

Роль полиморфизма гена коннексина 40 в генезе наследственного синдрома слабости синусового узла

С.Ю.Никулина¹, А.А.Чернова¹, В.А.Шульман¹, Т.С.Кукушкина¹, М.И.Воевода², В.Н.Максимов²
¹Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого;
²ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск

Резюме. В настоящей работе впервые на клинико-генетическом материале выявлена ассоциация наследственного синдрома слабости синусового узла с полиморфизмом гена коннексина 40.

Впервые выявлено, что гетерозиготный вариант генотипа гена коннексина 40 достоверно чаще встречается у больных с синдромом слабости синусового узла и их здоровых родственников по сравнению с лицами контрольной группы.

Ключевые слова: синдром слабости синусового узла, полиморфизм, ген коннексина 40. Гетерозиготный полиморфизм гена коннексина 40 способствует возникновению наследственного синдрома слабости синусового узла (СССУ).

Role of connexin 40 gene polymorphism in the pathogenesis of hereditary sick sinus syndrome

S.Y.Nikulina¹, A.A.Chernov¹, V.A.Schulman¹, T.S.Kukushkina¹, M.I.Voevoda², V.N.Maksimov²
¹Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F.Voyno-Yasenetsky
²State Institution «Research Institute for Therapy SB RAMS», Novosibirsk

Summary. In this study for the first time on clinical-genetic material an association of the hereditary sick sinus syndrome (SSS) with the connexin 40 gene polymorphism was found.

For the first time it was revealed that the heterozygous variant of connexin 40 gene genotype was significantly more common in patients with SSS and their healthy relatives in comparison with subjects of the control group.

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

Сведения об авторах

Чернова Анна Александровна – асс. каф. внутренних болезней №1 КГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого. E-mail: anechkachernova@yandex.ru

Никулина Светлана Юрьевна – д-р мед. наук, проф., зав. каф. внутренних болезней №1 КГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого. E-mail: nicoulina@mail.ru

Шульман Владимир Абрамович – д-р мед. наук, проф. каф. внутренних болезней №1 КГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Кукушкина Татьяна Сергеевна – клинический ординатор каф. внутренних болезней №1 КГМУ им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Воевода Михаил Иванович – директор ГУ НИИ терапии СО РАМН

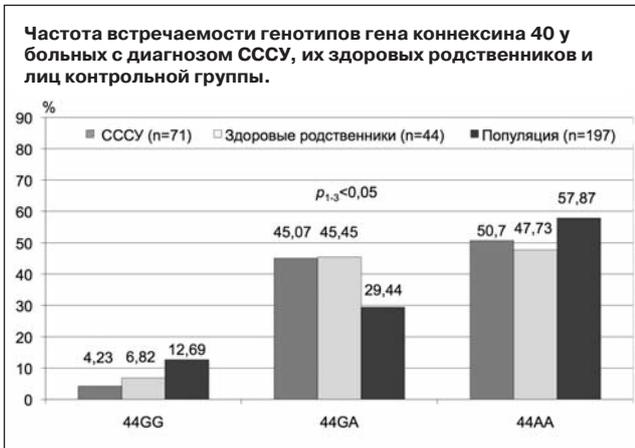
Максимов Владимир Николаевич – науч. сотр. ГУ НИИ терапии СО РАМН. E-mail: Medik11@mail.ru

В основе нарушения ритма лежит изменение основных свойств клеток проводящей системы сердца (ПСС) – автоматизма, возбудимости и проводимости. Основная структура ПСС – пейсмекерная клетка, обладающая в отличие от остальных способностью к самогенерации импульсов. Это свойство обусловлено электрофизиологическим феноменом спонтанной деполяризации – самопроизвольным током ионов через мембрану клетки в фазе покоя, благодаря которому изменяется разность потенциалов по обе стороны мембраны и создаются условия для генерации импульса.

Способность к спонтанной деполяризации различна на разных уровнях проводящей системы: клетки синусового узла генерируют в минуту 60–80 импульсов, атриовентрикулярного соединения – 40–60, ножки пучка Гиса и волокна Пуркинью – менее 40 импульсов в минуту. Однако при определенных условиях пейсмекерная активность клеток ПСС может повышаться, а иногда пейсмекерные свойства могут проявляться у клеток, которые ранее ими не обладали, – так называемый «аномальный автоматизм». Скорость проведения импульса по отрезкам ПСС в значительной степени связывают с преобладанием в мем-

Частота встречаемости генотипов гена Sx40 у больных с диагнозом CCCУ, их здоровых родственников и лиц контрольной группы									
Генотипы	Больные с диагнозом CCCУ (n=71)		Здоровые родственники (n=44)		Контрольная группа (n=197)		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	$p>0,05$	$p>0,05$	$p>0,05$

Примечание. Различия по исследуемым показателям рассчитаны с использованием критерия χ^2 .



