

Из них маркируют повышенный риск развития ИМ 6 сочетаний: *ACE*\**I*/\**D* – *APOB*\**X*+/\**X*- (OR=3.14, CIOR=1.28-7.71); *ACE*\**I*/\**D* – *NOS3*\**4B*/\**4A* (OR=2.94, CIOR=1.05-8.22); *APOB*\**X*+/\**X*- – *AT1R*\**A*/\**C* (OR=6.38, CIOR=1.33-30.69); *APOB*\**X*+/\**X*+ – *NOS3*\**4B*/\**4B* (OR=3.82, CIOR=0.99-14.74); *AT1R*\**A*/\**C* – *NOS3*\**4B*/\**4B* (OR=2.56, CIOR=1.14-5.72); *NOS3*\**4B*/\**4A* – *PON1*\**Q*/\**Q* (OR=3.82, CIOR=0.99-14.74).

Различные сочетания генотипов полиморфных вариантов генов могут иметь различные комбинации. В зависимости от различных вариантов сочетаний генотипов и степени их относительного риска, надо полагать, будет различным проявление заболевания или клинического фенотипа.

### Выводы

Таким образом, установлено, что с развитием инфаркта миокарда в популяции якутов ассоциированы полиморфные маркеры генов *APOE*, *APOB*, *NOS3*, *ACE*, *AT1R*. Относительный риск заболевания повышен у носителей ге-

нотипов *APOB*\**X*+/\**X*+, *APOB*\**X*+/\**X*, *AT1R*\**A*/\**C* и понижен у носителей генотипов *APOB*\**X*-/\**X*-, *APOE*\**3*/\**3*, *NOS3*\**4B*/\**4B*. Обнаружено, что полиморфные маркеры генов *NOS3*, *ACE* повышают риск развития инфаркта миокарда в возрасте до 50 лет.

### Литература

1. Large scale association analysis for identification of genes underlying premature coronary heart disease: cumulative perspective from analysis of 111 candidate genes / J. J. McCarthy [et al.] // J. Med. Genet. – 2004. – V. 41. – P. 334-341.
2. Полиморфизм гена аполипопротеина Е и риск развития инфаркта миокарда / О. Е. Мустафина [и др.] // Молекулярная биология. – 2002. – Т. 36. – №6. – С. 1-7.
3. Шахтштейн Е. В. Связь полиморфизма гена аполипопротеина Е с факторами риска хронических неинфекционных заболеваний в популяциях г. Новосибирска и коренных жителей Горной Шории: автореф. дис. ... к-та мед. наук: 14.00.05, 03.00.15 / Е. В. Шахтштейн; ГУ НИИ терапии СО РАМН. – Новосибирск. – 2004. – 23 с.
4. Янченко О. В. Особенности распространенности и связи с инфарктом миокарда факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний у мужчин коренной национальности Республики Хакасия: автореф. дис. ... к-та мед. наук: 14.00.06 / О. В. Янченко; ГУ НИИ терапии СО РАМН. – Новосибирск, 2005. – 18 с.

5. *ACE* and *AT1R* gene polymorphisms and hypertension in Indian population / T. F. Ashavaid [et al.] // J. Clin. Lab. Anal. – 2000. – V. 14. – P. 230-237.

6. Association of apolipoprotein genetic polymorphisms with plasma cholesterol in a Japanese rural population / M. Zaman [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 1997. – V. 17. – P. 3495-3504.

7. Аульченко Ю. С. Методологические подходы и стратегии картирования генов, контролирующих комплексные признаки человека / Ю. С. Аульченко, Т. И. Аксенович // Вестник ВОГиС. – 2006. – Том 10. – №1. – С. 189-202.

8. Mapping genes through the use of linkage disequilibrium generated by genetic drift: 'drift mapping' in small populations with no demographic expansion / Terwilliger J. D. [et al.] // Hum. Hered. – 1998. – V. 48. – № 3. – P. 138-154.

