

М.А. Сазонова^{1,2,3}, В.В. Синёв³, М.М. Чичёва^{1,3}, К.Ю. Митрофанов^{1,3},
А.В. Желанкин^{1,3}, А.Н. Орехов^{1,3}, И.А. Собенин^{1,2,3}

Ассоциация гетероплазмии мутаций митохондриальных генов РНК с гомогенатами пораженной атеросклерозом интимы аорты (сообщение 2)

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

² ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а.2

³ Научно-исследовательский институт атеросклероза, 143025, Москва, Инновационный Центр Сколково, ул. Новая, д.100

В настоящей работе представлен сравнительный анализ уровня гетероплазмии 4 мутаций митохондриального генома в образцах ДНК, выделенных из тотальных гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Обнаружено, что в исследованных аортах уровень гетероплазмии мутантного аллеля A1555G и G12315A в гомогенатах атеросклеротического поражения значительно выше по сравнению с тотальными гомогенатами из нормальной интимы.

Ключевые слова: митохондриальная мутация, гомогенат, интима, аорта, гетероплазмия, атеросклероз, липофибровая бляшка, ген, РНК

М.А. Sazonova^{1,2,3}, V.V. Sinyov^{1,3}, M.M. Chicheva^{1,3}, K.Yu. Mitrofanov^{1,3},
A.V. Zhelankin^{1,3}, A.N. Orekhov^{1,3}, I.A. Sobenin^{1,2,3}

The association of heteroplasmy of mutations in mitochondrial RNA genes with homogenates of intima aorta affected with atherosclerosis

¹ The Institute for General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., Moscow, 125315, Russia

² Skolkovo Innovations Centre, Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, 143025, 100, Novaya Str., Moscow, Russia

³ Russian Cardiology Research Center, 15a, 3rd Cherepkovskaya str., Moscow, 121552, Russia

In this paper a comparative analysis of the heteroplasmy level of 4 mitochondrial genome mutations in DNA samples isolated from total homogenates of 10 normal and affected with atherosclerosis intima of aortas of people, who died in a result of an accident or a sudden death, is represented. It was found that the heteroplasmy level of the mutant allele A1555G and G12315A in homogenates of atherosclerotic lesions is significantly higher compared to total homogenates from normal intima of in the investigated aortas.

Key words: mitochondrial mutation, homogenate, intima, aorta, heteroplasmy, atherosclerosis, lipofibrous plaque, gene, RNA

Сердечно-сосудистые заболевания ССЗ, среди которых преобладает ишемическая болезнь сердца ИБС, являются основной причиной смертности в большинстве экономически развитых стран мира. В настоящее время распространенность ИБС в России составляет $13,5 \pm 0,1\%$, в том числе среди мужчин — $14,3 \pm 0,3\%$, среди женщин — $13,0 \pm 0,2\%$. Это в 3 раза превышает аналогичные показатели в США, где распространенность ИБС по данным

Американской ассоциации сердца, составляла в 2004 г. лишь $4,9\%$. Распространенность ИБС увеличивается с возрастом, и в нашей стране составляет более 50% среди населения старше 70 лет [12].

В основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит атеросклероз. Вследствие этого большое значение имеет ранняя, досимптоматическая диагностика атеросклероза, в том числе молекулярно-генетическими методами.

Соматические мутации митохондриального генома человека могут быть одной из возможных причин возникновения и развития этого грозного заболевания XXI века [1, 2—5].

Для корреспонденции: Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГБУ «РКНПЦ» Минздрава РФ, НИИ атеросклероза. E-mail: daisy29@mail.ru

Митохондриальная ДНК человека представлена одной кольцевой молекулой ДНК размером 16 569 пар нуклеотидов (рис. 1). Она состоит из 37 генов и кодирует 13 белков, 22 транспортные рРНК, две рибосомальные рРНК [3].

Цель работы — пилотный анализ ассоциации гетероплазмии четырех мутаций митохондриальных генов рРНК человека с гомогенатами пораженной атеросклерозом интимы аорты. По данным литературы, эти мутации ассоциированы с митохондриальными миопатиями, MELAS, офтальмоплегией, глухотой, энцефалопатией, лактоцидозом, кардиомиопатией и некоторыми другими заболеваниями людей [13, 14, 17, 18].

Методика

В качестве материала исследования были использованы тотальные гомогенаты интимы аорты лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Все пораженные атеросклерозом участки интимы аорты гомогенизировали, тщательно перемешивали и брали 10 мкг ткани для выделения ДНК. Таким же способом получали гомогенаты интимы нормальных участков аорты. Для исследования было взято 10 аорт.

