

УДК: 575.174.015.3:616.126.3-007]-053.2

А.В. Каменщик,**О.М. Камишиний,****О.Г Іванько**Запорізький державний медичний
університет**ОДНОНУКЛЕОТИДНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ
RS11665469 ГЕНА NFATC1 У ДІТЕЙ ІЗ
ДВОСТУЛКОВИМ АОРТАЛЬНИМ
КЛАПАНОМ СЕРЦЯ****Ключові слова:** алейний поліморфізм rs11665469, вроджені вади серця, двостулковий аортальний клапан, доплероехокардіографія, діти.**Резюме.** Проведено дослідження розподілу алелів СС, ТТ, СТ при генотипуванні поліморфізму rs11665469 гена NFATC1 у дітей із двостулковим аортальним клапаном серця (ДАК) порівняно з групою хворих, що мали інші вроджені вади серця (ВВС) та умовно здоровими дітьми. Виявлено достовірне збільшення відносного відхилення від очікуваної гетерозиготності за рахунок переважання гомозиготних алелів СС та ТТ у дітей із ДАК та іншими ВВС порівняно із контрольною групою а також достовірне збільшення цього показника у хворих на ДАК дітей порівняно із групою хворих, що мали інші ВВС. У хворих групи ДАК виявлено достовірне переважання гомозиготного алеля ТТ порівняно з іншими групами пацієнтів. Встановлена асоціованість гетерозиготного алеля СТ із збільшенням маси міокарда лівого шлуночка та гомозиготної СС із збільшенням кінцевого діастолічного об'єму у хворих на ДАК дітей.**Вступ**

Гени сімейства нуклеарного фактору активованих Т-клітин (NFATC), що відносяться до регуляторів транскрипційної активності, відомі своєю участю у багатьох важливих біологічних реакціях організму. Насамперед, це стосується регуляції імунної відповіді, стимуляції цитокинової експресії, участі у процесах онтогенезу [1,2]. Ці гени представлені принаймні чотирма відомими ізоформами (NFATC1-, NFATC4, що виявляють різну тканинно-залежну активність. Зокрема, NFATC1 виявляє експесію у міокарді, де активується за допомогою сигнального шляху кальцієвину, який представлений кальмодуліном, іонами кальцію та власне кальцієврином [3]. Після активації відповідний фактор NFATC виявляється у ядрі міокардіоцита з активізацією експресії відповідного гена, після чого запускається транскрипційний каскад та відбуваються гіпертрофічні реакції у міокарді [4]. Слід також зазначити, що схожі процеси в ембріогенезі відбуваються й при формуванні клапанів серця [5,6]. Були продемонстровані взаємозв'язки між наявністю поліморфізмів NFATC1, таких як rs7240256, rs11665469, rs754505 та деякими вродженими вадами серця, зокрема дефектом міжшлуночкової перегородки (ДМШП) [7]. Також установлені тандемні повтори в посліднанні з поліморфізмом NFATC1 при перимембранозному ДМШП [8]. Важливим є також установлення факту відсутності формування клапанів серця у NFATC1^{-/-} нокаутних ембріонів мишей та

виявлення гетерозиготних місенс-мутацій у деяких пацієнтів з атрезією трикуспідального клапана [8]. Наявність мутацій NFATC1 також виявлена у одного з 4 випадків встановлених у пацієнтів із двостулковим аортальним клапаном серця [9]. Підкреслюється також важлива роль виявлення поліморфізмів NFATC1 при клапанних вроджених вадах серця (ВВС) [10]. У наших попередніх дослідженнях експресії генів NFATC1 та NFATC4 у дітей з двостулковим аортальним клапаном серця також встановлено підвищення відносної нормалізованої експресії саме гена NFATC1 порівняно як з контрольною групою, так й із іншими ВВС [11].

Мета дослідження

Визначити частоту наявності поліморфізму rs11665469 у дітей із двостулковим аортальним клапаном серця порівняно з іншими вродженими вадами серця та умовно здоровими дітьми групи контролю та встановлення можливих асоціацій з морфофункціональними параметрами геометрії міокарда за даними доплерокардіографії.