9. Анализ линий митохондриальной ДНК в популяции якутов / С. А. Федорова [и др.] // Молекулярная биология. – 2003. – Т. 37. – С. 643-653.

10. Diversity of mtDNA and Y-chromosome lineages in populations of Republic Sakha (Yakutia) / S. A. Fedorova [et al.] // HGM. Kyoto. – 2005. – P. 59.

11. Purification of human genomic DNA from whole blood using proteinase K treatment followed by phenol-chloroform extraction / M. Johns [et al.] // Anal. Biochem. – 1989. – V. 180. – P. 276-278.

12. Roff P. The STATistical analysis of DNA polymorphisms chi 2 and problem of small samples / P. Roff, P. Bentzen // Mol. Biol. Evol. – 1989. – V. 6. – P. 539-545.

13. Bland J. M. The odds ratio / J. M. Bland, D. G. Altman // BMJ. – 2000. – V. 320. – P. 1468.

О.Г. Иванова, О.А.Макеева, А.А. Лежнев, И.В. Цимбалюк, В.В. Шипулин, В. П. Пузырев

## СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *GATA4* С ЭХОКАРДИОГРАФИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ В ПОПУЛЯЦИИ И У БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

УДК 575.191:616.12-008.46

В работе изучены полиморфные варианты гена транскрипционного фактора *GATA4*, контролирующего экспрессию генов миокарда на разных этапах биологического развития, а также при патологических состояниях. Генотипы по однонуклеотидным полиморфным меткам (tagging SNP) гена *GATA4* *rs804271*, *rs8191515* и *rs2898293* были определены в контрольной выборке лиц с нормальными эхокардиографическими показателями (N=280) и у больных с ишемической болезнью сердца (N=130). Выявлена ассоциация генотипа GG полиморфизма *rs804271* с более высокими значениями индекса массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) у женщин в контрольной выборке: 96,0±12,7 г/м<sup>2</sup> у носительниц генотипа TT против 90,3±12,2 г/м<sup>2</sup> и 90,4±12,1 г/м<sup>2</sup> с генотипами GG и GT, соответственно (p=0,037). Полиморфный вариант *rs2898293* ассоциирован с величиной фракции выброса у больных ИБС (p=0,05).

**Ключевые слова:** ИБС, генетический полиморфизм, кальцинеурин.

Polymorphisms of *GATA4* gene, encoding cardiac specific transcription factor, influencing genetic expression in the heart at the different stages of biological development, as well as at the pathological conditions have been studied. Genotypes on *GATA4* tagging SNPs *rs804271*, *rs8191515* and *rs2898293* were identified in control group with normal echocardiographic parameters (N=280) and in patients with ischemic heart disease (n=130). Association of *rs804271* GG genotype with higher left ventricular mass index in woman of control group had been revealed: 96,0±12,7 g/m<sup>2</sup> in TT carriers versus 90,3±12,2 g/m<sup>2</sup> and 90,4±12,1 g/m<sup>2</sup> with genotypes GG and GT, accordingly (p=0,037). *rs2898293* genotypes were associated with ejection fraction in patients with ischemic heart disease (p=0,05).

**Keywords:** ischemic heart disease, polymorphism, calcineurin.

Сотрудники НИИ МГ СО РАМН (г. Томск): **ИВАНОВА Оксана Геннадьевна** – лаборант-исследователь, e-mail: o\_iwanowa@mail.ru, **МАКЕЕВА Оксана Алексеевна** – к.м.н., рук. группы, e-mail: oksana.makeeva@medgenetics.ru, **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** – акад. РАМН, проф., директор; сотрудники НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск): **ЛЕЖНЕВ Александр Александрович** – аспирант, e-mail: mdralex@cardio.tsu.ru, **ШИПУЛИН Владимир Митрофанович** – д.м.н., проф., зав. отделением, e-mail: shipulin@cardio.tsu.ru; **ЦИМБАЛЮК Игорь Владимирович** – к.м.н., ассистент ГУ ВПО «Сибирский гос. мед. ун-т», e-mail: doctor\_ivts@mail.ru.

