

На правах рукописи



ПОЛОВКОВА
Оксана Геннадьевна

**РОЛЬ ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ КАЛЬЦИНЕУРИНА
В РАЗВИТИИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ МИОКАРДА
У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА**

03.02.07 – генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении “Научно-исследовательский институт медицинской генетики” Сибирского отделения РАМН и в Федеральном государственном бюджетном учреждении “Научно-исследовательский институт кардиологии” Сибирского отделения РАМН, г. Томск.

Научные руководители:

академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор

Пузырёв Валерий Павлович

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ

Шипулин Владимир Митрофанович

Официальные оппоненты:

Сазонов Алексей Эдуардович, доктор медицинских наук

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет” Минздрава России, главный научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории

Трифорова Екатерина Александровна, кандидат медицинских наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Научно-исследовательский институт медицинской генетики” Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, научный сотрудник лаборатории эволюционной генетики

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

Защита состоится «11» апреля 2013 года в ___ час. на заседании диссертационного совета ДМ 001.045.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении “Научно-исследовательский институт медицинской генетики” Сибирского отделения РАМН по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения “Научно-исследовательский институт медицинской генетики” Сибирского отделения РАМН (634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10.)

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук



Хитринская И. Ю.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В последние годы становится всё более актуальным исследование структуры генетической подверженности к ремоделированию сердца – важнейшей стадии сердечно-сосудистого континуума. Для сердечно-сосудистых заболеваний характерна высокая распространенность и смертность в большинстве стран мира. По M. Pfeffer «ремоделирование сердца – это структурно-геометрические изменения левого желудочка, включающие в себя процессы гипертрофии и дилатации, приводящие к изменению его геометрии и нарушению систолической и диастолической функции» [цит. по Васюк Ю. А., 2003]. В настоящее время очерчен широкий спектр генов, участвующих в инициации и регуляции процесса ремоделирования сердца [Stambader J.D. et al., 2010]. Накоплены данные, касающиеся влияния полиморфных локусов кандидатных генов на гипертрофию левого желудочка. Обнаружены общие гены для этиологически разных форм ремоделирования сердца [Пузырев В.П. с соавт., 2006; Макеева О. А. с соавт., 2004].

Наиболее распространенный подход исследования многофакторных состояний – анализ ассоциаций кандидатных генов с заболеваниями и важнейшими эндотипами. Ремоделирование сердца имеет многофакторную природу и возникает в результате взаимодействия множества внешнесредовых и генетических факторов. Для распространенных заболеваний и признаков характерно: сложность генетических взаимоотношений, генетическая гетерогенность, взаимодействие генотип-среда, специфичные для каждой популяции [Feingold J., 2005; Пузырёв В. П., 2011]. Тем не менее, совершенствуются технологии и подходы к исследованию широко распространенных заболеваний. Среди них международный проект HarMap [<http://harmap.ncbi.nlm.nih.gov/>], «карта гаплотипов генома человека», в котором представлена информация о вариабельности генов в четырех крупных популяциях мира. С использованием проекта HarMap создаются ресурсы для оптимального выбора полиморфных вариантов при изучении ассоциации генов с заболеванием.

Для понимания механизмов ремоделирования большое значение приобретают исследования изменения паттерна генетической экспрессии. Существует много данных, свидетельствующих об активации в кардиомиоцитах определенного набора генов при гипертрофии, при сердечной недостаточности, а также на различных стадиях сердечной недостаточности [Naq S., et al., 2001; Vuermans H.P. et al., 2005].

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является ведущей причиной сердечной недостаточности [Мареев В. Ю. с соавт., 2010; Агеев Ф.Т. с соавт., 2000]. Выживаемость больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) ишемического генеза существенно ниже, чем у больных с ХСН другой этиологии [Беленков Ю.Н., Агеев Ф.Т., 1999]. Причиной ишемического ремоделирования служит гибель кардиомиоцитов при инфаркте или в условиях формирования зон хронической ишемии (гибернации) миокарда [Бузиашвили Ю.И. с соавт., 2002]. Основными составляющими постинфарктного

ремоделирования левого желудочка являются экспансия инфаркта, дилатация желудочка и гипертрофия неинфарцированных сегментов [Бузиашвили Ю.И. с соавт., 2002]. Известно, что дилатация левого желудочка играет важнейшую роль в развитии хронической сердечной недостаточности, а такой показатель как объём левого желудочка является наиболее мощным предиктором выживаемости у пациентов с ИБС [White H.D., et al., 1987].

Существуют значительные индивидуальные различия в степени выраженности постинфарктного ремоделирования [Katz A.M., 1990; Бойцов С.А. с соавт., 1999]. Так дилатация ЛЖ развивается у 42%-46% пациентов, перенесших инфаркт миокарда [Gaudron P., et al., 1993; Jeremy R.W. et al., 1989], а прогрессирует только у 16%-20% [Jeremy R.W. et al., 1989; Warren S.E. et al., 1988].

Экспериментальные исследования продемонстрировали важнейшую роль кальцинеурина в развитии ремоделирования сердца [Molkentin J.D. et al., 1998]. Предложена модель участия кальцинеурина в ремоделировании сердца, которая предполагает активацию экспрессии генов гипертрофического ответа с участием ядерного фактора активированных Т-клеток NFAT3 и фактора транскрипции типа цинковых пальцев GATA4 [Molkentin J.D. et al., 1998]. Компоненты СПК могут быть вовлечены в различные типы ремоделирования сердца у человека. Несколькими исследовательскими группами были найдены ассоциации полиморфных вариантов в генах СПК с гипертрофией левого желудочка [Poirier O., et al., 2003; Tang W. et al., 2005]. Показано изменение уровней экспрессии генов СПК при гипертрофии миокарда у человека, а также сердечной недостаточности [Grammer J.V. et al., 2006; Zhao Y. et al., 2010].

Изучение генетической предрасположенности к ремоделированию сердца вследствие ишемии миокарда играет важную фундаментальную роль в понимании патогенеза этого состояния и определяет разработку новых подходов к лечению и профилактике ишемической болезни сердца (ИБС) и сердечной недостаточности.

Цель исследования:

Изучить роль генов сигнального пути кальцинеурина в формировании генетической предрасположенности к ишемическому ремоделированию миокарда.

Задачи исследования:

1. Изучить популяционные характеристики выбранных полиморфных генетических вариантов с предполагаемой функциональной значимостью в генах сигнального пути кальцинеурина *GATA4*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1* и *NFATC4*.
2. Изучить ассоциацию полиморфных вариантов генов сигнального пути кальцинеурина с ишемической болезнью сердца.
3. Изучить связь полиморфных вариантов генов *GATA4*, *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1* и *NFATC4* с вариабельностью важнейших эхокардиографических параметров и уровней систолического и диастолического артериального давления у здоровых индивидуумов и у больных ишемической болезнью сердца.

4. Провести анализ ассоциаций выбранных полиморфных генетических вариантов сигнального пути кальцинеурина с развитием значительной дилатации сердца и дезадаптивным ремоделированием у больных с ишемической болезнью сердца.
5. Провести сравнительный анализ уровней экспрессии генов сигнального пути кальцинеурина *PPP3CA*, *PPP3R1*, *PPP3CB*, *GATA4* и *NFATC4* в образцах тканей миокарда в группах пациентов с ИБС с выраженной дилатацией левого желудочка (постинфарктная аневризма) и больных с сохраненной формой левого желудочка.
6. Изучить связь полиморфных генетических вариантов сигнального пути кальцинеурина с уровнем их экспрессии в миокарде ушка правого предсердия у больных ИБС.

Научная новизна исследования: Впервые у русских определены частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов и их фланкирующих регионов *NFATC4* (rs1955915, rs7149586), *GATA4* (rs10112596, rs17153747, rs6601604, rs11250164, rs10096189, rs804271, rs8191515, rs2898293), *PPP3CA* (rs7696663, rs6818482, rs2132696, rs2659504, rs2659533, rs2850998), *PPP3R1* (rs1060842, rs17034884, rs11126175, rs1169285, rs13028330, rs12468533), *PPP3CB* (rs12644, rs12775630, rs1041532). Установлена вовлеченность генов *PPP3CA*, *PPP3R1*, *GATA4*, *NFATC4* в вариабельность ЭхоКГ признаков у здоровых индивидов и у больных ИБС.

