

СВЯЗЬ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА С АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ КОРОНАРНЫХ И СОННЫХ АРТЕРИЙ

Л.А. Смирнова, З.Б. Хасанова, М.В. Ежов, Т.Ю. Полевая, Ю.Г. Матчин,
Т.В. Балахонова, И.А. Собенин, А.Ю. Постнов

ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва

Контакты: Марат Владиславович Ежов marat_ezhov@mail.ru

Цель исследования – изучение связи мутаций митохондриального генома (C3256T, G13513A, G14846A, G12315A) с наличием и выраженностью атеросклеротического поражения коронарных и сонных артерий.

Материалы и методы. В исследование включены 193 пациента (средний возраст составил $54,6 \pm 9,5$ года), в том числе 154 мужчины, которым была проведена коронарная ангиография. Основную группу составили 130 пациентов с атеросклерозом коронарных артерий. В контрольную группу вошли 63 пациента без атеросклероза коронарных артерий. Генетический анализ состоял из 3 этапов: 1) выделение геномной ДНК из лейкоцитов цельной крови методом фенол-хлороформной экстракции; 2) амплификация полиморфных участков изучаемых генов митохондриальной дезоксирибонуклеиновой кислоты при помощи полимеразной цепной реакции; 3) пиросеквенирование для детекции нуклеотидной последовательности и определения уровня гетероплазмы исследуемых мутаций.

Результаты. Уровень гетероплазмы мутаций G13513A и C3256T был статистически значимо выше среди больных с коронарным атеросклерозом по сравнению с лицами без коронарного атеросклероза ($p = 0,03$ и $p = 0,01$ соответственно), тогда как уровень гетероплазмы мутации G12315A был значимо выше у лиц без коронарного атеросклероза ($p = 0,004$). Уровень гетероплазмы мутации G14846A был выше у лиц старше 45 лет. Не установлено связи мутаций митохондриального генома с такими факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, как курение, артериальная гипертензия, отягощенный семейный анамнез, ожирение. С наличием гиперлипидемии отмечена прямая связь мутации C3256T ($r = 0,18$; $p = 0,01$) и обратная – мутации G12315A ($r = -0,2$; $p = 0,005$). Выявлена положительная корреляция между мутацией G14846A и уровнем липопротеида (a). Установлена положительная связь атеросклероза сонных артерий с мутацией C3256T ($r = 0,49$; $p = 0,0001$) и с мутацией G14846A ($r = 0,48$; $p = 0,0001$). Для мутации G12315A выявлена отрицательная связь с атеросклерозом сонных артерий ($r = -0,32$; $p = 0,01$).

Заключение. В исследовании случай–контроль доказана связь между уровнем гетероплазмы мутаций митохондриального генома C3256T, G13513A, G14846A, G12315A и атеросклерозом коронарных и сонных артерий. Измерение уровня гетероплазмы мутаций митохондриального генома C3256T, G13513A и G14846A может быть рекомендовано в качестве потенциальных генетических маркеров для улучшения диагностики предрасположенности к атеросклерозу коронарных и сонных артерий.

Ключевые слова: атеросклероз, мутации, митохондриальный геном, митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота, гетероплазмия, факторы риска

ASSOCIATION OF MUTATIONS IN THE MITOCHONDRIAL GENOME WITH CORONARY AND CAROTID ATHEROSCLEROTIC LESIONS

L.A. Smirnova, Z.B. Khasanova, M.V. Ezhov, T.Yu. Polevaya, Yu.G. Matchin, T.V. Balakhonova, I.A. Sobenin, A.Yu. Postnov
Russian Cardiology Research-and-Production Complex, Ministry of Health of Russia, Moscow

Objective: to study the association of C3256T, G13513A, G14846A, and G12315A mutations in the mitochondrial genome with the presence and degree of coronary and carotid atherosclerotic lesions.

Subjects and methods. The investigation enrolled 193 patients (mean age 54.6 ± 9.5 years), including 154 men, who had undergone coronary angiography. A study group consisted of 130 patients with coronary atherosclerosis. A control group comprised 63 patients without this disease. Genetic analysis consisted of 3 steps: 1) isolation of genomic deoxyribonucleic acid from whole blood leukocytes by phenol-chloroform extraction; 2) amplification of polymorphic sites in the examined mitochondrial deoxyribonucleic acid genes by polymerase chain reaction; 3) pyrosequencing for the detection of nucleotide sequencing and the determination of the level of heteroplasmy of the examined mutations.

Results. The level of heteroplasmy of G13513A and C3256T mutations was statistically significantly higher in the patients with coronary atherosclerosis than in those without this condition ($p = 0.03$ and $p = 0.01$, respectively) whereas that of G12315A mutation was significantly higher in the persons without coronary atherosclerosis ($p = 0.004$). The level of heteroplasmy of G14846A mutation was greater in people over 45 years of age. No association was found between mutations in the mitochondrial genome and cardiovascular risk factors, such as smoking, hypertension, poor family history, and obesity. There was a direct relationship of hyperlipidemia to C3256T mutation ($r = 0.18$; $p = 0.01$) and its inverse relationship to G12315A mutation ($r = -0.2$; $p = 0.005$). There was a positive correlation between G14846A mutation and lipoprotein (a) levels. There was also a positive correlation between carotid atherosclerosis with C3256T ($r = 0.49$; $p = 0.0001$) and G14846A ($r = 0.48$; $p = 0.0001$) mutations. G12315A mutation showed a negative correlation with carotid atherosclerosis ($r = -0.32$; $p = 0.01$).

