверные различия между группами пациентов с синдромом WPW, различающимися носительством аллеля Т80807, по средней скорости проведения импульсов по дополнительным путям ($p < 0,01$) и среднему значению ЭРП ДПП ($p < 0,01$).

Полученные данные позволяют предполагать, что полиморфизм гена SP4, ассоциирован с электрофизиологическими особенностями проводящей систе-

Таблица 1.

Средние уровни электрофизиологических показателей в зависимости от генотипа по полиморфизму А80807Т гена SP4 у пациентов с синдромом WPW ($M \pm m$).

	1-ая группа (n=40)	2-ая группа (n=41)
АВ проведение (имп/мин)	193,8±9,5	191,4±9,6
ЭРП АВС (мс)	274,2±44,2	275,4±39,9
Проведение по ДПП (имп/мин)	194,5±1,4	209,2±1,3*
ЭРП ДПП (мс)	200,3±12,4	258,7±10,8*

Где * - достоверная разница, $p < 0,05$. В таблице приведены средние значения электрофизиологических показателей, стандартизованные по категориальным и непрерывным переменным, статистически значимо влияющим на значения анализируемых показателей в общей линейной модели (GLM): в случае АВ проводимости - пол, наличие пролапса створок митрального клапана, толщина задней стенки левого желудочка, частота приступов тахикардии в месяц и ЭРП АВ соединения. В случае ЭРП АВ соединения - толщина задней стенки левого желудочка и АВ проведение; в случае проведения по ДПП - наличие пароксизмальной фибрилляции предсердий, пролапса митрального клапана и добавочной хорды в левом желудочке, стадия гипертонической болезни, размеры ЛП, КСР, КДР, толщина МЖП, ЗС и ФВ, давность «аритмологического» анамнеза, частота приступов тахикардии в месяц, ЭРП ДПП. В случае ЭРП ДПП: КСР и ЧСС во время приступа тахикардии.

мы сердца у больных с синдромом WPW. Учитывая, что анализируемый ОНПМ расположен в некодирующей части гена, наблюдаемая ассоциация может являться как результатом собственного влияния данного полиморфизма на экспрессию гена, так и его сцеплением с влияющими на этот процесс аллелями других вариабельных участков гена. Наиболее вероятно, что модуляция экспрессии гена SP4 в свою очередь влияет на экспрессию гена, кодирующего коннексин-

40, что далее определяет особенности ультраструктуры и функционального состояния проводящей системы сердца в зависимости от генотипа по анализируемому ОНПМ гена SP4.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о перспективности дальнейшего поиска генетических факторов, определяющих индивидуальные особенности аритмогенеза и в частности изучения его связи с полиморфизмом гена SP4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coppens S., Dupont E., Rothery S, Severs N. Connexin 45 Expression Is Preferentially Associated With the Ventricular Conduction System in Mouse and Rat Heart // *Circulation Research*. - 1998. - Vol. 82. - P. 232-243.
2. 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.
3. Van der Welden, H. M. W. et al. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat // *Cardiovasc. Res.*-2000. - Vol. 46-P. 476-486.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА SP4 С ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ СИНДРОМА WPW

А.В.Шабалин, И.А.Гусева, Ю.Л.Казаринова, И.В.Куликов, А.Г.Ромашенко, М.И.Воевода

Изучена ассоциация полиморфизма гена транскрипционного фактора SP4 с электрофизиологическими параметрами у пациентов с синдромом WPW. Выявлены достоверные различия средней скорости проведения импульсов по дополнительным путям и среднему значению эффективного рефрактерного периода дополнительных проводящих путей между группами пациентов с синдромом WPW, различающимися наличием в генотипе аллеля T80807 гена SP4. Сделано предположение, о влиянии полиморфизма гена SP4 на модуляцию экспрессии гена, кодирующего коннексин 40, что в свою очередь влияет на ультраструктурные особенности проводящей системы сердца и ее функциональное состояние.

The association of SP4 gene polymorphism with electrophysiologic features has been studied in patients with WPW syndrome. Mean accessory way conduction and ERP values differed significantly between groups of patients depend of T80807 allele carriage. It is proposed that SP4 gene polymorphism modulate the connexin-40 gene expression and as a result, defines the variation in functional state of conduction system in patients with WPW syndrome.