

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

Анализ гетероплазмии некоторых генов субъединиц NADH дегидрогеназы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорты (сообщение 3)

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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «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, 100

Проведен сравнительный анализ уровня гетероплазмии четырех мутаций митохондриальных генов субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы в образцах ДНК, выделенных из тотальных гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт. Обнаружено, что в исследованных аортах уровень гетероплазмии мутаций C5178A и G14459A в гомогенатах с атеросклеротическим поражением значительно выше по сравнению с тотальными гомогенатами из нормальной интимы.

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

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 analysis of heteroplasmy of some subunits NADH dehydrogenase genes in homogenates of aortic intima atherosclerotic lesion

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

A comparative analysis of heteroplasmy level of four mutations in mitochondrial genes of subunits 1, 2, 5 and 6 NADH dehydrogenase in DNA samples was carried out. The DNA samples were isolated from total homogenates of intima of 10 aortas affected with atherosclerosis and normal ones. It was found that the heteroplasmy level of mutations G14459A and C5178A in homogenates with atherosclerotic lesions is significantly higher compared to total homogenates from normal intima in the investigated aortas.

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

Согласно данным медицинской статистики, ежегодно в России около 1 млн 300 тыс. чел. умирают от заболеваний сердечно-сосудистой системы, и каждый год этот показатель увеличивается приблизительно на 2—3%. Среди общей смертности в России сердечно-сосудистые заболевания составляют 57%.

В основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит атеросклероз, поэтому большое

значение приобретает ранняя, досимптоматическая диагностика атеросклероза, в том числе, молекулярно-генетическими методами.

Одной из возможных причин атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [1—3]. Как известно, митохондриальная ДНК человека представлена одной кольцевой молекулой ДНК размером 16 569 п.н. Она кодирует 13 белков, 22 транспортных РНК, две рибосомальные РНК. Следует отметить, что 60% генов, кодирующих митохондриальные белки, приходится на семь субъединиц ферментативного комплекса NADH-дегидрогеназы, остальные гены коди-

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

руют две субъединицы АТФ-синтетазы, три субъединицы цитохромоксидазы, одну субъединицу убихинол-цитохром-с-редуктазы (цитохром b) [4].

В настоящей работе проведен пилотный анализ четырех мутаций митохондриального генома, локализованных в генах субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы, в общих гомогенатах нормальной интимы и атеросклеротического поражения аорт человека (табл. 1).

По данным литературы, большинство исследуемых нами мутаций вызывает образование дефектного белка субъединиц NADH дегидрогеназы, что приводит к полной дисфункции фермента дыхательной цепи митохондрий [10, 11, 13, 16].

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. 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. Праймеры для ПЦР и пиросеквенирования были подобраны с помощью онлайн программы Primer3 [12].

Расчет величины процента гетероплазмии 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 [5—9, 14, 15].

Результаты и обсуждение

С целью выявить мутации, ассоциированные с атеросклерозом, был проведен анализ однонуклеотидных замен T3336C, C5178A, G13513A и G14459A в митохондриальных генах 1, 2, 5 и 6 субъединиц NADH дегидрогеназы, выявленных ранее при различных патологиях, таких как стеноз коронарных сосудов, диабет, глухота, инфаркт миокарда и кардиомиопатии [9—12]. Данные мутации предварительно были отобраны нами при исследовании отдельных липофиброзных бляшек интимы аорт человека [13]. В настоящей работе были исследованы ПЦР-фрагменты ДНК, выделенные из общих гомогенатов пораженной и нормальной интимы 10 аорт, с целью выявить средний процент гетероплазмии выбранных нами мутаций в каждой аорте.

Таблица 1

Праймеры

Ген	Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР	Праймер для секвенса
Ген субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы	T3336C	bio-AGGACAAGAGAAA TAAGGCC (3129—3149)	ACGTTGGGGCCTTT GCGTAG (3422—3403)	TGCGATTAGAATGGGTAC (3354—3337)
Ген субъединицы 2 NADH-дегидрогеназы	C5178A	bio-GCAGTTGAGGTGG ATTAAC (4963—4982)	GGAGTAGATTAGGCGTA GGTAG (5366—5345)	ATTAAGGGTGTTAGTCATGT (5200—5181)
Ген субъединицы 5 NADH-дегидрогеназы	G13513A	CCTCACAGGTTTCTACT CCAAA (13491—13512)	bio-AAGTCCTAGGAAAGTGA CAGCGAGG (13825—13806)	AGGTTTCTACTCCAA (13497—13511)
Ген субъединицы 6 NADH-дегидрогеназы	G14459A	CAGCTTCTACACTATT AAAGT (14303—14334)	bio-GTTTTTTTAAATTTATTT AGGGGG (14511—14489)	GATACTCCTCAATAGCCA (14439—14456)