### Введение

Ремоделирование сердца является одним из этапов сердечно-сосудистого континуума и представляет собой весь комплекс изменений, ведущих к дисфункции миокарда и развитию сердечной недостаточности [9]. В ответ на хроническую перегрузку сердца при разных заболеваниях развивается гипертрофия миокарда, прогрессирование которой приводит в конечном итоге к декомпенсации, нарушению архитектоники камер сердца и сердечной недостаточности.

Множество сигнальных путей мо-

жет вовлекаться в формирование ремоделирования миокарда. Экспериментальные исследования показывают важнейшую роль кальцинеурина в развитии гипертрофии сердца [3]. Модель участия кальцинеурина в развитии гипертрофии была предложена Molkentin с соавторами и предполагает, что активированный при длительном увеличении базальной концентрации Ca<sup>2+</sup> кальцинеурин дефосфорилирует ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT3). Это сопровождается транслокацией NFAT3 в ядро, взаимодействием с фактором транскрипции

типа цинковых пальцев *GATA4*, что приводит к активации экспрессии генов гипертрофического ответа [3].

В настоящее время существует всего несколько исследований, посвященных изучению роли генетического полиморфизма в генах сигнального пути кальцинеурина при гипертрофии сердца и дилатационной кардиомиопатии [2,7,10,12]. Ранее нами были изучены полиморфные варианты *A160G* в гене транскрипционного фактора *NFATC4*, инсерционно-делеционный полиморфизм *51/5D* в промоторе гена кальцинеурина *B*, *PPP3R1* и тринуклеотидный повтор в промоторе гена альфа изоформы каталитической субъединицы кальцинеурина *A*, *PPP3CA* у больных с эссенциальной гипертензией [2,12]. Нами также были изучены два полиморфных варианта в 4 итроне гена *GATA4*, однако не было обнаружено связи полиморфных вариантов в этом гене с наличием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ), а также эхокардиографическими (ЭхоКГ) параметрами [2].

В задачи настоящего исследования входило изучение взаимосвязи полиморфных вариантов, представляющих собой tagging SNP – однонуклеотидные полиморфные метки) в гене транскрипционного фактора *GATA4* с ЭхоКГ параметрами в выборке здоровых жителей г. Томска, а также с некоторыми клинически значимыми эхокардиографическими показателями в выборке больных ишемической болезнью сердца (ИБС).

#### Материалы и методы

В исследование включено 130 пациентов, больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда, средний возраст составил 53 года. Пациенты обследованы в НИИ кардиологии СО РАМН. Контрольная группа в размере 280 чел. в возрасте старше 30 лет (120 мужчин, 165 женщин) была сформирована путем отбора из большой популяционной выборки индивидуумов, имеющих нормальные эхокардиографические параметры, такие как толщина межжелудочковой перегородки, задней стенки левого желудочка, величина конечного диастолического размера и индекса массы миокарда левого желудочка. Пациенты контрольной группы были обследованы на базе Сибирского государственного медицинского университета. Массу миокарда левого желудочка (ММЛЖ) определяли по критериям PENN и стандартной формуле [4]. Индекс ММЛЖ (ИММЛЖ) рассчитывался как отношение ММЛЖ к площади тела пациента. Факт наличия или отсутствия ГЛЖ устанавливали на основании