Матеріал і методи

Дослідження проведено у трьох групах дітей. Першу групу створили зі 39 дітей із діагностованим за даними доплерокардіографії двостулковим аортальним клапаном серця (ДАК), середній вік яких склав $10,2 \pm 0,7$ року. До другої групи увійшли 42 дитини з іншими ВВС без залучення

клапанів серця, що мали середній вік $12,8 \pm 0,5$ року. З них дефект міжпередсердної перегородки мали місце у 15 пацієнтів, дефект міжшлуночкової перегородки - 11, хірургічна корекція тетради Фалло - у 4, відкрите овальне вікно - у 2, хірургічна корекція подвійного відходження магістральних судин від правого шлуночка у - 2, хірургічна корекція транспозиції магістральних судин - у 2, стеноз легеневої артерії - у 1, інфундибулярний стеноз вивідного тракту лівого шлуночка - у 1, коарктація аорти - у 2, аномальний хід верхньої порожнистої вени - у 1, хірургічна корекція відкритої артеріальної протоки - у 2. У двох зазначених групах дітей з ВВС на момент дослідження не було ознак серцевої недостатності. До контрольної групи включена 51 умовно здорова дитина, із середнім віком $10,9 \pm 0,8$ року. У зазначених трьох групах пацієнтів переважали хлопчики: 31 (79,4%), 22 (52,4%) та 28 (54,9%) відповідно, при цьому у групі дітей з ДАК кількість хлопчиків була достовірно вищою як порівняно з контрольною групою, так й з іншими ВВС ($p < 0,05$). Доплерографічне дослідження з визначенням стандартних параметрів внутрішньосерцевої більшою гемодинаміки проводилось за допомогою сканера "Medison - 8000" з датчиком 2,5 МГц. Розрахунок маси міокарда лівого шлуночка проводився за формулою Devereux R.V. - $1,04 [КДР + МШП + ЗСЛШ]^3 - КДР^3$ - 13,6 [12], де КДР - кінцевий діастолічний розмір лівого шлуночка, МШП - товщина міжшлуночкової перегородки у діастолу (мм), ЗСЛШ - товщина задньої стінки лівого шлуночка (мм), індексу маси міокарда (ІММЛШ) за формулою P.Gosse [13] - $M/H^2,7$, де М - маса міокарда лівого шлуночка, (г), Н - зріст (м). Відносна товщина стінки лівого шлуночка (ВТС) визначалася за методом Ganau, $ВТС = (2 * ЗСЛШ / КДР)$, де ЗСЛШ - товщина задньої стінки лівого шлуночка [14]. Тип геометрії лівого шлуночка визначався за методом P. Verdecchia [15], залежно від змін ВТС та індексу маси міокарда лівого шлуночка. Для генотипування використані зразки тотальної ДНК людини, що виділялася з цільної крові згідно з інструкцією виробника за допомогою комплекту реагентів "ДНК-експрес-кровь-пдус" ("Литех", Росія). Генотипування за допомогою TaqMan проб проводилося на ампліфікаторі CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", США). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) для TaqMan генотипування проводили згідно з інструкцією Applied Biosystems, США.

Розподіл генотипів досліджуваного поліморфного локусу перевіряли на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за допомогою критерію χ^2 та

відношення шансів (odds ratio, OR), використовуючи програмний калькулятор "Випадок-контроль" (http://gen-exp.ru/calculator_or.php). Статистична обробка проводилася за допомогою програмного модуля Statistica 6.0 Для порівняння частот алелів між групами використовували критерій χ^2 , або точний тест Фішера при кількості спостережень менше за 5. Значущими рахували відмінності при $p < 0,05$. Для розрахунку очікуваної гетерозиготності (H_e) використовували формулу $H_e = 1 - \sum x_i^2$ [16], де x_i - частота 1-го алеля. Спостережувану гетерозиготність (H_o) розраховували шляхом поділу числа гетерозигот на загальне число спостережень. Відносна відхилення очікуваної гетерозиготності від спостережної розраховували за формулою $H = (H_o - H_e) / H_e * 100$ [17]. Для виявлення асоціацій між наявністю трьох досліджуваних алелів гена NFATC1 та морфофункціональними параметрами серця за даними доплерокардіографії використовували критерій Стьюдента та непараметричні статистичні методи (медіанний тест).

Обговорення результатів дослідження

У процесі генотипування поліморфізму rs11665469 гена NFATC1 у 3 зазначених групах дітей у групі хворих на ДАК алель СС виявлена у 23 із 39 хворих (58,97%), ТТ - у 7 хворих (17,95%), та СТ - у 9 (23,07%). У хворих із іншими ВВС алель СС виявлена у 26 із 42 осіб (61,90%), ТТ - у 2 (4,76%) та СТ - у 14 (33,33%). У групі контролю відповідно СС у 22 (43,14%), ТТ - у 1 (1,96%) та СТ - у 28 (54,90%) дітей. На підставі цих даних проведені розрахунки очікуваної та спостережуваної гетерозиготності й отримані значні відмінності між зазначеними трьома групами пацієнтів. Ці дані наведені у таблиці 1.

