

7. Shilov AM. [Sartans in the practice of primary care physicians in the treatment of hypertension]. Farmateka. 2014;9:17-21. Russian.

8. ACCORD Study Group. Effects of intensive blood pressure control in type 2 diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. 2010;362:1575-85.

Стаття надійшла до редакції
26.04.2016



УДК 616.126.5-007.2-056.7:577.218]-053.2

А.В. Каменщик,
О.М. Камышний *,
О.Г. Іванько **

ЭКСПРЕСИЯ ГЕНОВ НУКЛЕАРНОГО ФАКТОРА АКТИВОВАНИХ Т-КЛІТИН У ДІТЕЙ З ДВОСТУЛКОВИМ АОРТАЛЬНИМ КЛАПАНОМ СЕРЦЯ

*Запорізький державний медичний університет
кафедра госпітальної педіатрії
кафедра мікробіології, вірусології та імунології *
кафедра пропедевтики дитячих хвороб **
пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69000, Україна
Zaporizhzhya State Medical University
Department of hospital Paediatrics
Department of Microbiology, Virology and Immunology *
Department of propaedeutics of children diseases **
Mayakovski avenue, 26, Zaporizhzhya, 69000, Ukraine
e-mail: kamenshchik@mail.ru*

Ключові слова: двостулковий аортальний клапан, діти, доплерокардіографія, генна експресія, NFATC1, NFATC4

Key words: bicuspid aortic valve, children, dopplerocardiography, gene expression, NFATC1, NFATC4

Реферат. Экспрессия генов нуклеарного фактора активированных Т-клеток у детей с двухстворчатым аортальным клапаном сердца. Каменщик А.В., Камышний А.М., Іванько О.Г. Гены нуклеарного фактора активированных Т-клеток (NFATC) играют ключевую роль как в формировании клапанов сердца, так и в иммунном ответе. В экспериментальных моделях также показано, что данные гены, относящиеся к факторам транскрипции, могут приводить к развитию гипертрофии миокарда в постнатальном периоде. Целью данного исследования стало определение уровня экспрессии генов NFATC1 и NFATC4 в крови 30 детей с врожденными пороками сердца (ВПС). У 15 из этих детей был диагностирован двухстворчатый аортальный клапан (ДАК), у 15 – ВПС без клапанных аномалий, 15 условно здоровых детей составили группу контроля. У всех больных не отмечалось признаков сердечной недостаточности. На первом этапе исследования методом доплерокардиографии у детей с ДАК в сравнении с ВПС без клапанных аномалий и группой контроля было выявлено достоверное утолщение задней стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки. На втором этапе исследования было выявлено достоверное увеличение относительной нормализованной экспрессии гена NFATC1 у больных с ДАК при отсутствии достоверных различий в уровне экспрессии гена NFATC4 в указанных категориях детей. Таким образом, у детей с двухстворчатым аортальным клапаном сердца имеет место формирование ранней гипертрофии миокарда с изменением экспрессии генов нуклеарного фактора активированных Т-клеток при превалировании экспрессии NFATC1. Определение уровня экспрессии указанных генов в крови детей с ДАК может рассматриваться как ранний маркер прогрессирующей гипертрофии миокарда.

Abstract. Gene expression of nuclear factor of activated T-cells in children with bicuspid aortic valve. Kamenshchyk A.V., Kamyshny A.M., Ivanko O.G. *The genes of nuclear factor of activated T-cells (NFATC) play a key role both in heart valves formation and immune response. The genes belong to transcriptional factors and lead to myocardial hypertrophy in postnatal period that is confirmed by experimental models on animals. The purpose of this study was to reveal NFATC1 and NFATC4 genes expression level in the blood of 30 children with congenital heart diseases (CHD), 15 of them had bicuspid aortic valve, 15 had CHD without valve anomalies and 15 healthy children of the control group. No patients had signs of heart failure. At the first stage of Doppler heart ultrasound study a significant increase of the left ventricle posterior wall and ventricular septum thickness in comparison with CHD and control was revealed in BAV group. At the second stage a significant rise of relative normalized expression of NFATC1 in BAV children compared to CHD and control without differences in the expression of NFATC4 gene were established. Thus, in children with bicuspid aortic valve, formation of early myocardial hypertrophy with changes in nuclear factor of activated T-cells genes expression with prevailing of NFATC1 expression takes place. The detection of NFATC1 expression level in the blood of children could be considered as an early marker of progressive myocardial hypertrophy.*