ИММЛЖ  $>134$  г/м<sup>2</sup> у мужчин и  $>110$  г/м<sup>2</sup> у женщин.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенол/хлороформной экстракции, амплифицировали фрагменты гена *GATA4*, содержащие изучаемые полиморфные варианты. Праймеры для проведения ПЦР участков гена *GATA4* были подобраны при помощи программы Primer3 [11]. Синтезированный фрагмент гена *GATA4*, содержащий полиморфный вариант *rs804271* после рестрикции ферментом *Bst*MAI в случае аллеля "Т" расщеплялся на фрагменты размером 153 и 55 пар оснований (п.о.). Аллелю "G" полиморфизма *rs8191515* после рестрикции ферментом *Bst*V1 I соответствовали фрагменты длиной 111 и 60 п.о., а аллелю "А" - нерестрицированный фрагмент размером 171 п.о. Аллелю "G" полиморфизма *rs2898293* соответствовали фрагменты длиной 120 и 98 п.о. после рестрикции ферментом *Bst*C8I, аллелю "А" - 218 п.о. Фрагменты ДНК фракционировали в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка результатов включала тест на равновесие Харди-Вайнберга, определение частот аллелей и генотипов. Оценку различия частот генотипов и аллелей между разными группами осуществляли по точному тесту Фишера. Сравнение средних значений ЭхоКГ показателей в группах, выделенных в зависимости от генотипа по исследуемому полиморфизму, проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа. Зависимость показателя от возраста и индекса массы тела исследовали при помощи линейного регрессионного анализа.

#### Результаты и обсуждение

Распределение генотипов по полиморфизмам *rs804271* и *rs2898293* гена *GATA4* соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга в обеих группах. Частота редкого аллеля "G" полиморфизма *rs804271* в контрольной выборке составила 48%, частота редких аллелей полиморфизмов *rs8191515* и *rs2898293* - 10 и 32% соответственно, что совпадает с частотами, зафиксированными у европейцев по данным OMIM (42, 8,5 и 33%).

На первом этапе исследования была изучена связь полиморфных вариантов в гене *GATA4* с ИБС. Ген транскрипционного фактора *GATA4* является кандидатным в отношении ИБС: с помощью анализа сцепления было показано, что локус хромосомы 8p, включающий ген *GATA4*, вносит вклад в формирование ишемической болезни сердца [6]. Однако в нашем исследовании больные ИБС не отличались от контрольной выборки по частотам аллелей и генотипов (табл.1).

В дальнейшем был проведен анализ дисперсии ЭхоКГ параметров в зависимости от генотипа по изученным полиморфным вариантам гена *GATA4*.

В контрольной группе при сравнении средних значений индекса массы миокарда ЛЖ (ИММЛЖ) у пациентов с разными генотипами не выявлено ассоциации полиморфных вариантов *rs8191515* и *rs2898293* гена *GATA4* с ИММЛЖ. Наличие аллеля "Т" полиморфизма *rs804271*, находящегося в промоторе гена *GATA4*, было связано с более высокими значениями ИММЛЖ у женщин ( $p=0,037$ ). Кроме того, при объединении пациентов с генотипами "GG" и "GT" также была показана ассоциация аллеля "Т" с более высокими значениями ИММЛЖ как отдельно у женщин ( $p=0,010$ ), так и в общей группе мужчин и женщин ( $p=0,047$ ). Средние значения ИММЛЖ в зависимости от генотипа по полиморфизму *rs804271* представлены в табл. 2.

Ген *GATA4* кодирует член GATA семейства транскрипционных факторов типа цинковых пальцев. Члены этого семейства распознают GATA мотив, который присутствует в промоторах многих структурных и регуляторных генов, в том числе генов гипертрофического ответа, таких как гены тяжелой цепи

