

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.1:616.12-008.46

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ  
КАЛЬЦИНЕЙРИНА В МИОКАРДЕ: СВЯЗЬ С ИШЕМИЧЕСКИМ  
РЕМОДЕЛИРОВАНИЕМ СЕРДЦА У ЧЕЛОВЕКА

© 2013 г. О. Г. Половкова<sup>1\*</sup>, О. А. Макеева<sup>1</sup>, А. А. Лежнев<sup>2</sup>, И. А. Гончарова<sup>1,3</sup>,  
Е. В. Кулиш<sup>1</sup>, В. М. Шипулин<sup>2</sup>, В. П. Пузырёв<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения  
Российской академии медицинских наук, Томск, 634050

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт кардиологии  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск, 634012

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Кемерово, 650002

Поступила в редакцию 05.10.2012 г.

Принята к печати 29.11.2012 г.

Сигнальный путь кальцинейрина играет важнейшую роль в ремоделировании сердца различного генеза, развитии дилатации камер сердца и прогрессировании сердечной недостаточности. Компоненты сигнального пути кальцинейрина вовлечены в регуляцию гипертрофии кардиомиоцитов, в ангиогенез и апоптоз. Определен уровень экспрессии основных генов сигнального пути кальцинейрина (*PPP3CA*, *PPP3R1*, *PPP3CB*, *GATA4* и *NFATC4*) в миокарде ушка правого предсердия у больных ишемической болезнью сердца, подвергнутых хирургическому лечению, тип которого определяется тяжестью клинической картины: операция по восстановлению формы левого желудочка (постинфарктная аневризма) или операция аортокоронарного шунтирования при сохраненной морфологии левого желудочка. У больных с выраженной постинфарктной дилатацией левого желудочка ( $n = 21$ ) уровень экспрессии генов каталитической субъединицы кальцинейрина *PPP3CA* и *PPP3CB* был в 1.3 и 1.6 раза ( $p = 0.018$  и  $0.023$ ) ниже, чем у больных ишемической болезнью с сохраненной формой сердца ( $n = 34$ ). Уровень экспрессии гена *PPP3R1*, кодирующего регуляторную субъединицу кальцинейрина В, и генов факторов транскрипции *GATA4* и *NFATC4* не отличался статистически значимо в изученных группах больных. Таким образом, снижение уровня экспрессии генов *PPP3CA* и *PPP3CB* в миокарде предсердий может служить маркером выраженного постинфарктного ремоделирования левого желудочка. Изучение связи между уровнем экспрессии генов сигнального пути кальцинейрина и степенью повреждения миокарда позволит, возможно, в дальнейшем найти подходы к прогнозированию отдаленных неблагоприятных последствий хирургического лечения у больных с постинфарктным ремоделированием.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, экспрессия генов, гены сигнального пути кальцинейрина, ремоделирование миокарда, дилатация левого желудочка.

EXPRESSION PROFILE OF CALCINEURIN PATHWAY GENES IN MYOCARDIUM TISSUES IN RELATION TO ISCHEMIC HEART REMODELING IN HUMANS by O. G. Polovkova<sup>1\*</sup>, O. A. Makeeva<sup>1</sup>, A. A. Lezhnev<sup>2</sup>, I. A. Goncharova<sup>1,3</sup>, E. V. Kulish<sup>1</sup>, V. M. Shipulin<sup>2</sup>, V. P. Puzirev<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Research Institute of Medical Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Science, Tomsk, 634050 Russia; \*e-mail: oksana.ivanova@medgenetics.ru; <sup>2</sup>Research Institute of Cardiology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Science, Tomsk, 634012 Russia; <sup>3</sup>Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Siberian Division, Russian Academy of Medical Science, Kemerovo, 650002 Russia). Calcineurin pathway plays the crit-

Принятые сокращения: *PPP3CA* (protein phosphatase 3 gene, catalytic subunit,  $\alpha$  isozyme) – ген  $\alpha$ -изоформы каталитической субъединицы протеинфосфатазы 3; *PPP3CB* (protein phosphatase 3 gene, catalytic subunit,  $\beta$  isozyme) – ген  $\beta$ -изоформы каталитической субъединицы протеинфосфатазы 3; *PPP3R1* (protein phosphatase 3, regulatory subunit B,  $\alpha$  isoform) – ген  $\alpha$ -изоформы регуляторной субъединицы В протеинфосфатазы 3; *GATA4* (GATA binding protein 4) – ген GATA-связывающего белка 4; *NFATC4* (nuclear factor of activated T-cells) – ген ядерного фактора активированных Т-клеток; *Bcl-x* (B-cell lymphoma x) – ген В-клеточной лимфомы; *VEGFA* (vascular endothelial growth factor A) – ген фактора роста сосудистого эндотелия А; *ANF* (natriuretic peptide A) – ген натрийуретического пептида А; *BNP* (natriuretic peptide B) – ген натрийуретического пептида В; LVAD (left ventricular assist device) – устройство, поддерживающее работу левого желудочка; NYHA – классификация хронической сердечной недостаточности Нью-Йоркской кардиологической ассоциации; ЛЖ – левый желудочек; ИБС – ишемическая болезнь сердца; АКШ – аортокоронарное шунтирование; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