Таблица 2

Условия для ПЦР

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl ₂ в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
C5178A	383 п.н.	2,5 мМ	94°	60°	72°
T3336C	294 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
G13513A	335 п.н.	1,5 мМ			
G14459A	209 п.н.	1,5 мМ	94°	50°	72°

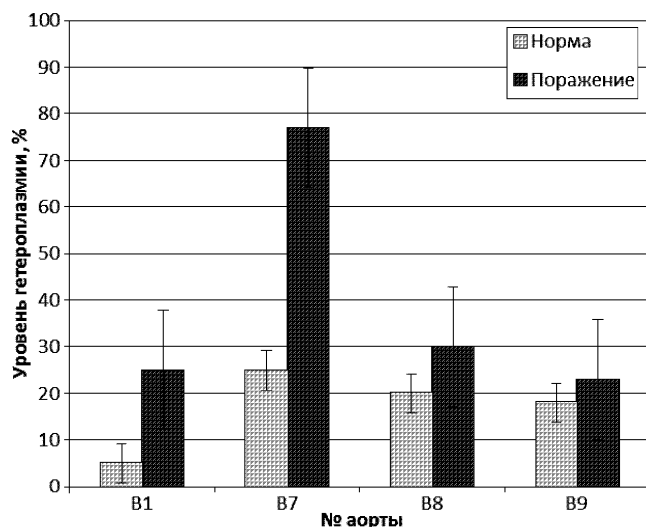


Рис. 1. Уровень гетероплазии мутации C5178A в гомогенатах интимы аорт

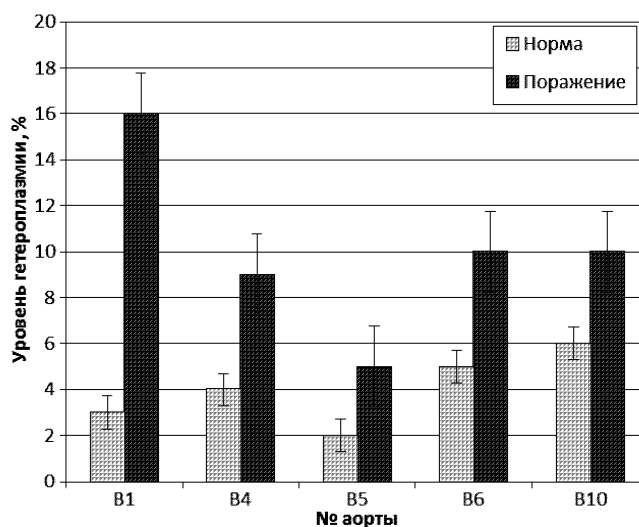


Рис. 2. Уровень гетероплазии мутации G14459A в гомогенатах интимы

Обнаружено 2 мутации, процент которых значительно выше в гомогенатах пораженной интимы аорты по сравнению с гомогенатами нормальной интимы. Это точечные мутации C5178A и G14459A (рис. 1 и 2). Согласно данным, представленным на гистограммах, можно видеть, что по мутации G14459A во всех гомогенатах и по мутации C5178A в гомогенатах аорт B1 и B7 различия между пораженной атеросклерозом и нормальной интимой достоверно значимы. Обращают на себя внимание компаундные митохондриальные мутации в гомогенате аорты B1, процент которых в несколько раз выше в гомогенате атеросклеротического поражения, чем в нормальной интиме. В аорте B7 отмечена трехкратная разница процента гетероплазии C5178A между нормальной и пораженной гладкомышечной сосудистой тканью.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что, по крайней мере, две соматические митохондриальные мутации: C5178A (ген субъединицы 2 NADH дегидрогеназы) и G14459A (ген субъединицы 6 NADH дегидрогеназы) ассоциированы с атеросклерозом. Это подтверждает полигенную гипотезу возникновения и развития мультифакториальных заболеваний, которая предполагает, что данные патологии являются следствием накопления мутаций.

Данная статья может быть полезна практикующим врачам, медицинским генетикам и исследователями в области изучения проблем атеросклероза.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

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., 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.
5. 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.
6. 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.
7. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю. и др. Патентная заявка от 11.10.2010 «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный №2010141594.
8. 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 // Сборник тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятия 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.

9. **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 №2010133468.

10. **Chol M., Lebon S., Benit P.** et al. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency // *J. Med. Genet.* — 2003. — Vol. 40. — P. 188—191.

11. **Gropman A., Chen T.-J., Perng Ch.-L.** et al. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation // *American Journal of Medical Genetics.* — 2004. — Vol. 124A. — P. 377—382.

12. <http://simgene.com/Primer3>

13. **Matsunaga H., Tanaka Y., Tanaka M.** et al. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care.* — 2001. — Vol. 24. — March. — P. 500—503.

14. **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.

15. **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.

16. **Solano A., Roig M., Vives-Bauza C.** et al. Bilateral Striatal Necrosis Associated with a Novel Mutation in the Mitochondrial ND6 Gene // *Ann. Neurol.* — 2003. — Vol. 54. — P. 527—530.

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