ПРЕДИКТОРНАЯ РОЛЬ КОННЕКСИНА 40 В ГЕНЕЗЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО СИНДРОМА СЛАБОСТИ СИНУСОВОГО УЗЛА

С.Ю. Никулина¹, А.А. Чернова^{1*}, В.А. Шульман¹, Т.С. Кукушкина¹,
М.И. Воевода², В.Н. Максимов²

¹ Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 630089, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

Предикторная роль коннексина 40 в генезе наследственного синдрома слабости синусового узла

С.Ю. Никулина¹, А.А. Чернова^{1*}, В.А. Шульман¹, Т.С. Кукушкина¹, М.И. Воевода², В.Н. Максимов²

¹ Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого. 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

² Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 630089, Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

Цель. Изучить ассоциацию наследственного синдрома слабости синусового узла (СССУ) с полиморфизмом гена коннексина 40 (Cx40).

Материал и методы. В проспективное исследование отобраны 29 семей, имеющих первичный наследственный СССУ. Среди пробандов было 20 женщин и 9 мужчин в возрасте 58±0,15 лет. Среди родственников I, II и III степени родства были 65 мужчин и 68 женщин в возрасте 39±0,13 лет. Всем пробандам и их родственникам провели клинико-инструментальное обследование. Диагноз СССУ верифицировали при чреспищеводной стимуляции предсердий. Молекулярно-генетическое обследование больных СССУ и их родственников проводили в лаборатории медицинской генетики НИИ терапии СО РАМН города Новосибирска.

Результаты. По полиморфизму 44G>A гена Cx40 был генотипирован 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.

Заключение. Установлено достоверное преобладание гетерозиготного генотипа 44G>A у больных СССУ (45,07±5,9%) по сравнению с лицами контрольной группы (29,44±3,2%).

Ключевые слова: молекулярно-генетическое исследование, синдром слабости синусового узла, полиморфизм гена коннексина 40.

РФК 2011;7(2):174–176

Predictive role of connexin 40 in the pathogenesis of hereditary sick sinus syndrome

S.Yu. Nikulina¹, A.A. Chernova^{1*}, V.A. Shulman¹, T.S. Kukushkina¹, M.I. Voevoda², V.N. Maksimov²

¹ Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voino-Yasensky. Partizana Zheleznyaka ul. 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

² Research Institute of Therapy, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences. B. Bogatkova ul. 175/1, Novosibirsk, 630089 Russia

Aim. To study the association of hereditary sick sinus syndrome (SSS) with connexin 40 gene (Cx40) polymorphism.

Material and methods. 29 families with hereditary SSS were involved into prospective study. Probands were 20 women and 9 men (aged 58±0.15). Relatives, I-III degree of kinship, were 65 men and 68 women (aged 39±0.13). Clinical and instrumental examination was performed in all probands and their relatives. Diagnosis of SSS was verified by transesophageal atrial electrostimulation. Molecular genetic investigation of SSS patients and their relatives was carried out in laboratory of medical genetics of Research Institute of Therapy, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences.

Results. 71 SSS patients, 44 their healthy relatives, I-III degree of kinship, 197 subjects of control group were genotyped for the polymorphism of 44G>A of gene Cx40. According to allele-specific polymerase chain reaction 3 types of genotypes ADRA2B (II — homozygous wild, ID — heterozygous, DD — homozygous mutant) were found in SSS patients, their relatives and healthy subjects of control group.

Conclusion. Significant predominance of the heterozygous genotype 44G>A was found in SSS (45,07±5,9%) patients in comparison with subjects of the control group (29,44±3,2%).

Key words: molecular genetic studies, sick sinus syndrome, connexin 40 gene polymorphism.

Rational Pharmacother. Card. 2011;7(2):174–176

Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): anechkachernova@yandex.ru

Электрофизиологические свойства проводящей системы сердца обусловлены функционированием ионных каналов кардиомиоцитов и их гар-соединений. Строе-ние, форма и белковый состав этих соединений опре-деляются генами, изменения которых могут приводить

к структурным и функциональным нарушениям кле-точных мембран и межклеточных соединений. Нару-шения функционирования ионных каналов и межкле-точных взаимоотношений при соответствующих усло-виях, например при избыточном влиянии катехолами-нов, могут быть пусковым элементом аритмий. В пла-не генов, влияющих на структурные особенности про-водящей системы сердца, в настоящее время имеются данные о связи у мышей вариативности структуры гена транскрипционного фактора HF1b, контролирующего экс-прессию коннексина 40, одного из белков межклеточ-ных гар-соединений, с фатальными аритмиями при от-сутствии макроскопических структурных аномалий про-водящей системы [1]. При частичном снижении экс-прессии гена структурные аномалии сердца не опре-деляются, но сохраняется высокая частота внезапной смерти за счет развития фатальных желудочковых арит-

Сведения об авторах:

Никулина Светлана Юрьевна — д.м.н., профессор, зав. кафедрой внутренних болезней №1 КрасГМУ, проректор по учебной работе КрасГМУ

Чернова Анна Александровна — к.м.н., ассистент той же кафедры

Шульман Владимир Абрамович — д.м.н., профессор той же кафедры

Кукушкина Татьяна Сергеевна — клинический ординатор той же кафедры

Воевода Михаил Иванович — д.м.н., член-корреспондент РАМН, профессор, директор НИИ терапии СО РАМН

Максимов Владимир Николаевич — д.м.н., в.н.с. того же института

мий и нарушений атриовентрикулярной проводимости [2]. Этот эффект также объясняется и тем, что при отсутствии фактора HF1b в эмбриональном периоде возникает дефицит рецептора нейротропина trcC, 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 идентифицированы 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, увеличивался 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, электрофизиологической гетерогенности. Этот эффект наблюдается у лиц с пароксизмами фибрилляции предсердий на фоне функционирования дополнительных путей проводящей системы, где миокард предсердий более уязвим к возникновению микро-re-entry [6].

