

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-4-12-21

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА КАЛЬЦИЯ С РИСКОМ ТЯЖЕЛОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ КСЕНОАОРТАЛЬНЫХ БИОПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА, ИМПЛАНТИРОВАННЫХ В МИТРАЛЬНУЮ ПОЗИЦИЮ

ПОНАСЕНКО А.В.¹, КУТИХИН А.Г.¹, ХУТОРНАЯ М.В.¹, РУТКОВСКАЯ Н.В.¹, ЦЕПОКИНА А.В.¹, КОНДЮКОВА Н.В.¹, ЮЖАЛИН А.Е.², БАРБАРАШ Л.С.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

²Кафедра онкологии, Оксфордский институт радиационной онкологии, Оксфордский университет, г. Оксфорд, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии

ORIGINAL RESEARCH

RS13290979 POLYMORPHISM WITHIN NOTCH1 GENE IS ASSOCIATED WITH SEVERE BIOPROSTHETIC MITRAL VALVE CALCIFICATION

ANASTASIA V. PONASENKO¹, ANTON G. KUTIKHIN¹, MARIA V. KHUTORNAYA¹, NATALIA V. RUTKOVSKAYA¹, ANNA V. TSEPOKINA¹, NATALIA V. KONDYUKOVA¹, ARSENIY E. YUZHALIN², LEONID S. BARBARASH¹

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002), Russian Federation

²CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, University of Oxford (Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive, Oxford, OX3 7DQ), United Kingdom

Резюме

Цель. Тяжелая кальцификация ксеноортальных биопротезов клапанов сердца, имплантированных в митральную позицию, часто ведет к функциональной недостаточности биопротеза и является важной проблемой в сердечно-сосудистой хирургии. К сожалению, до настоящего времени практически отсутствуют работы, посвященные генетической восприимчивости к тяжелой кальцификации таких биопротезов. Данная работа была проведена с целью оценить связь полиморфизмов генов метаболизма кальция с риском тяжелой кальцификации ксеноортальных биопротезов клапанов сердца, имплантированных в митральную позицию.

Материалы и методы. В исследование было включено 124 пациента, подвергшихся операции по замене митрального клапана (62 с функциональной недостаточностью протезного клапана вследствие его тяжелой кальци-

кации и 62 с нормальным функциональным состоянием биопротеза). Всего было оценено восемь полиморфизмов в пяти генах: rs13290979 (ген *NOTCH1*), rs731236 и rs2228570 (ген *VDR*), rs1042636 (ген *CASR*), rs3134069, rs2073618, rs3102735 (ген *OPG*) и rs1801197 (ген *CALCR*). Генотипирование проводилось по технологии TaqMan (аллель-специфичная полимеразная цепная реакция с флюоресцентной детекцией результата в реальном времени). Статистический анализ проводился в программе SNPStats с расчетом отношения шансов согласно пяти моделям наследственности (кододоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Поправка на множественные сравнения проводилась с использованием средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR).

Результаты. Генотип G/G полиморфизма rs13290979 гена *NOTCH1*, кодирующего одно-

именный рецептор, был ассоциирован с почти трехкратно повышенным риском тяжелой кальцификации ксеноаортальных биопротезов клапанов сердца, имплантированных в митральную позицию, в сравнении с генотипами A/A и A/G. Генотипы других изученных полиморфизмов не были статистически значимо ассоциированы с вероятностью возникновения данной патологии.

Заключение. Полиморфизмы генов метаболизма кальция (в частности, гена *NOTCH1*) могут обуславливать генетическую восприимчивость к тяжелой кальцификации биопротезов клапанов сердца.

Ключевые слова: биопротезы клапанов сердца, кальцификация, метаболизм кальция, *NOTCH1*, генетическая восприимчивость.

Abstract

Aim. Bioprosthetic mitral valves frequently undergo severe calcification causing bioprosthetic valve failure, an urgent problem in cardiovascular surgery. However, no research have been performed on genetic susceptibility to severe bioprosthetic mitral valve calcification. Here we assessed whether inherited variation in genes of calcium metabolism is associated with severe bioprosthetic mitral valve calcification.

Materials and Methods. We recruited 124 consecutive patients who underwent mitral valve replacement surgery. We assessed eight polymorphisms within the five genes: rs13290979 (*NOTCH1* gene), rs731236 and rs2228570 (*VDR* gene), rs1042636 (*CASR* gene), rs3134069, rs2073618, rs3102735 (*OPG* gene) and rs1801197 (*CALCR* gene). Genotyping was carried out in 96-well format using the TaqMan SNP genotyping assay. Statistical analysis was performed utilizing

the SNPStats software, with the calculation of the odds ratio according to codominant, dominant, recessive, overdominant, and log-additive models of inheritance. Adjustment for multiple comparisons was conducted using false discovery rate.