Як видно з даних таблиці 1, найбільший показник очікуваної гетерозиготності по поліморфізму rs11665469 гена NFATC1 мав місце у групі контролю як порівняно з ДАК (0,54 та 0,23 відповідно; $p < 0,05$), так й з групою хворих, що мали інші ВВС (0,54 та 0,33 відповідно; $p < 0,05$). Водночас, відмінності між групою хворих з ДАК та іншими ВВС за цим показником не були достовірними (0,33 та 0,23 відповідно; $p > 0,05$). Слід також зазначити, що найбільше відносне відхилення від очікуваної гетерозиготності спостерігалось у групі дітей з ДАК та було достовірним порівняно з іншими ВВС (59% та 35% відповідно; $p < 0,05$). При цьому відносне відхилення від очікуваної гетерозиготності у групі дітей з іншими ВВС порівняно з групою контролю також було достовірним (35% та 6% відповідно; $p < 0,05$). Отже, у дітей з ДАК, як й у групі хворих з іншими ВВС, мало

Таблиця 1

Частоти очікуваної і спостережуваної гетерозиготності та відносне відхилення від очікуваної (%) у дітей з ДАК порівняно із контрольною групою та іншими ВВС

Групи хворих	Очікувана гетерозиготність	Спостережувана гетерозиготність	Відносне відхилення від очікуваної гетерозиготності
ДАК (n=39)	0,57	0,23*	59 %*
інші ВВС (n=42)	0,51	0,33	35%**
Контроль (n=51)	0,51	0,54	6%

Примітки: * - $p < 0,05$ між групою ДАК та контролем; ** - $p < 0,05$ між групою хворих з іншими ВВС та контролем

місце достовірне зменшення рівня гетерозиготності порівняно з контрольною групою, однак найбільше достовірне відхилення від очікуваної спостерігалось саме у пацієнтів, що мали ДАК. На підставі вищевказаного, з метою з'ясування які саме з 2 гомозиготних алелів гена NFATC1 (CC, TT) визначали рівень гомозиготності у зазначених групах дітей, розподіл частот цих алелів перевірений на відповідність рівновазі Харді-Вайнберга за загальною моделлю наслідування. Ці дані наведені в таблиці 2.

Як можна побачити з таблиці 2, найбільша невідповідність рівновазі Харді-Вайнберга за рахунок збільшення частоти гомозиготної алелі tt спостерігалася у групі хворих дітей з ДАК (0,179 та 0,02 відповідно; $\chi^2 = 12,91$, OR=10,94). Точний тест Фішера при порівнянні частот генотипу TT у групах (7 та 1 випадків відповідно) виявив достовірні розбіжності ($\chi^2 = 5,75$, $p = 0,02$).

Слід також зазначити, що у хворих з іншими ВВС відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга не

отримано. Ці дані наведені у таблиці 3. Як в видно з даних таблиці 3, по жодній з алелів поліморфізму гена NFATC1 (TT, CT та CC) не виявлено відхилення від рівноваги Харді-Вайнберга ($\chi^2 = 4,50$, OR(TT) = 2,50; OR(CT) = 0,41 та OR(CC) = 2,14 відповідно, $p > 0,05$).

Під час проведення доплерокардіографії у дітей з ДАК, на відміну від групи хворих з іншими ВВС виявлені ознаки концентричної гіпертрофії лівого шлуночка (індекс маси міокарда $61,37 \text{ г/м}^{2,7} \pm 17,51 \text{ г/м}^{2,7}$ та $33,07 \text{ г/м}^{2,7} \pm 2,80 \text{ г/м}^{2,7}$ відповідно; $p < 0,05$, відносна товщина стінки лівого шлуночка $0,43 \text{ мм} \pm 0,02 \text{ мм}$ та $0,37 \text{ мм} \pm 0,02 \text{ мм}$ відповідно; $p < 0,05$). При зіставленні отриманих даних щодо розподілу алелів поліморфізму rs11665469 гена NFATC1 з морфофункціональними параметрами серця, за даними доплерокардіографії у групі дітей з ДАК виявлені асоціації зазначених алелів з масою міокарда лівого шлуночка (ММЛШ) та кінцевим діастолічним об'є-

