

## РОЛЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ *HLA-DRB1\** В РАЗВИТИИ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

А.В. Цепочкина<sup>1</sup>, А.В. Шабалдин<sup>1</sup>, Н.А. Литвинова<sup>2</sup>, С.А. Шмулевич<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний", Кемерово

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Кемеровский государственный университет"

<sup>3</sup>Муниципальное бюджетное учреждение здравоохранения "Кемеровский кардиологический диспансер"  
E-mail: annasepokina@mail.ru

## THE ROLE OF POLYMORPHIC VARIANTS *HLA-DRB1\** IN DEVELOPMENT OF CONGENITAL HEART DISEASES

A.V. Tsepokina<sup>1</sup>, A.V. Shabaldin<sup>1</sup>, N.A. Litvinova<sup>2</sup>, S.A. Shmulevich<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo

<sup>2</sup>Kemerovo State University

<sup>3</sup>Kemerovo Cardiology Dispensary

Изучение факторов, влияющих на риск развития врожденных пороков сердца (ВПС), является актуальным для современной медицины. Поиску предикторов, которые вносят вклад в развитие ВПС, посвящено большое количество исследований, однако до сих пор эта проблема не решена до конца. В настоящей работе проанализирована взаимосвязь *HLA-DRB1\** и ВПС. В исследование включено 97 женщин и 59 мужчин, имеющих детей с ВПС. Проведено генотипирование методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР). В ходе исследования установлено, что аллели гена *HLA-DRB1 HLA-DRB1\*03* ( $p=0,0069$ ) и *HLA-DRB1\*11* ( $p=0,0036$ ) являются факторами риска. Таким образом, показано, что полиморфизм генов системы *HLA* оказывает значимое влияние на формирование ВПС.

**Ключевые слова:** врожденные пороки сердца, *HLA-DRB1\**, генотип, аллель.

Risk factors of congenital heart disease (CHD) remain unclear. Here we investigated the association of the polymorphisms within the *HLA-DRB1\** alleles and CHD. We recruited 97 females and 59 males who had children with CHD. Genotyping was performed by allele-specific polymerase chain reaction. *HLA-DRB1\*03* and *HLA-DRB1\*11* were associated with a high risk ( $p=0.0007$  and  $0.0036$ , respectively). We concluded that the polymorphisms of the *HLA* genes may be associated with CHD.

**Key words:** congenital heart disease, *HLA-DRB1\**, genotype, allele.

### Введение

ВПС являются наиболее распространенными среди всех врожденных дефектов и аномалий развития плода и новорожденного, а также одной из главных причин инвалидизации и смертности в детском возрасте [1]. ВПС относят к многофакторным заболеваниям, на развитие которых оказывают влияние как экзогенные, так и эндогенные факторы. Изучение составляющих данного заболевания является актуальным направлением медицины и биологии.

Известно, что реализация внутриутробного развития плода проходит за счет адекватной иммуно-нейроэндокринной перестройки матери [2], поэтому важно отметить роль генов главного комплекса гистосовместимости человека (major histocompatibility complex – МНС), белковые продукты которых играют важную роль в иммунной системе как матери, так и ребенка.

Известно, что в локусе МНС II класса находятся гены иммунного ответа, которые определяют характер, силу и

качество иммунного реагирования на все антигены экзо- и эндогенного происхождения. Молекулы МНС представлены на клеточной мембране лейкоцитов, и у человека МНС обозначается как HLA – human leukocyte antigen [3]. Основной функцией данных структур является участие в иммунных реакциях: распознавание чужеродного антигена, представление его иммунокомпетентным клеткам, а также участие в формировании антиген-специфической иммуносупрессии. HLA появляется на клетках плода и плаценты в ранние сроки эмбриогенеза. Показано, что формирование и вынашивание беременности рестриковано распознаванием материнским иммунным микроокружением аллоантигенов МНС (наследуемых от отца) на оплодотворенном яйце и эмбрионе [4]. Помимо всего этого, HLA комплекс отвечает за поддержание генетического разнообразия человека как в перинатальном, так и в постнатальном периоде. Система HLA имеет несколько локусов, определяющих предрасположенность или устойчивость к той или иной патологии. Основные маркеры расположены в локусе *HLA-DR*, который имеет

463 аллельных варианта [5]. *HLA-DRB1* – ген, кодирующий молекулы HLA, располагается на коротком плече 6-й хромосомы в положении 21.3 и обладает высокой полиморфностью. На сегодняшний день описано 14 групп аллелей *HLA-DRB1*, ассоциированных с некоторыми аутоиммунными заболеваниями, а также с репродуктивными нарушениями как у женщин, так и у мужчин [6, 7]. Помимо этого данные гены также принимают участие в патогенезе заболеваний.