\* Эл. почта: oksana.ivanova@medgenetics.ru

ical role in the cardiac remodeling of various origin, development of chambers dilatation and progression of heart failure. Components of calcineurin pathway are involved in myocardium hypertrophy regulation, angiogenesis and apoptosis. Results of quantitative expression profiling study of main calcineurin pathway genes *PPP3CA*, *PPP3R1*, *PPP3CB*, *GATA4* and *NEATC4* in myocardium of right atrium auricle of patients with a coronary heart disease, exposed to various types of surgical treatments depending on weight of a clinical finding (surgical reconstruction of the geometry of left ventricle (LV) (postinfarction aneurysm) or coronary artery bypass grafting in case of unaltered morphology of LV) are presented. In patients with sizable postinfarction LV dilatation ( $n = 21$ ) expression level of calcineurin catalytic subunit genes *PPP3CA* and *PPP3CB* was 1.3 and 1.6 times lower ( $p = 0.018$  and  $0.023$ , accordingly) compared to patients with unaltered shape of the heart ( $n = 34$ ). Expression level of *PPP3R1* gene encoding calcineurin regulatory subunit B and *GATA4* and *NEATC4* genes for transcription factors did not differ in studied subgroups of patients. Thus, lower expression of *PPP3CA* and *PPP3CB* genes in atrium myocardium can be related to expressed postinfarction LV remodeling. Further studies of relation quantitative expression profiling of calcineurin pathway genes with the level of damage of myocardium is essential what may have important outcome for the prevention of adverse events of cardiosurgical treatments in patients with postinfarction remodeling.

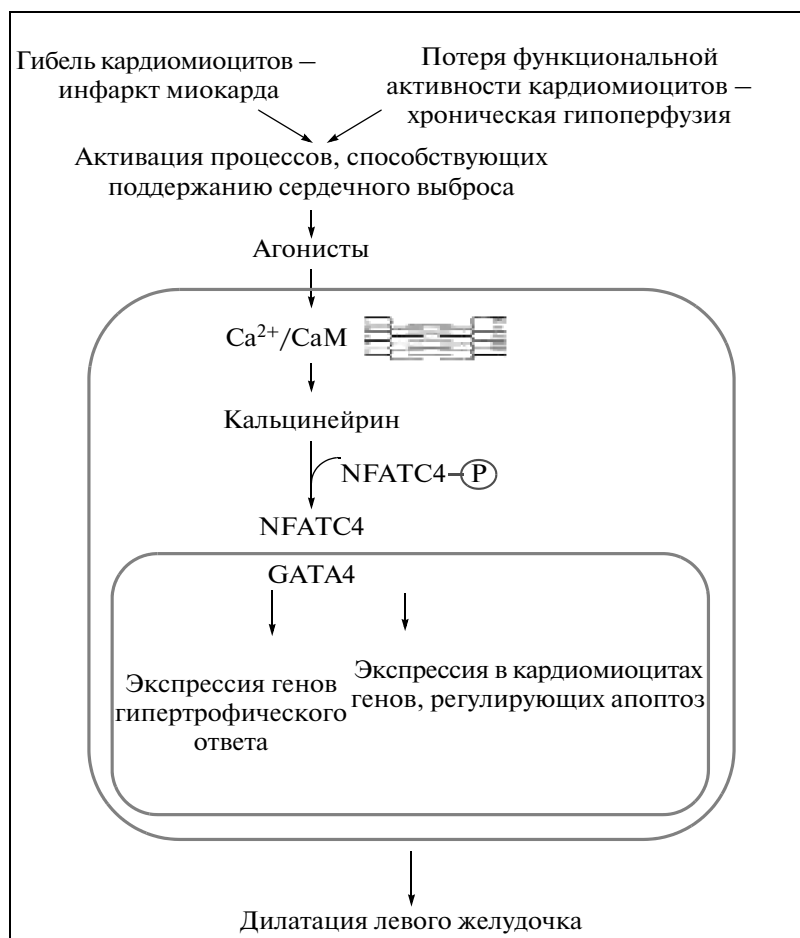
**Keywords:** ischemic heart disease, gene expression, calcineurin pathway genes, myocardium remodeling, left ventricular dilatation.