Таблиця 2

Відповідність розподілу частот алелів поліморфізму rs11665469 гена NFATC1 у дітей із ДАК рівновазі Харді-Вайнберга по загальній моделі наслідування у порівнянні з групою контролю

Генотипи	діти з ДАК (n = 39)	Контроль (n = 51)	χ^2	P	OR
генотип CC/CC	0,59	0,431	12,91	0,002	1,89
генотип CC/TT	0,231	0,549			0,25
генотип TT/TT	0,179	0,02			10,94

Таблиця 3

Відповідність розподілу частот алелів поліморфізму rs11665469 гена NFATC1 у дітей з іншими ВВС рівновазі Харді-Вайнберга за загальною моделлю наслідування порівняно з групою контролю

Генотипи	інші ВВС n = 42	контроль n = 51	χ^2	P	OR
Генотип TT/TT	0,048	0,02	4,5	0,11	2,5
Генотип TT/CC	0,333	0,549			0,41
Генотип CC/CC	0,619	0,431			2,14

мом (КДО) за результатами медіанного тесту. При цьому для ММЛШ носії гетерозиготної алелі ст мали суттєво вищі значення ММЛШ ($\chi^2 = 6,75$; $p < 0,05$). Ці дані наведені на рисунку 1.

Як видно з рисунка 1, у дітей з ДАК гомозиготні алелі (cc,tt) асоційовані з меншою ММЛШ, тоді як у хворих з іншими ВВС не отримано достовірних розбіжностей у розподілі гомозиготних та гетерозиготних алелів зазначеного поліморфізму

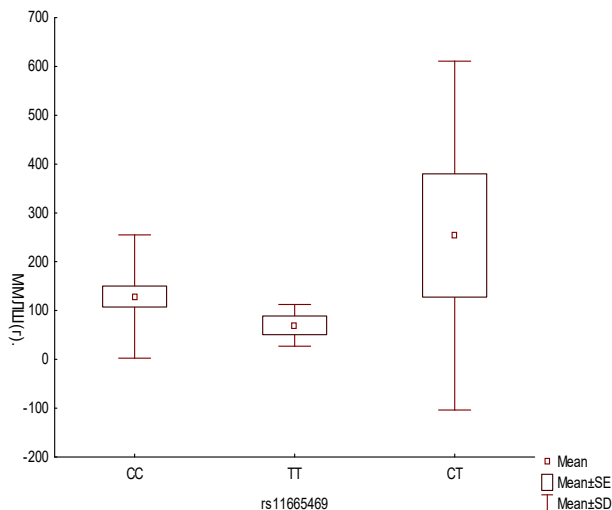


Рис. 1. Значення ММЛШ у хворих на ДАК дітей залежно від розподілу алелів CC,TT,CT поліморфізму rs11665469 гена NFATC1

($\chi^2 = 4,53$; $p > 0,05$).

Таким чином, у дітей з ДАК, гетерозиготний алель ст поліморфізму rs11665469 гена NFATC1 асоційований зі збільшенням ММЛШ та відповідним зменшенням КДО. Виявлені особливості алельної дискримінації можуть засвідчити про адаптивний вплив гетерозиготного носійства при розвитку гіпертрофічних реакцій у міокарді хворих на ДАК дітей та відповідно дезадаптивний при гомозиготному носійстві, коли при збільшенні КДО відбувається підвищення перенавантаження з подальшими дистрофічними змінами у міокарді за більш повільного формування гіпертрофії.

Висновки

1. У хворих на ДАК дітей із переважають гомозиготні носії поліморфізму rs11665469 гена NFATC1.

2. У хворих на ДАК дітей, що мають поліморфізм rs11665469 гена NFATC1 серед гомозиготних виявляється більша частота алелі TT.

3. У хворих на ДАК дітей алель СТ асоційований з розвитком міокардіальної гіпертрофії, а гомозиготний алель cc із збільшенням КДО, перенавантаженням та можливим розвитком дистрофічних реакцій у міокарді.