Results. G/G genotype of the rs13290979 polymorphism within the *NOTCH1* gene was associated with 2.75-fold increased risk of severe bioprosthetic mitral valve calcification compared to the A/A and A/G genotypes. Other genotypes did not show a significant association with this condition.

Conclusions. Polymorphisms within the calcium metabolism genes (e.g., *NOTCH1* gene) may be associated with severe bioprosthetic mitral valve calcification.

Keywords: bioprosthetic heart valves, calcification, calcium metabolism, *NOTCH1*, genetic susceptibility.

◀ English

Введение

Кальцификация митрального клапана, способствующая развитию воспалительного процесса и депонированию липидов в экстрацеллюлярном матриксе, статистически значимо связана с классическими факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и с высокой вероятностью предшествует приобретенным порокам митрального клапана [1, 2]. Эффективное лечение митрального стеноза и митральной недостаточности на поздней стадии требует проведения достаточно инвазивной и технически сложной операции по протезированию митрального клапана [1]. Однако широко применяемые с этой целью ксеноаортальные биопротезы клапанов сердца при имплантации в митральную позицию у ряда пациентов также подвергаются тяжелой кальцификации, приводящей к недостаточности протезного клапана, которая, в свою очередь, требует выполнения повторной операции по замене протеза [1].

Было показано, что кальцификация митрального клапана часто встречается у членов одной и той же семьи [3], однако при этом практически неизвестны геномные маркеры кальцификации и нативных клапанов сердца, и их биопротезов [4]. Идентификация таких маркеров, несомненно, может способствовать пониманию механизмов развития этой патологии и разработке новых методов стратификации риска и лечения приобретенных пороков митрального клапана.

Быстрое развитие и распространение различных технологий генотипирования привело к проведению огромного количества исследований, посвященных связи генных полиморфизмов с различными патологическими состояниями и их клиническими манифестациями [5]. Генные полиморфизмы характеризуются множественными функциональными последствиями, напрямую зависящими от их локализации в геноме [6]. Генные полиморфизмы в некодирующих участках ДНК могут изменять эффектив-

ность инициации транскрипции или сплайсинга мРНК [6]. Несинонимичные (вызывающие замену одной аминокислоты на другую) генные полиморфизмы способны изменять экспрессию, устойчивость к деградации и процесс фолдинга белка, а также влиять на посттрансляционные модификации [6].

Цель исследования

Оценить связь полиморфизмов генов метаболизма кальция с риском тяжелой кальцификации ксеноаортальных биопротезов клапанов сердца, имплантированных в митральную позицию.

Материалы и методы

Исследуемая популяция

Критерии включения в исследование: 1) принадлежность к русскому этносу; 2) проживание в Кемеровской области на протяжении как минимум двух поколений; 3) операция по замене митрального клапана вследствие его пороков; 4) наличие информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения: 1) принадлежность к коренному населению или иммигрантам; 2) злокачественные опухоли, аутоиммунные или психические заболевания в анамнезе; 3) отказ подписать информированное согласие на участие в исследовании.

В расширенный список входящих в исследование лиц было включено 140 пациентов, поступивших в Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия) и подвергшихся операции по замене митрального клапана вследствие его пороков в 2006-2007 г.г. После того, как 16 пациентов были исключены из исследования в соответствии с вышеуказанными критериями, окончательный размер выборки составил 124 человека (**таблица 1**).

У половины из них (n = 62) в течение 8 лет после имплантации развилась тяжелая кальцификация биопротеза; оставшиеся пациенты (n = 62) рассматривались как контрольная группа (**таблица 2**). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом.

Таблица 1.

Клинико-патологические характеристики пациентов, подвергшихся замене митрального клапана сердца

Характеристика Features	Число, n (%) Number, n (%)
Мужской пол Male gender	50 (40,32%)
Возраст ≥ 50 лет Age ≥ 50 years	65 (52,42%)
Митральный стеноз и/или недостаточность III-IV функционального класса Mitral stenosis and/or insufficiency III-IV functional class	54 (43,55%)
Ишемическая болезнь сердца Coronary artery disease	14 (11,29%)
Заболевания периферических артерий Peripheral artery disease	6 (4,84%)
Гипертоническая болезнь Arterial hypertension	38 (30,64%)
Сахарный диабет Diabetes mellitus	8 (6,45%)
Тяжелая кальцификация биопротеза в течение 8 лет после имплантации Severe bioprosthetic mitral valve calcification during 8 years of follow-up	62 (50,00%)

Table 1.

Clinicopathological features of the patients who underwent mitral valve replacement surgery

Таблица 2.