**DOI:** 10.7868/S0026898413030117

Изучение механизмов ремоделирования сердца вследствие острой и хронической ишемии миокарда позволяет разработать новые подходы к лечению больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и сердечной недостаточностью, а также стратегии профилактики этих заболеваний. “Ремоделирование сердца — это структурно-геометрические изменения левого желудочка (ЛЖ), включающие в себя процессы гипертрофии и дилатации, приводящие к изменению его геометрии и нарушению систолической и диастолической функции” (цит. по [1]). Ремоделирование, будучи адаптивным механизмом, поддерживающим сердечный выброс, со временем неотвратимо приводит к нарушению систолической и диастолической функции сердца [2]. В зависимости от провоцирующего фактора выделяют различные типы ремоделирования. Причиной ишемического ремоделирования служит гибель кардиомиоцитов при инфаркте или в условиях формирования зон хронической ишемии (гибернации) миокарда [2]. Постинфарктное ремоделирование ЛЖ включает дилатацию, которая, в свою очередь, играет важнейшую роль в развитии хронической сердечной недостаточности, а объем ЛЖ считается наиболее мощным предиктором выживаемости больных ИБС [3]. Существуют значительные индивидуальные различия в степени выраженности постинфарктного ремоделирования [4, 5], так дилатация ЛЖ развивается только у 42–46% больных, перенесших инфаркт миокарда [6, 7], а прогрессирующая дилатация — у 16–20% [7, 8]. В настоящее время очерчен спектр генов, участвующих в инициации и регуляции процесса ремоделирования сердца, что может быть важным для понимания патогенеза и разработки стратегии профилактики отдаленных последствий ИБС.

В качестве одного из путей развития гипертрофии и ремоделирования миокарда экспериментально хорошо изучен кальций-зависимый кальцинейриновый сигнальный путь. Вовлеченность кальцинейрина в процессы ремоделирования сердца впервые была показана Molkenkin et al. [9]. Кальцинейрин представляет собой  $Ca^{2+}$ -кальмодулинзависимую протеинфосфатазу — гетеродимер, состоящий из кальмодулинсвязывающей каталитической субъединицы, кальцинейрина А, и малой  $Ca^{2+}$ -связывающей регуляторной субъединицы, кальцинейрина В. Кальцинейрин А кодируется тремя различными генами — *PPP3CA* ( $\alpha$ -изоформа), *PPP3CB* ( $\beta$ -изоформа), *PPP3CC* ( $\gamma$ -изоформа) [10]. Кальцинейрин В кодируется генами *PPP3R1* и *PPP3R2* ( $\alpha$ - и  $\beta$ -изоформы). Активация кальцинейрина приводит к дефосфорилированию фактора транскрипции NF-AT3, который транслоцируется в клеточное ядро, где взаимодействует со специфическим для сердца фактором транскрипции GATA4 с мотивом цинковых пальцев и синергично с ним способствует активации генов гипертрофического ответа (таких, как *ANF* и *BNP* и др.) [9].

На рисунке представлена предполагаемая схема участия сигнального пути кальцинейрина в ишемическом ремоделировании ЛЖ. В ответ на потерю клеток миокарда или снижение их функциональной активности (что отмечается при инфаркте миокарда и хронической гипоперфузии мышцы сердца) запускаются процессы, направленные на поддержание сердечного выброса и нормализацию напряжения стенки желудочка [2]. Активируется ренин-ангиотензиновая система, формируется гипертрофия миокарда. Эти механизмы не всегда могут обеспечить нормализацию напряжения стенки ЛЖ, однако стимулы к дальнейшему ремоделированию сохраняются, проис-



Гипотетическая схема сигнального пути кальцинейрина в кардиомиоцитах при развитии ишемического ремоделирования.

ходит перерастяжение миокарда. На начальных этапах это поддерживает сердечный выброс, но в дальнейшем приводит к прогрессирующей потере кардиомиоцитов и дилатации ЛЖ [2].

В настоящее время установлено, что у мышей ген *GATA4* может регулировать процессы апоптоза и фиброза в миокарде [11, 12]. Фактор *GATA4* играет ключевую роль в выживаемости кардиомиоцитов, поскольку является активатором антиапоптотического гена *Bcl-x<sub>L</sub>* [13]. Кроме того, на кардиомиоцитах мыши показано, что *GATA4* – это основной регулятор ангиогенеза [13], который помогает поддерживать баланс между ростом миоцитов (гипертрофией) и снабжением питательными веществами (плотностью капилляров) [14]. Увеличенная экспрессия *GATA4* в кардиомиоцитах может усилить ангиогенез посредством секреции VEGFA. Фактор *GATA4* связывается и активирует промотор гена *VEGFA*.

В представленной работе проведено сравнительное изучение уровней экспрессии генов сигнального пути кальцинейрина – *PPP3CA*, *PPP3R1*, *PPP3CB*, *GATA4* и *NFATC4* – в миокарде больных с

разными стадиями ИБС, а также при постинфарктном ремоделировании и дилатации ЛЖ. Исследованы две группы больных ИБС: 1) больные с выраженной дилатацией ЛЖ (аневризма сердца), перенесшие хирургическое восстановление формы сердца; 2) больные ИБС с нормальной геометрией ЛЖ, перенесшие операцию по восстановлению снабжения сердца кровью (аортокоронарное шунтирование, АКШ).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обе группы больных перенесли хирургические операции. В первую группу вошли больные, которым была выполнена хирургическая реконструкция ЛЖ ( $n = 21$ ). Сердце у этих больных содержит участки нежизнеспособного миокарда и имеет большой объем ЛЖ. Контрольная группа состояла из больных, которым была выполнена операция АКШ ( $n = 34$ ). Больные обеих групп имели инфаркт миокарда в анамнезе: в группе с операцией АКШ – 82%; в группе с хирургическим восстановлением формы сердца – 100%. В табл. 1

представлена клиническая характеристика групп больных. Больные не отличались по возрасту, но статистически значимо различались практически по всем эхокардиографическим параметрам. Таким образом, больные, перенесшие операцию АКШ, имели более легкую стадию заболевания, которая не привела к дилатации ЛЖ в отличие от выборки больных, нуждающихся в хирургической реконструкции ЛЖ.

