

# Полиморфизм митохондриальной ДНК и заболевания сердечно-сосудистого континуума

Голубенко М.В.<sup>1,2</sup>, Салахов Р.Р.<sup>2</sup>, Шумакова Т.В.<sup>1</sup>, Буйкин С.В.<sup>1</sup>,  
Макеева О.А.<sup>1</sup>, Назаренко М.С.<sup>1,2,3</sup>, Пузырев В.П.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск, Россия

e-mail: maria.golubenko@medgenetics.ru

Митохондриальный геном кодирует жизненно важные белки субъединиц дыхательной цепи и характеризуется высоким уровнем полиморфизма в популяциях человека. Однако работы по поиску генов предрасположенности к многофакторным заболеваниям, в том числе сердечно-сосудистым, часто ограничиваются анализом ядерного генома. В то же время показано, что отдельные генотипы мтДНК могут отличаться более высокой или низкой эффективностью окислительного фосфорилирования. Выявлены ассоциации популяционного полиморфизма мтДНК с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Согласно результатам наших исследований, а также опубликованных другими авторами результатам ассоциативных и функциональных исследований, можно говорить о том, что эффект полиморфизма мтДНК проявляется чаще не в предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям в целом, а в риске развития осложнений и коморбидных фенотипов в пределах синтропии сердечно-сосудистого континуума.

**Ключевые слова:** митохондриальная ДНК (мтДНК), полиморфизм, сердечно-сосудистый континуум.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

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

## Mitochondrial DNA polymorphism and cardiovascular continuum diseases

Golubenko M.V.<sup>1,2</sup>, Salakhov R.R.<sup>2</sup>, Shumakova T.V.<sup>1</sup>, Buikin S.V.<sup>1</sup>,  
Makeeva O.A.<sup>1</sup>, Nazarenko M.S.<sup>1,2,3</sup>, Puzyrev V.P.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular diseases, Kemerovo, Russia

<sup>3</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Mitochondrial genome, encoding respiratory chain subunits, is characterized by high polymorphism level in human populations. In most studies for susceptibility genes for common diseases, including cardiovascular diseases, the analysis is limited to the nuclear genome. It was shown that particular mtDNA genotypes may differ by oxidative phosphorylation efficiency. Some associations of mtDNA polymorphisms with cardiovascular diseases have been found. According to our results and published data, we suggest that mtDNA effect on cardiovascular system does not manifest in predisposition to cardiovascular diseases themselves but rather in risk of complications and comorbidities in the cardiovascular continuum.

**Key words:** mitochondrial DNA (mtDNA), polymorphism, cardiovascular continuum.

### Введение

Заболевания сердечно-сосудистой системы, объединяемые в сердечно-сосудистый континуум (ССК) [1], являются ведущей причиной заболеваемости и смертности взрослого населения. Оценки наследуемости болезней, входящих в ССК, достигают 65%. Однако многочисленные исследования, посвященные анализу ассоциаций полиморфизма генома человека с сердечно-сосудистыми заболеваниями, обычно выявляют не так уж много SNP, имеющих значимые эффекты. Так, в одном из наиболее крупных полногеномных ассоциативных

исследований (GWAS) для атеросклероза был выявлен сильный эффект всего одного SNP, для сахарного диабета 2 типа — трех SNP и для гипертонии — ни одного варианта [2]. Расхождения между оценками наследуемости и фактически выявляемым эффектом генов предрасположенности к многофакторным заболеваниям с использованием GWAS были обозначены как «упущенная наследуемость» [3]. Наряду с эпигенетическими изменениями, эпистазом и генно-средовыми взаимодействиями, одним из компонентов «упущенной наследуемости» может являться митохондриальный геном [4].

### Особенности полиморфизма мтДНК при многофакторных заболеваниях

Митохондриальная ДНК (мтДНК), в отличие от ядерного генома, расположена в цитоплазме, характеризуется высоким числом копий в клетке, может реплицироваться в течение всего клеточного цикла (а не только в S-фазе), имеет более высокий темп мутирования по сравнению с ДНК хромосом, наследуется по материнской линии без рекомбинации с отцовской мтДНК. Вероятно, эти особенности и привели к тому, что полиморфизм мтДНК обычно не рассматривается в GWAS. В то время как в ядерных генах для каждого биаллельного SNP возможны три варианта генотипа, а различные SNP на одной хромосоме могут быть или не быть сцеплены друг с другом, в мтДНК все полиморфные сайты изначально находятся в полном неравновесии по сцеплению, и генотип почти всегда «гомозиготен» — гомоплазмичен, за исключением случаев гетероплазмии, которые довольно редки. Таким образом, методы анализа ассоциаций мтДНК с заболеваниями несколько отличаются от используемых при работе с ядерными генами.

