

Полиморфизм мтДНК при клинически выраженном каротидном атеросклерозе: протективный эффект гаплогруппы J

Голубенко М.В.^{1,2}, Тарасенко Н.В.^{1,3}, Макеева О.А.¹, Гончарова И.А.^{1,2}, Марков А.В.¹, Слепцов А.А.¹, Комар А.А.³, Назаренко М.С.^{1,2,3}, Барбараш О.Л.², Пузырев В.П.^{1,3}

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия
e-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

Исследован полиморфизм митохондриальной ДНК (мтДНК) в группе пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и в контрольной группе индивидов с субклиническим атеросклерозом. Определены частоты основных гаплогрупп мтДНК. Сравнение частот гаплогрупп H, U, J и T в исследуемых выборках показало более высокую частоту гаплогруппы J в контроле: 17,65%, по сравнению с 4,55% в группе больных ($p = 0,0145$). Полученные результаты указывают на протективный эффект гаплогруппы J в отношении развития клинически выраженного каротидного атеросклероза.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, гаплогруппа J, атеросклероз.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование поддержано грантом РФФИ №16-04-01481-А.

Mitochondrial DNA polymorphism in advanced carotid atherosclerosis: protective effect of haplogroup J

Golubenko M.V.^{1,2}, Tarasenko N.V.^{1,3}, Makeeva O.A.¹, Goncharova I.A.^{1,2}, Markov A.V.¹, Sleptsov A.A.¹, Komar A.A.³, Nazarenko M.S.^{1,2,3}, Barbarash O.L.², Puzirev V.P.^{1,3}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk

² Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular diseases, Kemerovo

³ Siberian State Medical University, Tomsk

MtDNA polymorphism was studied in the group of patients with advanced carotid atherosclerosis and in controls with subclinical atherosclerosis. Frequencies of main European mtDNA haplogroups were determined. Comparison of the haplogroups frequencies has revealed higher frequency of haplogroup J in controls (17.65%) than in patients (4.55%; $p = 0.0145$). The results suggest protective effect of haplogroup J in relation to advanced carotid atherosclerosis.

Key words: mitochondrial DNA, haplogroup J, atherosclerosis.

Введение

В патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний важную роль играют митохондрии и окислительный стресс [1]. Митохондриальный геном человека (мтДНК) характеризуется высоким уровнем полиморфизма в популяциях. Учитывая, что мтДНК кодирует белки дыхательной цепи митохондрий, можно предположить, что полиморфизм мтДНК может вносить вклад в предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям, в том числе к атеросклерозу. Целью исследования был сравнительный анализ полиморфизма мтДНК (наиболее распространенных гаплогрупп) у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и в группе пожилых людей с субклиническим атеросклерозом.

Материалы и методы

Выборка пациентов с атеросклерозом сонных артерий ($N = 110$) была сформирована из образцов ДНК пациентов, обследованных и оперированных в НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово). Исследование одобрено локальными этическими комитетами НИИ КПССЗ и НИИ МГ ТНИМЦ. От всех обследуемых получено информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Средний возраст индивидов в выборке составил 63 года. Все пациенты имели стеноз сонных артерий более 50%, сопровождающийся инсультом или транзиторными ишемическими атаками в анамнезе, или стеноз сонных артерий более 70%, что являлось показанием к операции каротидной эндартерэктомии.

Контрольная выборка была сформирована из добровольцев — жителей г. Томска, без жалоб на состояние сердечно-сосудистой системы и без диагностированных сердечно-сосудистых заболеваний (N = 51). Всем участникам контрольной группы было проведено ультразвуковое обследование сонных и позвоночных артерий. Средний возраст индивидов в контрольной группе составил 72 года. По результатам УЗИ сонных артерий, 10 человек (20%) не имели признаков атеросклероза, у 18 человек (35%) толщина комплекса интима-медиа превышала 1 мм (без образования бляшек), у 12 человек было выявлено сужение просвета артерии (стеноз) менее 30%, и у 11 человек — стеноз от 30% до 45%. Во всех случаях обследованные не имели симптомов нарушений мозгового кровообращения, поэтому наличие стеноза такой степени рассматривали как субклинический атеросклероз.