Основные характеристики изученной популяции

Характеристика Features	Пациенты без кальцификации Patients without calcification	Пациенты с кальцификацией Patients with calcification	Всего Total	P P value
Размер выборки Sample size	62 (50,00%)	62 (50,00%)	124 (100,00%)	0,99
Средний возраст Mean age	50,60 (48,12-53,08)	47,81 (45,68-49,94)	49,20 (47,57-50,83)	0,09
Стандартное отклонение от среднего возраста Standard deviation of the mean age	9,76	8,39	9,17	
Мужской пол Male gender	19 (30,64%)	31 (50,00%)	50 (40,32%)	0,03
Женский пол Female gender	43 (69,36%)	31 (50,00%)	74 (59,68%)	

Table 2.

Major characteristics of the population

Диагноз порока митрального клапана сердца и решение о проведении операции по замене клапана были основаны на соответствующих рекомендациях (American College of Cardiology/American Heart Association Guidelines) [7]. С целью замены митрального клапана использовались ксеноаортальные биопротезы КемКор и ПериКор (НеоКор, Россия), обработанные диглицидиловыми эфирами этиленгликоля для увеличения резистентности к окислению и ферментативной деградации [8]. Функциональное состояние биопротезов оценивалось ежегодно посредством эхокардиографического обследования. После эксплантации биопротезов в случае их функциональной недостаточности кальцификация подтверждалась окраской по Коссу и сканирующей электронной микроскопией.

Отбор генных полиморфизмов и генотипирование

Основными критериями отбора генных полиморфизмов были (1) локализация в генах метаболизма кальция, (2) высокая распространенность в популяции (распространенность минорного аллеля в русской популяции $\geq 5\%$ по данным НарМар), (3) предполагаемые или доказанные функциональные последствия на молекулярном уровне и (4) полное или почти полное отсутствие исследований, оценивающих роль того или иного генного полиморфизма в кальцификации митрального клапана. Для отбора генных полиморфизмов использовались базы данных dbSNP, SNPinfo и SNPnexus [9, 10]. Всего было отобрано 8 полиморфизмов 5 генов (таблица 3).

Генный полиморфизм Gene polymorphism	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Хромосомная позиция Chromosomal position	Аминокислотная замена Amino acid substitution	5'-3' и 3'-5' праймеры для полимеразной цепной реакции Forward 5'-3' and reverse 3'-5' polymerase chain reaction primers
Ген NOTCH1 NOTCH1 gene				
rs13290979	A>G	139425634	интронный intronic	F: ccagcccagcagtgagaactgagccac R: accctctggcctgacctacactcgggctt
Ген VDR VDR gene				
rs731236	A>G	48238757	Ile352Ile	F: tgtgttgacagcgctcctggatggcctc R: atcagcgcggcctcctgaccccaggacga
rs2228570	A>G	48272895	Met1Thr/Lys/Arg	F: ggcaggggaagtgtcggccgacattgctcc R: tcctgttaagaacagcaagcagccacggc
Ген CASR CASR gene				
rs1042636	A>G	122003769	Arg990Gly	F: gatgagcctcagaagaacccatggccac R: ggaattctacgcaccagaactcctggagg
Ген OPG OPG gene				
rs3134069	A>C	119964988	5'-upstream	F: ggagcttctacgcgctgaactctggagt R: gcctcctcgaggctttccactagcctcaa
rs2073618	G>C	119964052	Asn3Lys	F: gggacttaccacgagcgcgacacagcaa R: ttgttcattgtggtccccggaacctcagg
rs3102735	T>C	119965070	5'-upstream	F: ctttctctagggttcgctgctccccat R: aattcctggtctagaagtttagactgatg
Ген CALCR CALCR gene				
rs1801197	A>G	93055753	Leu481Pro	F: tcgccttggttggctggttcattcctc R: gctcctgatggcagatgtaaatgggatg

Таблица 3.

Характеристики изученных генных полиморфизмов

Table 3.

Features of the studied gene polymorphisms

NOTCH1 – рецептор NOTCH1, VDR – рецептор к витамину D, CASR – кальций-чувствительный рецептор, OPG – остеопротегерин, CALCR – кальцитониновый рецептор

NOTCH1 – NOTCH1 receptor, VDR – vitamin D receptor, CASR – calcium-sensing receptor, OPG – osteoprotegerin, CALCR – calcitonin receptor

У всех участников исследования в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой забиралось 5 мл периферической венозной крови. Далее 0,5 мл крови немедленно переносилось в свежую пробирку с последующим добавлением 1 мл солевого буфера цитрата натрия (Promega). Далее содержимое пробирки перемешивалось на вортексе и центрифугировалось при 12000 оборотов в минуту в течение 2 ми-

нут. Осадок растворялся в буфере, содержащем 10% додецилсульфат натрия (Sigma) и 100 мкг/мл протеиназы К (Helicon), в течение 3 ч при 50°C. Далее в пробирку добавлялся один объем смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1), содержимое пробирки перемешивалось на вортексе в течение 20 секунд и центрифугировалось при 12000 оборотов в минуту в течение 15 минут. Вязкий слой на границе раз-

дела фаз переносился в свежую пробирку с последующим добавлением 70% этанола для преципитации геномной ДНК из раствора. Раствор центрифугировался при 12000 оборотов в минуту в течение 5 минут. Осадок ДНК инкубировался в течение ночи в деионизированной воде при комнатной температуре и далее хранился при -70°C .