Conclusion. *The case-control study gave proof to the association between the level of heteroplasmy of C3256T, G13513A, G14846A, and G12315A mutations in the mitochondrial genome and coronary and carotid atherosclerosis. Measurement of the heteroplasmy of C3256T, G13513A and G14846A mutations in the mitochondrial gene may be proposed as potential genetic markers to improve the diagnosis of a preposition to coronary and carotid atherosclerosis.*

Key words: *atherosclerosis, mutations, mitochondrial genome, mitochondrial deoxyribonucleic acid, heteroplasmy, risk factors*

Введение

Одним из приоритетных направлений современной медицины является доклиническая ранняя диагностика и профилактика социально значимых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца (ИБС). Несмотря на достижения в области фармакологии и кардиологии, заболеваемость и смертность от ИБС остаются на высоком уровне, представляя глобальную медико-социальную проблему. Большое количество исследований в последние годы было направлено на поиск генетических биомаркеров атеросклероза. В основном изучались мутации ядерного генома, в то время как изучению роли мутаций митохондриального генома в развитии атеросклероза посвящено ограниченное количество работ.

Митохондрии имеют собственный геном, который наследуется по материнской линии. Митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота (мтДНК) человека — двухцепочечная кольцевая молекула размером 16 569 пар нуклеотидов, в которой расположены 37 генов, кодирующих субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования, а также гены 22 транспортных рибонуклеиновых кислот (тРНК) и 2 рибосомальных РНК, принимающих участие в синтезе белка в митохондриях. В течение жизни в митохондриальном геноме возникают соматические мутации, это обусловлено особенностями его структурной организации, близким прилеганием мтДНК к мембране, ошибками репликации, неэффективной системой репарации, отсутствием защитных гистонов [1]. Однако наибольший вклад вносят активные формы кислорода [2]. Скорость мутирования мтДНК примерно в 10–17 раз выше, чем ядерной ДНК [3]. Присутствие в одной митохондрии молекул ДНК дикого типа и молекул ДНК, несущих мутации, получило название «гетероплазмия» [4]. Мутации мтДНК приводят к увеличению образования в митохондриях активных форм кислорода, что способствует развитию дисфункции и апоптозу эндотелиальных и гладкомышечных клеток, активации матриксных металлопротеиназ, росту сосудистых гладкомышечных клеток и их миграции в интиму, экспрессии молекул адгезии и окислению липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [5–7], снижению продукции оксида азота эндотелиальной NO-синтазой [8]. Все эти процессы способствуют развитию и прогрессированию атеросклеротического поражения.

Имеются единичные клинические работы, демонстрирующие ассоциацию между уровнем гетероплазмии

мутаций митохондриального генома в лейкоцитах крови человека и атеросклеротическим поражением сонных и коронарных артерий [9, 10].

Предпосылкой для нашей работы послужило экспериментальное исследование, выполненное в ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» в 2009 г. При изучении 40 мутаций митохондриального генома в образцах ДНК, выделенных из пораженных атеросклерозом и нормальных участков интимы аорты 10 молодых людей, погибших вследствие несчастных случаев, обнаружено, что уровни гетероплазмии 10 мутаций мтДНК (A1555G, C3256T, G12315A, T3336C, G13513A, C5178A, G15059A, G14459A, G14846A, 652insG) были значительно выше в участках аорты, пораженных атеросклерозом [11].

Для нашей работы было выбрано 4 мутации: G13513A, G14846A, C3256T, G12315A, для которых повышенный уровень гетероплазмии был связан с атеросклеротическим поражением по данным аутопсии [11].

Цель данного исследования — изучение связи мутаций митохондриального генома с наличием и выраженностью атеросклеротического поражения коронарных и сонных артерий.

Материалы и методы

В исследование были включены мужчины и женщины старше 18 лет, имеющие показания для проведения коронарной ангиографии (КАГ). В исследование не включали лиц с семейной гиперхолестеринемией; концентрацией триглицеридов (ТГ) более 4,5 ммоль/л; больных, перенесших острый коронарный синдром или хирургические вмешательства в последние 3 мес; лиц с онкологическими заболеваниями в анамнезе, сахарным диабетом, вторичными дислипидемиями, обусловленными дисфункцией печени, почек, щитовидной железы.

Оценка поражения коронарного русла проводилась на основе ангиографической симптоматики по 2 методикам: 1) с учетом числа пораженных магистральных артерий (1; 2; 3), имеющих сужение просвета более 50 % по диаметру; 2) по суммарному индексу стенозов (индекс Gensini). Всем пациентам проводили дуплексное сканирование экстракраниального отдела брахиоцефальных артерий. Исходно в сыворотке крови измеряли концентрацию общего холестерина (ХС), ТГ, ХС липопротеидов высокой плотности (ЛПВП). Содержание ХС ЛПНП рассчитывали по формуле Фридлянда (1972 г.): $ХС\ ЛПНП = \text{общий ХС} - ХС\ ЛПВП -$

ТГ/2,2 (ммоль/л). Определение концентрации липопротеида (а) (ЛП(а)) сыворотки крови выполняли методом твердофазного иммуоферментного анализа.