Во всех случаях операции шли на открытом сердце в условиях полной внутривенной анестезии и искусственной вентиляции легких. Хирургический доступ осуществляли через срединную стернотомию. После вскрытия полости перикарда выполнялась монокавальная канюляция. После введения раствора гепарина подключали аппарат искусственного кровообращения. Кардиоплегию выполняли раствором “Кустодиол” и дополняли местным охлаждением при помощи снежной кашицы. Аневризму ушивали по методу Дора [15].

Все больные дали информированное согласие на участие в исследовании. Образцы биопсии для изучения профиля экспрессии генов кальциевого пути брали во время операции из области ушка правого предсердия на этапе канюляции и подключения аппарата искусственного кровообращения. Образцы сразу же опускали в жидкий азот и хранили при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . мРНК из образцов миокарда выделяли с использованием набора TRIzol® Reagent (“Invitrogen”). кДНК получали на матрице мРНК при помощи реакции обратной транскрипции с использованием набора High capacity cDNA Reverse transcription Kit with RNase inhibitor (“Applied Biosystems”). На следующем этапе проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени (РВ-ПЦР) с помощью системы iCycler iQ (“BIO RAD”, США). Пробы метили красителем FAM, информация о

TaqMan-пробах представлена в табл. 2. Относительный количественный уровень экспрессии генов *PPP3CA*, *PPP3R1*, *PPP3CB*, *GATA4* и *NFATC4* определяли методом построения калибровочной кривой [16]. На каждый 96-луночный планшет кроме экспериментальных образцов наносили “калибраторный образец”, на основании которого строили калибровочную кривую. Этот образец представлял собой смесь нескольких образцов кДНК, полученных на РНК ткани миокарда больных, входящих в обе группы. Калибровочную кривую строили, проводя реакцию РВ-ПЦР с калибраторным образцом (использовали пять двукратных разведений этого образца). Уровень экспрессии анализировали согласно руководству для определения относительного уровня экспрессии генов, используя протокол РВ-ПЦР, разработанный фирмой “Applied Biosystems” [17]. Реакционная смесь (20 мкл) состояла из 4 мкл кДНК, набора реагентов TaqMan Gene Expression Assay (“Applied Biosystems”), содержащего специфические ПЦР-праймеры и 0.5 мкл TaqMan-пробы, 0.1 объема  $10\times$  буфера для ПЦР, 3 мкл 20 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 2 мкл 20 мМ смеси дезоксирибонуклеотидов, 0.5–1.0 ед. акт. Таq-ДНК-полимеразы (ЗАО “Бюсан”), воду, свободную от РНКаз (“Invitrogen”). Реакцию ОТ-ПЦР с каждым образцом проводили в трех повторностях одновременно. Уровень экспрессии генов в экспериментальных образцах нормировали по уровню мРНК гена домашнего хозяйства *GAPDH* по соотношению средних значений экспрессии (нг РНК) изучаемого гена и гена *GAPDH* согласно [19].

Кратность различий в уровне экспрессии в двух выборках оценивали, вычисляя отношение средних значений нормированных показателей уровня экспрессии каждого гена. Различия в уровне экспрессии в группах оценивали по критерию Манна–Уитни.

**Таблица 1.** Клиническая характеристика групп больных

Параметр	Опытная группа, хирургическое восстановление формы ЛЖ, $n = 21$	АКШ, контрольная группа, $n = 34$	$p$
Пол, муж, %	100	100	
Возраст, г	$53.1 \pm 7.8$	$54.5 \pm 8.0$	0.697
КДО, мл	$198.3 \pm 67.2$	$128.8 \pm 34.5$	0.00006
КСО, мл	$122.5 \pm 62.2$	$58.7 \pm 28.0$	0.00003
КДР, мм	$60.2 \pm 10.9$	$53.3 \pm 7.7$	0.031
КСР, мм	$46.6 \pm 12.5$	$36.1 \pm 7.3$	0.003
ФВ, %	$46.1 \pm 14.3$	$58.5 \pm 11.1$	0.004
МЖП, мм	$10.6 \pm 2.1$	$11.8 \pm 1.9$	0.043