Таблица 1

Сравнение по частотам аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *GATA4* в контрольной выборке и у больных ИБС

| Полиморфизм/выборка            | Генотипы    |     |     | Аллели      |             |
|--------------------------------|-------------|-----|-----|-------------|-------------|
|                                | GG          | GT  | TT  | T (%)       | G (%)       |
| <b><i>rs 804271, GATA4</i></b> |             |     |     |             |             |
| Контроль                       | 64          | 141 | 78  | 297 (52,47) | 269 (47,53) |
| ИБС                            | 33          | 62  | 32  | 126(49,61)  | 128(50,39)  |
|                                | $p=0,733$   |     |     | $p=0,494$   |             |
| <b><i>rs8191515, GATA4</i></b> |             |     |     |             |             |
| Контроль                       | 227         | 48  | 5   | 58(10,36)   | 502(89,64)  |
| ИБС                            | 99          | 28  | 2   | 32(12,40)   | 226(87,60)  |
|                                | $p^*=0,513$ |     |     | $p=0,454$   |             |
| <b><i>rs2898293, GATA4</i></b> |             |     |     |             |             |
| Контроль                       | 33          | 117 | 134 | 183(32,22)  | 385(67,78)  |
| ИБС                            | 9           | 57  | 64  | 75(28,85)   | 185(71,15)  |
|                                | $p=0,333$   |     |     | $p=0,373$   |             |

Примечание. p – достигнутый уровень значимости для теста  $\chi^2$  с поправкой Йетеса на непрерывность,  $p^*$  – для точного теста Фишера

Таблица 2

Значения ИММЛЖ в зависимости от генотипа по полиморфизму rs804271 гена GATA4 в контрольной выборке

| Генотип                | ИММЛЖ, г/м <sup>2</sup><br>мужчины | ИММЛЖ, г/м <sup>2</sup><br>женщины | ИММЛЖ,<br>г/м <sup>2</sup> Общая<br>группа<br>(мужчины и<br>женщины) |
|------------------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| GG                     | 100,90±13,73                       | 90,26±12,21                        | 94,41±13,75                                                          |
| GT                     | 101,84±17,96                       | 90,39±12,06                        | 95,18±15,81                                                          |
| TT                     | 102,60±17,26                       | 95,99±12,67                        | 98,96±15,17                                                          |
| p                      | 0,928863                           | 0,037                              | 0,133                                                                |
| GG+GT vs. TT rs 804271 |                                    |                                    |                                                                      |
| GG+GT                  | 101,56±16,74                       | 90,35±12,05                        | 94,94±15,16                                                          |
| TT                     | 102,60±17,26                       | 95,99±12,67                        | 98,96±15,17                                                          |
| p                      | 0,76                               | 0,010                              | 0,047                                                                |
| GT+TT vs. GG rs 804271 |                                    |                                    |                                                                      |
| GG                     | 100,90±13,75                       | 90,26±12,21                        | 94,41±13,75                                                          |
| GT+TT                  | 102,12±17,614                      | 92,32±12,51                        | 96,53±15,65                                                          |
| p                      | 0,75                               | 0,367                              | 0,330                                                                |

α-миозина, сердечного тропонина С, предсердного и мозгового натрийуретических пептидов, сердечного тропонина I, натрий-кальциевого обменника и др. [5]. Полиморфизмы, находящиеся в промоторе гена GATA4 могут непосредственно влиять на экспрессию гена, и, таким образом, участвовать в механизмах ремоделирования сердца.

Больные ишемической болезнью сердца, включенные в исследование, перенесли инфаркт миокарда и характеризовались сниженными значениями ФВ и высокими значениями конечного диастолического объема. Механизмы развития повреждения миокарда при ИБС, в том числе ишемической кардиомиопатии, остаются в значительной степени неизученными. Основной причиной заболевания является множественное атеросклеротическое поражение коронарных артерий [1]. Однако выраженная дилатация камер сердца происходит далеко не у каждого больного, и между ее степенью и выраженностью нарушения коронарного кровотока нет прямой зависимости [1].

Несколько исследований продемонстрировали, что гены сигнального пути кальцинеурина могут играть

важную роль в прогрессии сердечной недостаточности у человека [8]. Так, при дилатационной кардиомиопатии, Diedrichs с соавторами показали, увеличивается экспрессия GATA4, а также энзиматическая активность кальцинеурина и экспрессия кальцинеурина В.