Генетическое исследование

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили методом фенол-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К. В целях амплификации короткоцепочечных участков мтДНК проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) в амплификаторе РТС-200 (MJ Research, США). Далее ПЦР-амплификаты были пиросеквенированы для детекции нуклеотидной последовательности и определения уровня гетероплазии исследуемых мутаций с помощью соответствующих праймеров («Синтол», Москва). Пиросеквенирование проводили в анализаторе PSQ96МА (Pyrosequencing AB, Швеция) по методике, рекомендованной производителем. Количественная оценка мутантного аллеля заключалась в расчете уровней гетероплазии мутаций мтДНК с использованием высот пиков пирограммы в исследуемой области одноцепочечного ПЦР-фрагмента митохондриального генома. Формула для подсчета процента гетероплазии мутаций митохондриального генома была разработана М.А. Сазоновой и соавт. в лаборатории медицинской генетики НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова:

$$P = (h - N)/(M - N) \times 100 \%,$$

где P – процент гетероплазии; h – высота пика исследуемого нуклеотида; N – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100 % нормальных аллелей; M – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100 % мутантных аллелей.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0. Вид распределения количественных признаков анализировали при помощи теста Колмогорова–Смирнова. При описании количественных показателей с нормальным распределением приводились среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD), если распределение не соответствовало параметрическому, приводили медиану (Me) и межквартильные интервалы (25-й перцентиль; 75-й перцентиль). Для качественных величин данные представляли как n (%). Для оценки значимости статистических различий по количественному признаку использовались параметрический (t-критерий Стьюдента) и непараметрический (критерий Манна–Уитни) методы. Значимость различий качественных признаков в группах наблюдения оценивали при помощи непараметрического критерия χ^2 Пирсона, при малой встречаемости признака использовали точный тест Фишера. Для оценки связи мутаций митохондриального генома с факторами риска и атеросклерозом коронарных и сонных артерий при-

меняли корреляционный анализ с использованием рангового критерия Спирмена. Для оценки диагностической значимости мутаций митохондриального генома были построены характеристические кривые. В качестве критерия диагностической значимости рассчитывали площадь под кривой. Уровень статистической значимости принят при $p < 0,05$.

Результаты

Сравнительная характеристика больных

В исследование включены 193 пациента (154 мужчины и 39 женщин) в возрасте от 33 до 78 лет (средний возраст $54,6 \pm 9,5$ года). Основную группу составили 130 пациентов с атеросклерозом коронарных артерий. В контрольную группу вошли 63 пациента без атеросклероза коронарных артерий. Группы были сопоставимы по возрасту, частоте встречаемости артериальной гипертонии, ожирению, отягощенной наследственности по отцовской линии (табл. 1). Мужчин было больше в основной группе, чем в контрольной. Мужчины с коронарным атеросклерозом были существенно старше. Средний возраст у обследованных женщин между группами не отличался. Лиц с отягощенным анамнезом по материнской линии было больше среди больных

Таблица 1. Клиническая характеристика групп обследованных больных

Показатель	Основная группа (n = 130)	Контрольная группа (n = 63)	P
Мужчины	116 (89 %)	38 (60 %)	< 0,001
Женщины	14 (11 %)	25 (40 %)	< 0,001
Возраст, лет	$55,0 \pm 9,1$	$53,9 \pm 10,3$	0,45
Возраст мужчин, лет	$54,4 \pm 8,9$	$49,3 \pm 7,5$	< 0,001
Возраст женщин, лет	$59,9 \pm 9,5$	$60,8 \pm 10,1$	0,54
Артериальная гипертония	95 (73 %)	45 (71 %)	0,94
Курение	88 (68 %)	15 (24 %)	< 0,001
Гиперлипидемия	124 (95 %)	50 (78 %)	< 0,001
Отягощенная наследственность:			
– по отцовской линии	22 (17 %)	9 (14 %)	0,80
– по материнской линии	34 (26 %)	8 (13 %)	0,05
Ожирение	37 (28 %)	21 (33 %)	0,59
Инфаркт миокарда в анамнезе	78 (60 %)	0	–
Коронарное стентирование	69 (53 %)	0	–
Аортокоронарное шунтирование	23 (18 %)	0	–

Примечание. Данные представлены как n (%), $M \pm SD$.

основной группы: 26 % против 13 % в контрольной группе ($p = 0,05$). В группе с коронарным атеросклерозом существенно чаще встречались лица с курением в анамнезе: 68 % против 24 % в контрольной группе ($p < 0,001$). В основной группе 60 % больных перенесли инфаркт миокарда, у половины было выполнено стентирование коронарных артерий, у 18 % – операция аортокоронарного шунтирования в анамнезе.

Уровень общего ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП был существенно ниже у больных основной группы, так как все пациенты принимали статины, тогда как в контрольной группе статины получали лишь 24 % пациентов (табл. 2). Уровень ЛП(а) был выше при наличии коронарного атеросклероза ($p = 0,016$).