ДНК выделяли из лейкоцитов цельной венозной крови фенол-хлороформным методом. Генотипирование мтДНК осуществляли путем секвенирования первого гипервариабельного сегмента (ГВС1, 16024-16400) D-петли мтДНК методом Сэнгера на автоматическом генетическом анализаторе ABI 3730, с использованием праймеров L15996 и H408. Указанные координаты секвенируемого участка и 5'-концов праймеров приведены по исправленной референсной последовательности митохондриального генома человека rCRS [2]. Гаплотипы ГВС1 мтДНК определяли как перечень расхождений с rCRS и предварительно классифицировали по известным гаплогруппам мтДНК, ориентируясь на характерные замены в ГВС1. Затем принадлежность к гаплогруппе уточняли, генотируя известные «диагностические» полиморфные сайты в кодирующей части митохондриального генома рестрикционным анализом (см. [3]). Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Статистический анализ данных выполнен с использованием программного пакета SPSS Statistics 17.0 (IBM, США). Сравнение частот гаплогрупп мтДНК

между анализируемыми выборками проводили по критерию χ^2 с поправкой Йейтса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате генотипирования мтДНК в исследованных выборках были определены частоты гаплогрупп мтДНК, составляющих основную долю в митохондриальном генофонде европейцев: H, U, J и T, а также частота полиморфизма T16189C, который встречается в различных гаплогруппах. В целом, частотный профиль этих гаплогрупп соответствовал таковому в российских популяциях, в частности, в популяции г. Томска [3], за исключением частоты гаплогруппы J, которая была значительно выше в контрольной группе, по сравнению с выборкой больных: 17,65% и 4,55% соответственно, $p = 0,0145$ при сравнении по критерию χ^2 с поправкой Йейтса (таблица). Высокая доля гаплогруппы J, наблюдаемая в контрольной выборке, является нехарактерной для русских популяций, где она обычно не превышает 10%. Таким образом, полученные результаты указывают на вероятный протективный эффект гаплогруппы J в отношении риска развития клинически выраженного каротидного атеросклероза. Для других гаплогрупп и полиморфизма T16189C не было выявлено статистически значимых различий.

Протективный эффект митохондриальной гаплогруппы J в отношении атеросклероза на примере атеросклероза сонных артерий показан нами впервые. Однако для этого филогенетического кластера ранее были выявлены ассоциации с другими фенотипами, причем гаплогруппа J может проявлять себя и как благоприятный, и как неблагоприятный фактор: именно эта гаплогруппа чаще всего является фоном для мутаций офтальмопатии Лебера [4] и, по данным некоторых исследователей, может быть ассоциирована с сахарным диабетом 2 типа [5]. С другой стороны, в некоторых популяциях гаплогруппа J была ассоциирована с долгожительством [6–7]. В одном исследовании для гаплогрупп H и J были выявлены разнонаправленные эффекты при

Таблица

Сравнение частот гаплогрупп мтДНК в выборке больных клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и в контрольной группе

Гаплогруппа мтДНК	Частота в группе больных, %	Частота в контрольной группе, %	Значение критерия χ^2 ; уровень значимости
H	40,0	33,33	0,41; $p = 0,5244$
U	25,45	23,53	0,07; $p = 0,9466$
J	4,55	17,65	5,97; $p = 0,0145$
T	11,82	11,76	0,06; $p = 0,8005$
Другие	18,18	13,73	0,18; $p = 0,6694$
Замена T16189C	22,73	25,49	0,03; $p = 0,8535$

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые значения.

ишемической кардиомиопатии: частота гаплогруппы Н была выше у больных, а частота гаплогруппы J — у здоровых [8]. Тенденция к более высокой частоте гаплогруппы Н у пожилых относительно здоровых индивидов имела место и в нашем исследовании (таблица).