Нами была изучена роль полиморфных вариантов в гене GATA4 в формировании клинически значимых фенотипов, таких как ИМЛЖ у здоровых лиц контрольной группы и фракции выброса левого желудочка у больных с ИБС. При сравнении средних значений ФВ у пациентов с разными генотипами по полиморфизмам rs804271 и rs8191515 гена GATA4 в этой группе пациентов не выявлено ассоциации с носительством тех или иных генотипов по изученным полиморфизмам гена GATA4.

Средние значения ФВ в зависимости от генотипа по полиморфизму rs2898293 представлены в табл.3. Выявлено, что генотип "GG" полиморфизма rs2898293, находящийся в интроне гена GATA4, связан с более низким значением ФВ у женщин (p=0,050).

### Заключение

Ген транскрипционного фактора GATA4 – один из важнейших компонентов сигнального пути кальцинеурина – является важным геном-кандидатом гипертрофии миокарда. Как показывают различные экспериментальные исследования, ген GATA4 может вносить вклад в формирование ремоделирования сердца и на более поздних этапах сердечно-сосудистого континуума – в формировании дилатации камер сердца после инфаркта миокарда. В настоящем исследовании показана ассоциация полиморфизма rs804271 с ИММЛЖ в контрольной группе, а так-

же rs2898293 с фракцией выброса у больных ИБС. Ранее были выявлены ассоциации полиморфных вариантов генов NFATC4, PPP3R1 с эхокардиографическими параметрами при эссенциальной гипертензии и сахарном диабете. Таким образом, полученные результаты указывают на необходимость дополнительных исследований этих генов, так как функционально-значимые полиморфизмы сигнального пути кальцинеурина еще неизвестны.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-01814-а

### Литература

1. Бойцов С.А., Глухов А.А., И.М.Ильинский. Ишемическая кардиомиопатия (обзор литературы) // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 1999, №2-3, С. 39-44.
2. Полиморфизмы генов фактора транскрипции GATA-4 и альфа-изоформы кальцинеурина А в связи с гипертрофией миокарда при эссенциальной гипертензии / О.А. Макеева, К.В. Пузырев, М.В. Голубенко и др. // Генетика человека и патология: Сб. научных трудов. под ред. В.П. Пузырева. - 2004 – Вып.7. - С. 108-117.
3. A Calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy / J.D. Molkentin, [et al.] // Cell. - 1998. - V. 93. - P. 215-228.
4. Devereux R. B., Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method / R. B. Devereux, N. Reichek // Circulation. - 1977. - V.55. - P.613-618.
5. GATA transcription factors in the developing and adult heart / S. Pikkariainen, [et al.] // Cardiovasc. Res. - 2004. - V. 63. - P.196-207.
6. Identification of a chromosome 8p locus for early-onset coronary heart disease in a French Canadian population / J.C. Engert [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. - 2008. V.16. - P. 105-14.
7. Identification of a novel 5-base pair deletion in calcineurin B(PPP3R1) promoter region and its association with left ventricular hypertrophy / W.Tang, [et al.] // Am. Heart J. - 2005. - V.150. - P. 845-51.
8. Increased regulatory activity of the calcineurin NFAT pathway in human heart failure / H. Diedrichs, [et al.] // Europ. J. Heart Fail. - 2004. - V.6. - P. 3-9.
9. Maisch B. Ventricular remodeling / B. Maisch // Cardiology. - 1996. - V. 87 (Suppl. 1). P. 2-10.
10. Polymorphisms of genes of the cardiac hypertrophy / O. Poirier [et al.] // Europ.J. Hum. Genet. -2003. -V.11. - P.659-664.
11. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. / S. Rozen, H.J. Skaletsky // Methods in Molecular Biology. Humana -2000. P.365-386.
12. The role of calcineurin pathway genes polymorphisms in cardiac remodeling of different origin / O. A. Makeeva [et al.] // European Heart Journal – 2008. -V.29 (Abstract Suppl.).