На сегодняшний день нет данных о вкладе гена *HLA-DRB1\** в развитие ВПС, но есть небольшое количество исследований, посвященных изучению участия данного гена в патогенезе других заболеваний. Таким образом, можно сделать вывод о том, что изучение влияния *HLA-DRB1\** на риск развития ВПС является актуальным, поскольку нет единого мнения о влиянии того или иного фактора на возникновение ВПС.

Цель исследования: определение роли полиморфных вариантов *HLA-DRB1\** в развитии ВПС.

## Материал и методы

Исследование проводили на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (Кемерово), оно было одобрено локально-этическим комитетом НИИ. Все участники эксперимента подписали информированное согласие на участие. В исследуемую группу были включены 97 женщин и 59 мужчин, имеющих детей с ВПС. Контрольную группу составили 54 женщины и 98 мужчин, которые имели детей без ВПС и были сопоставимы с опытной группой по возрасту. Средний возраст женщин опытной и контрольной групп составил 26 (18–48) [Me (25–75% перцентили)] лет и 23 (17–35) года соответственно, мужчин – 27 (19–53) и 25 (18–40) лет соответственно. Пять миллилитров цельной периферической венозной крови собирали в пробирку с ЭДТА. Геномную ДНК выделяли из цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции по протоколу.

Определяли частоту встречаемости 14 аллелей гена *HLA-DRB1* (*HLA-DRB1\*01*; *HLA-DRB1\*03*; *HLA-DRB1\*04*; *HLA-DRB1\*07*; *HLA-DRB1\*08*; *HLA-DRB1\*09*; *HLA-DRB1\*10*; *HLA-DRB1\*11*; *HLA-DRB1\*12*; *HLA-DRB1\*13*; *HLA-DRB1\*14*; *HLA-DRB1\*15*; *HLA-DRB1\*16*; *HLA-DRB1\*17*).

Генотипирование проводили методом полимеразно-цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени наборами компании «ДНК–технология», при помощи детектирующего ам-

плификатора DT-96 (ДНК–технология, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Контроль качества генотипирования проводили посредством повторного генотипирования 10% образцов. Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ STATISTICA 10.0. Анализ гендерно-возрастных характеристик проводили при помощи описательных статистик [медиана (25 и 75 перцентили)]. Равновесие Харди-Вайнберга определяли при помощи критерия хи-квадрат Пирсона. Для оценки риска вычисляли относительный риск (RR) и 95%-й доверительный интервал (CI) для RR. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Таблица 1

### Сравнительная характеристика частот распределения аллелей *HLA-DRB1* у женщин

Аллель	Группы				p	RR (CI 95%)
	Группа исследования, n=194		Группа сравнения, n=108			
	Абс.	%	Абс.	%		
<i>HLA-DRB1*01</i>	20	0,10	17	0,16	0,231	0,61 (0,24–1,57)
<i>HLA-DRB1*03</i>	22	0,11	2	0,01	0,0069	5,56 (2,16–14,2)
<i>HLA-DRB1*04</i>	23	0,12	21	0,19	0,104	0,56 (0,21–1,43)
<i>HLA-DRB1*07</i>	18	0,09	11	0,10	1	0,89 (0,34–2,27)
<i>HLA-DRB1*08</i>	6	0,04	9	0,08	0,083	0,36 (0,13–0,90)
<i>HLA-DRB1*09</i>	2	0,01	1	0,01	0,603	0,93 (0,36–2,38)
<i>HLA-DRB1*10</i>	5	0,03	0	0	0,22	6,30 (2,45–16,14)
<i>HLA-DRB1*11</i>	30	0,15	4	0,04	0,0036	4,31 (1,67–11,03)
<i>HLA-DRB1*12</i>	4	0,02	8	0,07	0,048	0,28 (0,10–0,71)
<i>HLA-DRB1*13</i>	30	0,15	14	0,13	0,671	1,21 (0,47–3,09)
<i>HLA-DRB1*14</i>	3	0,02	0	0	0,488	3,97 (1,54–10,16)
<i>HLA-DRB1*15</i>	26	0,13	18	0,17	0,54	0,77 (0,30–1,97)
<i>HLA-DRB1*16</i>	5	0,03	3	0,03	0,79	0,87 (0,34–2,24)

Примечание: n – количество аллелей, p – уровень значимости, RR – относительный риск.

