

Ассоциации полиморфизма митохондриального генома с количественными признаками при инфаркте миокарда и сахарном диабете*

Салахов Р.Р.¹, Макеева О.А.^{1,2}, Кашталап В.В.¹, Барбараш О.Л.¹, Голубенко М.В.^{1,2,3}

¹ — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, ул. Сосновый бульвар, 6, 650002, e-mail: reception@kemcardio.ru

² — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», Томск, ул. Наб. р. Ушайки, 10, 634050, e-mail: valery.puzyrev@medgenetics.ru

³ — Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, пр. Ленина, 36, 634050, e-mail: rector@tsu.ru

Проведено изучение полиморфизма митохондриального генома в группе пациентов с инфарктом миокарда, в зависимости от наличия сахарного диабета. Исследована связь популяционного полиморфизма мтДНК с индексом массы тела, показателями липидного спектра, уровнем глюкозы, артериальным давлением. Получены данные об ассоциации гаплогруппы H с индексом массы тела в общей группе ($p = 0,017$) и уровнем глюкозы у больных сахарным диабетом при поступлении в стационар ($p = 0,03$).

Ключевые слова: инфаркт миокарда, полиморфизма митохондриальной ДНК, сахарный диабет

Введение

Патогенез сердечно-сосудистых заболеваний во многом зависит от взаимодействия генетических факторов с различными факторами внешней среды (факторами риска), из которых каждый сам по себе может привести к развитию заболевания и осложнений. К факторам риска относят курение, дислипидемии, сахарный диабет 2 типа, артериальную гипертензию. Вся цепь этих событий нашла отражение в теории сердечно-сосудистого континуума, предложенной V. и E. Graupwald [7]. Особого внимания заслуживает группа больных, у которых наряду с основным заболеванием присутствует сопутствующее заболевание. Данная категория больных характеризуется более тяжелым течением болезни. Значительная частота диагностирования одновременно нескольких сердечно-сосудистых заболеваний у одного индивида позволяет отнести сердечно-сосудистый континуум к синтропии — неслучайному сочетанию двух и более патологических состояний у индивидуума и его ближайших родственников, имеющему эволюционно-генетическую основу [4]. Каждое из синтропных заболеваний имеет как свои генетические факторы риска, так и общие. Среди генетических факторов риска в развитии патологии можно рассматривать вклад митохондриального генома. Митохондриальная ДНК (мтДНК) содержит гены, ответственные за синтез наиболее важных компонентов дыхательной цепи. Для мтДНК характерна значительная изменчивость в популяциях человека, причем полиморфизм может затрагивать как гены белков, так и гены РНК, а также регуляторные регионы. Каждая из известных гаплогрупп мтДНК характеризуется набором сцепленных по-

лиморфизмов, локализованных в различных участках митохондриального генома. Кроме митохондриальных болезней, вызываемых редкими мутациями, выявлены ассоциации полиморфизма мтДНК с широким спектром многофакторных фенотипов, среди которых не последнее место занимают болезни сердечно-сосудистого континуума [5, 6]. Эффект вариантов мтДНК на развитие сердечно-сосудистых болезней связан с индуцируемыми этими вариантами изменениями эффективности синтеза АТФ и продукции активных форм кислорода [8, 18].

Целью работы была оценка вклада полиморфных сайтов мтДНК в патогенез развития острого коронарного синдрома в зависимости от наличия или отсутствия сахарного диабета.

Материалы и методы

Изучена выборка из 406 пациентов (г. Кемерово) с острым коронарным синдромом с подъемом сегмента ST, которым в дальнейшем был поставлен диагноз *инфаркт миокарда* (ИМ). Средний возраст пациентов составил 60 ± 10 лет, в том числе 290 мужчин (средний возраст 59 ± 10 лет) и 116 женщин (средний возраст 64 ± 9 лет), из них 44,83% были курильщиками. Выборка больных делилась на подгруппы с учетом наличия или отсутствия у пациентов в анамнезе сахарного диабета 2 типа (70 чел. с диабетом). У всех больных были оценены важные количественные показатели крови: уровни липидного спектра, глюкозы. Кроме того, учитывались такие показатели, как индекс массы тела, значения систолического и диастолического давлений (табл. 1).

* Исследование выполнено при частичной поддержке РФФИ (№13-04-02162-А).