гена NFATC1 ($\chi^2 = 3,60$; $p > 0,05$). Треба зазначити, що для КДО у пацієнтів з ДАК також отримані достовірні розбіжності в розподілі відповідних алелів ($\chi^2 = 6,10$;

$p < 0,05$). Ці дані наведені на рисунку 2. З наведених даних рис. 2, у хворих на ДАК дітей гомозиготні алелі були асоційованими з більшими значеннями КДО, при цьому у групі хворих з іншими ВВС достовірних розбіжностей не отримано

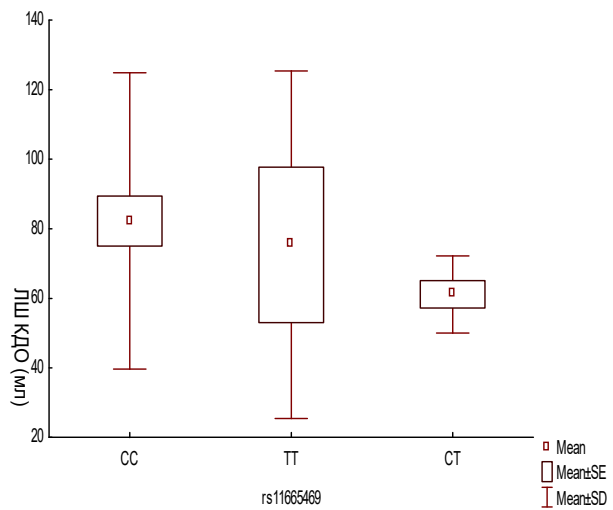


Рис. 2. Значення КДО у хворих на ДАК дітей залежно від розподілу алелів CC,TT,CT поліморфізму rs11665469 гена NFATC1

Перспективою подальших досліджень є визначення інших поліморфізмів гена NFATC1 з метою встановлення діагностичних та предикторних генних маркерів цієї патології.

Література. 1. Ruben E.A. Musson. Molecular Diagnostics of Calcineurin-Related Pathologies / Musson Ruben E.A., Cobbaert Christa M., Smit Nico P.M. // Clinchem. -2012. Mar; 58(3):511-522. 2. Shoichiro Miyatake. Differential Contribution of NFATc2 and Cells NFATc1 to TNF- a Gene Expression in T Cells / Shoichiro Miyatake, Takachika Hiroi, Hiroyuki Miyoshi, Atsushi Miyawaki, Osamu Kaminuma, Fujiko Kitamura, Noriko Kitamura // J Immunol 2008; 180:319-326. 3. Ida Gjervold Lunde. Molecular mechanisms of heart failure; Nuclear Factor of Activated T-cell (NFAT) signaling in myocardial hypertrophy and dysfunction. Dissertation for the degree of Philosophiae Doctor (PhD) / University of Oslo, Oslo, Norway. Series of dissertations submitted to the Faculty of Medicine, University of Oslo, 2011. No. 1307. 4. Voelkl J. Annexin A7 deficiency potentiates cardiac NFAT activity promoting hypertrophic signaling / J. Voelkl, I Alesutan, T. Pakladok [et al] // Biochem. Biophys. Res Commun. -2014. Feb 28;445(1):244-9. 5. Bingruo Wu. Nfatc1 directs the endocardial progenitor cells to make heart valve primordium / Wu Bingruo, H. Scott Baldwin, Bin Zhou // Trends in Cardiovascular Medicine. Volume 23, Issue 8, Pages 294-300, November 2013. 6. Seo H.H. The role of nuclear factor of activated T cells during phorbol myristate acetate-induced cardiac differentiation of mesenchymal stem cells // H.H. Seo, C.Y Lee, J. Lee, S. Lim, E. Choi, J.C Park, Lee S, K.C. Hwang // Stem Cell Res Ther. 2016 Jul 12;7(1):90. doi: 10.1186/s13287-016-0348-6. 7. Wang F. Association Between Single Nucleotide Polymorphisms in NFATC1 Signaling Pathway Genes and Susceptibility to Congenital Heart Disease in the Chinese Population / F. Wang, H. Wang, L. Wang, S. Zhou, M. Chang, J. Zhou, Y. Dou,