Таблица 2

### Сравнительная характеристика частот распределения аллелей *HLA-DRB1* у мужчин

Аллель	Группы				p	RR (CI 95%)
	Группа исследования, n=118		Группа сравнения, n=196			
	Абс.	%	Абс.	%		
<i>HLA-DRB1*01</i>	14	0,12	31	0,16	0,42	0,73 (0,282–1,887)
<i>HLA-DRB1*03</i>	10	0,08	0	0	0,0001	38,03 (14,68–98,41)
<i>HLA-DRB1*04</i>	19	0,16	25	0,13	0,50	1,31 (0,509–3,41)
<i>HLA-DRB1*07</i>	18	0,15	12	0,06	0,0006	4,53 (1,744–11,755)
<i>HLA-DRB1*08</i>	5	0,04	6	0,03	0,82	1,42 (0,54–3,67)
<i>HLA-DRB1*09</i>	0	0	2	0,01	0,70	0,33 (0,127–0,850)
<i>HLA-DRB1*10</i>	2	0,02	4	0,02	0,84	0,92 (0,35–2,37)
<i>HLA-DRB1*11</i>	12	0,10	27	0,14	0,44	0,72 (0,25–1,72)
<i>HLA-DRB1*12</i>	2	0,02	3	0,02	0,72	1,19 (0,458–3,071)
<i>HLA-DRB1*13</i>	13	0,11	26	0,13	0,68	0,82 (0,318–2,131)
<i>HLA-DRB1*14</i>	4	0,04	7	0,06	0,82	0,99 (0,384–2,570)
<i>HLA-DRB1*15</i>	15	0,13	22	0,11	0,82	1,16 (0,449–3,006)
<i>HLA-DRB1*16</i>	3	0,02	9	0,04	0,53	0,60 (0,231–1,548)
<i>HLA-DRB1*17</i>	1	0,01	18	0,09	0,0058	0,12 (0,047–0,317)

Примечание: n – количество аллелей, p – уровень значимости, RR – относительный риск.

## Результаты и обсуждение

В результате исследования установлено, что у женщин, имеющих детей с ВПС, в генотипе значимо чаще встречались аллели *HLA-DRB1\*03* ( $p=0,0069$ ) и *HLA-DRB1\*11* ( $p=0,0036$ ) гена *HLA-DRB1* по сравнению с женщинами контрольной группы (табл. 1). Величина относительного риска (RR) аллелей *HLA-DRB1\*11* и *HLA-DRB1\*03* составила 4,31 и 5,56 соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные аллели ассоциированы с повышенным риском развития ВПС.

Напротив, аллель *HLA-DRB1\*12* имел значение RR, равное 0,28, что говорит о протективной роли данного аллеля в отношении данной патологии.

При анализе аллелей у мужчин было показано, что значимо чаще встречались только два аллеля из всех представленных, а именно: *HLA-DRB1\*03* ( $p=0,0001$ ) и *HLA-DRB1\*07* ( $p=0,0006$ ), таблица 2. Показатели относительного риска (RR) у данных аллелей были равны 38,03 и 4,53 соответственно, что указывает на предрасполагающую роль этих аллелей в развитии ВПС.

Полученные в нашем исследовании данные о взаимосвязи аллелей *HLA-DRB1* с формированием ВПС не имеют аналогов в современной научной литературе. В предыдущих исследованиях [8, 9] было показано, что аллель *HLA-DRB1\*03* ассоциирован с аутоиммунными заболеваниями, такими как рассеянный склероз ( $OR=2,8$ ;  $P_{\text{cor}}=0,0029$ ) [10], системная красная волчанка, сахарный диабет и тиреоидит Хашимото [11]. Ряд авторов [12] показали, что аллель *HLA-DRB1\*11* был ассоциирован с тиреоидитом Хашимото и ювенильным ревматоидным артритом. На сегодняшний день есть данные о том, что аллель *HLA-DRB1\*07* вносит вклад в развитие сахарного диабета I типа и болезни Грейвса [13].

При этом отдельные авторы показывают как положительную ( $RR=9,2$ ), так и отрицательную ( $RR=0,9$ ) связь аллелей *HLA-DRB1\*04* и *HLA-DRB1\*01* с сахарным диабетом I типа, спонтанными абортными и привычным невынашиванием [5, 14]. Другие исследователи доказывают ассоциации аллеля *HLA-DRB1\*15* с развитием рассеянного склероза, злокачественной анемии и системной красной волчанки [15, 16].

**Ограничение исследования.** Данное исследование включает ограниченную выборку женщин и мужчин, как имеющих детей с ВПС, так и контрольной группы. Полученные в пилотном исследовании результаты не могут с высокой степенью достоверности быть перенесены на всю популяцию в целом. Тем не менее, полученные данные, подтвержденные статистическими методами, являются социально значимыми для региона, что определяет необходимость расширения контрольной и опытной групп.