Впервые выявлено, что у больных ИБС с массой миокарда левого желудочка ассоциированы полиморфные варианты гена *NFATC4* (rs7149586) и tagSNP гена *PPP3CA* (rs6819484 и rs2132696); с систолической функцией ЛЖ ассоциированы SNP гена *GATA4* (rs17153747), полиморфные варианты фланкирующих регионов гена *GATA4* (rs804271, rs2898293), SNP гена *PPP3R1* (rs11692815, rs12468533) и tagSNP гена *PPP3R1* (rs11126176). Впервые показана связь tagSNP гена *GATA4* rs804271 с развитием дезадаптивного ремоделирования ЛЖ и rs17153747 гена *GATA4* с развитием значительной дилатации ЛЖ.

Установлено, что сниженный уровень экспрессии генов каталитической субъединицы кальцинеурина *PPP3CA* и *PPP3CB* в миокарде ушка правого предсердия является маркером выраженного постинфарктного ремоделирования (дилатация) левого желудочка. Впервые выявлена ассоциация полиморфных вариантов rs2229309, rs1955915 гена *NFATC4*, tagSNP гена *GATA4* rs804271, tagSNP гена *PPP3R1* rs1060842 с уровнем экспрессии гена *PPP3CB* и ассоциация tagSNP гена *GATA4* rs804271 с уровнем экспрессии гена *PPP3CA*.

Научно-практическая значимость исследования: Выявленные ассоциации генетических вариантов со структурно-функциональными изменениями миокарда при ИБС дополняют знания о структуре наследственной компоненты ремоделирования сердца при ИБС и служат основой для дальнейшего изучения механизмов патогенеза этого состояния. Полученные в настоящей работе результаты могут быть использованы для разработки панели молекулярно-генетических маркёров для изучения подверженности к ремоделированию миокарда, для оценки особенностей

течения и исходов ИБС. Полученные данные о связи генетической вариабельности компонентов сигнального пути кальцинеурина с ремоделированием сердца при ИБС могут быть использованы для разработки новых подходов к лечению и профилактике осложнений ИБС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Полиморфные варианты, генов сигнального пути кальцинеурина и их фланкирующих регионов *NFATC4* (rs7149586), *GATA4* (rs804271, rs17153747 и rs2898293), *PPP3R1* (rs11126176, rs11692815 и rs12468533) и *PPP3CA* (rs6819482 и rs2132696) связаны с формированием ишемического ремоделирования сердца, влияют на показатели массы миокарда и систолической функции левого желудочка, ассоциированы с развитием стадии дезадаптивного ремоделирования и дилатации камер сердца при ИБС.

2. Сниженный уровень экспрессии генов каталитической субъединицы кальцинеурина *PPP3CA* и *PPP3CB* в миокарде ушка правого предсердия является маркером выраженного постинфарктного ремоделирования (дилатация) левого желудочка.

3. Полиморфный вариант rs804271, являющийся однонуклеотидной полиморфной меткой (tagSNP) гена *GATA4*, кодирующего специфический для сердца транскрипционный фактор GATA4, ассоциирован как с важнейшими эхокардиографическими параметрами (массой миокарда ЛЖ и показателями систолической функции), типом ремоделирования (в частности, формированием дезадаптивного ремоделирования, так и с уровнями экспрессии генов *PPP3CA* и *PPP3CB*, которые дифференцированно экспрессируются в зависимости от наличия/отсутствия дилатации (аневризмы) ЛЖ.

Апробация работы:

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на VIII научной конференции с международным участием «Генетика человека и патология» (Томск, 2007), на Ежегодной Европейской конференции по генетике человека (Барселона, 2008), межлабораторных научных семинарах НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск, 2008, 2012), на VI съезде Российского общества медицинских генетиков (г. Ростов-на-Дону, 2010), на конгрессе Европейского Общества кардиологов (Мюнхен, 2008).

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах списка ВАК РФ, 2 статьи в сборниках, 5 тезисов в материалах отечественных конференций, 6 – в зарубежных.

Структура и объем работы:

Диссертация изложена на 186 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, собственные результаты и их обсуждение, заключение, выводы и приложения. Данные проиллюстрированы 15 таблицами, 29 рисунками. Библиографический указатель включает 203 источника, из них 39 работ отечественных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 206 человек с диагнозом ИБС и постинфарктный кардиосклероз, из них 183 мужчины (53,8±7,8 года) и 23 (55,5±6,1 лет) женщины. Пациенты обследованы на базе хирургического отделения НИИ кардиологии СО РАМН (руководитель отделения д.м.н., профессор В.М. Шипулин). Контрольная группа включала 288 человек, отобранных на основании следующих критериев: возраст старше 30 лет, этническая принадлежность (русские, г. Томск), нормальные эхокардиографические параметры (толщина стенок ЛЖ менее 11 мм, КДР 46-57 мм, ИММЛЖ менее 134 и 110 г/м² у мужчин и женщин соответственно). Выборка включала 120 мужчин (45,99±10,49 лет) и 168 женщин (44,39±7,42 года). Индивиды контрольной группы были обследованы на базе Сибирского государственного медицинского университета (к.м.н. И.В. Цимбалюк). Пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании.

У всех пациентов проведено эхокардиографическое исследование (ЭхоКГ), у хирургических больных – до проведенной операции на сердце. Определяли следующие ЭхоКГ параметры: толщину межжелудочковой перегородки (МЖП) и задней стенки левого желудочка (ЗСЛЖ), фракцию выброса (ФВ), конечный диастолический объем (КДО), конечный систолический объем (КСО), конечный систолический размер (КСР), конечный диастолический размер (КДР). Массу миокарда левого желудочка (ММЛЖ) рассчитывали по формуле R. Devereux с соавт. [Devereux R. V., Reiches N., 1997]: $ММЛЖ = 1,04 \times [(КДР + МЖП + ЗСЛЖ)^3 - КДР^3] - 13,4$. Индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) рассчитывали как отношение массы миокарда к площади тела. Данные артериального давления были получены путем трехкратного измерения.

Больные ИБС были разделены на несколько подгрупп по типу ремоделирования миокарда (бессимптомное, адаптивное и дезадаптивное) в соответствии с классификацией, предложенной в национальных рекомендациях по лечению ХСН [Мареев В. Ю. и др., 2010]. Данная классификация основана на анализе выраженности симптомов ХСН, оценке систолической и диастолической дисфункции, относительной толщины стенок ЛЖ и индекса сферичности ЛЖ.

Для изучения уровня экспрессии генов СПК *PPP3CA*, *PPP3R1*, *PPP3CB*, *GATA4* и *NFATC4* в миокарде были сформированы 2 выборки: с выраженным постинфарктным ремоделированием и без ремоделирования левого желудочка. Обе группы больных перенесли хирургические операции. В первую группу включены пациенты с выраженной постинфарктной дилатацией левого желудочка, которым была выполнена хирургическая реконструкция левого желудочка (n=21). Сердце у этих больных характеризовалось участками нежизнеспособного миокарда и большим объемом левого желудочка. Целью хирургического лечения являлось уменьшение объема и улучшение формы ЛЖ путем исключения несокращающегося сегмента, а также полная реваскуляризация гибернированных участков миокарда. Контрольной группой служила выборка

пациентов с сохраненной формой сердца, которым выполнена только операция аортокоронарного шунтирования (АКШ) (n=34). Образцы биопсии забирались во время операции из области ушка правого предсердия на этапе канюляции и подключения аппарата искусственного кровообращения, опускались в пластиковые микропробирки и хранились при -80⁰ С.

Для исследования был проведен анализ структуры генов кальцинеуринового сигнального пути и выбраны варианты с предполагаемой функциональной значимостью и однонуклеотидные полиморфные метки (tagging SNP) (таблица 1).