Технологический переход от GWAS с использованием SNP-микрочипов к секвенированию полных экзотов методом массового параллельного секвенирования не изменил этой ситуации: большинство наборов для обогащения и подготовки экзомных ДНК-библиотек не содержат проб для мтДНК [5]. Таким образом, мтДНК в буквальном смысле является «упущенной наследственностью» в масштабных генетических исследованиях многофакторных заболеваний.

Следует отметить, что для мтДНК уже осуществлена та задача, которая стоит сейчас перед исследователями ядерного генома: подробная классификация и описание популяционного полиморфизма. Соответственно, при анализе ассоциаций с полиморфизмом мтДНК исследователи сталкиваются с проблемами, которые только намечаются в полноэкзомных и полногеномных работах: как среди большого количества вариантов найти действительно значимые и учесть их взаимодействие в одном гаплотипе.

Дизайн ассоциативного исследования «случай-контроль» предполагает сравнение частот генотипов между анализируемыми выборками. При исследовании мтДНК обычно рассматривают наиболее распространенные в популяции гаплогруппы или полиморфизм в отдельных гипервариабельных сайтах. При этом нужно заметить, что как со стороны фенотипа, так и со стороны генотипа в таких исследованиях имеет место «скрытая изменчивость». Так, самая частая у европейцев гаплогруппа H (около 40% в популяции) состоит из десятков субгаплогрупп. Вторая по распространенности среди европейцев гаплогруппа U «старше», чем H, и состоит из девяти отдельных гаплогрупп U1-U9 (в том числе гаплогруппа K является ветвью гаплогруппы U8). Гаплогруппы J и T имеют ряд общих аминокислотных замен. В каждой из таких филогенетических линий

в процессе микроэволюции сложился свой уникальный набор замен в различных генах мтДНК, в том числе миссенс-полиморфизмов, замен в генах рРНК, тРНК и в регуляторных участках мтДНК. В свою очередь, фенотипическая гетерогенность выборок также может быть очень высокой: «коронарный атеросклероз», «инфаркт миокарда», «артериальная гипертензия» являются общими фенотипами, генетическая основа которых гетерогенна.

В результате при проведении ассоциативного исследования «случай-контроль» можно получить значимые различия лишь в случае довольно сильного эффекта отдельного варианта. Более детальное генотипирование (вплоть до полной последовательности мтДНК), учет сцепления и гомоплазмии (повторных мутаций на разном генетическом фоне) может помочь выявить более слабый вклад в предрасположенность к многофакторным заболеваниям.

При этом ассоциации, найденные в одной популяции, могут не выявляться в другой, что объясняется географической дифференциацией полиморфизма мтДНК. Например, ассоциация варианта T16189C с сахарным диабетом 2 типа [6] подтверждается не во всех исследованиях [7], однако в европейских, азиатских и латиноамериканских популяциях этот полиморфизм связан с разными гаплогруппами — т.е. с различным «генетическим фоном».

В отношении фенотипа нужно также стремиться к большей однородности выборок. Одним из способов «уточнения» фенотипа может быть выделение подгрупп пациентов с определенным характером течения заболевания и сопутствующими заболеваниями в пределах ССК, а также сравнение подгрупп с наличием или отсутствием сопутствующего заболевания или осложнения. Для изучения подверженности к болезни лучше использовать не только популяционный контроль (большинство индивидов в популяции имеют предрасположенность к заболеваниям ССК), но и группы индивидов, здоровых в пожилом возрасте, а также долгожителей.