Полиморфизм митохондриальной ДНК изучали на ДНК, выделенной из лейкоцитов венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование проводили методом секвенирования первого гипервариабельного сегмента D-петли (ГВС1: 16024–16400) и последующего рестрикционного анализа для определения принадлежности к основным гаплогруппам мтДНК. Для амплификации использовали праймеры L15997 и H408 [13]; ПЦР-продукт очищали от dNTP и праймеров обработкой термочувствительной щелочной фосфатазой и экзонуклеазой I; секвенирующую реакцию проводили с праймера L15997, а при наличии замены в позиции 16189TC — дополнительную реакцию секвенирования с обратного праймера H16527. Для реакции секвенирования использовали флуоресцентно меченные дидезоксинуклеотидтрифосфаты (BigDye Terminators v3.1), продукты реакции пересаждали этанолом, разделение и анализ проводили на приборах Genetic Analyzer 3500, Genetic Analyzer 3730 («Applied Biosystems», США) по протоколу производителя. Полученные последовательности выравнивали и сравнивали с референсной последовательностью митохондриального генома человека в программе BioEdit [9]. На основании гаплотипа ГВС1 проводили первичную классификацию мтДНК по гаплогруппам, принадлежность к которым подтверждали путем генотипирования определяющих гаплогруппы сайтов рестрикции. Праймеры и ферменты для рестрикции соответствовали приведенным в литературе [19].

Сравнение частот маркеров мтДНК (отдельных гаплогрупп, а также частот аллелей в гипервариабельных сайтах) проводили между подгруппами пациентов, разделенных по клинически важным признакам, с помощью критерия Пирсона χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность или двустороннего точного критерия Фишера (в случае численности одного из классов менее 5). Проверку на нормальность распределений количественных признаков проводили по критерию Колмогорова—Смирнова. Анализ ассоциаций количественных признаков с гаплогруппами мтДНК осуществляли с по-

мощью непараметрического критерия Манна—Уитни. Расчеты осуществляли с помощью программного пакета Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В ходе работы был проведен сравнительный анализ наиболее часто встречающихся в европейской популяции гаплогрупп: H (в том числе H1), U (в том числе U5, U2e, K), J, T, HV0, кроме того в исследование были включены наиболее часто встречающиеся полиморфные варианты: T16189C (замена, ведущая к образованию полицитозинового тракта в первом гипервариабельном сегменте D-петли мтДНК), T16519C (гипервариабельный сайт в области D-петли мтДНК), A10398G (замена аминокислоты Thr114Ala в третьей субъединице NADH-дегидрогеназы). Относительная доля отдельных гаплогрупп в выборке соответствовала средним частотам, полученным для русских популяций [3].

Сравнение частот гаплогрупп и полиморфных сайтов между подгруппами пациентов с диабетом и без диабета не выявило статистически значимых различий (табл. 2). Имела место тенденция к более высокой частоте гаплогруппы HV0 у пациентов без диабета (уровень значимости $p = 0,0299$ для одностороннего критерия Фишера и $p = 0,0648$ для двустороннего критерия Фишера). У больных диабетом наблюдались несколько более высокие значения частоты гаплогрупп U и T, а также варианта 16519C. Таким образом, наше исследование не показало значимого вклада полиморфизма мтДНК в риск развития ИМ (острого коронарного синдрома) в зависимости от наличия или отсутствия сахарного диабета. Отсутствие статистически значимых ассоциаций, однако, может быть обусловлено недостаточной численностью выборки больных сахарным диабетом.

Для анализа вклада полиморфных сайтов мтДНК в изменчивость количественных показателей, характеризующих состояние организма при сердечно-сосудистой патологии и сахарном диабете, были выбраны мар-

Таблица 1

Основные количественные показатели в выборке больных

	Общая (n = 406)	Пациенты без диабета (n = 336)	Больные диабетом (n = 70)
ИМТ	28,26 ± 4,47	27,86 ± 4,39	30,23 ± 4,34
Глюкоза при поступлении	9,19 ± 4,54	7,83 ± 2,59	15,67 ± 5,97
Глюкоза натощак	7,03 ± 3,00	6,08 ± 1,49	10,51 ± 4,34
ОХС	5,41 ± 1,33	5,38 ± 1,31	5,59 ± 1,39
ЛПНП	3,18 ± 1,14	3,20 ± 1,14	3,08 ± 1,14
ЛПВП	1,16 ± 0,64	1,17 ± 0,68	1,11 ± 0,36
ТГ	2,13 ± 1,21	2,05 ± 1,01	2,53 ± 1,86
САД	133,49 ± 23,98	132,17 ± 23,94	139,79 ± 23,37
ДАД	82,51 ± 13,91	82,15 ± 14,12	84,21 ± 12,84