Таблица 1

Перечень изученных в исследовании полиморфных вариантов, их предполагаемая функциональная значимость и метод генотипирования

SNP (rs-номер)	Функциональная значимость	Метод генотипирования
<i>NFATC4</i>		
rs1955915	вариант в интроне	рестрикция
rs7149586	несинонимичная замена	TaqMan-пробы
rs2229309	ассоциация, показанная в др. исследовании	рестрикция
<i>GATA4</i>		
rs10112596	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs17153747	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs6601604	tagging SNP	рестрикция
rs11250164	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs10096189	tagging SNP	рестрикция
rs804271	tagging SNP	рестрикция
rs8191515	tagging SNP	рестрикция
rs2898293	сайт связывания с регуляторным фактором	рестрикция
<i>PPP3R1</i>		
rs1060842	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs17034884	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs11126176	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs11692815	несинонимичная замена	TaqMan-пробы
rs13028330	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs12468533	tagging SNP	TaqMan-пробы
5I/5D	ассоциация, показанная в др. исследовании	рестрикция

SNP (rs-номер)	Функциональная значимость	Метод генотипирования
<i>PPP3CA</i>		
rs7696663	tagging SNP	рестрикция
rs6819482	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs2132696	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs2659504	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs2659533	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs2850998	tagging SNP	TaqMan-пробы
<i>PPP3CB</i>		
rs12644	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs12775630	tagging SNP	TaqMan-пробы
rs1041532	tagging SNP	TaqMan-пробы

Для генотипирования использовали образцы тотальной ДНК, выделенной из цельной венозной крови стандартным методом [Маниатис Т. с соавт., 1984] с некоторыми модификациями. Генотипирование осуществляли с помощью TaqMan-проб и ПДРФ анализа (табл. 1). Для амплификации фрагментов ДНК использовали структуру праймеров, подобранных с помощью программы «Primer3» [Rozen S., Skaletsky N. J., 2000]. Для полиморфизма 5I/5D *PPP3R1* для проведения ПЦР использовали праймеры, опубликованные Tang с соавторами [Tang W. et al., 2005]. Генотипирование с помощью TaqMan-проб производилось на приборе «iCycler iQ» (BIO-RAD, США). ПЦР для TaqMan-генотипирования проводили согласно инструкции Applied Biosystems, США.

Выделение мРНК проводили с использованием набора TRIZOL® Reagent (INVITROGEN). Для изучения экспрессии исследуемых генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, *NFATC4*, *GATA4* использовали наборы, содержащие праймеры для амплификации фрагментов и TaqMan пробу фирмы Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assay). Нормализацию уровня экспрессии исследуемых генов проводили по уровню мРНК гена домашнего хозяйства *GAPDH* согласно руководству, разработанному Applied Biosystems [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf].

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга (РХВ) с помощью критерия χ^2 [Вейр Б., 1995]. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность или точному тесту Фишера при количестве наблюдений в какой-либо из подгрупп ≤ 5 . Значимыми считали отличия при $p \leq 0,05$. Отношение шансов (odds ratio, OR) рассчитывали по формуле: $OR = ad/bc$, где a – частота анализируемого аллеля у больных, b – частота данного аллеля в группе контроля, c и d – суммарная частота остальных аллелей у больных и в контроле соответственно [Pearce N.,

1993]. Границы 95% доверительного интервала (ДИ) для OR рассчитывали по методу Woolf [Szumilas M., 2010].

Наблюдаемый уровень гетерозиготности вычисляли как долю гетерозигот от общего объёма выборки. Ожидаемую гетерозиготность рассчитывали по Nei [Nei M., 1987]. Относительное отклонение ожидаемой гетерозиготности от наблюдаемой (H) рассчитывали по формуле: $H=(h_{obs}-h_{exp})/h_{exp}$, где h_{obs} и h_{exp} – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно. Для оценки неравновесия по сцеплению между парами генетических маркеров одного гена использовали меру неравновесия по сцеплению D' (коэффициент Левонтина) [Lewontin R.C., 1964; Hedric, P.W., 1987], рассчитанный с помощью программы Haploview 4.2. Проверку на нормальность распределений осуществляли по критерию Колмагорова-Смирнова или Критерию Шапиро-Уилка при небольших объёмах выборки ($n \leq 50$). Кроме этого была введена поправка на возраст и индекс массы тела. Данная процедура выполнена по формуле: $y=x+b(t_0-t)$; где x – исходная величина исправляемого показателя; b – коэффициент линейной регрессии; t_0 – средний возраст; t – исходный возраст [Лильин Е. Т. с соавт., 1984]. В случае нормального распределения сравнение средних значений нескольких переменных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа, в случае несоответствия нормальному распределению – непараметрическими методами по Манна-Уитни и Краскелу-Уоллесу [Лакин Г.Ф., 1990]. Оценку кратности различий экспрессии генов в двух выборках оценивали путем вычисления отношения средних значений нормализованных показателей уровня экспрессии каждого гена. Оценку различий в уровне экспрессии между группами осуществляли по критерию Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика полиморфизма генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, *NFATC4* и *GATA4* в контрольной выборке и у больных ИБС

При оценке соответствия наблюдаемого распределения генотипов, ожидаемому при РХВ в контрольной выборке было выявлено отклонение частот генотипов для полиморфного варианта rs12468533 гена *PPP3R1* и tagSNP гена *PPP3CA* rs7696663 за счёт недостатка гетерозигот. По остальным полиморфным маркерам наблюдалось соответствие частот генотипов равновесию Харди-Вайнберга. В выборке больных ИБС отмечено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга по вариантам rs2659504 и rs2659533 гена *PPP3CA* за счёт недостатка гетерозигот.

Распределение частот аллелей по большинству изученных полиморфных вариантов генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R*, *NFATC4* и *GATA4* у лиц контрольной выборки не отличались от данных, представленных в проекте HarMap для лиц европейского происхождения. Статистически значимые отличия по частотам аллелей были зафиксированы для следующих генетических вариантов: rs1955915, rs10096189, rs11250164, rs17153747, rs11692815, rs7696663, rs6819482 и rs2659504 ($p < 0,05$). Структура неравновесия

по сцеплению в исследуемой выборке соответствовала паттерну, полученному при анализе данных НарМар (генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R*, *NFATC4*, *GATA4*). Выявлены блоки из двух близко расположенных SNPs, характеризующиеся высоким уровнем сцепления: в гене *NFATC4* (rs2229309 и rs7149586, $D'=1$), в гене *GATA4* (rs10112596 и rs6601604, $D'=0,95$), в гене и фланкирующем регионе гена *PPP3R1* (rs1060842 и rs11692815, $D'=0,96$), в гене *PPP3CA* (rs2850998 и rs2659533, $D'=0,97$).

Изучение ассоциаций полиморфных вариантов генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, *NFATC4* и *GATA4* с ИБС и уровнями АД

Группа больных ИБС по частотам аллелей и генотипов не отличалась от контрольной выборки. При изучении влияния полиморфных вариантов исследованных генов на вариабельность показателей артериального давления выявлена ассоциация полиморфизма rs804271 с уровнем систолического АД (САД) в подгруппе женщин: у носителей аллеля «G» САД $129,9 \pm 18,5$ мм рт. ст., у носителей генотипа «ТТ» $139,3 \pm 19,7$ мм рт. ст. ($p=0,005$). Поскольку данный полиморфизм находится на расстоянии 9706 п.о. от гена *GATA4*, вероятнее всего он сцеплен с другим внутригенным функционально значимым вариантом, или обладает самостоятельными регуляторными функциями. Возможный механизм, с помощью которого распространенные варианты в этом гене оказывают влияние на артериальное давление, заключается в регуляции транскрипционным фактором *GATA4* экспрессии гена эндотелина-1 [Но J.E. et al., 2011].