Гени нуклеарного фактора активованих Т-клітин (*NFATC*), з одного боку, відомі своєю участю у формуванні клапанного апарату серця на етапі ембріогенезу і в реалізації імунної відповіді [4]. Ці гени представлені у вигляді 5 модифікацій (*NFATC1-NFATC5*), що належать до транскрипційних факторів та мають найбільший рівень експресії у хондроцитах, міоцитах, адипоцитах, кератиноцитах, ендотеліальних клітинах при диференціації та розвитку клапанів серця і судин, а також при гіпертрофічних реакціях кісток та серцевих м'язів [10]. З іншого боку, при імунних реакціях при участі цих генів відбувається активація Т-клітин після взаємодії їх з інтерлейкіном – 2. Вважають, що експресія відповідних генів щільно асоційована з імунною відповіддю [7]. Також була продемонстрована провідна роль *NFATC1* у розвитку стрес – індукованої гіпертрофії міокарда [5, 8, 9], а саме асоціації поліморфізмів *NFATC* із потовщенням стінки та відповідним збільшенням маси лівого шлуночка [3, 11]. Суттєве значення цього поліморфізму виявлено в розвитку патологічної спортивної гіпертрофії з асиметричним збільшенням лівих камер серця [2]. Підтвердження зазначених фактів має місце також і в експериментальних моделях [12]. Слід зазначити, що, на відміну від вивчення поліморфізмів, дослідження експресії цих генетичних маркерів при серцево-судинній патології в людини у зв'язку з певними труднощами забору біопсійного матеріалу можна зробити лише при проведенні оперативних втручань на серці, вони мають поодинокий характер та стосуються безпосередньо тканини міокарда [1].

Завдяки очікуваній високій пре- та постнатальній транскрипційній активності та системним ефектам щодо вальвулогенезу, імунорегуляції та розвитку патологічної гіпертрофії серця, можна вважати перспективним дослідження експресії генів нуклеарного фактора акти-

вованих Т-клітин, таких як *NFATC1* та *NFATC4*, у клітинах крові в якості маркерів ранніх міокардіальних змін у дітей з аномаліями серцевих клапанів.

Виходячи з вищенаведеного, метою нашого дослідження стало визначення рівнів відносної нормалізованої експресії генів *NFATC1* та *NFATC4* у крові хворих дітей з двостулковим аортальним клапаном серця.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для реалізації поставленої мети на першому етапі дослідження була проведена діагностика вроджених вад серця (ВВС) за допомогою ультразвукового доплерографічного дослідження серцевої гемодинаміки сканером “Medison – 8000” датчиком 2,5 МГц з визначенням стандартних ехокардіоскопічних параметрів у 45 дітей віком від 7 до 15 років, у 30 з яких мали місце ВВС. При цьому в 15 дітей був діагностований двостулковий аортальний клапан серця (ДАК). В інших 15 хворих, які склали групу порівняння, мали місце вроджені вади серця (ВВС), що не супроводжувалися аномаліями клапанного апарату. З них дефект міжпередсердної перетинки (ДМПП) спостерігався в 7 хворих, дефект міжшлуночкової – у 5, інфундібулярний стеноз вихідного тракту лівого шлуночка – в 1, коарктація аорти – в 1, стеноз легеневої артерії – в 1. У всіх цих 30 хворих не було виявлено ознак серцевої недостатності. Контрольну групу склали 15 умовно здорових дітей відповідного віку.