Примечание. КДО – конечно-диастолический объем; КСО – конечно-систолический объем; ФВ – фракция выброса; КДР – конечный диастолический размер; КСР – конечный систолический размер; МЖП – межжелудочковая перегородка;  $p$  – уровень значимости. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами рассмотрены две выборки больных с разными стадиями заболевания. В выборке больных с выраженной дилатацией сердца (перенесших хирургическое восстановление формы ЛЖ) уровень экспрессии всех изученных генов, кодирующих компоненты сигнального пути кальцинейрина, был несколько ниже, чем у больных ИБС с более легкой стадией заболевания (перенесших операцию АКШ) (табл. 3). Статистически значимые различия между выборками выявлены только в случае двух генов из пяти: *PPP3CA* и *PPP3CB*. Уровень экспрессии гена *PPP3CA* был в 1.34 раза ( $p = 0.018$ ), а *PPP3CB* в 1.57 раза ( $p = 0.023$ ) ниже в группе больных с выраженной дилатацией сердца по сравнению с контрольной группой (больные с сохраненной формой ЛЖ). Таким образом, сниженный уровень экспрессии генов *PPP3CA* и *PPP3CB* в миокарде ушка правого предсердия, по-видимому, можно рассматривать в качестве маркера прогрессирования процессов ремоделирования ЛЖ.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В первую группу вошли больные, перенесшие хирургическую реконструкцию ЛЖ, целью которой было уменьшение объема и улучшение формы ЛЖ путем исключения несокращающегося сегмента. Контрольной группой служила выборка больных, которым проведена операция АКШ с целью восстановления кровоснабжения ишемизированного участка миокарда с помощью обходных путей (шунтов). Больные обеих групп статистически значимо различались практически по всем эхокардиографическим параметрам. Важно отметить, что такие эхокардиографические признаки, как конечно-диастолический объем, конечно-систолический объем, фракция выброса, являются диагностическими критериями ремоделирования сердца. Так, в многочисленных работах описана связь между увеличением конечно-систолического и конечно-диастолического объема ЛЖ, снижением его фракции выброса, связанных с постинфарктным ремоделированием, и развитием застойной сердечной недоста-

Таблица 2. Характеристика TaqMan-проб

Ген	Набор "Applied Biosystems", номер	Контекстная последовательность
<i>GATA4</i> , ген GATA-связывающего белка 4	Hs01034629_m1	ccgtgtcccagacgttctcagtcag
<i>NFATC4</i> , ген ядерного фактора активированных Т-клеток	Hs00190037_m1	ccctatctcaggacctctgccta
<i>PPP3CA</i> , ген протеинфосфатазы 3, каталитическая субъединица ( $\alpha$ -изоформа)	Hs00174223_m1	tggatttgatgggcaacagctgca
<i>PPP3CB</i> , ген протеинфосфатазы 3, каталитическая субъединица ( $\beta$ -изоформа)	Hs00236113_m1	gagaaaaagtgcagaaatgttgg
<i>PPP3R1</i> , ген протеинфосфатазы 3, регуляторная субъединица В ( $\alpha$ -изоформа)	Hs00168722_m1	gctcacacttgatgcggatgaaat
<i>GAPDH</i> , ген глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы	Hs99999905_m1	gggcgcctggtcaccagggctgctt

Примечание. Последовательности праймеров и проб наборов "Applied Biosystems" недоступны (являются коммерческой тайной). Контекстная последовательность — нуклеотидная последовательность, ближайшая к региону, с которым связывается проба.

Таблица 3. Уровень мРНК в миокарде больных

Ген	Уровень экспрессии в миокарде		$p$	Кратность различий
	хирургическое восстановление формы ЛЖ, $n = 21$	контроль, АКШ, $n = 34$		
<i>GATA4</i>	1.31 $\pm$ 0.59	1.61 $\pm$ 0.76	0.200	1.22
<i>NFATC4</i>	1.24 $\pm$ 0.69	1.49 $\pm$ 0.90	0.194	1.21
<i>PPP3CA</i>	1.77 $\pm$ 0.80	2.37 $\pm$ 0.95	<b>0.018</b>	1.34
<i>PPP3CB</i>	2.22 $\pm$ 2.02	3.48 $\pm$ 2.05	<b>0.023</b>	1.57
<i>PPP3R1</i>	1.39 $\pm$ 0.49	1.61 $\pm$ 0.71	0.239	1.16

Примечание.  $p$  — уровень значимости. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

точности. Кроме того, увеличение систолического и диастолического объемов ЛЖ тесно связано с выживаемостью как больных, перенесших острый инфаркт миокарда, так и при хронической сердечной недостаточности [18, 19].

Изучению профиля экспрессии генов сигнального пути кальциейрина при различных патологических условиях посвящен ряд работ, однако практически все они выполнены на различных модельных организмах или в системах *in vitro*. Нами показано, что уровень экспрессии генов *PPP3CA* и *PPP3CB*, кодирующих каталитическую субъединицу кальциейрина (кальциейрин А), у больных с выраженной дилатацией сердца в 1.3 и 1.6 раза ниже, чем в контрольной выборке больных с сохраненной формой ЛЖ. Эти результаты согласуются с результатами нескольких экспериментальных работ.