Генотипирование проводилось по технологии TaqMan (аллель-специфичная полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией результата в реальном времени) с использованием системы для проведения полимеразной цепной реакции ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Итоговый объем реакционной смеси, содержащей 100 нг ДНК, 1,25 мкл каждого праймера, 2,5 mM MgCl_2 , 1 mM дНТФ и 1 ЕД Taq-полимеразы (Life Technologies) составил 10 мкл. Для проведения полимеразной цепной реакции использовались следующие настройки: 50°C в течение 120 секунд и 95°C в течение 10 минут, затем 40 циклов по 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 1 минуты. В таблице 3 представлены данные по специфичным праймерам для всех генных полиморфизмов. Лабораторный персонал, осуществлявший генотипирование, не знал, к какой группе принадлежит пациент, и 10% образцов было генотипировано повторно для контроля качества.

Статистический анализ

Распределение возраста было принято нормальным в соответствии с критерием д'Агостино-Пирсона. Поэтому для описания возраста использовались среднее, 95% доверительный интервал (ДИ) и стандартное отклонение. Для описания качественных признаков использовались доли (MedCalc, MedCalc Software). Статистический анализ генетических ассоциаций проводился с использованием программы SNPStats [11]. Для сравнения выявленных и ожидаемых частот генотипов рассчитывалось равновесие Харди-Вайнберга по критерию хи-квадрат с одной степенью свободы. Для оценки риска, связанного с тем или иным аллелем или генотипом, рассчитывалось отношение шансов (ОШ) и 95% ДИ. Расчет ОШ проводился в соответствии с пятью известными моделями наследственности (кодминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная). Выбор наиболее вероятной модели проводился в со-

ответствии с информационным критерием Акаике (AIC); модель с наименьшим значением AIC определялась как наиболее вероятная. Поправка на множественные сравнения проводилась с использованием средней доли ложных отклонений гипотез (FDR). Р-значения, или q-значения в случае применения FDR (q-значения - это р-значения, скорректированные с учетом FDR), $< 0,05$ принимались статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Генотип G/G полиморфизма rs13290979 гена *NOTCH1* был статистически значимо ассоциирован с повышенным в 2,75 раза (согласно рецессивной модели наследования) риском тяжелой кальцификации ксеноаортальных биопротезов клапанов сердца, имплантированных в митральную позицию (таблица 4). Иных статистически значимых различий выявлено не было.

Предыдущие исследования предоставили лишь незначительную информацию о генетической восприимчивости к кальцификации митрального клапана. Novaro с соавт. [12] и Tangri с соавт. [13] не выявили статистически значимых связей между полиморфизмами генов *apoE* (кодирует аполипопротеин E), *Klotho*, β -*Klotho* и *FGF-23* (кодируют белки *Klotho*, β -*Klotho* и *FGF-23*, составляющие один из основных путей фосфорнокальциевого гомеостаза) и данной патологией. Davutoglu и Nacak [14] показали, что генотип I/I и аллель I полиморфизма rs4340 гена *ACE* (кодирует ангиотензинпревращающий фермент) ассоциированы с повышенным риском кальцификации митрального клапана. Полногеномное исследование Thanassoulis с соавт. [15] выявило два полиморфизма гена *IL1F9* (кодирует интерлейкин-36γ/1F9), rs17659543 и rs13415097, в качестве маркеров высокого риска кальцификации митрального клапана.

Стоит отметить, что данных о генетической восприимчивости к кальцификации биопротезов клапанов сердца опубликовано не было. В нашем исследовании генотип G/G полиморфизма rs13290979 гена *NOTCH1* был идентифицирован как независимый маркер тяжелой кальцификации ксеноаортальных биопротезов клапанов сердца, имплантированных в митральную позицию. Известно, что белок Notch1 в норме ингибирует кальцификацию, индуцируя экспрессию транскрипционных факторов *Notch1*