На другому етапі дослідження був визначений рівень експресії генів *NFATC1* та *NFATC4* у клітинах крові в зазначених 3 групах пацієнтів за допомогою виділення тотальної РНК з використанням набору «РНК-екстран» («Синтол», Росія). При цьому в 15 з них спостерігався двостулковий аортальний серцевий клапан (ДАК). РНК виділяли відповідно до протоколу до набору. Для проведення зворотної транскрипції й

отримання кДНК використовували набір ОТ-1 фірми "Синтол" (Росія). Для визначення рівня експресії досліджуваних генів використовували ампліфікатор CFX96™Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) і набір реактивів Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, США). Фінальна реакційна суміш для ампліфікації включала барвник SYBR Green, ДНК – полімераза Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase, по

0,2 мкл прямого і зворотного специфічних праймерів, 1 мкл матриці (кДНК). Реакційну суміш доводили до загального об'єму 25 мкл додаванням деіонізованої води. Специфічні пари праймерів (5'-3') для аналізу досліджуваних і референсного генів були підібрані за допомогою програмного забезпечення Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) та виготовлені фірмою Thermo Scientific, США (табл.).

Ген	Праймер	Температура плавлення (°C)	Довжина продукту ПЛР, (п.н.)	Екзон-екзонний стик
<i>NFATC1</i>	F: 5' TGCAAGCCGAATTCTCTGGT-3'	59,96	67	2412/2413
	R: 5' GAACGGGGCTGGTTATCCTC-3'	60,18		
<i>NFATC4</i>	F: 5' GGGGATTGGGGGAAGAAGT-3'	60,03	66	433/434
	R: 5' GCTCTCCCAAGGCCAGAC-3'	59,73		
<i>GAPDH</i>	F: 5' CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3'	59,83	63	165/166
	R: 5' CGATGTGGCTCGGCTGG-3'	60,58		

Після початкової денатурації протягом 10 хв при 95°C ампліфікація складалася з 45-50 циклів та проводилася за таких умов: денатурація - 95°C, 15 сек., відпал - 59-61°C, 30-60 сек., елонгація - 72°C, 30 сек. В якості референт - гена для визначення відносного значення зміни рівня експресії досліджуваних генів був використаний ген гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (GAPDH). Відносну нормалізовану кількість кДНК таргетних генів визначали за методом $\Delta\Delta C_t$ [6]. Статистичний аналіз даних ПЛР проводили за допомогою програмного забезпечення CFX Manager™ (Bio-Rad, США). Узагальнена статистична обробка матеріалу проводилася за допомогою стандартного програмного пакету Statistica 6.0

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При проведенні ультразвукового доплерокардіоскопічного дослідження в дітей з ДАК нами було виявлене достовірне збільшення товщини задньої стінки лівого шлуночка, порівняно як з групою хворих на ВВС без залучення клапанних аномалій (8,43±0,41 мм та 7,44±0,27 мм відповідно, $p<0,05$), так і з контрольною групою (8,43±0,41 мм та 7,21±0,27 мм відповідно, $p<0,05$). У той же час, у групі хворих на ВВС, що не супроводжувалися аномаліями серцевих клапанів, відмінності товщини задньої стінки лівого

шлуночка порівняно з контролем не були достовірними (7,44±0,27 мм та 7,21±0,27 мм відповідно, $p>0,05$). Така сама тенденція спостерігалась стосовно розмірів міжшлуночкової перетинки (8,44±0,41 мм та 7,23±0,28 мм, $p<0,05$; 7,44±0,23 мм та 7,23±0,28 мм, $p>0,05$ відповідно).

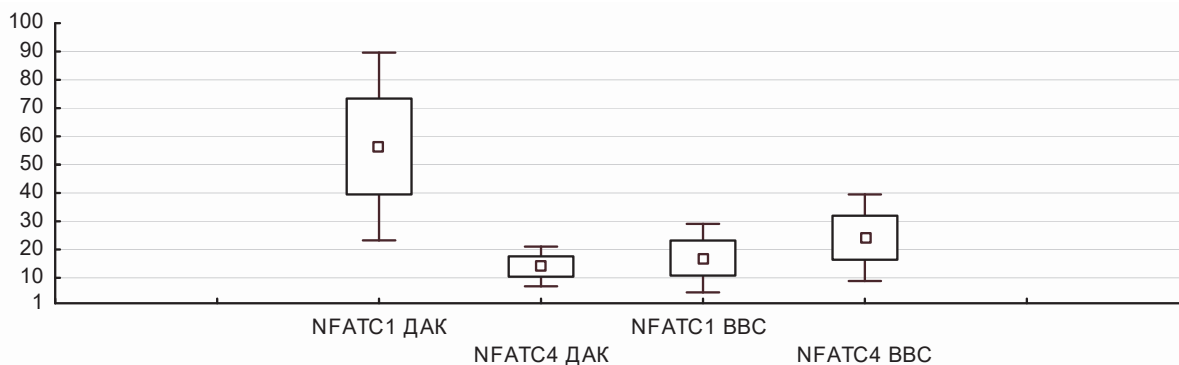
При визначенні відносної нормалізованої експресії у клітинах крові хворих обох досліджуваних груп виявилось, що вона значно перевищувала референтні значення в контрольній групі, які приймалися за базовий рівень, що дорівнював умовній одиниці експресії. Так, для гена *NFATC1* у дітей з ДАК та при так званих «неклапанних» ВВС відносна нормалізована експресія підвищувалася в 56 та 18 разів відповідно, а для гена *NFATC4*, відповідно, в 14 та 24 рази. Ці дані наведені на рисунку.