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани проводилось с помощью метода фенол-хлороформной экстракции. После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы с целью выявления процента гетероплазмии по интересующим нас мутациям.

Амплификацию фрагментов, содержащих область мутаций, осуществляли с праймерами, приведенными в табл. 1.



Рис. 1. Схема митохондриальной ДНК человека [3]

Режим ПЦР и размер амплификатов указаны в табл. 2.

Анализ последовательности ДНК, для определения доли мутантного аллеля митохондриальной ДНК в гетероплазмической смеси, осуществляли с использованием технологии пиросеквенирования в режиме реального времени. Исследования проводили на автоматическом пиросекваторе PSQ96MA [16].

Праймеры для ПЦР и пиросеквенирования были подобраны с помощью онлайн программы Primer3 [15].

Таблица 1

Праймеры для ПЦР и пиросеквенса

Ген	Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР	Праймер для секвенса
Ген рРНК 12S	652insG	TAGACGGGCTCACATCAC (621–638)	bio-GGGGTATCTAATCCC AGTTTGGGT (1087–1064)	CCCATAAACAAATA (639–651)
	A1555G	TAGGTCAAGGTGTAGCCCA TGAGGTGGCAA (1326–1355)	bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTGGG (1704–1684)	ACGCATTTATATAGAGGA (1537–1554)
Ген тРНК-Leu (кодон узнавания UUR)	C3256T	bio-AGGACAAGAGAAA TAAGGCC (3129–3149)	ACGTTGGGGCCTTTGCGTAG (3422–3403)	AAGAAGAGGAATTGA (3300–3286)
Ген тРНК-Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	bio-CTCATGCCCCCATGTCTAA (12230–12249)	TTACTTTTATTGGAGTTGCAC (12337–12317)	TTGGAGTTGCAC (1228–1216)

Таблица 2

Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl ₂ в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
652insG	467 п.н.	2,5 мМ	94°	60°	72°
C3256T	294 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
A1555G	379 п.н.	2,5 мМ	94°	50°	72°
G12315A	108 п.н.	2,5 мМ			

Расчет величины процента гетероплазмы по мутациям проводился на основе пиков, соответствующих интенсивности люминисценции при последовательном встраивании различных нуклеотидов в цепь анализируемого фрагмента. Данный оригинальный количественный метод оценки мутантного аллеля был разработан в нашей лаборатории на базе метода SNP-анализа [6—11, 19—23].

Результаты и обсуждение

В настоящей работе в тотальных гомогенатах нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт человека был проанализирован уровень гетероплазмы мутаций в рРНК- и тРНК-кодирующих генах: мутация 652insG и A1555G в 12S рРНК; C3256T — в тРНК — лейцин, кодон узнавания UUR; G12315A — в тРНК — лейцин, кодон узнавания CUN.

Обнаружены две мутации, процент которых значительно выше в гомогенатах пораженной интимы по сравнению с гомогенатами нормальной интимы аорты (рис. 2).

Согласно данным, представленным на рис. 2, уровень гетероплазмы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы в несколько раз выше по сравнению с гомогенатами нормальной сосудистой ткани. Следует отметить статистическую достоверность отличий в гомогенатах аорт В1, В10 и В8 30% исследованных сосудов. Наиболее значительная разница между пораженным атеросклерозом и нормальным гомогенатом отмечается в образцах В1 в 8,5 раз и В10 в 16 раз по мутации A1555G и образце В8 в 3,7 раза по мутации G12315A.

Планируется дальнейшее расширение выборки для возрастания достоверности результатов.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что соматические митохондриальные мутации A1555G (ген 12S рРНК) и G12315A (ген тРНК-лейцин, кодон узнавания CUN) ассоциированы с атеросклерозом. Это позволяет сделать предположение о том, что данные мутации способствуют замедлению или прекращению синтеза ферментов дыхательной цепи митохондрий, что может привести к окислительному стрессу в клетках интимы аорты, и, в дальнейшем, возникновению и развитию атеросклероза.

Данная статья может быть полезна клиницистам, занимающимся диагностикой атеросклероза, и ученым, изучающим молекулярно-генетические механизмы атерогенеза.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