### Полиморфизм митохондриальной ДНК и заболевания ССК

Используя подобный подход в наших исследованиях, мы выявили ассоциации полиморфизма мтДНК с некоторыми фенотипами ССК (таблица). В частности, при сравнении выборки, сформированной из образцов ДНК индивидов, умерших в возрасте до 55 лет по различным сердечно-сосудистым причинам, было показано, что гаплогруппа H1 ассоциирована с ранней смертью от сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Такой же неблагоприятный эффект для гаплогруппы H1 был выявлен и в отношении риска повторных инфарктов миокарда, ишемических инсультов, прогрессирования сердечной недостаточности в течение года после перво-

го инфаркта миокарда [9]. В то же время, фактором риска для раннего инфаркта миокарда — в возрасте до 55 лет — являлись гаплогруппа U2e и замена T16189C, а гаплогруппа U5, наоборот, реже встречалась в группе пациентов с ранним инфарктом, но с другой стороны, она ассоциирована с таким неблагоприятным показателем как сниженная (<40%) фракция выброса левого желудочка [9]. Все субгаплогруппы H, кроме H1 были факторами риска для развития ишемической кардиомиопатии, по сравнению с популяционной выборкой [8]. Анализ полиморфизма мтДНК при артериальной гипертензии показал, что гаплогруппа T была ассоциирована с гипертрофией левого желудочка сердца, в то время как индивиды с гаплогруппой H были менее склонны к развитию гипертрофии [10]. Гаплогруппа J была более распространена у пожилых людей без клинически выраженного атеросклероза сонных артерий, по сравнению с пациентами, имевшими показания для удаления каротидных бляшек. Согласно последним нашим исследованиям, у больных с сахарным диабетом 2 типа обнаружено разнонаправленное изменение частот гаплогрупп J и T в зависимости от того, перенесли ли они инфаркт миокарда: гаплогруппа T встречалась главным образом в группе с инфарктом, а гаплогруппа J — в группе без инфаркта. В выборке пациентов с сахарным диабетом 2 типа без инфаркта миокарда в анамнезе частоты гаплогрупп J и T составили 18,8% и 3,03%, а в группе пациентов с сахарным диабетом, перенесших инфаркт миокарда — 2,86% и 15,71% соответственно. Показано, что полиморфизм мтДНК ассоциирован также с изменчивостью количественных признаков: гаплогруппа H и вариант 16519C связаны с индексом массы тела у больных с острым коронарным синдромом, а у пациентов с са-

харным диабетом 2 типа гаплогруппа H была ассоциирована с более высокими значениями глюкозы в крови натощак; выявлена ассоциация гаплогруппы U с толщиной комплекса интима-медиа сонных артерий, а U5 — со сниженной фракцией выброса левого желудочка, найдена ассоциация гаплогруппы H с уровнем холестерина и со значениями глюкозы в крови индивидов при поступлении в стационар [9,11]. Выявлена ассоциация полиморфизма мтДНК с изменчивостью липидного спектра и интервальных оценок ЭКГ в популяциях различного этнического происхождения [8, 12–14].

Интересно, что большинство ассоциированных с фенотипом гаплогрупп мтДНК распространены в популяции с частотой около 10% (H1 — 12%, T — 10%, J — 6%, U5 — 12%). Другая заметная особенность состоит в том, что для полиморфизма мтДНК значимые ассоциации выявляются, главным образом, не с основными заболеваниями ССК (инфаркт миокарда, атеросклероз, сахарный диабет 2 типа, гипертензия), а с их осложнениями, коморбидными фенотипами (например, инфаркт миокарда при сахарном диабете 2 типа, повторные инфаркты в течение года наблюдения и т.д.), а также с изменчивостью патогенетически значимых количественных признаков. Обращает на себя внимание и тот факт, что некоторые гаплогруппы мтДНК нельзя однозначно охарактеризовать как «благоприятные» или «неблагоприятные». В зависимости от фенотипа, они могут иметь либо «рисковый», либо «протективный» эффект: например, гаплогруппа U5. Гаплогруппа J, по нашим данным, при заболеваниях ССК является скорее «благоприятным» фактором, тогда как, например, для офтальмопатии Лебера и для синдрома Бругада это фактор риска [15, 16].