Таблица 2. Сравнительная характеристика групп по биохимическим параметрам

Показатель	Основная группа (n = 130)	Контрольная группа (n = 63)	p
Общий ХС, ммоль/л	4,7 ± 1,3	5,4 ± 1,1	< 0,001
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,3	0,03
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,9 ± 1,0	3,4 ± 0,9	< 0,001
ТГ, ммоль/л	1,8 ± 1,3	2,0 ± 1,4	0,3
ЛП(а), мг/дл	54 (8; 100)	23 (5; 69)	0,016

Примечание. Данные представлены как $M \pm SD$, медиана (25 %; 75 %).

Не у всех пациентов на момент включения были достигнуты целевые значения липидов, в последующем проводилась коррекция гиполипидемической терапии.

Явление гетероплазмии было обнаружено для всех изучаемых мутаций мтДНК. Для всех мутаций распределение уровней гетероплазмии значительно отличалось от нормального (тест Колмогорова–Смирнова с коррекцией по Лиллиефорсу, $p < 0,001$).

Мы проанализировали связь между уровнем гетероплазмии исследуемых мутаций и наличием коронарного атеросклероза. Уровень гетероплазмии по мутации С3256Т был выше среди больных с коронарным атеросклерозом по сравнению с лицами без коронарного атеросклероза ($p = 0,01$). Уровень гетероплазмии по мутации G13513А был статистически значимо выше среди больных с коронарным атеросклерозом по сравнению с лицами без коронарного атеросклероза ($p = 0,03$), тогда как уровень гетероплазмии по мутации G12315А был значимо выше у лиц без коронарного атеросклероза по сравнению с пациентами основной группы ($p = 0,004$). По мутации G14846А различий по группам выявлено не было.

Оценка поражения коронарного русла в нашем исследовании проводилась по количеству пораженных основных магистральных артерий и на основе расчета

индекса Gensini. Выявлена прямая связь мутации С3256Т с количеством пораженных основных коронарных артерий ($r = 0,18$; $p < 0,05$) и с индексом стенозов ($r = 0,18$; $p < 0,05$).

При изучении связи классических факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) с мутациями митохондриального генома была получена положительная корреляция мутации G14846А с возрастом ($r = 0,21$; $p = 0,012$). В проведенном нами исследовании не выявлено связи мутаций с такими факторами риска ССЗ, как пол, курение, артериальная гипертония, ожирение, отягощенный семейный анамнез по ССЗ как по материнской, так и по отцовской линии. С наличием гиперлипидемии отмечена прямая связь мутации С3256Т ($r = 0,18$; $p = 0,01$) и обратная – мутации G12315А ($r = -0,2$; $p = 0,005$).

В рамках нашей работы была исследована ассоциация мутаций митохондриального генома лейкоцитов крови с различными липидными параметрами (ТГ, общий ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ЛП(а)) крови пациентов, не получавших статины и другие гиполипидемические препараты. Получена положительная корреляция уровня гетероплазмии мутации G13513А с ХС ЛПВП ($r = 0,2$; $p < 0,005$) и отрицательная связь мутации С3256Т с ХС ЛПВП ($r = -0,17$; $p < 0,05$).

В ранее проведенных исследованиях не изучалась ассоциация мутаций митохондриального генома с уровнем ЛП(а). Мы впервые провели анализ взаимосвязи концентрации ЛП(а) крови с мутациями митохондриального генома, выявили положительную связь мутации G14846А с уровнем ЛП(а) ($r = 0,23$; $p = 0,01$).

При подгрупповом анализе мы не выявили связи мутаций митохондриального генома с коронарным атеросклерозом у женщин, лиц с курением в анамнезе, пациентов с артериальной гипертонией, больных с отягощенным семейным анамнезом по материнской линии по ССЗ.

Во всех работах по изучению ССЗ оценивается общий отягощенный семейный анамнез. Учитывая то, что митохондриальный геном наследуется только по материнской линии, мы разделили выборку на 2 подгруппы: лица с отягощенным семейным анамнезом по материнской линии и без него. В подгруппе больных с отягощенным материнским анамнезом различий по уровню гетероплазмии между пациентами основной и контрольной групп не выявлено. Среди пациентов без отягощенного материнского анамнеза выявлялась ассоциация мутаций С3256Т и G13513А с коронарным атеросклерозом.

В зависимости от выраженности атеросклеротического поражения сонных артерий пациенты были разделены на 4 подгруппы: 1) без изменений в сонных артериях (8 % пациентов); 2) утолщение комплекса интима–медиа (11 % пациентов); 3) стенозы в сонных артериях 20–49 % (63 % пациентов); 4) стенозы в сонных артериях более 50 % (15 % пациентов). При про-

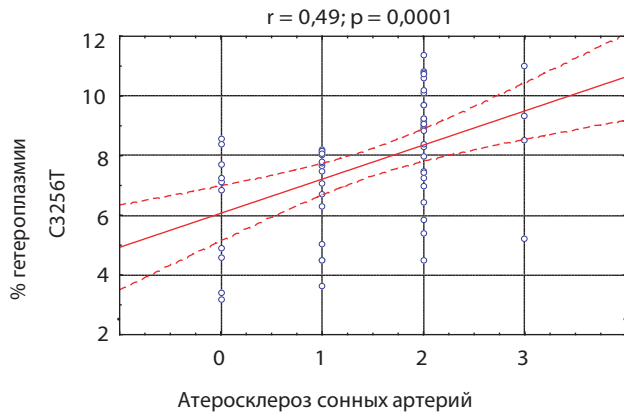


Рис. 1. Взаимосвязь между уровнем гетероплазии мутации митохондриального генома C3256T и атеросклерозом сонных артерий