У женщин с уровнем АД ассоциирован rs7149586 гена *NFATC4*: у носителей аллеля «С» уровень САД составил $130,0 \pm 17,8$ мм рт. ст., у индивидов с генотипом «ТТ» – $142,3 \pm 21,2$ мм рт. ст. ($p=0,008$), у носителей аллеля «С» уровень ДАД составил $82,7 \pm 10,4$ мм рт. ст., у носителей генотипа «ТТ» – $87,9 \pm 9,8$ мм рт. ст. ($p=0,047$).

Полиморфный вариант rs1955915 гена *NFATC4* ассоциирован с САД у мужчин, а также ДАД у женщин ($p=0,017$). У носителей аллеля «G» показатель САД составил $127,7 \pm 13,6$ мм рт. ст., у носителей генотипа «АА» – $135,6 \pm 23,2$ мм рт. ст. ($p=0,035$).

В подгруппе женщин обнаружено, что носительство аллеля «5D» полиморфизма 5I/5D, который находится в промоторе гена *PPP3R*, связано со снижением САД ($124,3 \pm 10,3$ мм рт. ст. у носителей аллеля «5D», $134,1 \pm 20,2$ мм рт. ст. у индивидов с генотипом «II») ($p=0,014$), а наличие аллеля «С» полиморфизма rs17034884 и аллеля «А» полиморфизма rs11126176 связано со снижением ДАД ($p=0,003, p=0,049$ соответственно).

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, *NFATC4* и *GATA4* с параметрами сердца у индивидов контрольной выборки

Для tagSNP rs804271, rs2898293 во фланкирующем регионе гена *GATA4*, и rs6601604 гена *GATA4* показаны ассоциации с ЭхоКГ параметрами. У женщин выявлена ассоциация rs804271 с параметром ИММЛЖ: у носителей аллеля «G»

ИММЛЖ составил $90,12 \pm 12,01$ г/м², у индивидов с генотипом «ТТ» – $95,92 \pm 12,06$ г/м² ($p=0,007$). Носительство аллеля «G» rs804271 также связано с меньшими значениями параметров МЖП ($p=0,038$), ЗСЛЖ ($p=0,029$), ММЛЖ ($p=0,015$). Найдена ассоциация полиморфизма rs6601604 с показателем ЗСЛЖ у женщин: наличие аллеля «А» связано со снижением значения ЗСЛЖ ($p=0,032$). Отдельно у женщин полиморфизм rs2898293 ассоциирован с показателями КСР и ФВ. Варианты rs804271 и rs2898293 находятся в нескольких десятках килобаз от гена *GATA4*. Их роль, вероятно, связана со сцеплением с функционально значимым вариантом (или вариантами) в самом гене. Замена rs6601604 находится в интроне гена и, возможно, влияют на сплайсинг гена.

Подгруппы мужчин, выделенные в зависимости от генотипа по полиморфизму rs7149586 гена *NFATC4* различались по величине ИММЛЖ: максимальное значение ИММЛЖ отмечено у индивидов с генотипом «ТТ»: $110,05 \pm 12,91$ г/м², минимальное у индивидов с генотипом «СТ»: $97,13 \pm 17,43$ г/м² ($p=0,046$). У мужчин носительство аллеля «С» связано с более низкими значениями ЗСЛЖ и МЖП ($p=0,039$ и $p=0,03$), ММЛЖ и ИММЛЖ ($p=0,021$ и $p=0,017$). В отношении rs7149586 известно, что он может влиять на экспрессию гена *NFATC4*, поскольку он участвует в формировании триплекс-формирующей последовательности [<http://pupasuite.bioinfo.cipf.es>], а также влияет на сплайсинг экзонов.

Женщины с генотипом «АА» tagSNP rs11126176 гена *PPP3R1* имели более высокие значения КДР ($48,29 \pm 3,56$ мм), нежели объединённая группа с генотипами «АG» и «GG» ($46,90 \pm 3,09$ мм) ($p=0,029$), в то время как у мужчин этот полиморфный вариант ассоциирован с КСР ($p=0,039$). Отдельно у женщин аллель «5D» полиморфизма *5I/5D* определяет более низкие значения МЖП и ЗСЛЖ, ($p=0,01$, $p=0,012$). Ранее в работе W. Tang с соавторами было выявлено, что «5D» аллель связан с развитием гипертрофии миокарда в группе афроамериканцев. В настоящем исследовании аллель «5D» играет протективную роль в отношении развития гипертрофии сердца. Возможно, существуют межэтнические особенности влияния данного SNP на массу миокарда.

Вариант rs2659504 гена *PPP3CA* ассоциирован с толщиной МЖП у женщин, носители аллеля «С» имели более высокие значения МЖП: $8,61 \pm 0,94$ мм в сравнении с носителями генотипа «ТТ»: $8,12 \pm 0,83$ мм ($p=0,005$), а также более высокие значения ЗСЛЖ ($p=0,002$). В отношении tagSNP гена *PPP3CA* rs6819482 показано, что носители аллеля «G» в выборке мужчин имеют более низкие значения ФВ: $59,57 \pm 3,72\%$ в сравнении с носителями генотипа «АА» $61,83 \pm 3,51\%$ ($p=0,045$). У женщин аллель «G» rs6819482 ассоциирован с более низкими значениями других параметров – ЗСЛЖ ($p=0,034$) и КДР ($p=0,034$), КСР ($p=0,038$). Также в подгруппе женщин rs2132696 ассоциирован с такими параметрами как ЗСЛЖ, КДР и КСР. Полиморфные варианты rs2132696 и rs6819482, вероятно, сцеплены с функционально значимым полиморфизмом в самом гене или имеют регуляторное значение, поскольку расположены межгенной области.

Анализ ассоциаций полиморфных вариантов генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, *NFATC4* и *GATA4* с ЭхоКГ параметрами у больных ИБС

Анализ ЭхоКГ параметров левого желудочка был проведён исключительно в подгруппе мужчин, по причине малочисленности выборки женщин. Ассоциации аллельных вариантов генов СПК с ЭхоКГ параметрами в выборке ИБС приведены в таблице 2.

Таблица 2

Значения ЭхоКГ параметров массы миокарда и систолической функции ЛЖ у больных ИБС в зависимости от генотипа по исследуемым полиморфным вариантам генов СПК

<i>NFATC4</i>						
ТТ и СТ vs СС rs7149586		ТТ и СТ		СС	F	p
	N	68		46		
	ИММЛЖ	159,50±41,43		139,52±32,70	7,525	0,007
	N	72		47		
	ММЛЖ	311,68±82,09		277,26±74,27	5,383	0,022
<i>GATA4</i>						
СС и СТ vs ТТ rs17153747		СС и СТ		ТТ	F	p
	N	58		76		
	ФВ	52,87±12,06		48,36±13,53	4,013	0,047
GG и AG vs AA rs2898293		GG и AG		AA	F	p
	N	148		10		
	КДР	55,18 ± 8,83		61,30 ± 5,76	4,645	0,033
GG и GT vs ТТ rs804271		GG и GT		ТТ	F	p
	N	96		28		
	КСО	85,55±48,89		107,93±59,16	4,12	0,045
	N	120		37		
	КСР*	40,85±10,51		45,10±11,76		0,041
<i>PPP3R1</i>						
GG и AG vs AA rs11126176		GG и AG		AA	F	p
	N	105		35		
	КДР	56,57±8,68		52,60±7,88	5,744	0,018
rs11692815		GG	AA	AG	F	p
	N	46	35	61		
	КДР	57,57±8,89	51,61±7,48	56,46±8,67	5,433	0,005
AA и AG vs GG rs11692815		AA и AG		GG	F	p
	N	76		33		
	КСО	83,52±43,72		107,74±63,74	5,28	0,024
СС и СТ vs ТТ rs12468533		СС и СТ		ТТ	F	p
	N	75		68		
	КДР	57,24±8,45		53,95±8,76	5,231	0,024