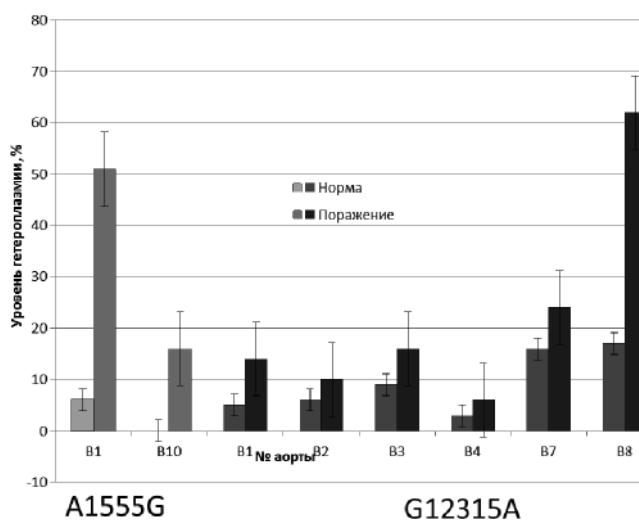


Рис. 2. Частота мутации A1555G и G12315A в гомогенатах интимы аорт

Список литературы

1. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертензии и различных видов кардиомиопатии // Проблемы и перспективы современной науки. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 85—87.
2. Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В. и др. Мутации митохондриального генома в патологии человека // Фундаментальные науки и практика. — 2010. — Т. 1, №4. — С. 164—167.
3. Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий // Соросовский образовательный журнал. — 2000. — Т. 6, №1. — С. 34.
4. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А. и др. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека // Кардиологический вестник. — 2012. — 7 19, 1. — С. 57—61.
5. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца // Проблемы и перспективы современной науки. — 2011. — Т. 3, №1. — С. 92—96.
6. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома // Пат. физиол. Экспер. тер. — 2011. — №4. — С. 82—85.
7. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В. и др. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома // Фундаментальные науки и практика. — 2010. — Т. 1, №2. — С. 19—21.
8. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н. Патентная заявка «Способ количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома в лейкоцитах крови человека». Входящий №065647, регистрационный №2009146012, от 14.12.2009.
8. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю. и др. Патентная заявка от 9.10.2010 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный №2010141594.

10. *Собенин И.А., Мясоедова В.А., Сазонова М.А.* и др. Разработка метода комплексной оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений на основе анализа генотипа и фенотипа: Сб. тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы». — М.: 25–27 ноября 2009. — С. 134–135.
11. *Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н.* Патентная заявка от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу», регистрационный №20101133468.
12. *Шальнова С.А., Деев А.Д.* Ишемическая болезнь сердца в России: распространенность и лечение по данным клинико-эпидемиологических исследований // Терапевтический архив. — 2011. — Т. 83. №1. — С. 1.
13. *Cheng-Bo Han, Jia-Ming Ma, Yan Xin* et al. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance // World J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 11, №1. — P. 31–35.
14. *Fu K., Hartlen R., Johns T.* et al. A novel heteroplasmic tRNA^{Leu}CUN mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy // Human Molecular Genetics. — 1996. — Vol. 5, №111. — P. 1835–1840.
15. <http://simgene.com/Primer3>
16. <http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96id.aspx>
17. *Jeppesen T.D., Schwartz M., Hansen K.* Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C→T point mutation of mitochondrial DNA // J. of the Neurological Sciences. — 2003. — Vol. 214. — P. 17–20.
18. *Li R., Xing G., Yan M.* et al. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss // Am. J. Med. Genet. A. — 2004. — Jan. 15. — 124A, №2. — P. 113–117.
19. *Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.* et al. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta // 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10–13, 2007 // Atherosclerosis Suppl. — 2007. — Vol. 8, №1. — P. 45–46.
20. *Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B.* et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome // Atherosclerosis. — 2009. — Vol. 204, №1. — P. 184–190.
21. *Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y.* et al. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis // 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10–13, 2007 // Atherosclerosis Suppl. — 2007. — Vol. 8, №1. — P. 46.
22. *Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z.* et al. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta // 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26–29, 2008 // Atherosclerosis Suppl. — 2008. — Vol. 9, №1. — P. 113.
23. *Sazonova M.A., Budnikov Ye.Ye., Khazanova Z.B.* et al. Possible role of somatic mitochondrial mutations in the development of atherosclerotic lesion of human aorta // ACC 57th Annual Scientific Session, Chicago, USA, March 29 — April 1, 2008 // J. Am. Coll. Cardiol. — 2008. — Vol. 51, №10. — Suppl. A. — A285.

Поступила 24.10.12

Сведения об авторах:

Синёв Василий Владимирович, аспирант, лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

Чичёва Мария Михайловна, аспирант лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

Митрофанов Константин Юрьевич, аспирант, лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

Желанкин Андрей Викторович, аспирант лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

Орехов Александр Николаевич, д-р биол. наук, зав. лаб. клеточных механизмов атерогенеза ФГБУ «НИИОПП» РАМН, НИИ атеросклероза

Собенин Игорь Александрович, д-р мед. наук, ФГБУ «НИИОПП» РАМН, ФГБУ «РКНПЦ» Минздрава РФ, НИИ атеросклероза