— С использованием генетической модели дилатационной кардиомиопатии у мышей показано, что кальциейрин играет цитопротекторную роль в миокарде, и более высокий уровень экспрессии его гена связан с улучшением функции сердца и уменьшением выраженности процессов ремоделирования [20].

— У мышей с делецией гена кальциейрина  $\beta$ , как показано в опытах с экспериментальной ишемией-реперфузией, значительно снижена жизнеспособность миокарда, повышена гибель кардиомиоцитов, нарушены функции сердца по сравнению с мышами дикого типа [21].

— Изучение экспрессии генов в миокарде больных, которым имплантировали устройство, поддерживающее работу ЛЖ (LVAD — Left ventricular assist device), показало, что при восстановлении функции сердца увеличивается уровень экспрессии гена *PPP3CA*, кодирующего каталитическую субъединицу кальциейрина [22].

Однако существуют данные, свидетельствующие о том, что в патологических условиях уровень экспрессии данных генов, напротив, может возрастать. Например показано, что с повышением класса сердечной недостаточности по классификации NYHA (согласно этой классификации больных делят на четыре функциональных класса в зависимости от переносимости физической нагрузки (I ФК — ограничений в физической активности нет; IV ФК — невозможно выполнять какие-либо нагрузки без появления дискомфорта [23]) возрастает уровень экспрессии мРНК генов *PPP3CA* и *PPP3CB* в миокарде [24]. Установлено, что при ремоделировании сердца, спровоцированного тахикардией, уровень экспрессии гена *PPP3CA* повышался в 1.99 раза на декомпенсированной стадии сердечной недостаточности по сравнению с контрольной группой животных [25]. Наряду с этим при сердечной недостаточности в пораженном миокарде человека увели-

чивается содержание активированного белка кальциейрина [26].

В нашей работе уровень экспрессии гена *PPP3RI* ингибиторной субъединицы кальциейрина В в ушке правого предсердия сердца не отличался статистически значимо в группах с аневризмой и с нормальной формой ЛЖ. Противоречивые данные получены также при изучении профиля экспрессии гена *PPP3RI*. На животных моделях установлено снижение уровня экспрессии гена кальциейрина В при ишемии миокарда. Так, согласно [27] уровень экспрессии гена кальциейрина В в ишемизированном миокарде был в 1.9 раза ниже, чем в неишемизированной ткани. У собаки с сердечной недостаточностью, вызванной экспериментальной тахикардией, уровень экспрессии *PPP3RI* был снижен в 0.44 раза. Подобная модель сердечной недостаточности по гемодинамическим, структурным и электрофизиологическим характеристикам воспроизводит процессы, происходящие при сердечной недостаточности у человека [28]. В то же время показано [29], что при дилатационной кардиомиопатии возрастает содержание белка кальциейрина В.

Нами определен уровень экспрессии гена GATA-связывающего белка 4 (GATA4) — одного из самых ранних факторов транскрипции, экспрессия которого начинается в эмбриональном периоде. GATA4 играет важнейшую роль в формировании сердца. Белок GATA4 содержит высококонсервативный ДНК-связывающий домен, состоящий из двух цинковых пальцев, которые связывают непосредственно элемент (A/T)GATA(A/G) в промоторах многих генов [30]. У млекопитающих *GATA4* экспрессируется в кардиомиоцитах на всем протяжении жизни и контролирует многие структурные и регуляторные гены в миокарде [31].

Мы не зафиксировали статистически значимых различий в уровне экспрессии генов *GATA4* и *NFATC4* у больных ИБС с выраженной дилатацией ЛЖ и с нормальной формой ЛЖ (табл. 3).

Однако в системах *in vitro* и на модельных животных показано, что экспрессия генов факторов транскрипции GATA4 и NFATC4 изменяется при разных типах ремоделирования сердца — при гипертрофии, ишемии миокарда, а также при сердечной недостаточности.

— В модели гипертрофии сердца *in vitro*, при которой неонатальные кардиомиоциты подвергались электрической стимуляции, наблюдали увеличение экспрессии мРНК гена *GATA4* [32].

— Обнаружено, что эпизоды ишемии и реперфузии у мышей снижают уровень экспрессии гена *GATA4* [33], а локальное повышение уровня экспрессии данного гена в пограничной зоне инфаркта приводит к улучшению функции ЛЖ и

уменьшению постинфарктного ремоделирования сердца [34].

– Снижение экспрессии гена *GATA4* в миокарде трансгенных животных ассоциировано с дилатацией сердца и сердечной недостаточностью [35].

– Значительное снижение уровня транскрипта *GATA4* в миокарде человека отмечено при сердечной недостаточности [36].

– Использование LVAD, устройства, поддерживающего работу ЛЖ, приводило к уменьшению уровня экспрессии гена *GATA4* [37].