Таблица

## Ассоциации полиморфизма мтДНК с фенотипами ССК

Гаплогруппа (маркер)	Ассоциированный фенотип	OR	Доверительный интервал для OR
H1	Смерть от сердечно-сосудистых заболеваний в возрасте до 55 лет	1,98	1,11–3,51
H1	Повторные сердечно-сосудистые "события" в течение года после инфаркта миокарда	5,29	1,81–15,47
U2e	Инфаркт миокарда в возрасте до 55 лет	— *	p = 0,004*
T16189C	Инфаркт миокарда в возрасте до 55 лет	2,22	1,26–3,92
U5	Инфаркт миокарда в возрасте до 55 лет	0,29	0,13–0,66
U5	Значение фракции выброса левого желудочка менее 40%	2,3	1,13–4,70
J	Атеросклероз сонных артерий	0,22	0,07–0,71
J	Инфаркт миокарда у больных диабетом 2 типа	0,22	0,05–0,98
T	Инфаркт миокарда у больных диабетом 2 типа	10,91	2,34–50,82
T	Гипертрофия левого желудочка при артериальной гипертензии	6,16	1,17–9,74
H	Гипертрофия левого желудочка при артериальной гипертензии	0,42	0,17–0,98
H(-H1)	Ишемическая кардиомиопатия	1,51	1,04–2,20
Примечание. * OR не был рассчитан из-за нулевой частоты маркера в одной из групп. Уровень значимости различий указан по точному критерию Фишера.			

# Оценка функциональной значимости популяционного полиморфизма митохондриальной ДНК

Известно, что гаплогруппы Н и J различаются по эффективности окислительного фосфорилирования и продукции активных форм кислорода: Н характеризуется более высокими значениями этих показателей, а J — более низкими. Это было показано с использованием цибридов — клеточных линий, которые имеют одинаковый ядерный геном, но отличаются своей мтДНК [17]. При сопоставлении гаплогруппы Н и африканской супергаплогруппы L были выявлены различия в продукции АТФ и АФК, а также в уровне экспрессии генов различных сигнальных путей [18].

Клеточные линии с гаплогруппой Т были более устойчивы к окислительному стрессу [19], а цибридные линии с гаплогруппой J обладали большей скоростью роста и более высокой выживаемостью при сублетальных дозах ультрафиолетового облучения [20]. У больных астенозооспермией с гаплогруппой Т при изучении активности окислительного фосфорилирования было выявлено снижение эффективности работы первого комплекса — на 23% и четвертого комплекса — на 29%, по сравнению с гаплогруппой Н [21]. Также было показано, что гаплогруппа Т чаще встречается у больных гипертрофической кардиомиопатией [22]. Таким образом, эта гаплогруппа может являться фактором, способствующим гипертрофии миокарда как при моногенном заболевании [22], так и при гипертонии [10], а при сахарном диабете 2 типа — фактором риска инфаркта миокарда (см. выше).

Полиморфизм T16189C, приводящий к образованию гомополимерного (цитозинового) тракта с гетероплазмией длины этого тракта, может влиять на связывание белка mtSSB и, следовательно, на число копий мтДНК [23]. Так как окислительный стресс является одним из важных факторов в развитии атеросклероза, такие различия между гаплогруппами могут вносить свой вклад в прогрессирование атеросклероза и его осложнений. Однако механизм влияния генотипа мтДНК на фенотип сердечно-сосудистой системы, вероятно, более комплексный и не ограничивается простым изменением уровня свободных радикалов и запаса АТФ. Функция митохондрий является основной, жизненно важной для клетки, и снижение продукции АТФ и АФК может приводить к активации соответствующих биохимических путей, с целью компенсации недостающей функции.

Не следует забывать и о ключевой роли митохондрий в инициации апоптоза. Есть данные об ассоциации некоторых гаплогрупп мтДНК с числом копий мтДНК в клетке [17], а также с уровнем экспрессии и/или метилирования некоторых ядерных генов, в том числе связанных с функционированием митохондрий; при этом гаплогруппа J в большинстве случаев была ассоциирована со снижением экспрессии, по сравнению с гаплогруппой Н [17]. Исследования на клеточных линиях и модельных животных показывают, что взаимное «соот-

ветствие» ядерного и митохондриального геномов имеет значение для выживаемости клеток в культуре, приживаемости стволовых клеток при трансплантации и даже для устойчивости к сердечно-сосудистым заболеваниям [24].

Таким образом, роль полиморфизма мтДНК в формировании предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям не ограничивается влиянием на функцию дыхательной цепи. Учитывая результаты наших исследований, можно говорить о том, что для сердечно-сосудистой системы эффект полиморфизма мтДНК на уровне фенотипа проявляется чаще не в предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям в целом, а в риске развития осложнений и коморбидных фенотипов в пределах синтропии ССК.

