

Митохондриальный геном человека представлен компактной кольцевой молекулой ДНК размером около 16,5 тыс. пар нуклеотидов, последовательность которых полностью расшифрована [1].

Обращает на себя внимание тот факт, что в клинических проявлениях многих митохондриальных болезней присутствует поражение сердца - кардиомиопатия.

M. Derbrinski et al. [2] показали, что хроническая недостаточность энергии (в тканях сердца и мозга) ассоциируется с накоплением генетических повреждений в митохондриальной ДНК (мтДНК), а именно в ткани сердца у больных с хронической гипоксией и кардиомиопатиями по сравнению с контрольной группой с возрастом увеличивается частота делеции размером 4997 пар оснований между повторами в 13 пар оснований и генами АТФ-азы и ND<sub>5</sub>.

Интересно исследование, также подтверждающее возможное участие нарушений мтДНК в развитии патологических состояний сердечно-сосудистой системы. Изучались частота делеций в митохондриальном геноме у здоровых лиц разного возраста и больных с коронаросклерозом [3]. Было отмечено, что делеции в отдельных районах мтДНК у больных коронаросклерозом регистрируются в 7-200 раз чаще, чем у здоровых лиц того же возраста.

В результате большой делеции мтДНК (до 7 Кб) наблюдается снижение активности ферментов комплексов I, III и IV митохондрий. В результате этого развивается синдром Кернса-Сейра - мультисистемное заболевание, клинически характеризующееся развитием хронической наружной офтальмоплегии, нарушением сердечного ритма, пигментной дегенерацией сетчатки [4].

Ряд исследователей оценил мутации и полиморфизм митохондриальной ДНК у больных с дилатационной кардиомиопатией [5,6, 7].

И поскольку исследование рестрикционного полиморфизма мтДНК у больных с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости (НСП) ранее не проводилось, нам показалась интересной эта область исследований.

**Цель настоящего исследования:** анализ ассоциаций идиопатических нарушений сердечной проводимости с полиморфизмом митохондриального генома.

#### **Материалы и методы.**

Проведено семейное обследование 316 пробандов, имеющих различные варианты НСП, и 1020 их родственников I, II, III степени родства (основная группа). Первая подгруппа - это 158 пробандов с атриовентрикулярными блокадами (АВБ) различной степени и 518 их родственников. Вторая подгруппа включала в себя 50 пробандов с полной блокадой правой ножки пучка Риса (ПБПНПГ) и 161 их родственников. Третья подгруппа - 108 пробандов с полной блокадой левой ножки пучка Риса (ПБЛНПГ) и блокадой левой передней ветви пучка Гиса (БЛПВПГ) и 152 их родственника. Контрольная группа состояла из 104 пробандов без клинико-электрокардиографических проявлений заболевания сердца и 321 их родственников. Всем обследуемым проводилась электрокардиография, атропиновая проба, эхокардиоскопия, электрофизиологическое исследование; части больным, при невозможности верифицировать НСП по поверхностной ЭКГ, исследование электрограммы пучка Гиса; для исключения вторичной патологии в диагностически неясных случаях - коронарография и скинтиграфия миокарда.

Материалом для генетического исследования послужила тотальная геномная ДНК части больных с различными вариантами НСП и лиц контрольной группы. ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови по стандартной методике. Анализ полиморфизма гена АПФ проводили ПЦР-методом с использованием праймеров, синтезированных группой синтеза и секвенса нуклеиновых кислот НИИ медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью критерия  $\chi^2$ .

#### **Результаты исследования.**

Выявлена взаимосвязь между полиморфными локусами митохондриального генома с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости. Из девяти потенциально полиморфных сайтов рестрикции в D-петле мтДНК полиморфизм был обнаружен только по пяти. Данные о частотах вариантов сайтов рестрикции у больных с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости и в контрольной группе приведены в таблице 1.

Сравнение частот сайтов рестрикции D-петли мтДНК в группе больных с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости и в контроле выявило достоверное повышение частоты сайта Hae III 16517 в группе больных ( $P = 0,0480$ ). Разделение группы больных по локализации блокады (атриовентрикулярные и внутрижелудочковые) показало, что повышение частоты этого сайта более выражено в группе больных с атриовентрикулярными блокадами, где она составила 86,36%. Уровень значимости при сравнении с контролем - 0,0059. Таким образом, имеет место ассоциация варианта «+» по сайту Hae III 16517 мтДНК с нарушениями сердечной проводимости, более выраженная в случае атриовентрикулярных блокад.

Вопрос о функциональной значимости полиморфизма по сайту рестрикции Hae III 16517 требует специального обсуждения. С одной стороны, он расположен в некодирующей области мтДНК и поэтому не связан с заменой аминокислоты в белке. С другой стороны, D-петля мтДНК содержит регуляторные элементы и изменения их нуклеотидной последовательности, определяющей вторичную структуру этого участка, предположительно могут

влиять на интенсивность репликации и транскрипции мтДНК, что в свою очередь воздействует на функцию окислительного фосфорилирования, так как мтДНК кодирует субъединицы ферментов дыхательной цепи.