## Литература

1. Marcin M.G., Skiadzien T., Skalski J.H. The impact of environmental factors on the occurrence of congenital heart disease in the form of hypoplastic left heart syndrome // *Kardiologia i Torakochirurgia Polska*. – 2015. – Vol. 12(3). – P. 204–207.
2. Иванов Д.О., Петренко Ю.В., Шемякина О.О., Фот А.Ю. Анализ антенатальных факторов риска формирования вро-

жденных пороков внутренних органов у детей // *Бюл. Федерального Центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова*. – 2012. – Т. 1. – С. 66–72.

3. Галактионов В.Г. Иммунология. – М.: Академия, 2004. – 528 с.
4. Шабалдин А.В. Иммуногенетические аспекты раннего онтогенеза: автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Челябинск, 2004. – 44 с.
5. Алексеев Л.П., Дедов И.И., Хаитов Р.М. и др. Клиническая значимость определения *HLA-DRB1*-генотипов, ассоциированных с предрасположенностью или устойчивостью к сахарному диабету 1 типа, в различных этнических группах России // *Сах. диабет*. – 2007. – Т. 10, № 2. – С. 2–5.
6. Айрапетов Д.Ю., Ординец И.М., Побединская О.С. Аллоиммунный механизм привычного невынашивания беременности // *Пробл. репродукции*. – 2010. – Т. 1. – С. 86–88.
7. Киселева А.Н., Зайцева Г.А., Исаева Н.В. и др. Особенности полиморфизма генов системы *HLA* при нарушениях процессов репродукции // *Вестн. акуш.-гин.* – 2014. – № 3. – С. 16–19.
8. Титович Е.В., Кураева Т.Л., Прокофьев С.А. и др. *HLA*-гаплотипы, аутоантитела к-клеткам: роль в прогнозировании сахарного диабета 1 типа (результаты 11-летнего наблюдения) // *Сах. диабет*. – 2010. – № 4. – С. 12–17.
9. Дядык А.И., Багрий А.Э., Ракитская И.В. и др. Системная красная волчанка: некоторые вопросы этиологии и патофизиологии // *Укр. ревматол. журнал*. – 2009. – № 2. – С. 61–66.
10. Michalik J., Cierny D., Kantorova E. et al. The association of *HLA-DRB1* and *HLA-DQB1* alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population. – *Neurol. Res.* – 2016. – P. 1–8.
11. Lee H.J., Li C.W., Hammerstad S.S. et al. Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: A comprehensive review // *J. Autoimmun.* – 2015. – Vol. 64. – P. 82–90.
12. Singh S., Bhattad S., Danda D. Genetics of juvenile idiopathic arthritis // *Int. J. Rheum. Dis.* – 2014. – Vol. 17(3). – P. 233–236.
13. Wongsurawat T., Nakkuntod J., Charoenwongse P. et al. The association between *HLA* class II haplotype with Graves' disease in Thai population // *Tissue Antigens*. – 2006. – Vol. 67(1). – P. 79–83.
14. Гордеева Л.А., Шабалдин А.В., Глушков А.Н. Ассоциация *HLA-DRB1* с репродуктивной патологией у женщин // *Мед. иммунология*. – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 643–648.
15. Masterman T., Ligens A., Olsson T. et al. *HLA-DR15* is associated with lower age at onset in multiple sclerosis // *Ann. Neurology*. – 2000. – Vol. 48(2). – P. 211–219.
16. Marchini M., Antonioli R., Lleo A. et al. *HLA* class II antigens associated with lupus nephritis in Italian SLE patients // *Human Immunology*. – 2003. – Vol. 64(4). – P. 462–468.

Поступила 18.02.2016

## Сведения об авторах

**Цепочкина Анна Викторовна**, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины ФГБНУ «НИИ КПССЗ».

Адрес: 652002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: annacepokina@mail.ru.

**Шабалдин Андрей Владимирович**, докт. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «НИИ КПССЗ».

Адрес: 652002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: Weit2007@yandex.ru.

**Литвинова Надежда Алексеевна**, докт. биол. наук, профессор кафедры физиологии человека и безопасности жизне-

деятельности ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет».

Адрес: г. Кемерово, ул. Красная, 6.

E-mail: Litvinca@kemsu.ru.

**Шмулевич Светлана Александровна**, заведующая отделением детской кардиологии МБУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер».

Адрес: 652002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

E-mail: smulsa@kemcardio.ru.