<i>PPP3CA</i>					
GG и AG vs AA rs6819482		GG и AG	AA	F	p
	N	39	85		
	ММЛЖ	279,05±78,92	311,05±78,16	4,455	0,037
	N	36	82		
AA и AG vs GG rs2132696		AA и AG	GG	F	p
	N	39	98		
	ММЛЖ	275,98±77,29	313,05±79,80	6,126	0,015
	N	36	94		
	ИММЛЖ	140,02±36,73	157,69±37,69	5,583	0,02
	ИММЛЖ	138,91±35,89	158,20±38,85	6,681	0,011

Примечание. Данные представлены как среднее значение±стандартное отклонение, N – численности генотипов, ФВ – фракция выброса, КСО – конечный систолический объём, КДР – конечный диастолический размер КСР – конечный систолический размер, ММЛЖ – масса миокарда левого желудочка, ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка, F – критерий Фишера, p – уровень значимости для однофакторного дисперсионного анализа, * использован критерий Манна-Уитни

Также как и в контрольной группе, в группе больных с ИБС и перенесенным инфарктом миокарда влияние на межиндивидуальную вариабельность ЭхоКГ параметров оказал полиморфизм rs7149586 гена *NFATC4*. Носители аллеля «Т» имели более высокие значения ИММЛЖ: 159,50±41,43 г/м², в сравнении с носителями генотипа «СС»: 139,52±32,70 г/м² (p=0,007), а также ММЛЖ (p=0,022), ЗСЛЖ (p=0,03). В гене *NFATC4* получена также ассоциация rs1955915 с величиной МЖП: носители аллеля «А» имели более высокие значения этого параметра (p=0,044). О. Poirier с соавторами отмечали для rs2229309 (*A160G*), что аллель “А” связан с риском развития дилатационной кардиомиопатии [Poirier O. et al. 2003]. Однако в настоящем исследовании полиморфизм rs2229309 не вносил вклад в вариабельность ЭхоКГ параметров.

Полиморфный вариант rs17153747 гена *GATA4* ассоциирован с ФВ (p=0,047) (табл.2). Носительство аллеля «G» rs804271 связано с меньшими значениями параметров КСО (p=0,045), КСР (p=0,041), но с большими значениями МЖП (p=0,045), ЗСЛЖ (p=0,038). Вариант rs2898293 гена *GATA4* ассоциирован с величиной МЖП (p=0,05), КДР; носители аллеля «G» имели меньшие значения КДР (p=0,033). Необходимо отметить, что по литературным данным есть сведения о роли генетического полиморфизма в гене *GATA4* в развитии инфаркта миокарда и артериальной гипертензии [Bakhit D.M. et al., 2010].

Изучение ассоциации вариантов гена *PPP3R1* и его 5' фланкирующего региона с ЭхоКГ параметрами в группе больных ИБС показало, что они не

вливают на толщину стенок ЛЖ и массу миокарда ЛЖ, однако ассоциированы с систолической функцией ЛЖ. Носители аллеля «G» tagSNP rs11126176 имели большие значения КДР, в сравнении с носителями альтернативного аллеля ($p=0,018$). Вариант rs11692815 ассоциирован с величиной КСО ($p=0,024$) и КДР ($p=0,005$). Носительство аллеля «A» полиморфизма rs11692815 связано с меньшими значениями КСО в сравнении с носительством альтернативного аллеля «G»(табл.2). Показано, что rs12468533 ассоциирован с величиной КДР. Носители аллеля «C» имели более высокие значения этого параметра ($p=0,024$). W. Tang с соавторами указывают, что полиморфизм *5I/5D* ассоциирован с фракцией укорочения левого желудочка. Этот показатель является одним из главных в оценке систолической (сократительной) функции левого желудочка. В настоящем исследовании, несмотря на то, что полиморфизм *5I/5D* оказался сцепленным с полиморфизмом rs11692815, $D'=1$, *5I/5D* не влиял на ЭхоКГ параметры.

Полиморфные варианты 5' фланкирующего региона гена *PPP3CA*, в настоящей работе ассоциированы с показателями массы миокарда. Носительство аллеля «G» rs6819482 связано с меньшими значениями ММЛЖ ($p=0,037$) и ИММЛЖ ($p=0,020$) в сравнении с носительством альтернативного аллеля «A». Rs213696 также влиял на ММЛЖ ($p=0,015$) и ИММЛЖ ($p=0,011$). Носительство аллеля «A» связано с меньшими значениями этих параметров в сравнении с носительством альтернативного аллеля «G».

Изучение ассоциации полиморфных вариантов генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, *NFATC4* и *GATA4* с развитием значительной постинфарктной дилатации и дезадаптивного ремоделирования

Для анализа ассоциаций полиморфизма генов СПК с формированием постинфарктной дилатации ЛЖ общая группа пациентов с ИБС была разделена на основании величины конечно-диастолического индекса КДИ (КДИ, КДО/Площадь тела) на подгруппы со «значительной дилатацией» (Дил+) и «без значительной дилатации» ЛЖ (Дил-). Критерием значительной дилатации считают увеличение КДИ ≥ 85 мл/м² [Brzezińska V. et al., 2007]. Статистически значимые различия по частотам аллелей и генотипов получены только для rs17153747, локализованного в интроне гена *GATA4*.

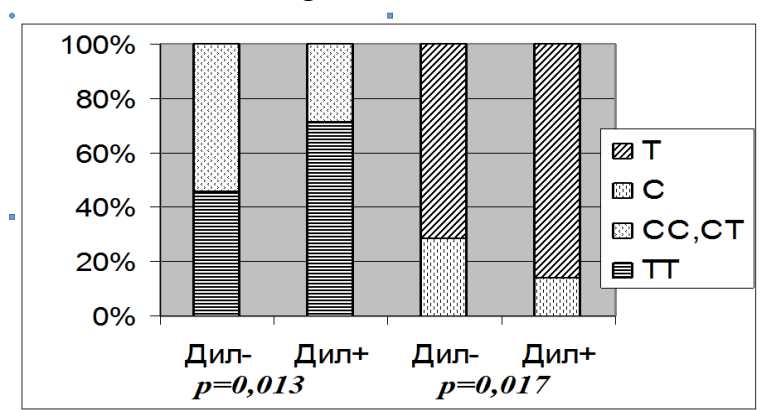


Рис. 1. Различия по частотам аллелей и генотипов rs17153747 гена *GATA4* у пациентов ИБС (мужчины) с КДИ < 85 мл/м² (Дил-) и КДИ > 85 мл/м² (Дил+).

Частота аллеля «Т» в 1,2 раза выше в подгруппе со значительной дилатацией (86% против 71%, $OR_T=2,43$; 95% ДИ 1,22-4,85; $p=0,017$). В связи с малочисленностью гомозигот «СС» их объединяли с гетерозиготами «СТ», при этом различия оставались статистически значимыми. Генотип «ТТ» чаще в 1,5 раза встречался в подгруппе со значительной дилатацией, (71% против 46%, $OR_{TT}=2,96$; 95% ДИ 1,33-6,62; $p=0,013$) по сравнению с группой контроля.

Для изучения влияния полиморфных вариантов генов СПК на стадию ремоделирования, в группе больных ИБС (мужчины) были выделены подгруппы с дезадаптивным, бессимптомным и адаптивным ремоделированием. Аллель «Т» tagSNP гена *GATA4* rs804271 встречался в 1,6 раз чаще у пациентов с дезадаптивным ремоделированием в сравнении с группой пациентов с бессимптомным и адаптивным ремоделированием (65,9% против 40,8%, $p=0,008$, $OR_T=2,8$; 95% ДИ 1,36-5,77). В связи с малочисленностью носителей гомозиготного генотипа «GG» в подгруппе индивидов с дезадаптивным ремоделированием, их объединяли с гетерозиготами «GT», при этом различия оставались статистически значимыми: генотип «ТТ» в 2,7 раза чаще встречался (45,5% против 16,7%, $p=0,016$) у пациентов с дезадаптивным ремоделированием в сравнении с группой пациентов с бессимптомным и адаптивным ремоделированием ($OR_{TT}=4,17$; 95% ДИ 1,42- 12,26).