Модель <i>Model of inheritance</i>	Генотип <i>Genotype</i>	Пациенты без КБКС <i>Patients without calcification</i>	Пациенты с КБКС <i>Patients with calcification</i>	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	P	AIC ИКА	HWE РХВ
NOTCH1 rs13290979							
Кодоминантная Codominant	A/A	26 (41,9%)	20 (32,8%)	1,00	0,1	168,3	0,35
	A/G	28 (45,2%)	26 (42,6%)	1,28 (0,56-2,93)			
	G/G	8 (12,9%)	15 (24,6%)	3,15 (1,05-9,46)			
Доминантная Dominant	A/A	26 (41,9%)	20 (32,8%)	1,00	0,2	169,2	
	A/G-G/G	36 (58,1%)	41 (67,2%)	1,65 (0,76-3,57)			
Рецессивная Recessive	A/A-A/G	54 (87,1%)	46 (75,4%)	1,00	0,04	166,6	
	G/G	8 (12,9%)	15 (24,6%)	2,75 (1,02-7,43)			
Сверхдоминантная Overdominant	A/A-G/G	34 (54,8%)	35 (57,4%)	1,00	0,72	170,7	
	A/G	28 (45,2%)	26 (42,6%)	0,87 (0,42-1,82)			
Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	1,68 (0,99-2,85)	0,05	167	
VDR rs731236							
Кодоминантная Codominant	A/A	32 (51,6%)	29 (47,5%)	1,00	0,54	171,6	0,67
	A/G	26 (41,9%)	24 (39,3%)	1,04 (0,48-2,27)			
	G/G	4 (6,5%)	8 (13,1%)	2,07 (0,55-7,81)			
Доминантная Dominant	A/A	32 (51,6%)	29 (47,5%)	1,00	0,64	170,6	
	A/G-G/G	30 (48,4%)	32 (52,5%)	1,19 (0,57-2,48)			
Рецессивная Recessive	A/A-A/G	58 (93,5%)	53 (86,9%)	1,00	0,27	169,6	
	G/G	4 (6,5%)	8 (13,1%)	2,03 (0,56-7,32)			
Сверхдоминантная Overdominant	A/A-G/G	36 (58,1%)	37 (60,7%)	1,00	0,85	170,8	
	A/G	26 (41,9%)	24 (39,3%)	0,93 (0,44-1,96)			
Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	1,27 (0,73-2,22)	0,39	170,1	
VDR rs2228570							
Кодоминантная Codominant	G/G	16 (25,8%)	19 (31,1%)	1,00	0,62	171,9	0,58
	A/G	36 (58,1%)	29 (47,5%)	0,70 (0,30-1,64)			
	A/A	10 (16,1%)	13 (21,3%)	1,02 (0,34-3,07)			
Доминантная Dominant	G/G	16 (25,8%)	19 (31,1%)	1,00	0,53	170,4	
	A/G-A/A	46 (74,2%)	42 (68,8%)	0,77 (0,34-1,74)			
Рецессивная Recessive	G/G-A/G	52 (83,9%)	48 (78,7%)	1,00	0,59	170,6	
	A/A	10 (16,1%)	13 (21,3%)	1,29 (0,50-3,33)			
Сверхдоминантная Overdominant	G/G-A/A	26 (41,9%)	32 (52,5%)	1,00	0,33	169,9	
	A/G	36 (58,1%)	29 (47,5%)	0,69 (0,33-1,44)			
Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	0,97 (0,57-1,67)	0,91	170,8	
CASR rs1042636							
Кодоминантная Codominant	A/A	47 (75,8%)	50 (82%)	1,00	0,25	170,1	
	A/G	14 (22,6%)	8 (13,1%)	0,51 (0,19-1,38)			
	G/G	1 (1,6%)	3 (4,9%)	2,79 (0,26-29,85)			
Доминантная Dominant	A/A	47 (75,8%)	50 (82%)	1,00	0,38	170,1	
	A/G-G/G	15 (24,2%)	11 (18%)	0,67 (0,27-1,65)			
Рецессивная Recessive	A/A-A/G	61 (98,4%)	58 (95,1%)	1,00	0,33	169,9	
	G/G	1 (1,6%)	3 (4,9%)	3,04 (0,29-32,42)			
Сверхдоминантная Overdominant	A/A-G/G	48 (77,4%)	53 (86,9%)	1,00	0,16	168,9	
	A/G	14 (22,6%)	8 (13,1%)	0,50 (0,19-1,35)			

Таблица 4.

Связь однонуклеотидных полиморфизмов генов метаболизма кальция с тяжелой кальцификацией ксеноортальных биопротезов клапанов сердца (КБКС), имплантированных в митральную позицию

Table 4.

