

С.Ю.Никулина, А.А.Чернова, В.А.Шульман,
Т.С.Кукушкина, М.И.Воевода, В.Н.Максимов

**ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА КОННЕКСИНА-40 В ГЕНЕЗЕ
НАСЛЕДСТВЕННОГО СИНДРОМА СЛАБОСТИ СИНУСОВОГО УЗЛА**
*Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого,
ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск*

С целью изучения полиморфизма генов, кодирующих белки, определяющие структурное и функциональное состояние проводящей системы, и его связи с различными нарушениями ритма сердца обследованы 29 семей, имеющих первичный, наследственный синдром слабости синусового узла, в том числе пробанды (20 женщин и 9 мужчин, средний возраст $58 \pm 0,15$ лет) и родственники I, II и III степени родства (65 мужчин и 68 женщин, средний возраст $39 \pm 0,13$ лет).

Ключевые слова: проводящая система сердца, синдром слабости синусового узла, молекулярно-генетическое исследование, полиморфизм генов, коннексины

To study polymorphism of genes coding proteins which determine the structural and functional states of the cardiac conduction system, and its correlation with different cardiac arrhythmias, 29 families with primary hereditary sick sinus syndrome were examined including probands aged 58 ± 0.15 years (20 females and 9 males) and their I, II, and III degree relatives (65 men and 68 women aged 39 ± 0.13 years).

Key words: cardiac conduction system, sick sinus syndrome, molecular genetic test, gene polymorphism, connexins.

Патология проводящей системы сердца (ПСС) привлекает внимание исследователей на протяжении столетия. За столь длительный период сформировались устоявшиеся представления об этиологии различных вариантов поражения ПСС, в частности известно, что практически любое заболевание сердца может служить причиной поражения ПСС. В связи с этим среди практических врачей сложилось стойкое убеждение, что патология ПСС почти всегда вторична. Это является частой причиной диагностических ошибок, когда само наличие патологии ПСС служит основанием для постановки какого-либо кардиологического диагноза, чаще всего атеросклеротического или миокардитического кардиосклероза, в зависимости от возраста пациента.

В то же время за последние два десятилетия накопилось достаточное количество публикаций, в которых рассматриваются различные варианты изолированного поражения ПСС без связи с какими-либо сердечно-сосудистыми заболеваниями. Такие случаи патологии ПСС рассматриваются как идиопатические. В связи с этим произошла определенная эволюция в представлениях об этиологической структуре рассматриваемой патологии.

Электрофизиологические свойства проводящей системы сердца обуславливаются функцией ионных каналов кардиомиоцитов и их гар-соединений. Строение, форма и белковый состав этих соединений определяются генами, изменения структуры которых могут приводить к структурным и функциональным нарушениям клеточных мембран и межклеточных соединений. Нарушения функционирования ионных каналов и межклеточных взаимоотношений при соответствующих условиях, например при избыточном влиянии катехоламинов, могут быть пусковым элементом аритмий. В плане генов, влияющих на структурные особенности проводящей системы сердца, в настоящее вре-

мя имеются данные о связи у мышей вариабельности структуры гена транскрипционного фактора NF1b, контролирующего экспрессию коннексина-40, одного из белков межклеточных гар-соединений, с фатальными аритмиями при отсутствии макроскопических структурных аномалий проводящей системы [1].

При частичном снижении экспрессии гена структурных аномалий сердца не определяется, но сохраняется высокая частота внезапной смерти за счет развития фатальных желудочковых аритмий и нарушений атриовентрикулярной проводимости [2]. Этот эффект также объясняется и тем, что при отсутствии фактора NF1B в эмбриональном периоде возникает дефицит рецептора нейротропина trcS, определяющего специализацию миокардиоцитов атриовентрикулярного соединения [3].