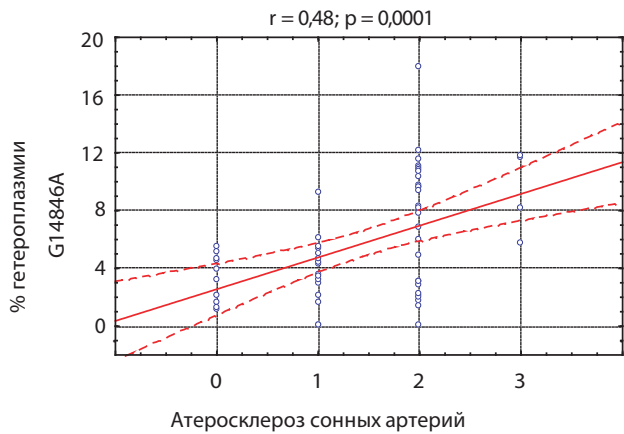


Рис. 2. Взаимосвязь между уровнем гетероплазии мутации митохондриального генома G14846A и атеросклерозом сонных артерий

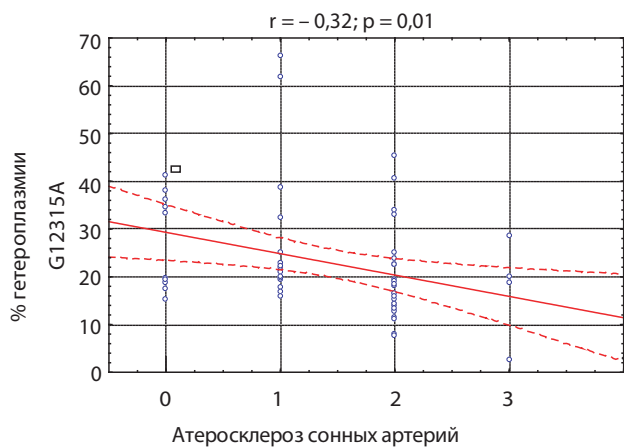


Рис. 3. Взаимосвязь между уровнем гетероплазии мутации митохондриального генома G12315A и атеросклерозом сонных артерий

ведении оценки связи между уровнем гетероплазии исследуемых мутаций мтДНК и атеросклерозом сонных артерий отмечена прямая корреляция между атеросклерозом сонных артерий и мутацией C3256T ($r = 0,49; p =$

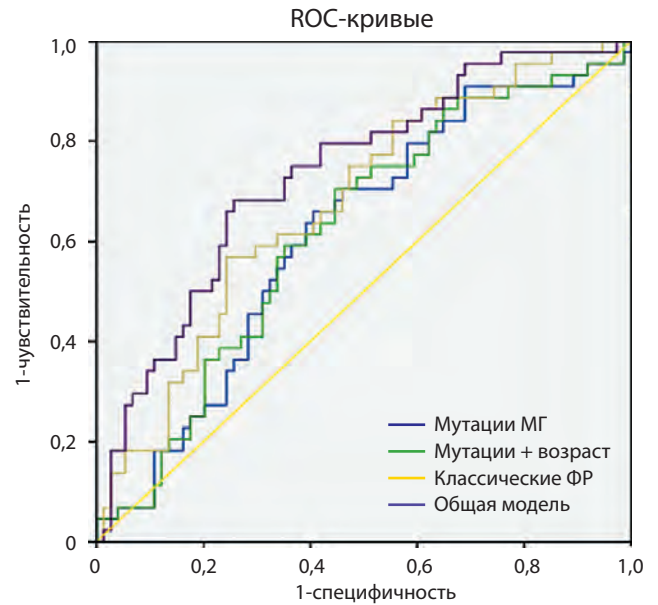


Рис. 4. Характеристические кривые для оценки диагностической значимости мутаций митохондриального генома. МГ – митохондриальный геном; ФР – факторы риска

0,0001) (рис. 1), атеросклерозом сонных артерий и мутацией G14846A ($r = 0,48; p = 0,0001$) (рис. 2). Для мутации G12315A установлена статистически значимая отрицательная связь с атеросклерозом сонных артерий ($r = -0,32; p = 0,01$) (рис. 3). Учитывая полученные выше данные, для оценки диагностической значимости мутаций митохондриального генома как генетических маркеров атеросклероза коронарных и сонных артерий был применен метод построения ROC-кривых (рис. 4).

Мы создали 4 модели (табл. 3). Первая модель включает только мутации митохондриального генома (C3256T, G14846A, G13513A), вторая – мутации и возраст, третья – классические факторы риска, четвертая – мутации в сочетании с возрастом и классическими факторами риска ССЗ.