В экспериментах с цибридными клеточными линиями (линии, имеющие одинаковый ядерный геном, но различающиеся по генотипу мтДНК) было показано, что линии с гаплогруппой J мтДНК имеют более низкий уровень продукции как АТФ, так и АФК, по сравнению с гаплогруппой Н; также были выявлены различия в экспрессии некоторых ядерных генов, вовлеченных в различные биохимические пути (апоптоз, воспаление, система комплемента) [9–10]. Позже этими же исследователями было показано, что различия в экспрессии ядерных генов могут быть обусловлены различиями в их статусе метилирования [11]. Цибридные линии с гаплогруппой J имели также более высокую скорость роста, по сравнению с Н, в том числе при воздействии сублетальных доз ультрафиолетового излучения [12]. Метаанализ публикаций по ассоциативным исследованиям мтДНК с МФЗ выявил «глобальный» эффект гаплогруппы Н [13]. Таким образом, низкий уровень продукции АФК — и, следовательно, низкий (по сравнению с другими гаплогруппами) уровень окислительного стресса у носителей гаплогруппы J может объяснять выявленный нами протективный эффект этой гаплогруппы.

Учитывая небольшую численность исследованной нами контрольной группы, выявленный эффект гаплогруппы J в отношении клинически выраженного каротидного атеросклероза требует подтверждения на более репрезентативных выборках. Тем не менее, полученные результаты согласуются с ранее выявленной ассоциацией гаплогруппы J с долгожительством, а также данными о роли окислительного стресса в развитии атеросклероза [6, 7, 9, 10]. Таким образом, принадлежность мтДНК к гаплогруппе J можно рассматривать как потенциальный протективный фактор в отношении риска развития клинически выраженного каротидного атеросклероза.

Список литературы

1. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999 Oct;23(2):147.
2. Yu E, Calvert PA, Mercer JR, 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 Aug 13;128(7):702-12.
3. Голубенко МВ, Салахов Р.Р., Макеева О.А., и др. Ассоциации полиморфизма митохондриальной ДНК с инфарктом миокарда и прогностически значимыми признаками атеросклероза. *Молекулярная биология.* 2015; 49 (6):968-976.
4. Мазунин ИО, Володько НВ, Стариковская ЕБ, Сукерник РИ. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека. *Молекулярная биология.* 2010; 44 (5):755-772.
5. Crispin D, Canani LH, Gross JL, et al. The European-specific mitochondrial cluster J/T could confer an increased risk of insulin-resistance and type 2 diabetes: an analysis of the m.4216T > C and m.4917A > G variants. *Ann Hum Genet.* 2006 Jul;70(Pt 4):488-495.
6. De Benedictis G, Rose G, Carrieri G, et al. Mitochondrial DNA inherited variants are associated with successful aging and longevity in humans. *FASEB J.* 1999 Sep;13(12):1532-1536.
7. Santoro A, Salvioli S, Raule N, et al. Mitochondrial DNA involvement in human longevity. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1388-1399.
8. Fernandez-Caggiano M, Barallobre-Barreiro J, Rego-Perez I, et al. Mitochondrial haplogroups H and J: risk and protective factors for ischemic cardiomyopathy. *PLoS One.* 2012 7(8):e44128.
9. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2013 8(1):e54339.
10. Kenney MC, Hertzog D, Chak G, et al. Mitochondrial DNA haplogroups confer differences in risk for age-related macular degeneration: a case control study. *BMC Med Genet.* 2013 Jan 9;14:4.
11. Atilano SR, Malik D, Chwa M, et al. Mitochondrial DNA variants can mediate methylation status of inflammation, angiogenesis and signaling genes. *Hum Mol Genet.* 2015 Aug 15;24(16):4491-4503.
12. Malik D, Hsu T, Falatoonzadeh P, Caceres-del-Carpio J, et al. Human retinal trans-mitochondrial cybrids with J or H mtDNA haplogroups respond differently to ultraviolet radiation: implications for retinal diseases. *PLoS One.* 2014 Jun 11;9(2):e99003.
13. Marom S, Friger M, Mishmar D. MtDNA meta-analysis reveals both phenotype specificity and allele heterogeneity: a model for differential association. *Sci Rep.* 2017 Feb 23;7:43449.