## Список литературы

1. Dzaug VJ, Antman EM, Black HR, et al. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part II: Clinical trial evidence (acute coronary syndromes through renal disease) and future directions. *Circulation*. 2006;114(25):2871-2891.
2. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-678.
3. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009; 461(7265):747-753.
4. Wallace DC. Bioenergetics in human evolution and disease: implications for the origins of biological complexity and the missing genetic variation of common diseases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013;368(1622):20120267.
5. Pesole G, Allen JF, Lane N, et al. The neglected genome. *EMBO Reports*. 2012;13(6):473-474.
6. Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Hum Mol Genet*. 2002;11(13):1581-1583.
7. Saxena R, de Bakker PI, Singer K, et al. Comprehensive association testing of common mitochondrial DNA variation in metabolic disease. *Am J Hum Genet*. 2006;79(1):54-61.
8. Жейкова ТВ. Генетическая основа регуляции окислительного стресса: связь с продолжительностью жизни и ишемической болезнью сердца. Автореф. Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. Томск, 2013. 24 с.
9. Голубенко МВ, Салахов РР, Макеева ОА, и др. Ассоциации полиморфизма митохондриальной ДНК с инфарктом миокарда и прогностически значимыми признаками атеросклероза. *Молекулярная биология*. 2015; 49 (6):968-976.
10. Буйкин СВ, Голубенко МВ, Пузырев ВП. Участие «митохондриальных генов» в формировании гипертрофии левого желудочка при артериальной гипертонии. *Молекулярная биология*. 2010; 44(1):28-32.
11. Салахов РР, Макеева ОА, Кашталап ВВ, Барбараш ОЛ, Голубенко МВ. Ассоциации полиморфизма митохондриального генома с количественными признаками при инфаркте миокарда и сахарном диабете. *Медицинская генетика*. 2015; 14(10):21-24.
12. Фрейдин МБ, Пузырев ВП, Салюков ВБ, Голубенко МВ. Связь полиморфизма некодирующих областей митохондриального генома человека с изменчивостью уровня артериального давления и величин интервальных оценок ЭКГ.



Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 127(1):82-84.

13. Буйкин СВ, Голубенко МВ, Пузырев ВП. Полиморфизм регуляторного района мтДНК и функционирование сердечно-сосудистой системы у тувинцев. Сибирский консилиум. 2006; 49(2):48-53.

14. Буйкин СВ. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов митохондриального генома и гена митохондриальной гамма ДНК-полимеразы с фенотипами сердечно-сосудистой системы. Автореф. дисс.. канд. мед. наук. Томск, 2006. 22 с.

15. Мазунин ИО, Володько НВ, Стариковская ЕБ, Сукерник РИ. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека. Молекулярная биология. 2010; 44(5):755-772.

16. Stocchi L, Polidori E, Potenza L, et al. Mutational analysis of mitochondrial DNA in Brugada syndrome. Cardiovascular Pathology. 2016; 25:47-54.

17. Kenney MC, Chwa M, Atilano S, et al. Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. Human Molecular Genetics. 2014;23(13):3537-3551.

18. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European in-

herited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. Biochim Biophys Acta. 2014;1842(2):208-219.

19. Mueller EE, Brunner SM, Mayr JA, Stanger O, Sperl W, Kofler B. Functional differences between mitochondrial haplogroup T and haplogroup H in HEK293 cybrid cells. PLoS One. 2012;7(12):e52367.

20. Malik D, Hsu T, Falatoonzadeh P, et al. Human retinal transmittochondrial cybrids with J or H mtDNA haplogroups respond differently to ultraviolet radiation: implications for retinal diseases. PLoS One. 2014;9(2):e99003.

21. Ruiz-Pesini E, Lapena AC, Diez-Sanchez C, et al. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. Am J Hum Genet. 2000;67(3):682-696.

22. Castro MG, Huerta C, Reguero JR, et al. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2006;112(2):202-206.

23. Park KS, Chan JC, Chuang LM, et al. Study Group of Molecular Diabetology in Asia. 2008. A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. Diabetologia. 2008;51:602-608.

24. Dunham-Snary KJ, Ballinger SW. Mitochondrial-nuclear DNA mismatch matters. Science. 2015;349:1449-1450.