Таблица 3. Данные характеристических кривых

Переменные	Площадь под кривой	Стандартная ошибка	95 % доверительный интервал	
			нижняя граница	верхняя граница
Мутации МГ	0,615	0,053	0,511	0,719
Мутации МГ + возраст	0,620	0,053	0,517	0,724
Классические ФР	0,675	0,050	0,576	0,774
Мутации + возраст + классические ФР	0,734	0,047	0,642	0,827

Примечание. МГ – митохондриальный геном; ФР – факторы риска ССЗ

Мы сравнили модели для оценки вклада мутаций митохондриального генома в значимость диагностики коронарного и каротидного атеросклероза. При изолированном использовании мутаций митохондриального генома (С3256Т, G14846А, G13513А) в качестве предиктора атеросклероза площадь под кривой составила 0,615, что свидетельствует о связи мутаций с наличием атеросклеротического поражения коронарных и сонных артерий, но степень этой взаимосвязи слабее, чем у классических факторов риска (площадь под характеристической кривой – 0,675). При использовании в модели мутаций митохондриального генома в сочетании с возрастом площадь под кривой была 0,620, и она существенно возростала при использовании в модели возраста, классических факторов риска и мутаций митохондриального генома ($0,734 \pm 0,047$). Таким образом, наилучшее предсказующее значение для подтверждения наличия атеросклероза коронарных и сонных артерий имеет модель, в которую вошли классические факторы риска, возраст и мутации митохондриального генома (С3256Т, G13513А, G14846А).

Обсуждение

В течение длительного времени мутациям митохондриального генома не уделялось должного внимания, хотя они могут играть значимую роль в формировании атеросклеротических поражений артерий. Для митохондриального генома характерна высокая скорость мутирования и накопления соматических мутаций в процессе онтогенеза. В одной клетке могут одновременно присутствовать митохондрии с геномом дикого типа и несущие мутации. За счет митохондрий с немутированной ДНК клетка будет нормально функционировать какое-то время. При достижении определенного порога дефектных копий мтДНК снижается продукция энергии, это приводит к компенсаторной пролиферации всех митохондрий, в том числе и дефектных. В связи с этим мутации митохондриального генома могут длительное время не иметь клинических проявлений.

Данная работа была направлена на поиск генетических биомаркеров атеросклероза – мутаций митохондриального генома. В ней использовался метод количественного определения мутантных аллелей митохондриального генома на основе технологии пиросеквенирования в модификации, разработанной М.А. Сазоновой и соавт. в лаборатории медицинской генетики ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс». Благодаря данному методу возможна не только качественная, но и количественная оценка мутантных аллелей митохондриального генома в лейкоцитах крови человека.

Лейкоциты играют важную роль в атерогенезе. Они мигрируют в субэндотелиальное пространство и участвуют в развитии атеросклеротического поражения сосудистой стенки [12]. Наличие мутаций митохондриального генома в лейкоцитах, находящихся в сосуди-

стой стенке, может привести к локальному окислительному стрессу и другим патологическим реакциям, которые могут способствовать развитию атеросклероза. Возможным механизмом, объясняющим влияние мутаций мтДНК на развитие атеросклероза, является то, что в макрофагах, содержащих мутантную ДНК, снижается продукция аденозинтрифосфата, синтез ферментов-липаз, работающих в лизосомах, макрофаги становятся неспособными полностью метаболизировать модифицированные ЛПНП, в результате чего они накапливаются в атеросклеротической бляшке, превращаясь в пенистые клетки. Поражение сосудистой стенки при атеросклерозе развивается локально. Классическими факторами риска ССЗ невозможно объяснить локальность атеросклеротического поражения. Мутации митохондриального генома могут частично объяснить данный факт. Мутации, передающиеся по материнской линии, могут избирательно накапливаться в определенных участках сосудистой стенки в связи с тем, что при делении митохондрии распределяются между дочерними клетками случайным образом вследствие митотической сегрегации, в результате чего дочерние клетки могут значительно различаться по уровню гетероплазмии [13]. Возможно, участки сосудистой стенки, где содержатся клетки с наибольшим количеством мутантной мтДНК, вследствие митохондриальной дисфункции, снижения производства энергии и выработки большого количества активных форм кислорода становятся наиболее подвержены атеросклеротическому процессу.

В нашем исследовании была показана положительная связь мутаций G13513А и С3256Т с наличием коронарного атеросклероза, в то время как уровень гетероплазмии мутации G12315А был значительно выше среди пациентов с интактными коронарными артериями. Данные нашего исследования частично совпадают с работой, в которую были включены 192 пациента (85 мужчин, средний возраст $65,0 \pm 9,4$ года), среди них 45 участников имели клинические проявления ИБС, было показано, что с ИБС ассоциированы мутации митохондриального генома С3256Т, G12315А, G13513А, уровень мутации G14846А не различался между группами [14]. Однако в этой работе диагноз ИБС выставлялся клинически и коронарный атеросклероз не был верифицирован с помощью КАГ.

В ранее проведенных исследованиях не изучалась ассоциация мутаций митохондриального генома со степенью выраженности коронарного атеросклероза [10, 15, 16]. Нами была установлена лишь слабая положительная корреляция количества пораженных основных коронарных артерий и индекса стенозов Gensini с уровнем гетероплазмии мутации С3256Т.

В связи с данными литературы, свидетельствующими о том, что факторы риска ССЗ (курение, артериальная гипертензия, гиперлипидемия) ассоциируются с повышением уровня производства активных форм

кислорода в митохондриях и, как следствие, с развитием повреждения мтДНК [17, 18], мы провели оценку взаимосвязи классических факторов риска с изучаемыми мутациями мтДНК и не выявили связи мутаций митохондриального генома с факторами риска ССЗ (пол, курение, артериальная гипертензия, отягощенный семейный анамнез по ССЗ, ожирение). Такие же данные были получены в исследовании с участием 183 условно здоровых женщин в возрасте от 34 до 86 лет, не имеющих клинических проявлений атеросклероза, где было показано, что мутации митохондриального генома G13513A, G14846A, C3256T и G12315A не связаны с классическими факторами риска ССЗ (курение, артериальная гипертензия, ожирение) [19].