Association of the polymorphisms within the genes responsible for calcium metabolism with severe bioprosthetic mitral valve calcification

Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	0,87 (0,42-1,80)	0,7	170,7	
OPG rs3134069							
Кодоминантная Codominant	A/A	49 (79%)	52 (85,2%)	1,00	0,59	171,8	0,99
	A/C	12 (19,4%)	9 (14,8%)	0,80 (0,30-2,12)			
	C/C	1 (1,6%)	0 (0%)	0,00 (0,00-0,00)			
Доминантная Dominant	A/A	49 (79%)	52 (85,2%)	1,00	0,56	170,5	
	A/C-C/C	13 (21%)	9 (14,8%)	0,75 (0,29-1,97)			
Рецессивная Recessive	A/A-A/C	61 (98,4%)	61 (100%)	1,00	0,35	170	
	C/C	1 (1,6%)	0 (0%)	0,00 (0,00-0,00)			
Сверхдоминантная Overdominant	A/A-C/C	50 (80,7%)	52 (85,2%)	1,00	0,68	170,7	
	A/C	12 (19,4%)	9 (14,8%)	0,81 (0,31-2,16)			
Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	0,72 (0,29-1,80)	0,48	170,3	
OPG rs2073618							
Кодоминантная Codominant	G/G	15 (24,2%)	12 (19,7%)	1,00	0,85	172,5	0,07
	C/G	35 (56,5%)	37 (60,7%)	1,29 (0,51-3,27)			
	C/C	12 (19,4%)	12 (19,7%)	1,13 (0,35-3,61)			
Доминантная Dominant	G/G	15 (24,2%)	12 (19,7%)	1,00	0,62	170,6	
	C/G-C/C	47 (75,8%)	49 (80,3%)	1,25 (0,51-3,08)			
Рецессивная Recessive	G/G-C/G	50 (80,7%)	49 (80,3%)	1,00	0,88	170,8	
	C/C	12 (19,4%)	12 (19,7%)	0,93 (0,37-2,37)			
Сверхдоминантная Overdominant	G/G-C/C	27 (43,5%)	24 (39,3%)	1,00	0,6	170,6	
	C/G	35 (56,5%)	37 (60,7%)	1,22 (0,58-2,57)			
Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	1,07 (0,60-1,91)	0,82	170,8	
OPG rs3102735							
Кодоминантная Codominant	T/T	39 (62,9%)	46 (75,4%)	1,00	0,39	171	0,53
	C/T	19 (30,6%)	14 (22,9%)	0,69 (0,30-1,61)			
	C/C	4 (6,5%)	1 (1,6%)	0,29 (0,03-2,80)			
Доминантная Dominant	T/T	39 (62,9%)	46 (75,4%)	1,00	0,26	169,6	
	C/T-C/C	23 (37,1%)	15 (24,6%)	0,63 (0,28-1,41)			
Рецессивная Recessive	T/T-C/T	58 (93,5%)	60 (98,4%)	1,00	0,28	169,7	
	C/C	4 (6,5%)	1 (1,6%)	0,32 (0,03-3,08)			
Сверхдоминантная Overdominant	T/T-C/C	43 (69,3%)	47 (77%)	1,00	0,48	170,3	
	C/T	19 (30,6%)	14 (22,9%)	0,74 (0,32-1,70)			
Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	0,63 (0,32-1,26)	0,19	169,1	
CALCR rs1801197							
Кодоминантная Codominant	A/A	32 (51,6%)	37 (60,7%)	1,00	0,48	171,4	0,99
	A/G	27 (43,5%)	20 (32,8%)	0,64 (0,29-1,39)			
	G/G	3 (4,8%)	4 (6,6%)	1,19 (0,24-5,98)			
Доминантная Dominant	A/A	32 (51,6%)	37 (60,7%)	1,00	0,34	169,9	
	A/G-G/G	30 (48,4%)	24 (39,3%)	0,69 (0,33-1,46)			
Рецессивная Recessive	A/A-A/G	59 (95,2%)	57 (93,4%)	1,00	0,65	170,6	
	G/G	3 (4,8%)	4 (6,6%)	1,43 (0,29-6,99)			
Сверхдоминантная Overdominant	A/A-G/G	35 (56,5%)	41 (67,2%)	1,00	0,23	169,4	
	A/G	27 (43,5%)	20 (32,8%)	0,63 (0,29-1,35)			
Лог-аддитивная Log-additive	---	---	---	0,82 (0,45-1,52)	0,54	170,5	

NOTCH1 – рецептор NOTCH1, VDR – рецептор к витамину D, CASR – кальций-чувствительный рецептор, OPG – остеопротегерин, CALCR – кальцитониновый рецептор, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал, АIC – информационный критерий Акаике, HWE – равновесие Харди-Вайнберга