На рис. 2. представлены частоты аллелей и генотипов rs804271 в сравниваемых группах.

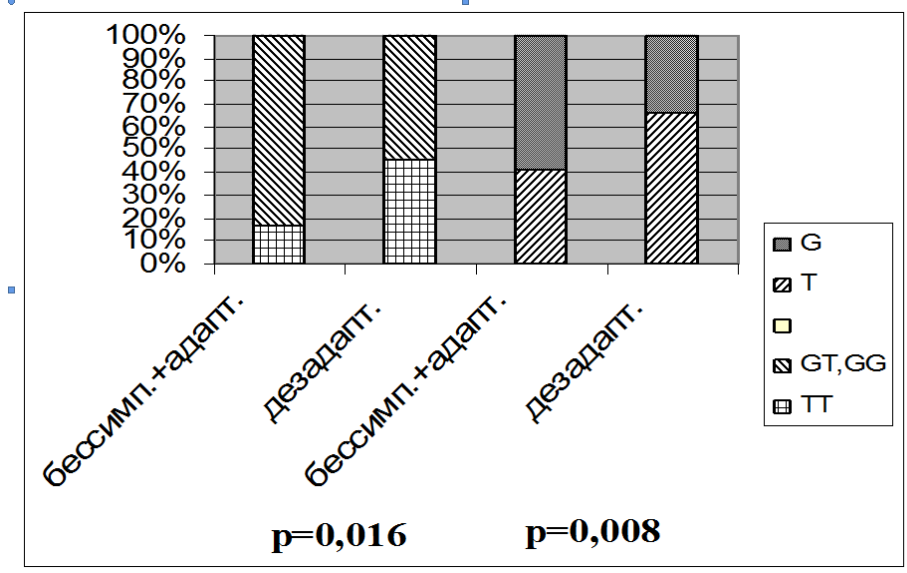


Рис. 2. Различие по частотам аллелей и генотипов у пациентов ИБС (мужчины) в группах с бессимптомным и адаптивным ремоделированием и дезадаптивным ремоделированием по tagSNP гена *GATA4* rs804271.

Анализ уровня экспрессии генов сигнального пути кальцинеурина в миокарде в связи с ишемическим ремоделированием миокарда

В выборке больных с выраженной постинфарктной дилатацией левого желудочка, уровень экспрессии всех изученных генов, кодирующих компоненты СПК, был несколько ниже, чем у больных ИБС, без ремоделирования левого желудочка (таблица 3).

Таблица 3

Уровень мРНК в миокарде больных с ремоделированием и без ремоделирования сердца

Ген	Уровень экспрессии в миокарде		<i>p</i>	Кратность различия в уровне экспрессии
	Группа больных (Хирургическое восстановление формы ЛЖ), n=21	Контроль (АКШ), n=34		
<i>GATA4</i>	1,31±0,59	1,61±0,76	0,200	1,22
<i>NFATC4</i>	1,24±0,69	1,49±0,90	0,194	1,21
<i>PPP3CA</i>	1,77±0,80	2,37±0,95	0,018	1,34
<i>PPP3CB</i>	2,22±2,02	3,48±2,05	0,023	1,57
<i>PPP3R1</i>	1,39±0,49	1,61±0,71	0,239	1,16

Примечание. Данные представлены: средние значения±стандартное отклонение, *p* – уровень значимости.

Значимые различия между группами, тем не менее, были зафиксированы только для двух генов из пяти: *PPP3CA* и *PPP3CB*. Уровень экспрессии гена *PPP3CA* был в 1,34 раза ниже ($p=0,018$), а *PPP3CB* в 1,57 раза ниже ($p=0,023$) в группе с дилатацией по сравнению с группой контроля (пациенты без выраженной дилатации ЛЖ).

Полученные результаты согласуются с результатами нескольких экспериментальных работ:

- при изучении генетической модели дилатационной кардиомиопатии у мыши показано, что кальцинеурин играет цитопротекторную роль в миокарде и более высокий уровень экспрессии связан с улучшением функции сердца и уменьшением выраженности процессов ремоделирования [Heineke J. et al., 2010];

- для мышей, несущих делецию кальцинеурина $A\beta$, зафиксированы значительная потеря жизнеспособного миокарда, повышенная клеточная гибель и ухудшение функции сердца по сравнению с мышами дикого типа в исследовании с экспериментальной ишемией-реперфузией [Bueno O.F. et al., 2004];

- изучение генетической экспрессии в миокарде больных, которым проводили имплантацию устройства, поддерживающего работу ЛЖ (LVAD - Left ventricular assist device) показало, что при восстановлении функции сердца происходит увеличение уровня экспрессии гена каталитической субъединицы кальцинеурина *PPP3CA* [Hall J.L. et al., 2007].

Однако существуют данные, свидетельствующие о том, что в патологических условия уровень экспрессии данных генов может, напротив, возрастиать [Zhao Y. et al., 2010; Ojaimi C. et al., 2007; Lim H.W. et al., 1999].

В настоящем исследовании уровень экспрессии гена ингибиторной субъединицы кальцинеурина В *PPP3R1* и генов транскрипционных факторов *GATA4* и *NFATC4* в ушке правого предсердия сердца статистически значимо не различался в группах с аневризмой и с нормальной формой левого желудочка. Однако в нескольких исследованиях *in vitro* и на модельных животных было показано, что экспрессия генов транскрипционных факторов *GATA4* и *NFATC4* изменяется при разных типах ремоделирования сердца – при гипертрофии, ишемии миокарда, а также при сердечной недостаточности [Simkhovich B.Z. et al., 2003; Gao Z. et al., 2006; Xia Y. et al., 2000; Bian J. et al., 2007; Oka T. et al., 2006; Zwadlo C. et al., 2005; Hall J.L., 2004; Lachtermacher S. et al., 2010; Wittchen F. et al., 2007]. Предпосылкой к изучению правого предсердия в настоящем исследовании послужило предположение о том, что экспрессия генов в миокарде ушка правого предсердия может отражать состояние левого желудочка. Исследования, основанные на оценке гистоморфометрических показателей миокарда, показали наличие статистически значимых связей между морфометрическими параметрами в левом желудочке и ушке правого предсердия [Казаков В.А. с соавт., 2009]. Наиболее весомым аргументом для изучения именно этого отдела сердца является то, что ушко правого предсердия, является наиболее доступной областью для дооперационного исследования степени повреждения миокарда [Казаков В.А. с соавт., 2009].

Изучение ассоциации полиморфных вариантов генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *GATA4*, *NFATC4* и *PPP3R1* с уровнем их экспрессии у больных ИБС

Функциональные полиморфные варианты генов, которые изменяют экспрессию гена и процессинг мРНК, вероятно, играют решающую роль в формировании вариабельности фенотипа у человека [Johnson A. D. et al., 2004]. Полиморфные варианты, оказывающие регуляторное влияние на экспрессию генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *GATA4*, *NFATC4*, *PPP3R1*, показаны на рисунке 3.

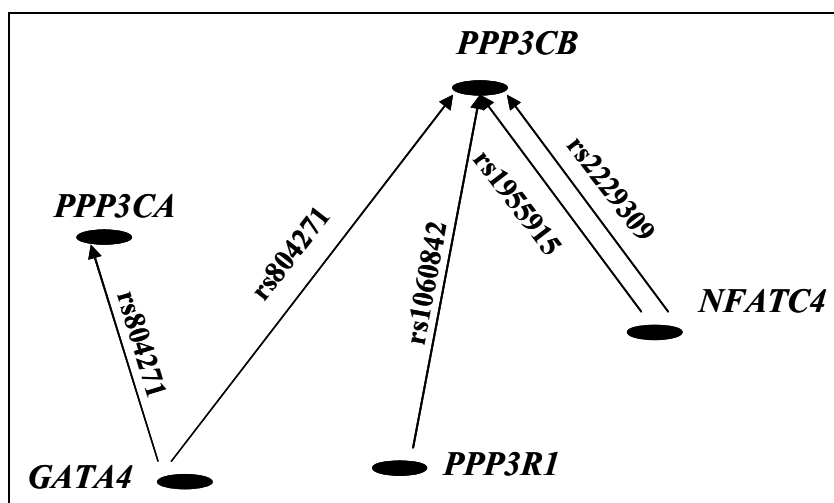


Рис. 3. Схема ассоциаций полиморфных вариантов генов *PPP3CA*, *PPP3CB*, *GATA4*, *NFATC4* и *PPP3R1* с уровнем их экспрессии.