Ассоциация мутаций с возрастом свидетельствует о накоплении мутаций митохондриального генома в течение жизни человека. Данный факт может быть обусловлен несколькими причинами. Возможно, мутации являются соматическими, это подтверждается тем, что для мтДНК характерна высокая скорость мутирования за счет повышенной концентрации активных форм кислорода в митохондриях, отсутствия защитных гистонов и неэффективной системы репарации [2]. Следующим объяснением накопления мутантной мтДНК может быть пролиферация митохондрий, содержащих мутантный аллель, переданный по наследству по материнской линии. Мутации митохондриального генома приводят к развитию заболевания, если порог гетероплазмии достигает определенного уровня [20, 21].

В нашем исследовании показана прямая связь атеросклероза сонных артерий с мутациями C3256T и G14846A. Для мутации G12315A установлена отрицательная связь с атеросклерозом сонных артерий. В ранее проведенных исследованиях была установлена корреляция между толщиной комплекса интима—медиа сонных артерий и уровнем гетероплазмии мутаций C3256T ($r = 0,362$; $p < 0,001$), G12315A ($r = 0,306$; $p < 0,001$), G13513A ($r = -0,357$; $p < 0,001$), в то время как уровень гетероплазмии мутации G14846A не ассоциирован с толщиной комплекса интима—медиа [16, 14]. В исследовании М.М. Чичевой уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома C3256T, G14709A, G12315A, G13513A и G14846A ассоциирован с атеросклерозом сонных артерий у женщин [19]. Различия между исследованиями могут быть обусловлены разными выборками, в частности, в нашей работе были пациенты с более тяжелым каротидным атеросклерозом, не только с утолщением комплекса интима—медиа, но и с гемодинамически значимыми атеросклеротическими бляшками в сонных артериях.

Выявленная отрицательная связь мутации G12315A с атеросклерозом сонных и коронарных артерий, с гиперлипидемией свидетельствует об антиатерогенном потенциале мутации G12315A. Таким образом, в ходе анализа данных, полученных в нашем исследовании,

мы можем сделать вывод, что на исследуемой выборке мутации C3256T, G13513A, G14846A оказывают проатерогенное действие, а мутация G12315A — антиатерогенное.

Определение точных патогенетических механизмов, с помощью которых мутации митохондриального генома влияют на атерогенез, является важной задачей и требует дальнейшего изучения.

Активные формы кислорода, несомненно, играют важную роль в повреждении мтДНК при атеросклерозе, данные исследования E. Yu et al. свидетельствуют о другом механизме, связывающем повреждение мтДНК и атеросклероз. Дефекты мтДНК способствуют снижению экспрессии генов, кодирующих белки дыхательных комплексов, что приводит к уменьшению выработки аденозинтрифосфата в гладкомышечных клетках, моноцитах/макрофагах, что стимулирует апоптоз и ингибирует пролиферацию клеток, способствуя развитию атеросклероза [22].

На модели мышей показано, что моноциты/макрофаги, содержащие повреждения мтДНК, увеличивают производство фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-1, способствуя увеличению некротического ядра и истончению фиброзного покрытия атеросклеротической бляшки [22].

Показано, что повреждения мтДНК лейкоцитов крови человека не имеют связи с объемом атеросклеротических бляшек, определенным с помощью внутрисосудистого ультразвукового исследования коронарных артерий, но отмечается положительная корреляция повреждений мтДНК с тонкой фиброзной покрывкой атеросклеротических бляшек [23, 24].

Мутация мтДНК C3256T происходит в гене, кодирующем митохондриальную тРНК лейцина. Мутация C3256T вызывает нарушение терминации трансляции, что препятствует отделению полипептидной цепи от рибосомы и приводит к нарушению дальнейшего использования как полипептида, так и рибосомы. Следствием дефектов тРНК лейцина является нарушение трансляции, в результате чего снижается синтез белков дыхательной цепи в митохондриях, что приводит к падению уровня энергии в клетке [25].

Мутация G12315A происходит в нуклеотиде 52 тРНК лейцина, который входит в состав Т-петли тРНК лейцина. Мутация G12315A приводит к замене гуанина на аденин в одной из цепей тРНК лейцина, что приводит к нарушению ее третичной структуры и снижению ее функциональности [26].

Мутация G13513A вызывает замену аспарагиновой кислоты на аспарагин в белке субъединицы 5 комплекса никотинамидадениндинуклеотид-дегидрогеназы дыхательного комплекса I, что приводит к нарушению переноса никотинамидадениндинуклеотида с убихинона на различные цепи пластохинона. В результате наличия мутации происходит снижение эффективности работы комплекса I дыхательной цепи митохондрий,

что способствует развитию митохондриальной дисфункции [27, 28].

Мутация G14846A ведет к изменению аминокислотного состава цитохрома В, который является частью комплекса III дыхательной цепи. При мутировании аминокислота глицин меняется на серин, что создает дополнительный сайт фосфорилирования белковой цепи [29].