NOTCH1 – NOTCH1 receptor, VDR – vitamin D receptor, CASR – calcium-sensing receptor, OPG – osteoprotegerin, CALCR – calcitonin receptor, OR – odds ratio, CI – confidence interval, AIC – Akaike information criterion, HWE – Hardy-Weinberg equilibrium

and *Hey2*, которые подавляют активность другого транскрипционного фактора *Runx2/Cbfa1* [16]. Транскрипционный фактор *Runx2/Cbfa1* является жизненно важным регулятором остеогенной дифференцировки клеток [17]: так, *Runx2/Cbfa1*-дефицитные мыши погибают вскоре после рождения вследствие полного отсутствия оссификации [18]. Белок *Runx2/Cbfa1* воздействует на целый ряд регуляторов кальцификации, таких, как транскрипционные факторы *osterix (Osx)* [19], *Msx (homeobox-7)* [20], а также модулирует экспрессию щелочной фосфатазы и остеокальцина, двух белков-маркеров остеогенной дифференцировки [18, 21]. Мутации и полиморфизмы гена *NOTCH1* могут приводить к сниженной экспрессии транскрипционных факторов *Hey1* и *Hey2*, способствуя развитию *Runx2*-опосредованной кальцификации [16]. В частности, инактивирующие ген *Notch1* мутации были ранее выявлены в двух семьях с длительной историей кальцификации аортального клапана [22]. Таким образом, можно предположить, что генотип G/G интронного полиморфизма rs13290979 снижает эффективность транскрипции гена *NOTCH1*. Однако полученные в данной работе результаты нуждаются в подтверждении на больших выборках.

Заключение

Полиморфизмы генов метаболизма кальция (в частности, гена *NOTCH1*) могут обуславливать генетическую восприимчивость к тяжелой кальцификации биопротезов клапанов сердца.

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Acknowledgements: this study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0546-2015-0011 "Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors".

Литература / References:

1. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Guyton RA, et al. 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63 (22): e57-185. doi: 10.1016/j.jacc.2014.02.536.
2. Roberts WC. The senile cardiac calcification syndrome. *Am J Cardiol.* 1986; 58 (6): 572-574. doi: 10.1016/0002-9149(86)90045-7.
3. Bella JN, Tang W, Kraja A, Rao DC, Hunt SC, Miller MB, et al. Genome-wide linkage mapping for valve calcification susceptibility loci in hypertensive sibships: the Hypertension Genetic Epidemiology Network Study. *Hypertension.* 2007; 49 (3): 453-460. doi: 10.1161/01.HYP.0000256957.10242.75.
4. Kutikhin AG, Yuzhalin AE, Brusina EB, Ponasenko AV, Golovkin AS, Barbarash OL. Genetic predisposition to calcific aortic stenosis and mitral annular calcification. *Mol Biol Rep.* 2014; 41 (9): 5645-5663. doi: 10.1007/s11033-014-3434-9.
5. Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Integrative systems of genomic risk markers for cancer and other diseases: future of predictive medicine. *Cancer Manag Res.* 2012; 4: 131-135. doi: 10.2147/CMAR.S30855.
6. Bakhtiar SM, Ali A, Baig SM, Barh D, Miyoshi A, Azevedo V. Identifying human disease genes: advances in molecular genetics and computational approaches. *Genet Mol Res.* 2014; 13 (3): 5073-5087. doi: 10.4238/2014.July.4.23.
7. American College of Cardiology; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease); Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Bonow RO, Carabello BA, Chatterjee K, et al. ACC/AHA 2006 guidelines for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing Committee to Revise the 1998 guidelines for the management of patients with valvular heart disease) developed in collaboration with the Society of Cardiovascular Anesthesiologists endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: e1-148. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.05.021.
8. Astapov DA, Karas'kov AM, Semenova EI, Demidov DP. The mitral valve replacement with biological prostheses: early and long-term results. *Khirurgiia (Mosk).* 2013; (9): 18-23.
9. Xu Z, Taylor JA. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (Web Server Issue): W600-605. doi: 10.1093/nar/gkp290.
10. Dayem Ullah AZ, Lemoine NR, Chelala C. SNPnexus: a web server for functional annotation of novel and publicly known genetic variants (2012 update). *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (Web Server issue): W65-70. doi: 10.1093/nar/gks364.
11. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006; 22 (15): 1928-1929. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268.

12. Novaro GM, Sachar R, Pearce GL, Sprecher DL, Griffin BP. Association between apolipoprotein E alleles and calcific valvular heart disease. *Circulation*. 2003; 108 (15): 1804-1808. doi: 10.1161/01.CIR.0000097560.96431.3E.
13. Tangri N, Alam A, Wooten EC, Huggins GS. Lack of association of Klotho gene variants with valvular and vascular calcification in Caucasians: a candidate gene study of the Framingham Offspring Cohort. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26 (12): 3998-4002. doi: 10.1093/ndt/gfr188.
14. Davutoglu V, Nacak M. Influence of angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism on rheumatic valve involvement, valve severity and subsequent valve calcification. *J Heart Valve Dis*. 2005; 14 (3): 277-281.
15. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013; 368 (6): 503-512. doi: 10.1056/NEJMoa1109034.
16. Rusanescu G, Weissleder R, Aikawa E. Notch signaling in cardiovascular disease and calcification. *Curr Cardiol Rev*. 2008; 4 (3): 148-156. doi: 10.2174/157340308785160552.
17. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyann H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*. 2005; 280 (39): 33132-33140. doi: 10.1074/jbc.M500608200.
18. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997; 89 (5): 755-764. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80258-5.
19. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002; 108 (1): 17-29. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00622-5.
20. Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem*. 2003; 278 (46): 45969-45977. doi: 10.1074/jbc.M306972200.
21. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997; 89 (5): 747-754. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80257-3.
22. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005; 437 (7056): 270-274. doi: 10.1038/nature03940.