Як можна побачити на рисунку, при порівнянні відносної експресії генів *NFATC1* та *NFATC4* у двох вищезазначених групах хворих дітей було встановлено статистично достовірне збільшення рівня експресії *NFATC1* у дітей з ДАК (56,42±16,93 та 16,98±6,17 відповідно, $p<0,05$). У той же час, експресія *NFATC1* була в цій групі також достовірно вищою за експресію *NFATC4* (56,42±16,93 та 14,02±3,57, $p<0,05$). Водночас достовірних розбіжностей щодо відносної нормалізованої експресії *NFATC4* при порівнянні її в дітей з ДАК та при ВВС, що не супроводжувалися

аномаліями серцевих клапанів, отримано не було ($14,02 \pm 3,57$ та $24,17 \pm 7,80$ відповідно, $p > 0,05$).

Таким чином, у дітей з двостулковим аортальним клапаном серця, що перебігає без ознак серцевої недостатності, порівняно з хворими із вродженими вадами серця без залучення серцевих клапанів та в контрольній групі, мають місце потовщення задньої стінки лівого шлуночка та міжшлуночкової перетинки разом із значним збільшенням відносної експресії гена

NFATC1, що може бути підтвердженням формування ранньої гіпертрофії міокарда в цієї категорії хворих. З урахуванням того, що зазначені зміни експресійної активності мають місце в клітинах крові хворих, тобто відбуваються на системному рівні, можна також передбачати наявність певних мутацій цих генів, які впливають як на ембріогенетичне формування серцевих клапанів, так і на розвиток міокардіальної гіпертрофії.



Відносна нормалізована експресія генів NFATC у дітей із вродженими захворюваннями серця

ВИСНОВКИ

1. У дітей з двостулковим аортальним клапаном серця має місце гіпертрофія міокарда зі збільшенням товщини задньої стінки лівого шлуночка та міжпередсердної перетинки, яка не залежить від суттєвих змін внутрішньосерцевої гемодинаміки.
2. У дітей з двостулковим аортальним клапаном серця, що перебігає без ознак серцевої недостатності, має місце значне підвищення експресії у крові генетичного фактора *NFATC1*,

яка перевищує показники хворих з іншими вродженими вадами серця.

3. У дітей з двостулковим аортальним клапаном серця та при BBC без залучення серцевих клапанів відносна нормалізована експресія гена *NFATC4* за інтенсивністю не відрізняється.

4. Визначення відносної експресії фактора *NFATC1* у крові хворих дітей з двостулковим аортальним клапаном серця може розглядатись як ранній маркер прогресуючої гіпертрофії міокарда.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Половкова О.Г. Роль генів сигнального пути кальцинеурина в розвитку ремоделювання міокарда у больных ішемічної болєзнью сердца: автореф. дис. на соискание учен. степени канд. мед. наук: спец. 03.02.07 / Половкова О.Г. – Томск, 2013. – 23 с.
2. Клинико-генетические аспекты формирования «патологического спортивного сердца» у высококвалифицированных спортсменов / А.Г. Федотова, И.В. Астратенкова, Е.В. Линде [и др.] // Вестник спортивной науки. – 2009. – № 2. – С. 32-37.
3. Association of *NFATc1* gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population / L. Shen, Z.Z. Li, A.D. Shen, [et al.] // Chin. Med. J. – 2013. – Vol. 126, N 1. – P. 78-81.
4. Fernando Macian. Nfat proteins: key regulators of T-cell development and function / Fernando Macian // Nature Reviews. Immunology. – 2005. – N 5. – P. 472-484.
5. 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, Norway. Series of dissertations submitted to the Faculty of Medicine. Oslo, 2011. – N 1307.
6. Kenneth J. Livak. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method / Livak Kenneth J., Thomas D. Schmittgen // METHODS. – 2001. – Vol. 25. – P. 402-408.
7. *NFATc1*/ α A: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes / Edgar Serfling, Andris Avots, Stefan