Патогенетическим звеном нарушения внутриклеточной проводимости является снижение количества или изменение структуры белков коннексинов - специализированных мембранных структур, осуществляющих прямую связь с соседними клетками. В человеческом геноме идентифицировано 20 видов коннексинов, в миокарде предсердий преобладающим является коннексин-40 (Cx40) [4]. Таким образом, многообразие коннексинов 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 гена Cx40 наблюдается замедление межпредсердного проведения, увеличился риск развития предсердных аритмий и дисфункции синусового узла [5]. У человека, мутации 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 фун-

кционирования дополнительный путей проводящей системы, где миокард предсердий более уязвим к возникновению *micro re-entry* [6]. В связи с приведенными данными целью исследования явилось изучение полиморфизма генов, кодирующих белки, определяющие структурное и функциональное состояние проводящей системы, и его связи с различными нарушениями ритма сердца.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование было проспективным. Из базы данных кафедры терапии №1 Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого были отобраны 29 семей, имеющих первичный, наследственный синдром слабости синусового узла (СССУ). Среди пробандов было 20 женщин и 9 мужчин, средний возраст составил $58 \pm 0,15$ лет. Среди родственников I, II и III степени родства было 65 мужчин и 68 женщин, средний возраст $39 \pm 0,13$ лет.

Всем пробандам и их родственникам I, II, III степени родства было проведено клинико-инструментальное исследование: клинический осмотр, электрокардиография, велоэргометрия, холтеровское мониторирование ЭКГ, атропиновая проба, электрофизиологическое исследование (чреспищеводная стимуляция левого предсердия до и после медикаментозной вегетативной блокады), эхокардиоскопия, кардиоритмография.

Молекулярно-генетическое исследование больных СССУ и их родственников I, II и III степени родства проводилось в лаборатории медицинской генетики ГУ НИИ терапии СО РАМН города Новосибирска. Для определения полиморфизма гена *Sx40* были взяты образцы крови 312 человек, из которых 71 - больные с диагнозом СССУ, 44 их здоровых родственников I, II, III степени родства и 197 человек контрольной группы. Экстракция ДНК из крови осуществлялась фенол-хлороформным методом [7, 8].

Для детекции ОНП маркера гена *Sx40*, локализованного в промоторе (замена G на A в позиции -44) выполнялась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) по методике Firouzi M [6]. Для детекции ОНП -44G>A гена *Sx40* использовали следующие праймеры: 5'-CCCTCTTTTAATCGTATCTGTGGC-3' (прямой) и 5'-GGTGGAGGGAAGAAGACTTTTAG-3' (обратный). После ПЦР продукт длиной 150 нуклеотидных пар обрабатывается рестриктазой *HaeIII*. При наличии G аллеля продукт разрезается на фрагменты 126 и 24 нуклеотидных пары [9].

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере типа «IBM PC» с использованием пакета программ «Statistica 7.0». Первым этапом определяли частоты аллелей и генотипов изучаемых генов-кандидатов. Соответствие распределения аллелей и генотипов равновесию Харди-Вайнберга, сравнительный анализ частот генотипов вышеперечисленных генов с контрольной группой выполнялось с использованием критерия χ^2 , двустороннего критерия Фишера.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По полиморфизму 44G>A гена *Sx40* было протипировано 71 больной с СССУ, 44 их здоровых родственника I, II и III степени родства и 197 лиц контрольной группы. По результатам аллель-специфической полимеразной цепной реакции выявлены 3 вида генотипов ADRA2B у больных СССУ, их здоровых родственников и лиц контрольной группы: II - гомозиготный дикий, ID - гетерозиготный, DD - гомозиготный мутантный. Установлено (табл. 1) достоверное преобладание гетерозиготного генотипа 44G>A у больных СССУ ($45,07 \pm 5,9\%$) по сравнению с лицами контрольной группы ($29,44 \pm 3,2\%$).

Согласно результатам M.Firouzi, была выявлена ассоциация гомозиготного полиморфизма с возникновением *micro re-entry* в предсердиях, как первичного электрофизиологического дефекта. Предположено, что при мутантном гомозиготном генотипе активность промотора гена снижается вдвое, 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. 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% [10].

В других работах по изучению полиморфизма -44G->A продемонстрировано, что в сочетании с мутациями в гене *SCN5A*, кодирующем натриевые ионные

Таблица 1.

Частота встречаемости генотипов гена *Sx40* у больных СССУ, их здоровых родственников и лиц контрольной группы

Генотипы	Больные СССУ N=71 (1)		Здоровые родственники N=44 (2)		Контрольная группа N=197 (3)		p_{1-2}^*	p_{1-3}	p_{2-3}
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%			
44GG	3	4,23	3	6,82	25	12,69	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$
44GA	32	45,07	20	45,45	58	29,44	$p>0,05$	$p<0,05$	$p>0,05$
44AA	36	50,7	21	47,73	114	57,87	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$

* - различия по исследуемым показателям рассчитаны с использованием критерия χ^2 .