керы, частота которых была достаточной для того, чтобы численность каждой из сравниваемых групп была не менее 20 чел. Этим условиям удовлетворяли три маркера: гаплогруппа Н, гаплогруппа U и полиморфизм T16519C. Кроме того, анализ был проведен для подвыборки больных, имеющих гаплогруппу Н, но не Н1 (Н1 — самая распространенная подгруппа гаплогруппы Н, охватывающая около 10% выборки). Значение каждого признака в группе пациентов, имеющих исследуемый маркер, сравнивали со значением этого признака у остальных пациентов. В результате анализа была выявлена ассоциация гаплогруппы Н с индексом массы тела в общей группе больных ($27,51 \pm 4,39$ для Н и $28,70 \pm 4,47$ для остальных гаплогрупп; $p = 0,017$). При разделении выборки на подгруппы, состоящие из пациентов с сахарным диабетом 2 типа и без, статистически значимые различия были получены только для второй подгруппы ($26,95 \pm 4,01$ и $28,39 \pm 4,54$; $p = 0,012$). Также была найдена ассоциация гаплогруппы Н с уровнем глюкозы при поступлении у пациентов с ИМ и сахарным диабетом 2 типа ($17,57 \pm 6,61$ ммоль/л для Н и $14,61 \pm 5,40$ ммоль/л для остальных гаплогрупп; $p = 0,03$). В группе «Н без Н1» отмечена ассоциация с уровнем общего холестерина ($5,56 \pm 1,17$ для Н без Н1 и $5,35 \pm 1,39$ для остальных гаплогрупп; $p = 0,042$). Интересно, что ранее была показана ассоциация этого полиморфизма с показателями липидного обмена у мужчин в популяционной выборке [1]. В отношении остальных количественных признаков, включенных в исследование, статистически значимых различий не было выявлено. Гаплогруппа U и полиморфизм T16519C также не были ассоциированы с исследованными показателями.

Показано, что уровень глюкозы при поступлении в стационар при ИМ является прогностическим фактором как в отношении госпитальной летальности, так и для отдаленного постинфарктного периода [2]. Кроме того, наличие сахарного диабета само по себе является фактором риска дальнейших осложнений ИМ. Стрессорная гипергликемия, возникающая во время острой фазы инфаркта миокарда, является следствием выброса стрессовых гормонов (в частности, глюкокортикоидов и адреналина), повышающих уровень глюкозы в крови. При наличии сахарного диабета (нарушенной толерантности к глюкозе) такое повышение вызывает нежелательные последствия: например, высокий уровень глюкозы усиливает окислительный стресс в эндотелии. С другой стороны, принадлежность митохондриальной ДНК к гаплогруппе Н ассоциирована с более высокой интенсивностью продукции АТФ и активных форм кислорода, по сравнению с гаплогруппами L и J, а также характеризуется более высоким уровнем окислительного повреждения митохондрий [10–12], т.е. тоже способствует окислительному стрессу. Ранее было показано, что гаплогруппа Н и ее подгруппа Н1 ассоциированы с ИМ [1, 15]. Функциональные отличия, связанные с гаплогруппой Н, могут быть обусловлены некоторыми полиморфизмами, маркирующими эту гаплогруппу. В частности, кроме «молчащего» полиморфизма T7028C, который обычно генопируют при установлении принадлежности к этой гаплогруппе, все ее обладатели имеют также замену G2706A в гене 16S рРНК. А гаплогруппа Н1 определяется дополнительной нуклеотидной заменой в том же гене — G3010A.

Таблица 2

Частоты полиморфных маркеров мтДНК у пациентов инфарктом миокарда в зависимости от наличия сахарного диабета 2 типа

	Сахарный диабет 2 типа			
	Нет (n = 336)		Есть (n = 70)	
Гаплогруппа	N	%	N	%
Н	121	36,01	24	34,29
в том числе Н1	36	10,71	7	10,00
U	82	24,40	22	31,43
в том числе U5	33	9,82	7	10,00
U2e	5	1,49	4	5,71
K	11	3,27	4	5,71
J	28	8,33	2	2,86
T	32	9,52	11	15,71
HV0 (вкл. V)	27	8,04	1	1,43
Полиморфные сайты:				
10398G	58	17,21	11	15,71
16519C	188	55,79	45	64,29
16189C	58	17,21	13	18,57

Следует отметить, что нами не выявлена ассоциация полиморфизма T16189C с сахарным диабетом 2 типа, которая ранее была найдена в популяциях различного этнического происхождения [14, 16, 17]. Причиной может быть небольшая численность исследованной нами выборки, не позволяющая выявить малые эффекты.

Полученные результаты указывают на вклад полиморфизма митохондриального генома в формирование некоторых фенотипов сердечно-сосудистого континуума. Ассоциации с уровнем глюкозы, холестерина, индексом массы тела показаны для самой распространенной в европейских популяциях гаплогруппы H, которая характеризуется, по сравнению с другими гаплогруппами, более эффективной работой электронтранспортной цепи, сопряженной с более сильным окислительным стрессом. Эти факторы могут оказывать влияние на течение ИМ, в том числе при сахарном диабете 2 типа.