Сведения об авторах

Понасенко Анастасия Валериевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.
Вклад в статью: разработка дизайна исследования, сбор биологического материала, проведение генотипирования, написание статьи.
ORCID: 0000-0002-3002-2863

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.
Вклад в статью: разработка дизайна исследования, статистический анализ, написание статьи.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Хуторная Мария Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.
Вклад в статью: сбор биологического материала, проведение генотипирования.
ORCID: 0000-0002-9714-4080

Рутковская Наталья Витальевна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории кардиоваскулярного биопротезирования отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.
Вклад в статью: разработка дизайна исследования, включение и исключение пациентов из исследования, выполнение пролонгированного этапа наблюдения.
ORCID: 0000-0002-8829-0481

Authors

Dr. Anastasia V. Ponasenko, MD, PhD, Head of the Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.
Contribution: conceived and designed the study; collected the samples; performed the genotyping; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0002-3002-2863

Dr. Anton G. Kutikhin, MD, PhD, Head of the Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.
Contribution: conceived and designed the study; performed the statistical analysis; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0001-8679-4857

Mrs. Maria V. Khutoraya, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.
Contribution: collected the samples; performed the genotyping.
ORCID: 0000-0002-9714-4080

Dr. Natalia V. Rutkovskaya, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory for Cardiovascular Bioprosthesis, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.
Contribution: conceived and designed the study; recruited the patients; conducted the follow-up.
ORCID: 0000-0002-8829-0481

Ms. Anna V. Tsepokina, MSc, Junior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.
Contribution: collected the samples; performed the genotyping.
ORCID: 0000-0002-4467-8732

Цепочкина Анна Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: сбор биологического материала, проведение генотипирования.

ORCID: 0000-0002-4467-8732

Кондюкова Наталья Владимировна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории кардиоваскулярного биопротезирования отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: включение и исключение пациентов из исследования, выполнение пролонгированного этапа наблюдения.

ORCID: 0000-0002-4378-8123

Южалин Арсений Евгеньевич, кандидат медицинских наук, постдок кафедры онкологии Оксфордского института радиационной онкологии при Оксфордском университете, г. Оксфорд, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии.

Вклад в статью: статистический анализ, написание статьи.

ORCID: 0000-0001-7454-6653

Барбараш Леонид Семенович, доктор медицинских наук, профессор, академик Российской академии наук, главный научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия.

Вклад в статью: разработка дизайна исследования, написание статьи.

ORCID: 0000-0001-6981-9661

Корреспонденцию адресовать:

Кутихин Антон Геннадьевич,
650002, г. Кемерово, б-р Сосновый, д. 6
E-mail: antonkutikhin@gmail.com

Для цитирования:

Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Хуторная М.В., Рутковская Н.В., Цепочкина А.В., Кондюкова Н.В., Южалин А.Е., Барбараш Л.С. Связь полиморфизмов генов метаболизма кальция с риском тяжелой кальцификации ксеноортальных биопротезов клапанов сердца, имплантированных в митральную позицию. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2018. Т. 3, № 4. С. 12–21

Статья поступила: 22.10.2018

Принята в печать: 30.11.2018

Dr. Natalia V. Kondyukova, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Cardiovascular Bioprosthesis, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: recruited the patients; conducted the follow-up.

ORCID: 0000-0002-4378-8123

Dr. Arseniy E. Yuzhalin, DPhil (Oxon), Postdoctoral Researcher, CRUK/MRC Oxford Institute for Radiation Oncology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom.

Contribution: performed the statistical analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-7454-6653

Prof. Leonid S. Barbarash, MD, PhD, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation.

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-6981-9661

Corresponding author:

Dr. Anton G. Kutikhin,
6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation
E-mail: antonkutikhin@gmail.com

For citation:

Ponassenko AV, Kutikhin AG, Khutorная MV, Rutkovskaya NV, Tsepokina AV, Kondyukova NV, Yuzhalin AE, Barbarash LS. Rs13290979 polymorphism within NOTCH1 gene is associated with severe bioprosthetic mitral valve calcification. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2018; 3 (4): p. 12–21.