Заключение

В нашей работе были исследованы мутации митохондриального генома и показана их ассоциация с атеросклерозом коронарных и сонных артерий, при этом связь с каротидным атеросклерозом была сильнее,

чем с поражением коронарных сосудов. Учитывая полученные данные, мутации митохондриального генома могут быть использованы в качестве генетических маркеров предрасположенности к атеросклерозу. В настоящее время появляется все больше доказательств того, что мутации митохондриального генома и, как следствие, митохондриальная дисфункция принимают непосредственное участие в развитии атеросклероза. Дальнейшие исследования в этом направлении представляются необходимыми. Понимание точных механизмов, с помощью которых мутации митохондриального генома и, как следствие, митохондриальная дисфункция способствуют развитию атеросклероза, откроет новые мишени для разработки лекарственных препаратов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- Ballinger S.W., Petterson C., Yan C.N. et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res* 2000;86(9):960–6.
- Тодоров И.Н., Тодоров Г.И. Мультифакторная природа высокой частоты мутаций в МТДНК соматических клеток млекопитающих. *Биохимия* 2009;74(9):1184–94.
- Wallace D.C., Ye J.H., Neckelmann S.N. et al. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ETP synthase beta subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet* 1987;12(2):81–90.
- Kmiec B., Wolozynska M., Janska H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr Genet* 2006;50(3):149–59.
- Harrison D., Griendling K.K., Landmesser U. et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91(3A): 7A–11A.
- Fearon I.M., Faux S.P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47(3):372–81.
- Madamanchi N.R., Runge M.S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007;100(4):460–73.
- Puddu P., Puddu G.M., Galletti L. et al. Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis. *Cardiology* 2005;103(3):137–41.
- Sobenin I.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M. et al. Mutation C3256T of mitochondrial genome in white blood cells: novel genetic marker of atherosclerosis and coronary heart disease. *PLoS One* 2012;7(10):e46573.
- Mueller E.E., Eder W., Ebner S. et al. The mitochondrial T16189C polymorphism is associated with coronary artery disease in Middle European populations. *PLoS One* 2011;6(1):e16455.
- Sazonova M., Budnikov E., Khasanova Z. et al. Studies of human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. *Atherosclerosis* 2009;204(1):184–90.
- Galkina E., Ley K. Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr Drug Targets* 2007;8(12):1239–48.
- Wonnapijit P., Chinnery P.F., Samuels D.C. The distribution of mitochondrial DNA heteroplasmy due to random genetic drift. *Am J Hum Genet* 2008;83(5):582–93.
- Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А. и др. Ассоциация мутаций ядерного генома с развитием инфаркта миокарда. *Атеросклероз и дислипидемии* 2013;(2):56–60.
- Abu-Amero K.K., Al-Boudari O.M., Moussa A. et al. The mitochondrial DNA variant T16189C is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in Saudi Arabs. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010;14(1):43–7.
- Sobenin I.A., Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V. et al. Mitochondrial mutations in atherosclerosis: new solutions in research and possible clinical applications. *Curr Pharm Des* 2013;19(33):5942–53.
- Wallace D.C. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 1992;256(5057):628–32.
- Ballinger S.W., Patterson C., Knight-Lozano C.A. et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* 2002;30;106(5):544–9.
- Синев В.В., Сазонова М.А., Чичёва М.М. и др. Изучение гетероплазмы мутации митохондриального генома A1555G в гомогенатах пораженной атеросклерозом интимы аорты. *Атеросклероз и дислипидемии* 2013;(3):45–48.
- Silvestri G., Santorelli F.M., Shanske S. et al. A new mtDNA mutation in the tRNA (Leu (UUR)) gene is associated with maternally inherited cardiomyopathy. *Hum Mutat* 1994;3(1):37–43.
- Merante F., Tein I., Benson L., Robinson B.H. Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA (glycine) gene. *Am J Hum Genet* 1994;55(3):437–46.
- Yu E., Calvert P.A., Mercer J.R. et al. Mitochondrial DNA damage can promote atherosclerosis independently of reactive oxygen species through effects on smooth muscle cells and monocytes and correlates with higher-risk plaques in humans. *Circulation* 2013;128(7):702–12.
- Calvert P.A., Obaid D.R., O'Sullivan M. et al. Association between IVUS findings and adverse outcomes in patients with coronary artery disease: the VIVA (VH-IVUS in Vulnerable Atherosclerosis) Study. *JACC Cardiovasc Imaging* 2011;4(8):894–901.
- Stone G.W., Maehara A., Lansky A.J. et al.; PROSPECT Investigators. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011;364(3):226–35.
- Rossmann W., Karwan R.M. Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA (Leu) (UUR) associated with mitochondrial diseases. *FEBS Lett* 1998;433(3):269–74.
- Levinger L., Mörl M., Florentz C. Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Res* 2004;32(18):5430–41.
- Shanske S., Coku J., Lu J. et al. The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases. *Arch Neurol* 2008;65(3):368–72.
- Sudo A., Honzawa S., Nonaka I., Goto Y. Leigh syndrome caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan. *J Hum Genet* 2004;49(2):92–6.
- Andreu A.L., Bruno C., Shanske S. et al. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology* 1998;51(5):1444–7.