5

Таким образом, полученную положительную ассоциацию варианта «+» по этому сайту следует, видимо, рассматривать скорее как действительный вклад этого варианта в формирование фенотипа нарушений сердечной проводимости. Альтернативным объяснением может быть сцепление этого сайта с действительно функционально значимой мутацией где-либо в кодирующей части мтДНК, но это менее вероятно, так как сайт Hae III 16517 является гипервариабельным и в нем часты обратные мутации.

В связи с тем, что митохондриальная ДНК не рекомбинирует, а передается по материнской линии, целесообразно рассматривать не только отдельные сайты рестрикции, но и их комбинации - гаплотипы, которые являются неизменными на протяжении многих поколений, а различия между линиями возникают только за счет мутаций. В настоящей работе комбинации полиморфных сайтов в D-петле определены как митотипы и рассмотрено их распределение в группе идиопатических нарушений сердечной проводимости в сравнении с контрольной группой. На основе комбинации исследованных сайтов в группе больных идиопатическими нарушениями сердечной проводимости было выявлено 12 митотипов. Структура митотипов и их частоты в группе больных и в контроле представлены в таблице 2.

В группе больных с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости можно выделить три наиболее часто встречающихся митотипа: это митотипы 1 (58,93%), 2 (17,86%) и 3 (10,71%). Другие митотипы встречаются со значительно меньшей частотой - 5,36% и ниже. В контрольной группе отмечено два основных митотипа: это митотипы 1 (49,50%) и 2 (36,63%). Таким образом, можно заключить, что в митотипической структуре больных с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости выделяется «основное ядро», представленное тремя наиболее встречающимися митотипами (1, 2 и 3).

Итак, больным с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости по сравнению с контролем свойственна высокая частота сайта рестрикции HaeIII 16517 ( $P = 0,0480$ ). Повышение частоты этого сайта более выражено в группе больных с атриовентрикулярными блокадами (частота сайта 86,36%), уровень значимости при сравнении с контролем составил 0,059-

Митотипический состав больных с идиопатическими нарушениями сердечной проводимости, определяемый полиморфизмом некодирующей области мтДНК, характеризуется преобладанием трех митотипов, суммарная доля которых составляет 87,5%, а частота наиболее распространенного митотипа достигает 58,93%.

**Обсуждение.** Таким образом, изменчивость мтДНК представляет собой возможный этиологический фактор патогенеза идиопатических нарушений сердечной проводимости. Очевидно, что замена нуклеотида в эволюционно консервативной области транспортной РНК приводит к нарушению вторичной структуры молекулы. Такая транспортная РНК не способна нормально функционировать, что ведет к падению уровня субъединиц ферментов дыхательной цепи, кодируемых митохондриальным геномом. Снижение активности метаболических процессов в митохондриях приводит к падению производства АТФ и нарушению нормального энергетического баланса миокарда. Изучение полиморфизма мтДНК в данном аспекте расширит возможности клинициста в ранней диагностике, а значит, и в своевременной терапии этих заболеваний.

Использование генетических маркеров для повышения точности диагноза представляется достаточно перспективным. Вместе с тем сила ассоциации маркера с заболеванием может значительно варьировать в различных популяциях, поэтому простая экстраполяция полученных значений на другие популяции требует известной осторожности и специальной проверки.

Таблица 1. Рестрикционный полиморфизм мтДНК у больных с нарушениями сердечной проводимости и в контрольной группе

Полиморфный сайт	Атриовентрикулярные блокады (N = 22)		Внутрижелудочковые блокады (N = 34)		Вместе блокады (N = 56)		Контроль (N = 101)		P
	n	%	n	%	n	%	n	%	
EcoRV16278	2	9,10	0	0	2	3,57	4	3,42	0,6008
BmeI8116390	21	93,36	33	97,62	55	97,62	97	95,97	0,4878
Kzo9II16215	1	4,45	1	2,94	2	3,57	2	1,59	0,6008

Крnl 16129	18	81,82	28	82,35	46	82,14	92	90,83	0,2370
НaeIII 16517	19	86,36	24	70,59	43	76,79	58	56,90	0,0480

Таблица2. Частоты рестрикционных митотипов в группах больных и в контроле

№	Полиморфные сайты					Частота митотипов								P
	o 0 55 g	oo	a.		15	Атриовентрикулярные блокады (N = 22)		Внутрижелудочковые блокады (N = 34)		Суммарно блокады (N = 56)		Контроль (N=101)		
						n	%	n	%	n	%	n	%	
1	+	-	+	-	+	13	59,09	20	58,82	33	58,93	50	49,50	0,3963
2	+	-	+	-	-	3	13,64	7	20,59	10	17,86	37	36,63	0,0227
3	+	-	-	-	+	3	13,64	3	8,82	6	10,71	6	5,94	0,4444
4	+	-	-	-	-	0	0	3	8,82	3	5,36	1	0,99	0,2865
5	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0	1	0,99	-
6	+	+	+	-	-	0	0	0	0	0	0	3	2,97	-
7	+	-	+	+	+	1	4,55	1	2,94	2	3,57	0	0	
8	+	+	-	-	+	1	4,55	0	0	1	1,79	0	0	- %
9	+	+	+	-	+	1	4,55	0	0	1	1,79	0	0	-
10	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0	1	0,99	-
11	+	+	-	-	-	0	0	0	0	0	0	1	0,99	-
12	-	-	+	-	+	0	0	0	0	0	0	1	0,99	-