Список литературы

1. Жейкова Т.В. Генетическая основа регуляции окислительного стресса: связь с продолжительностью жизни и ишемической болезнью сердца: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Томск, 2013. — 23 с.
2. Каретникова В.Н., Беленькова Ю.А., Зыков М.В., Кашталап В.В. и др. Уровень гликемии как фактор прогноза у больных инфарктом миокарда с подъемом сегмента ST // Кардиология. — 2012. — Т. 52, №1. — С. 26—31.
3. Морозова И.Ю., Наумова О.Ю., Рычков С.Ю., Жукова О.В. Полиморфизм митохондриальной ДНК в русском населении пяти областей Европейской части России // Генетика. — 2005. — Т. 41, №9. — С. 1265—1271.
4. Пузырев В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии у человека // Медицинская генетика. — 2008. — №9. — С. 3—9
5. Пузырев В.П., Голубенко М.В., Фрейдин М.Б. Сфера компетенции митохондриальной генетики // Вестник РАМН. — 2001. — №10. — С. 31—37.
6. Пузырев В.П., Макеева О.А., Голубенко М.В. Гены синтопии и сердечно-сосудистый континуум // Вестник ВОГиС. — 2006. — Т. 10, №3. — С. 479—490.
7. Dzau V., Braunwald E. Resolved and unresolved issues in the prevention and treatment of coronary artery disease: a workshop consensus statement // *Am. Heart. J.* — 1991. — Vol. 121. — P. 1244—1263.
8. Gutierrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells // *Circ. Res.* — 2006. — Vol. 99. — P. 924—932.
9. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // *Nucl. Acids. Symp. Ser.* — 1999. — Vol. 41. — P. 95—98.
10. Kenney M.C., Chwa M., Atilano S.R., Falatoonzadeh P. et al. Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2014. — Vol. 1842, №2. — P. 208—219.
11. Kenney M.C., Chwa M., Atilano S.R., Pavlis J.M. 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. — Vol. 8, №1. — e54339.
12. Martinez-Redondo D., Marcuello A., Casajus J.A., Ara I. et al. Human mitochondrial haplogroup H: he highest VO_{2max} consumer — Is it a paradox? // *Mitochondrion.* — 2010. — Vol. 10. — P. 102—107.
13. Mountain J., Hebert J.M., Bhattacharyya S. et al. Demographic history of India and mtDNA-sequence diversity // *Am. J. Hum. Genet.* — 1995. — Vol. 56. — P. 979—992.
14. 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. — Vol. 6, №1. — e16455.
15. Palacin M., Alvarez V., Martin M., Diaz M. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H // *Mitochondrion.* — 2011. — Vol. 11, №1. — P. 176—181.
16. Park K.S., Chan J.C., Chuang L.M. et al. A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians // *Diabetologia.* — 2008. — Vol. 51. — P. 602—608.
17. Poulton J., Luan J., Macaulay V. et al. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study // *NJ. Hum Mol Genet.* — 2002. — Vol. 11, №13. — P. 1581—1583.
18. Salminen A., Ojala J., Kaarniranta K., Kauppinen A. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2012. — Vol. 69. — P. 2999—3013.
19. Torroni A., Huoponen K., Francalacci P. et al. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations // *Genetics.* — 1996. — Vol. 144. — P. 1835—1850.

Association of mitochondrial genome polymorphism with quantitative traits of patients with myocardial infarction and diabetes

Salakhov R.R.¹, Makeeva O.A.^{1,2}, Kashtalap V.V.¹, Barbarash O.L.¹, Golubenko M.V.^{1,2,3}

¹ — Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,

6 Sosnovy blvd, Kemerovo 650002, Russia, reception@kemcardio.ru

² — Research Institute for Medical Genetics, 10 Nab. Ushaiki, Tomsk 634050, Russia, valery.puzzyrev@medgenetics.ru

³ — National Research Tomsk State University, 36 Lenin Prospekt, Tomsk, 634050, Russia, rector@tsu.ru

We studied the mitochondrial genome polymorphism in the group of patients with myocardial infarction, taking into account cooccurrence of the diabetes mellitus. Associations were investigated for the mtDNA polymorphism and body mass index, serum lipids, glucose levels and blood pressure. Association of haplogroup H with body mass index in the sample with infarction ($p = 0,017$) and with glucose levels in diabetic patients at admission ($p = 0,03$) has been found.

Keywords: myocardial infarction mitochondrial DNA, diabetes