Wang Y, X. Shi // *Pediatr Cardiol.* 2016 Dec;37(8):1548-1561. 8. Abdul-Sater Z, Two Heterozygous Mutations in NFATC1 in a Patient with Tricuspid Atresia / Z. Abdul-Sater, A. Yehya, J. Beresian, E. A. Salem, S. Kamar Baydoun, et al. // *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e49532. doi:10.1371/journal.pone.0049532. 9. Zhonghua Xin. Association between nuclear factor of activated T cells 1 gene mutation and simple congenital heart disease in children / *Xin Zhonghua, Guan Xue, Zhi Bing Za // Genet Mol Res.*, 2010 Jul;38(7):621-4. 10. Garcia -Jose Marin. Post-Genomic Cardiology / J.M. Garcia, Academic Press, 2014, 944 p., ISBN: 9780124045996. 11. Каменщик А.В. "Експресія генів нуклеарного фактору активованих Т-клітин у дітей з двостулковим аортальним клапаном серця." / А.В. Каменщик, О.М. Камишний, О.Г. Іванько // "Медицинські перспективи", том XXI, №3, 2016. С.29-34. 12. Devereux R.B. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings / R.B. Devereux, D.R. Alonso, E.M. Lutas et al // *Am. J. Cardiol.* - 1986. - Vol.57, №6. - p.450-458. 13. Gosse P. Echocardiographic definition of left ventricular hypertrophy in the hypertensive: which method of indexation of left ventricular mass? / P. Gosse, V. Jullien, P. Jarnier, P. Lemetayer, J. Clementy // *J. Hum. Hypertens.* - 1999. - Vol.13. - P.505-509. 14. Ganau A., Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension / A. Ganau, R.B. Devereux, M.J Roman. et al // *J. Am. Coll. Cardiol.* - 1992. - Vol.19. - P.1550-1558. 15. Verdecchia P. Asymmetric left ventricular remodeling due to isolated septal thickening in patients with systemic hypertension and normal left ventricular masses / P. Verdecchia, C. Porcellati, I. Zampi et al. // *Am. J. Cardiol.* - 1994. - 73. - P. 247-252. 16. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals / M. Nei // *Genetics*, 1978, 89: 583-590. 17. Selander R.K. Behavior and genetic variation in natural populations / R.K Selander // *Am Zool.* 1970;10:53-66.

**ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ
RS11665469 ГЕНА NFATC1 У ДЕТЕЙ С
ДВУСТВОРЧАТЫМ АОРТАЛЬНЫМ КЛАПАНОМ
СЕРДЦА**

А.В. Каменщик, О.М. Камишний, А.Г. Іванько

Резюме. Проведено дослідження розподілу алелей СС, ТТ, СТ при генотипуванні поліморфізма rs11665469 гена NFATC1 у дітей з двустворчатим аортальним клапаном серця (ДАК) по порівнянню з групою хворих, малих інші вроджені пороки серця (ВПС) і умовно здоровими дітьми. Виявлено достовірне збільшення відносного відхилення від очікуваної гетерозигот-

ности за рахунок переважання гомозиготних алелей СС і ТТ у дітей з ДАК і іншими ВПС в порівнянні з групою контролю, а також достовірне збільшення цього показателя у хворих ДАК дітей по порівнянню з групою хворих, малих інші ВПС. У хворих групи ДАК виявлено достовірне переважання гомозиготної алелі ТТ по порівнянню з іншими групами пацієнтів. Встановлено асоційованість гетерозиготної алелі СТ з збільшенням маси міокарда лівого шлуночка і гомозиготної алелі СС з збільшенням кінцевого діастолічного об'єму у хворих дітей з ДАК.

Ключевые слова: алельний поліморфізм rs11665469, вроджені пороки серця, двустворчатий аортальний клапан, доплерокардіографія, діти.

**RS11665469 SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM
OF NFATC1 GENE IN CHILDREN WITH
BICUSPIDAORTIC VALVE.**

A.V. Kamenshchik, O.M. Kamyshny, O.G. Ivanko

Abstract. The study of rs11665469 polymorphism alleles discrimination in children with bicuspid aortic valve (BAV), in patients with other congenital heart diseases (CHD) and in healthy children of the control group was conducted. There was established a reliable increase in relative deviation from the expected heterozygosity at the expense of CC and TT homozygous alleles prevalence in children with BAV and other CHD compared to the control together with a reliable increase of this parameter in BAV patients compared to other CHD group. In BAV children a reliable prevalence of homozygous TT allele compared to other groups of patients was revealed. The association between CT heterozygous allele and increased myocardial mass as well as CC homozygous allele and increased diastolic volume in children with BAV has been established.

Key words: rs11665469 allele discrimination, congenital heart diseases, bicuspid aortic valve, Doppler echocardiography, children.

**HSEE of Ukraine "Zaporizhzhya state medical
university"**

Clin. and experim. pathol. -2017.-Vol.16, №2(60),p.2.-P.23-27.

Надійшла до редакції 4.05.2017

Рецензент – проф. С.С. Ткачук

© А.В. Каменщик, О.М. Камишний, О.Г. Іванько, 2017