каналы, носительство редкого гомозиготного генотипа предрасполагает к угнетению функции автоматизма в миокардиоцитах предсердий, «остановке предсердий» [11]. У больных с синдромом слабости синусового узла, в основе которого лежит снижение автоматизма, по-ви-

димому снижено «нейтрализующее» действие мутантного аллеля. Повышение концентрации катехоламинов и ионов Са при интактной проводимости щелевых контактов, способно поддерживать аномальную автоматическую активность миокардиоцитов предсердий.

ЛИТЕРАТУРА

- 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
- Nguyen-Tran V.T.D., Kubalak S.W. Minamisawa S., Fiset S. A novel genetic pathway for sudden cardiac death nia defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages // Cell.-2000. - Vol. 102. - P. 671-682.
- 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.
- 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
- 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
- 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
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.: Мир. - 1984. - С. 357.
- Смит К., Калко С., Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. - /Анализ генома / Под ред. К. Дейвиса, пер. с англ. - М: Мир. - 1990. - С. 58-94.
- Juang JM, Chern YR, Tsai CT et al. The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. //Int J Cardiol. 2007 Mar 2;116(1):107-12.)
- 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.
- Gollob M.H., Jones D.L., Krahn A.D. et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation // New Eng. J. Med. 354: 2677-2688, 2006.

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА КОННЕКСИНА-40 В ГЕНЕЗЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО СИНДРОМА СЛАБОСТИ СИНУСОВОГО УЗЛА

С.Ю.Никulina, А.А.Чернова, В.А.Шульман, Т.С.Кукушкина, М.И.Воевода, В.Н.Максимов

С целью изучения полиморфизма генов, кодирующих белки, определяющие структурное и функциональное состояние проводящей системы, и его связи с различными нарушениями ритма сердца обследованы 29 семей, имеющих первичный, наследственный синдром слабости синусового узла. Среди пробандов было 20 женщин и 9 мужчин, средний возраст составил $58 \pm 0,15$ лет. Среди родственников I, II и III степени родства было 65 мужчин и 68 женщин, средний возраст $39 \pm 0,13$ лет. Всем пробандам и их родственникам I, II, III степени родства было проведено клинко-инструментальное исследование: клинический осмотр, электрокардиография, велоэргометрия, холтеровское мониторирование ЭКГ, атропиновая проба, электрофизиологическое исследование, эхокардиоскопия, кардиоритмография. По результатам аллель-специфической полимеразной цепной реакции выявлены 3 вида генотипов ADRA2B: II - гомозиготный дикий, ID - гетерозиготный, DD - гомозиготный мутантный. Таким образом, у больных с синдромом слабости синусового узла, в основе которого лежит снижение автоматизма, 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.

ROLE OF POLYMORPHISM OF CONNEXIN 40 GENE IN PATHOGENY OF SICK SINUS SYNDROME

S.Yu. Nikulina, A.A. Chernova, V.A. Shulman, T.S. Kukushkina, M.I. Voevoda, V.N. Maksimov

To study polymorphism of genes coding proteins which determine the structural and functional states of the cardiac conduction system, and its correlation with different cardiac arrhythmias, 29 families with primary hereditary sick sinus syndrome were examined. The probands aged 58 ± 0.15 years included 20 females and 9 males. The relatives of degrees I, II, and III included 65 men and 68 women aged 39 ± 0.13 years. In all probands and their relatives of degrees I, II, and III, the following assessments were performed: physical examination, electrocardiography, bicycle test, ECG Holter monitoring, Atropine test, electrophysiological study, echocardiography, and cardiorythmography.

According to the results of allele-specific polymerase chain reaction, 3 following ADRA2B genotypes were revealed: wild-type homozygous (II), heterozygous (ID), and homozygous mutant (DD). Thus, in patients with sick sinus syndrome due to a decreased automatism, the "neutralizing" effect of the mutant allele is apparently low. An increased concentration of catecholamines and calcium ions associated with intact conduction of gap junctions is able to maintain the pathologic automaticity of atrial cardiomyocytes.