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.

Материал и методы

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 CCCУ. 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.

Все пробанды и их родственники подписывали форму информированного согласия на исследование. Работа была одобрена на заседании этического комитета КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого от 22.06.2009 года.

Всем пробандам и их родственникам I, II, III степени родства было проведено клинко-инструментальное исследование: клинический осмотр, электрокардиография, велоэргометрия, суточное мониторирование ЭКГ, атро-

пиновая проба, электрофизиологическое исследование (чреспищеводная стимуляция левого предсердия до и после медикаментозной вегетативной блокады), эхокардиоскопия, кардиоритмография.

Молекулярно-генетическое исследование больных CCCУ 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 Cx40 были взяты образцы крови 312 человек, из которых 71 — больные с диагнозом CCCУ, 44 — их здоровые родственники I, II, III степени родства и 197 человек — контрольная группа.

Экстракция ДНК из крови осуществлялась методом фенол-хлороформной экстракции [7,8].

Для детекции ОНП маркера гена Cx40, 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 Cx40 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 с использованием пакета программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc). 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.

Результаты исследования

По полиморфизму 44G>A гена Cx40 были протипированы: 71 больной с CCCУ, 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 CCCУ, их здоровых родственников и лиц контрольной группы: II — гомозиготный дикий, ID — гетерозиготный, DD — гомозиготный мутантный.

Установлено (рис. 1) достоверное преобладание гетерозиготного генотипа 44G>A у больных CCCУ ($45,07 \pm 5,9\%$) по сравнению с лицами контрольной группы ($29,44 \pm 3,2\%$).

Обсуждение результатов

Согласно результатам M. Firouzi, была выявлена ас-

Таблица 1. Частота встречаемости генотипов гена Cx40 у больных CCCУ, их здоровых родственников и лиц контрольной группы

Генотипы	Больные CCCУ (n=71)	Здоровые родственники (n=44)	Контрольная группа (n=197)
44GG	3 (4,23)	3 (6,82)*	25 (12,69)*†
44GA	32 (45,07)	20 (45,45)*	58 (29,44)*†
44AA	36 (50,7)	21 (47,73)*	114 (57,87)*†

Различия по исследуемым показателям рассчитаны с использованием критерия χ^2 . Данные представлены в виде n (%). * – $p < 0,05$ (по сравнению с больными CCCУ), † – $p < 0,05$ (по сравнению со здоровыми родственниками)

Рис. 1. Частота встречаемости генотипов гена коннексина 40 у больных CCCУ, их здоровых родственников и лиц контрольной группы

социация гомозиготного полиморфизма с возникновением микро-реентри в предсердиях как первичного электрофизиологического дефекта. Предположено, что при мутантном гомозиготном генотипе активность промотора гена снижается вдвое, что отражается на количестве белка, особенно если учитывать короткие сроки жизни коннексина 40 (~2 ч). При гетерозиготном генотипе активность промотора гена носит усредненный характер. Возникающая анизотропия вследствие неравномерности распределения межклеточных щелевых контактов предрасполагает к появлению зон с односторонним блокированием импульса и 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 микро-реентри, 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 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-видимому, снижено «нейтрализующее» действие мутантного аллеля. Повышение концентрации катехоламинов и ионов Ca^{2+} при интактной проводимости щелевых контактов способно поддерживать аномальную автоматическую активность миокардиоцитов предсердий.

Заключение

Таким образом, в ходе исследования установлено достоверное преобладание гетерозиготного генотипа 44G>A у больных CCCУ по сравнению со здоровыми лицами.

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; 67: 548-560
- Nguyễn-Trần V.T., Kubalak S.W., Minamisawa S. et al. A novel genetic pathway for sudden cardiac death via defects in the transition between ventricular and conduction system cell lineages. Cell 2000; 102(5): 671-682.
- Amand T.R., Lu J.T., Chien K.R. Defects in cardiac conduction system lineages and malignant arrhythmias: developmental pathways and disease. Novartis Found Symp 2003; 250: 260-70.
- Willecke K., Elberger J., Degen J. et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. Biol Chem 2002; 383: 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; 99(11): 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; 95: e29
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
- Smith C.L., Kalco S.R., Cantor C.R. Pulsed field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. In: R.E. Davis, Ed. Genome analysis. A practical approach. 1st ed. Davis RE, ed. Oxford: IRL Press, 1988: 41-72.
- Juang J.M., Chern Y.R., Tsai C.T. et al. The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. Int J Cardiol 2007; 116(1): 107-12.
- Goeneveegen W.A., Firouzi M., Bezzina C.R. et al. A Cardiac Sodium Channel Mutation Co-segregates With a Rare Connexin 40 Genotype in Familial Atrial Standstill. Circ Res 2003; 92: 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 2006; 354: 2677-2688.

Поступила 24.10.2010

Принята в печать 29.11.2010