УДК 616.124.6-007.21:616-074

## СЕРДЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ У ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНО ЕДИНСТВЕННЫМ ЖЕЛУДОЧКОМ СЕРДЦА. УРОВЕНЬ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ ФОНТЕНА С ЭКСТРАКАРДИАЛЬНЫМ КОНДУИТОМ

А.А. Тупикина<sup>1</sup>, И.В. Плотникова<sup>1</sup>, И.А. Ковалев<sup>1,2</sup>, Л.И. Свинцова<sup>1</sup>, О.С. Янулевич<sup>1</sup>, Е.В. Кривошеков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт кардиологии», Томск

<sup>2</sup>Обособленное структурное подразделение Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. акад.

Ю.Е. Вельтищева», Москва

E-mail: anna\_tupikina@mail.ru

## HEART FAILURE IN CHILDREN WITH SINGLE VENTRICLE. LEVEL OF BIOCHEMICAL MARKERS AFTER FONTAN PROCEDURE WITH EXTRACARDIAC CONDUIT

A.A. Tupikina<sup>1</sup>, I.V. Plotnikova<sup>1</sup>, I.A. Kovalev<sup>1,2</sup>, L.I. Svintsova<sup>1</sup>, O.S. Yanulevich<sup>1</sup>, E.V. Krivoshchekov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute for Cardiology», Tomsk

<sup>2</sup>Separated Structural Subdivision of the State Budget Institution of Higher Professional Education «Russian National Research Medical University n.a. N.I. Pirogov» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Scientific Research Institute of Clinical Pediatrics n.a. acad. Yu. E. Veltishchev, Moscow

Цель: оценить биохимические маркеры повреждения миокарда, эндотелиальной дисфункции и сердечной недостаточности (СН) у детей с функционально единственным желудочком сердца (ФЕЖС) через год после тотального cavoпюльмонального соединения (ТКПС) и их корреляционные взаимосвязи с показателями гемодинамики до выполнения ТКПС. Материал и методы. В исследование были включены 29 пациентов в возрасте от 3 до 16 лет с ФЕЖС после ТКПС с экстракардиальным кондуитом через год после выполнения операции. Средний возраст пациентов – 7,7 лет±3,6 мес. Все пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от функционального класса (ФК) СН. Первая группа (ФК I) представлена 13, 2-я (ФК II) – 16 пациентами. Всем пациентам проведено комплексное обследование: электрокардиография (ЭКГ), холтеровское мониторирование (ХМ) ЭКГ, эхокардиография (ЭхоКГ), определены биохимические маркеры: мозговой натрийуретический пептид (BNP), концевой фрагмент мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP), предсердный натрийуретический пептид (ANP), белок, связывающий жирные кислоты (БСЖК), эндотелин-1, метаболиты оксида азота (NO). Медиана NT-proBNP была повышена во 2-й группе наблюдения [123,9 пг/мл (IQR: 52,9–370,5)]. Уровень BNP, превышающий норму, был выявлен у 27 детей (93,1%) через год после операции Фонтена. Показатели медианы BNP были повышены в 1 и 2-й группах наблюдения [204 пг/мл (IQR:129–355) и 211 пг/мл (IQR:92–327) соответственно]. Медиана уровня эндотелина-1 превышала нормативные значения в обеих группах (44,4 (IQR: 14–100,3) и 42,3 (IQR: 6,2–155,8)). Была получена прямая корреляционная зависимость между уровнем NT-proBNP в крови через год после операции ТКПС и уровнем среднего давления в легочной артерии до ее выполнения ( $r=0,54$ ;  $p=0,04$ ). Уровень нитрита азота у всех пациентов превышал нормальные значения. Были получены достоверно более высокие показатели медианы нитрата азота во 2-й группе наблюдения [22,52 (IQR: 31,47–28,95) и 27,94 (IQR: 19,84–45,51) соответственно],  $p=0,04$ . При индивидуальном анализе уровень нитрата азота соответствовал нормальным значениям лишь у одного пациента с ФК II, при этом уровень нитрита азота был повышен у всех пациентов. Заключение. Уровень BNP и NT-proBNP у большинства пациентов с ФЕЖС (82,8%) через год после ТКПС в крови превышал пороговые значения. Чем выше уровень давления в ЛА до проведения операции ТКПС, тем выше уровень NT-proBNP через год после ее проведения ( $p=0,04$ ).

**Ключевые слова:** функционально единственный желудочек сердца, сердечная недостаточность, эндотелиальная дисфункция, повреждение миокарда, тотальное cavoпюльмональное соединение.

The aim of the study was to assess biochemical markers of myocardial injury, endothelial dysfunction, and heart failure (HF) in children with single ventricle (SV) a year after total cavopulmonary connection (TCPC) and to determine correlations