Klein-Hessling, [et al.] // Cell Communication Signaling. – 2012. – P. 10:16.

8. NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice / S. de Frutos, E. Caldwell, C.H. Nitta [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2010. – Vol. 299, N 2. – H356-363.

9. NFATc3 is required for intermittent hypoxia-induced hypertension / S. de Frutos, L. Duling, D. Alò [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2008. – Vol. 294, N 5. – H2382-2390.

10. Partitioning the heart: Mechanisms of cardiac septation and valve development / C.J. Lin, C.Y. Lin,

C.H. Chen [et al.] // Development. – 2012. – Vol. 139. – P. 3277–3299.

11. Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy / O. Poirier, V. Nicaud, T. McDonagh [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2003. – Vol. 11, N 9. – P. 659-664.

12. Requirement of Nuclear Factor of Activated T-cells in Calcineurin-mediated Cardiomyocyte Hypertrophy. / Eva van Rooij, Pieter A. Doevendans Chiel C. de Theije, Fawzi A. Babiker [et al.] // J. Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277, N 50. – P. 48617.

REFERENCES

1. Polovkova OG. [The role of calcineurin signal pathway genes in myocardium remodeling of patients with ischemic heart disease]. Avtoref. cand. med. nauk. Tomsk. 2013;23. Russian.

2. Fedotova AG, Astratenkova IV, Linde EV, Ordzhonikidze ZG, Akhmetov II. [Clinical and genetic aspects of the "pathological athlete's heart" formation in highly skilled athletes]. Vestnik sportivnoy nauki. 2009;2:32-37. Russian.

3. Shen L, Li Z.Z, Shen A.D, Liu H, Bai S, Guo J, Yuan F, Li XF. Association of NFATc1 gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population. Chin Med J (Engl). 2013;126(1):78-81

4. Fernando Macian. Nfat proteins: key regulators of T-cell development and function. Nature reviews. Immunology. 2005;5:472-84.

5. 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;1307.

6. Kenneth J, Livak and Thomas D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. METHODS. 2001;25:402-8.

7. Edgar Serfling, Andris Avots, Stefan Klein-Hessling, Ronald Rudolf, Martin Vaeth and Friederike Berberich-Siebelt Cell Communication and Signaling NFATc1/ α A: The other Face of NFAT Factors in Lymphocytes. 2012;10:16.

8. de Frutos S, Caldwell E, Nitta CH, Kanagy NL, Wang J, Wang W, Walker MK, Gonzalez Bosc LV. NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2010;299(2):356-63.

9. de Frutos S, Duling L, Alò D, Berry T, Jackson-Weaver O, Walker M, Kanagy N, González Bosc L. NFATc3 is required for intermittent hypoxia-induced hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294(5):2382-90.

10. Lin CJ, Lin CY, Chen CH, Zhou B, Chang CP. Partitioning the heart: Mechanisms of cardiac septation and valve development. Development. 2012;139:3277-99.

11. Poirier O, Nicaud V, McDonagh T, Dargie HJ, Desnos M, Dorent R, Roizès G, Schwartz K, Tiret L, Komajda M, Cambien F. Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy. Eur J Hum Genet. 2003;11(9):659-64.

12. Eva van Rooij, Pieter A Doevendans, Chiel C de Theije, Fawzi A Babiker, Jeffery D Molkentin, Leon J. De Wind Requirement of Nuclear Factor of Activated T-cells in Calcineurin-mediated Cardiomyocyte Hypertrophy. The Journal Of Biological Chemistry. 2002;277(50):48617.

Стаття надійшла до редакції
06.05.2016