В результате данного исследования было показано, что уровень экспрессии субъединиц кальцинеурина *PPP3CA* и *PPP3CB* зависит от полиморфных вариантов, находящихся не в самих генах *PPP3CA* и *PPP3CB*, а в генах транскрипционного фактора *NFATC4*, фланкирующих регионах генов *GATA4* и *PPP3R1*. Статистически значимые различия в уровне экспрессии генов СПК в зависимости от генотипа получены для полиморфных вариантов гена *NFATC4* (rs2229309, rs1955915), tagSNP гена *GATA4* (rs804271) и tagSNP гена *PPP3R1* (rs1060842).

Таким образом, полиморфные варианты генов СПК ассоциированы с уровнем экспрессии только генов, для которых показано изменение экспрессии при исследовании выраженной постинфарктной дилатации сердца, т. е. для генов, кодирующих каталитическую субъединицу кальцинеурина *PPP3CA* и *PPP3CB*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постинфарктное ремоделирование миокарда – это сложный процесс, в который вовлекается множество сигнальных путей и белков-эффекторов. Особенностью настоящей работы было исследование генов, которые представляют собой единый сигнальный путь. С другой стороны, новизна подхода заключается в том, что изучена роль сигнального пути, который был изучен преимущественно в экспериментальных исследованиях на животных и экспериментах *in vitro*. Использован обоснованный подход к выбору генетического полиморфизма для анализа с учетом всех накопленных данных (полиморфных вариантов с предсказанной функциональной значимостью и tagging-SNP). Другой отличительной чертой исследования являлось изучение, как структурной вариабельности генов, так и изучение особенностей их функционирования.

Можно сделать следующие основные заключения.

Полиморфные варианты генов сигнального пути кальцинеурина влияют на вариабельность ЭхоКГ параметров и параметры АД в группе здоровых индивидов. С толщиной стенок ЛЖ ассоциированы rs7149586 гена *NFATC4* у мужчин, rs6601604 гена *GATA4* и tagSNP гена *GATA4* rs804271, 5I/5D гена *PPP3R1*, и rs2659504 гена *PPP3CA*, tagSNP гена *PPP3CA* rs6819482 и rs2132696 у женщин. С массой миокарда ассоциированы rs7149586 гена *NFATC4* у мужчин, у женщин – tagSNP гена транскрипционного фактора *GATA4* rs804271. С систолической функцией ЛЖ ассоциированы tagSNP гена *PPP3R1* rs11126176, tagSNP гена *PPP3CA* rs6819482 как у мужчин, так и у женщин, а также вариант в зоне связывания с регуляторными факторами rs2898293 и rs2132696 tagSNP гена *PPP3CA* у женщин.

В подгруппе мужчин с показателями АД ассоциирован вариант в интроне гена *NFATC4* rs1955915; в подгруппе женщин – полиморфные варианты гена *NFATC4* rs1955915 (интрон), rs7149586 (несинонимичная замена); *GATA4* rs804271 (tagSNP); *PPP3R1* полиморфизм 5I/5D (инсерция/делеция пяти пар оснований) и tagSNP гена *PPP3R1* rs17034884, rs11126176 .

У мужчин в ишемическое ремоделирование вовлекаются полиморфные варианты в гене *GATA4*. В сравнении с контрольной группой увеличен спектр вариантов, ассоциированных с массой миокарда и систолической функцией миокарда.

Установлено, что более тяжелая стадия ремоделирования миокарда характеризуется сниженной экспрессией генов каталитической субъединицы кальцинеурина *PPP3CA* и *PPP3CB* в миокарде ушка правого предсердия.

Из 27 только 4 изученных полиморфных варианта ассоциированы с уровнем экспрессии генов СПК. С понижением уровня экспрессии гена *PPP3CB* ассоциированы аллель «С» rs2229309 гена *NFATC4*, аллель «G» полиморфизма rs1955915 гена *NFATC4*, аллель «Т» tagSNP гена *PPP3R1* rs1060842. С повышением уровня экспрессии гена *PPP3CB* аллель «Т» tagSNP гена *GATA4* rs804271. С повышением уровня экспрессии гена *PPP3CA* ассоциирован аллель «Т» tagSNP гена *GATA4* rs804271.

ВЫВОДЫ

1. Для большинства изученных полиморфных вариантов (более 75%) генов сигнального пути кальцинеурина *PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3R1*, *NFATC4* и *GATA4* и их фланкирующих регионов, отличия в частотах аллелей между контрольной группой и европеоидной популяцией, представленной в базе данных проекта HarMap, составили не более 10%. Статистически значимые различия зафиксированы в отношении следующих полиморфных вариантов: rs1955915, rs10096189, rs11250164, rs17153747, rs11692815, rs7696663, rs6819482 и rs2659504.

2. Вариабельность показателей артериального давления крови в группе здоровых индивидов зависела от вариантов с предполагаемой функциональной значимостью и tagSNP (однонуклеотидных полиморфных меток) генов *NFATC4*, *PPP3R1* и *GATA4*. В подгруппе мужчин с показателями АД ассоциирован вариант в интроне гена *NFATC4* rs1955915; в подгруппе женщин – полиморфные варианты гена *NFATC4* rs1955915 (интрон), rs7149586 (несинонимичная замена); *GATA4* rs804271 (tagSNP); *PPP3R1* полиморфизм 5I/5D (инсерция/делеция пяти пар оснований) и tagSNP гена *PPP3R1* rs17034884, rs11126176.

3. У здоровых индивидов с нормальными эхокардиографическими параметрами величина массы миокарда левого желудочка связана с вариантом в гене *NFATC4* rs7149586 у мужчин, и tagSNP гена *GATA4* rs804271 у женщин; с параметрами, определяющими систолическую функцию левого желудочка, у мужчин ассоциированы tagSNP *PPP3R1* rs11126176 и tagSNP *PPP3CA* rs6819482; у женщин – полиморфный вариант rs2898293 во фланкирующем регионе гена *GATA4* (в зоне связывания с регуляторными факторами); tagSNP гена *PPP3R1* rs11126176; tagSNP гена *PPP3CA* rs6819482 и rs2132696.

4. У мужчин больных ИБС с массой миокарда левого желудочка ассоциированы полиморфные варианты гена *NFATC4* rs7149586 и tagSNP гена *PPP3CA* rs6819482 и rs2132696. С параметрами, определяющими

систолическую функцию левого желудочка, ассоциированы tagSNP гена *GATA4*: rs804271, rs17153747 и вариант в зоне связывания с регуляторными факторами rs2898293; несинонимичная замена в гене *PPP3R1* rs11692815 и tagSNP гена *PPP3R1*: rs11126176, и rs12468533.

5. С развитием дезадаптивного ремоделирования и значительной дилатации левого желудочка у больных ИБС ассоциированы однонуклеотидные полиморфные метки (tagSNP) гена транскрипционного фактора *GATA4*, в частности, с дезадаптивным ремоделированием: генотип «*TT*» и аллель «*T*» полиморфного варианта rs804271 ($p=0,016$ и $p=0,008$, соответственно; $OR_T=2,8$; 95% ДИ 1,36-5,77; $OR_{TT}=4,17$; 95%ДИ 1,42-12,26); с развитием значительной дилатации: генотип «*TT*» и аллель «*T*» полиморфного варианта rs17153747 ($p=0,033$ и $p=0,017$, соответственно; $OR_{TT}=2,96$; 95% ДИ 1,33- 6,62; $OR_T=2,43$; 95% ДИ 1,22- 4,85).