– На модели постишемической сердечной недостаточности у мышей показано повышение уровня экспрессии *NFATC4*, что может быть связано с активацией иммунной системы и воспалением после инфаркта миокарда [38].

– В миокарде человека при дилатационной кардиомиопатии, которая характеризовалась реакцией воспаления в миокарде, уровень экспрессии гена *NFATC4* был в 1.6 раза выше, чем у здоровых индивидов [39].

При определении уровня экспрессии изучаемого гена необходимо нормировать уровень экспрессии по отношению к референсному гену/генам, которые выбирают в зависимости от особенностей ткани и условий эксперимента. Наиболее важный критерий подбора “хорошего” референсного гена – стабильный уровень его экспрессии в условиях “нормы” и “патологии”. Ограничением настоящего исследования является нормирование уровней экспрессии генов только по одному гену (ген “домашнего хозяйства” *GAPDH*). Нормирование по гену *GAPDH* распространено при изучении экспрессионных профилей в тканях миокарда, например, при сердечной недостаточности [40]. В последнее время установили, что контрольными генами, которые используются при изучении ткани миокарда, могут служить также гены *Rpl32* и *Pgk1* (рибосомный белок и фосфолипаза 1 соответственно) [40]. Показано также, что наиболее надежные результаты получают при использовании одновременно нескольких контрольных генов [41], что, однако, не всегда возможно из-за ограниченного количества исследуемой ткани. Эти данные необходимо учитывать при изучении уровней экспрессии генов сигнального пути кальцинейрина.

В представленной работе выявлены различия в уровне экспрессии двух генов сигнального пути кальцинейрина (*PPP3CA* и *PPP3CB*) в миокарде ушка правого предсердия при наличии аневризмы сердца (декомпенсированная стадия ИБС) и при более легкой степени заболевания без выраженной дилатации ЛЖ. Предпосылкой к изучению правого предсердия в нашей работе послужило предположение о том, что экспрессия генов в миокарде ушка правого предсердия может отражать состояние ЛЖ. Изучение гистоморфометри-

ческих показателей миокарда выявило существование статистически значимых связей между морфометрическими параметрами в ЛЖ и ушке правого предсердия [42]. Наиболее весомым аргументом для изучения именно этого отдела сердца стало то, что ушко правого предсердия наиболее доступно для дооперационной оценки степени повреждения миокарда [42]. Выявленные отличия в уровне экспрессии требуют, однако, дальнейшего изучения, так как возможно существование различий в уровне экспрессии генов в миокарде предсердий и миокарде желудочков [43].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-01814а) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры для инновационной России” (ГК №П713 от 12.08.2009).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васюк Ю.А. 2003. Возможности и ограничения эхокардиографического исследования в оценке ремоделирования левого желудочка при ХСН. *Сердечная недостаточность*. **4**, 107–110.
2. Бузиашвили Ю.И., Ключников И.В., Мелконян А.М., и др. 2002. Ишемическое ремоделирование левого желудочка (определение, патогенез, диагностика, медикаментозная и хирургическая коррекция). *Кардиология*. **42**, 88–95.
3. White H.D., Norris R.M., Brown M. A., et al. 1987. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. **76**, 44–51.
4. Katz A.M. 1990. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N. Engl. J. Med.* **322**, 100–110.
5. Бойцов С.А., Глухов А.А. Ильинский И.И. 1999. Ишемическая кардиомиопатия (обзор литературы). *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*. **99**, 39–44.
6. Gaudron P., Eilles C., Kugler I., et al. 1993. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation*. **87**, 755–763.
7. Jeremy R.W., Allman K.C., Bautovitch G., et al. 1989. Patterns of left ventricular dilation during the six months after myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **13**, 304–310.
8. Warren S.E., Royal H., Markis J.E., et al. 1988. Time course of left ventricular dilation after myocardial infarction: influence of infarct-related artery and success of coronary thrombolysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **11**, 12–19.
9. Molkentin J.D., Lu J.R., Antos C.L., et al. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. **93**, 215–228.
10. Wang M.G., Yi H., Guerini D., et al. 1996. Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21q22 and 2p16p15, respectively. *Cytogenet. Cell. Genet.* **72**, 236–241.