бране клеток быстрых натриевых или медленных кальциевых каналов. Электрофизиологические свойства ПСС 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 ПСС, в настоящее время 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 (Sx40) [4]. Таким образом, многообразие коннексинов придает специфич-

ческие свойства межклеточным контактам для контроля потока молекулярной информации и определяет свойства ППС в норме и в патологии. У мышей с дефицитом гена Sx40 наблюдается замедление межпредсердного проведения, увеличивается риск развития предсердных аритмий и дисфункции синусового узла [5]. У человека мутации в области промотора гена Sx40 (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 дополнительных путей проводящей системы, где миокард предсердий более уязвим к возникновению микроцентри [6].

В связи с приведенными данными представляет значительный интерес исследование полиморфизма генов, кодирующих белки, определяющие структурное и функциональное состояние ПСС, и изучение его связи с разными нарушениями ритма.

Материалы и методы

Настоящее исследование было проспективным. Из базы данных кафедры терапии №1 КГМУ 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 $58 \pm 0,15$ года. Среди родственников 1, 2 и 3-й степени родства было 65 мужчин и 68 женщин, средний возраст – $39 \pm 0,13$ года.

Всем пробандам и их родственникам 1, 2 и 3-й степени родства было проведено клинико-инструментальное исследование: клинический осмотр, электрокардиография, велоэргометрия, холтеровское мониторирование эхокардиограммы, атропиновая проба, электрофизиологическое исследование (чреспищеводная стимуляция левого предсердия до и после медикаментозной вегетативной блокады), эхокардиоскопия, кардиоритмография.

Молекулярно-генетическое исследование больных с диагнозом CCCУ и их родственников 1, 2 и 3-й 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 CCCУ, 44 – их здоровые родственники 1, 2 и 3-й степени родства и 197 человек контрольной группы.

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

Для детекции однонуклеотидного полиморфного маркера гена Sx40, локализованного в промоторе (замена G на A в позиции – 44), выполнялась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) по методике M.Firouzi [6].

Для детекции однонуклеотидного полиморфного 44G>A гена Cx40 использовали следующие праймеры: 5'-CCCTCTTTTAAATCGTATCTGTGGC-3' (прямой) и 5'-GGTGGAGGGAAGAAGACTTTTAG-3' (обратный). После ПЦР продукт длиной 150 нуклеотидных пар обрабатывается рестриктазой HaeIII. При наличии G аллеля продукт разрезается на 126 фрагментов 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 перечисленных генов с контрольной группой выполнялись с использованием критерия χ^2 , двустороннего критерия Фишера.

Результаты и обсуждение

По полиморфизму 44G>A гена Cx40 были прогенотипированы: 71 больной с диагнозом CCCУ, 44 их здоровых родственника 1, 2 и 3-й степени родства, 197 лиц контрольной группы.

По результатам аллель-специфической ПЦР выявлены 3 вида генотипов ADRA2B у больных с диагнозом CCCУ, их здоровых родственников и лиц контрольной группы: II – гомозиготный дикий, ID – гетерозиготный, DD – гомозиготный мутантный (см. таблицу).

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

Согласно результатам M.Firouzi была выявлена ассоциация гомозиготного полиморфизма с возникновением микрорецентри в предсердиях как первичного электрофизиологического дефекта. Предполагено, 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 ч). При гетерозиготном генотипе активность промотора гена носит усредненный характер. Возникающая анизотропия вследствие неравномерности распределения межклеточных щелевых контактов predisposes к появлению зон с однонаправленным блокированием импульса, гетерогенной рефрактерностью клеток и отсутствию зон с восстановленной возбудимостью в пределах миокарда предсердий. Повидимому, у обладателей гетерозиготного генотипа

срабатывает фактор «усреднения» электрофизиологических параметров миокардиоцитов, определяя относительно благоприятный прогноз не только в плане развития микрорецентри, 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 predisposes к угнетению функции автоматизма в миокардиоцитах предсердий, «остановке предсердий» [11]. У больных с диагнозом CCCУ, в основе которого лежит снижение автоматизма, по-видимому, снижено «нейтрализующее» действие мутантного аллеля. Повышение концентрации катехоламинов и ионов Ca при интактной проводимости щелевых контактов способно поддерживать аномальную автоматическую активность миокардиоцитов предсердий.

Литература

1. Hewett LW, Sedmera D et al. Knockout of the neural and heart expressed gene HF-1b results in apical deficits of ventricular structure and activation. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 548–60.
2. Nguyen-Tran VTD, Kubalak SW, 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; 102: 671–82.
3. 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].
4. 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: 725–37.
5. 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.
6. 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. *Circ Res* 2004; 95: e29.
7. Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
8. Смит К, Калко С, Кантор Ч. Пульс-электрофорез и методы работы с большими молекулами ДНК. Под ред. К.Дейвуса. Пер. с англ. Анализ генома. М.: Мир, 1990; с. 58–94.
9. Juang JM, Chern YR, Tsai CT et al. The association of human connexin 40 genetic polymorphisms with atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2007; 116 (1): 107–12.
10. Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR et al. A Cardiac Sodium Channel Mutation Cosegregates With a Rare Connexin40 Genotype in Familial Atrial Standstill. *Circ Res* 2003; 92: 14–22.
11. Gollob MH, Jones DL, Krabn AD et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *New Eng J Med* 2006; 354: 2677–88.