6. Установлено, что сниженный уровень экспрессии генов *PPP3CA* и *PPP3CB* в миокарде ушка правого предсердия, является маркером формирования дилатации (аневризмы) левого желудочка. Уровень экспрессии гена *PPP3CA* в 1,34 раза ниже ($p=0,019$), а *PPP3CB* в 1,57 раза ниже ($p=0,024$) в группе с выраженным ремоделированием сердца по сравнению с группой больных без дилатации камер сердца.

7. Уровень экспрессии генов *PPP3CB* и *PPP3CA* ассоциирован с вариантами генов сигнального пути кальцинеурина, таких как *NFATC4* (rs2229309, rs1955915), гена *GATA4* (rs804271) и гена *PPP3R1* (rs1060842).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Иванова О.Г.**, Макеева О.А., Лежнев А.А., Цимбалюк И.В., Шипулин В.В., Пузырев В.П. Связь полиморфизма гена транскрипционного фактора *GATA4* с эхокардиографическими параметрами в популяции и у больных с ишемической болезнью сердца // Якутский мед. журнал. – 2009. – №2.– С. 102 – 104.

2. Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., Маркова В.В., **Половкова О.Г.** и др. Изменчивость полиморфных вариантов генов-кандидатов заболеваний сердечно-сосудистой системы у представителей четырех этнических групп сибирского региона // Медицинская генетика. – 2010.– №5. С.– 24 – 34.

3. **Иванова О.Г.**, Пузырев К.В., Цимбалюк И.В. и др. Изучение взаимосвязи полиморфных вариантов генов сигнального пути кальцинеурина *NFATC4* и *PPP3R1* с гипертрофией миокарда // Генетика человека и патология: Сб. науч. трудов / Под ред. В. П. Пузырева. – Вып. 8. – Томск: Печатная мануфактура, 2007.– С.79 – 82.

4. **Половкова О.Г.**, Шипулин В.М., Жейкова Т.В., Лежнев А.А., Пузырев К.В., Цимбалюк И.В., Макеева О.А. Анализ вариабельности эхокардиографических параметров в норме и патологии: связь с полиморфизмом генов сигнального пути кальцинеурина / Матер. VI Съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов-на-Дону. – 2010. – С. 143.

5. **Иванова О. Г.**, Лежнев А.А., Дьякова М. Л., Бычкова О.Ю., Цимбалюк И.В., Пузырев К.В., Макеева О.А., Шипулин В.М. Полиморфные варианты гена транскрипционного фактора *GATA4* в формировании ремоделирования сердца у больных сердечно-сосудистой патологией // Матер. V Съезда ВОГиС. – Москва. – 2009. – С. 424.

6. **Половкова О.Г.**, Макеева О.А., Гончарова И.А., Лежнев А.А., Шипулин В.М. Роль генов сигнального пути кальцинеурина в развитии ремоделирования сердца у больных ИБС // Матер. II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии”. – Курск. – 2011. – С.88 – 89.

7. **Половкова О.Г.**, Макеева О.А., Гончарова И.А., Кулиш Е. В., Лежнев А.А., Шипулин В.М. Уровень экспрессии генов сигнального пути кальцинеурина в образцах миокарда больных с ИБС // Генетика человека и патология: Сб. научных трудов. / Под ред. В. П. Пузырева. – Вып. 9. – Томск: Печатная мануфактура, 2011. – С. 194 – 199.

8. **Иванова О.Г.**, Макеева О.А., Цимбалюк И.В. Изучение взаимосвязи полиморфных вариантов генов сигнального пути кальцинеурина *NFATC4* и *GATA4* с параметрами сердца у здоровых жителей г. Томска // Сборник статей “Науки о человеке”: материалы VIII конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск. – 2007. С. 132 – 133.

9. **Иванова О.Г.**, Лежнёв А.А., Дьякова М. Л., Цимбалюк И. В., Макеева О.А., Шипулин В. М. Полиморфные варианты генов нейрогуморальных факторов сердечно-сосудистой системы в формировании ишемической кардиомиопатии и ишемической болезни сердца // Сборник статей “Науки о человеке”: материалы IX конгресса молодых ученых и специалистов. – Томск. – 2008. С. 57– 58.

10. Makeeva O.A., **Polovkova O.G.**, Shipulin V.M., Lezhnev A.A., Zheykova T.V., Kulish E.V., Puzyrev K.V., Tsimbal'uk I.V., Puzyrev V.P. Calcineurin pathway genes polymorphisms and their relation to cardiac parameters variability in normal population and patients with cardiovascular diseases // Clin. Chem. Lab. Med. – 2010. – V. 48 (8). – A55.

11. Makeeva O.A., Shipulin V.M., **Polovkova O.G.**, Lezhnev A.A., Zheykova T.V., Kulish E.V., Puzyrev K.V., Goncharova I.A., Tsimbal'uk I.V., Puzyrev V.P. The role of calcineurin pathway genes polymorphisms in cardiac parameters variability in normal subjects and patients with cardiovascular diseases // 60th Annual Meeting of the Am. Society of Hum. Genet. – 2010. URL: <http://abstracts.ashg.org> (дата обращения 20.01.2012).

12. **Ivanova O.G.**, Makeeva O.A., Lezhnev A.A., Tsimbal'uk I.V., D'jakova M.L., Puzyrev K.V., Kazakov V.A., Shipulin V.M., Puzyrev V.P. The study of *GATA4* gene tagging SNP in patients with arterial hypertension and ischemic heart disease // European Journal of Human Genetics. – 2009. – V. 17. – Suppl. 2. – P.386.

13. Makeeva O.A., **Ivanova O.G.**, Puzyrev K.V., Tsimbal'uk I.V., Bychikova O.U., Lezhnev A.A., Kazakov V.A., Shipulin V.M., Puzyrev V.P. The role of

calcineurin pathway genes polymorphisms in cardiac remodeling of different origin // European Heart Journal. – 2008. – V. 29 (17). – Suppl. 1. – P. 113-114.

14. **Ivanova O.G.**, Makeeva O.A., Tsimbal'uk I. V., Puzyrev K.V., Byichkova O.Y., Lezhnev A.A., Kazakov V. A., Shipulin V.M., Puzyrev V. P. *PPP3R1* and *NFATC4* polymorphisms are not influence on cardiac parameters in healthy individuals and related to cardiac remodeling in patients with cardiovascular disease // European Journal of Human Genetics. – 2008. – V. 16. – Suppl. 2. – P. 297.

15. Makeeva O.A., **Ivanova O.G.**, Lezhnev A.A., Zheykova T.V., Tsimbal'uk I.V., Puzirev K.V., Shipulin V.M., Puzyrev V.P. The Role of Calcineurin Pathway Genes Polymorphisms in Cardiac Remodeling // The 11th International Meeting on Human Genome Variation and Complex Genome Analysis (HGV 2009). – Tallinn. – 2009. – P. 82.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GATA4 – ген GATA - связывающего белка 4

NFATC 4 – ген ядерного фактора активированных Т-клеток

PPP3CA – ген протеинфосфатазы 3, каталитическая субъединица, альфа-изоформа

PPP3CB – ген протеинфосфатазы 3, каталитическая субъединица, бета-изоформа

PPP3R1 – ген протеинфосфатазы 3, регуляторная субъединица В, альфа,

LVAD – устройство, поддерживающее работу левого желудочка

SNP – однонуклеотидная замена

tagging-SNP – однонуклеотидные полиморфные метки

АКШ – аортокоронарное шунтирование

ДАД – диастолическое артериальное давление

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка

КДР – конечный диастолический размер

КДО – конечно-диастолический объем

КДИ – конечно- диастолический индекс

КСР – конечный систолический размер

КСО – конечно-систолический объём

ЛЖ – левый желудочек

ММЛЖ – масса миокарда левого желудочка

МЖП – межжелудочковая перегородка

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РХВ – равновесие Харди-Вайнберга

САД – систолическое артериальное давление

СПК – сигнальный путь кальцинеурина

ФВ – фракция выброса

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭхоКГ – эхокардиография