11. Bisping E., Ikeda S., Kong S.W., et al. 2006. GATA-4 is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 14471–14476.
12. Suzuki Y.J., Evans T. 2004. Regulation of cardiac apoptosis by the GATA4 transcription factor. *Life Sci*. **74**, 1829–1838.
13. Aries A., Paradis P., Lefebvre C., et al. 2004. Essential role of GATA4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 6975–6980.
14. Heineke J., Mannix Auger-Messier M., Xu J., et al. 2007. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J. Clin. Invest*. **117**, 3198–3210.
15. Dor V., Saab M., Coste P., Kornaszewska M., et al. 1989. Left ventricular aneurysm: a new surgical approach. *Thorac. Cardiovasc. Surg*. **37**, 11–19.
16. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., и др. 2009. ПЦР “в реальном времени”. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний.
17. Руководство для относительного определения уровня экспрессии генов, используя ПЦР в режиме реального времени. [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042380.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf).
18. White H.D., Norris R.M., Brown M.A., et al. 1987. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. **76**, 44–51.
19. Hammermeister K.E., DeRouen T.A., Dodge H.T. 1979. Variables predictive of survival in patients with coronary disease. Selection by univariate and multivariate analyses from the clinical electrocardiographic, exercise, arteriographic, and quantitative angiographic evaluations. *Circulation*. **59**, 421–430.
20. Heineke J., Wollert K.C., Osinska H., et al. 2010. Calcineurin protects the heart in a murine model of dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol*. **48**, 1080–1087.
21. Bueno O.F., Lips D.J., Kaiser R.A., et al. 2004. Calcineurin A $\beta$  gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circ. Res*. **9**, 91–99.
22. Hall J.L., Birks E.J., Grindle S., et al. 2007. Molecular signature of recovery following combination left ventricular assist device (LVAD) support and pharmacologic therapy. *Eur. Heart J*. **28**, 613–627.
23. Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю. 2000. К вопросу о классификации хронической сердечной недостаточности на рубеже веков. *Сердечная недостаточность*. **1**, 88–90.
24. Zhao Y., Wang J.-C., Wang M.-M. 2010. Relationship of calcineurin expression between T-lymphocyte and myocardium in patients with heart failure. *J. Geriatrics Cardiol*. **7**, 93–96.
25. Ojaimi C., Qanud K., Hintze T.H., et al. 2007. Altered expression of a limited number of genes contributes to cardiac decompensation during chronic ventricular tachycardia in dogs. *Physiol. Genomics*. **29**, 76–83.
26. Lim H.W., Molkentin J.D. 1999. Calcineurin and human heart failure. *Nat. Med*. **5**, 246–247.
27. Simkhovich B.Z., Marjoram P., Poizat C., et al. 2003. Age-related changes of cardiac gene expression following myocardial ischemia/reperfusion. *Arch. Biochem. Biophys*. **420**, 268–278.
28. Gao Z., Xu H., DiSilvestre D., et al. 2006. Transcriptional profiling of the canine tachycardia-induced heart failure model: global comparison to human and murine heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol*. **40**, 76–86.
29. Diedrichs H., Chi M., Boelck B., et al. 2004. Increased regulatory activity of the calcineurin/NFAT pathway in human heart failure. *Eur. J. Heart Fail*. **6**, 3–9.
30. Molkentin J.D. 2000. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. *J. Biol. Chem*. **275**, 38949–38952.
31. Pikkariainen S., Tokola H., Kerkelä R., et al. 2004. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc. Res*. **63**, 196–207.
32. Xia Y., McMillin J.B., Lewis A., et al. 2000. Electrical stimulation of neonatal cardiac myocytes activates the NFAT3 and GATA4 pathways and up-regulates the adenylosuccinate synthetase 1 gene. *J. Biol. Chem*. **275**, 1855–1863.
33. Suzuki Y.J., Nagase H., Day R.M., et al. 2004. Gata4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J. Mol. Cell Cardiol*. **37**, 1195–1203.
34. Bian J., Popovic Z.B., Benejam C., et al. 2007. Effect of cell-based intercellular delivery of transcription factor GATA4 on ischemic cardiomyopathy. *Circ. Res*. **100**, 1626–1633.
35. Oka T., Maillet M., Watt A. J., et al. 2006. Cardiac-specific deletion of GATA4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ. Res*. **98**, 837–845.
36. Zwadlo C., Borlak J. 2005. Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca<sup>2+</sup>-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. **207**, 244–256.
37. Hall J.L., Grindle S., Han X., et al. 2004. Genomic profiling of the human heart before and after mechanical support with a ventricular assist device reveals alterations in vascular signaling networks. *Physiol. Genomics*. **17**, 283–291.
38. Lachtermacher S., Esporcatte B.L., Montalvoro F., et al. 2010. Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure. *Braz. J. Med. Biol. Res*. **43**, 377–389.
39. Wittchen F., Suckau L., Witt H., et al. 2007. Genomic expression profiling of human inflammatory cardiomyopathy (DCMi) suggests novel therapeutic targets. *J. Mol. Med*. **85**, 257–271.
40. Brattelid T., Winer L.H., Levy F.O., et al. 2010. Reference gene alternatives to GAPDH in rodent and human heart failure gene expression studies. *BMC Mol. Biol*. **11**, 11–22.
41. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., et al. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. **3**, 1–12.
42. Казаков В.А., Гутор С.С., Суходоло И.В., и др. 2009. Корреляционные взаимосвязи гистоморфометрических показателей миокарда различных отделов сердца в норме и при хронической сердечной недостаточности. *Бюлл. сибирской медицины*. **3**, 43–48.
43. Barth A.S., Merk S., Arnoldi E., et al. 2005. Functional profiling of human atrial and ventricular gene expression. *Pflugers Arch*. **450**, 201–208.