

УДК 575.191:616.12-008.46

## УЧАСТИЕ “МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ” В ФОРМИРОВАНИИ ГИПЕРТРОФИИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ

© 2010 г. С. В. Буйкин<sup>1\*</sup>, М. В. Голубенко<sup>1</sup>, В. П. Пузырев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт медицинской генетики  
Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Томск, 634050

<sup>2</sup>Сибирский государственный медицинский университет Росздрава, Томск, 634050

Поступила в редакцию 24.06.2009 г.

Принята к печати 09.07.2009 г.

Изучено влияние полиморфных вариантов митохондриальной ДНК (мтДНК) и гена *POLG1* митохондриальной ДНК-полимеразы  $\gamma$  на развитие и течение эссенциальной гипертензии. Сравнение полиморфизма этих локусов в группах больных артериальной гипертензией и здоровых лиц, а также в группах больных артериальной гипертензией с гипертрофией левого желудочка и без этой патологии не выявило статистически значимых различий в распределении аллеля *C* *MspI*-полиморфизма гена *POLG1*. Выявлена более высокая частота гаплогруппы *H* мтДНК в группе больных без гипертрофии левого желудочка по сравнению с группой, имеющей это осложнение ( $OR = 0.42$ ; 95%CI 0.17–0.98;  $p = 0.043$ ). Отмечено накопление гаплогруппы *T* мтДНК в группе больных с гипертрофией левого желудочка ( $OR = 6.16$ ; 95%CI 1.17–9.74;  $p = 0.018$ ). Полученные результаты позволяют предположить, что полиморфизм митохондриального генома вовлечен в формирование предрасположенности к гипертрофии левого желудочка при артериальной гипертензии.

**Ключевые слова:** артериальная гипертензия, гипертрофия левого желудочка, анализ ассоциаций, многофакторные заболевания, мтДНК, ген *POLG1*.

“GENES FOR MITOCHONDRIA” IN ARTERIAL HYPERTENSION AND LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY, by S. V. Buikin<sup>1\*</sup>, M. V. Golubenko<sup>1</sup>, V. P. Puzirev<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Medical Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk 634050; \*e-mail: stepan.buikin@medgenetics.ru; <sup>2</sup>Siberian State Medical University, Russian Ministry of Health and Social Development, Tomsk, 634050). Study is devoted to “genes for mitochondria” – genes of mitochondrial genome and mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  gene (*POLG1*). We compared frequencies of polymorphisms in mitochondrial DNA and in *POLG1* between healthy individuals and patients with arterial hypertension, as well as between patients with and without left ventricular hypertrophy. We did not discover significant differences of distribution of *C* allele of *MspI*-polymorphism in *POLG1* in studied group. We have shown higher prevalence of mitochondrial haplogroup *H* of mtDNA in patients without left ventricle hypertrophy ( $OR = 0.42$ ; 95%CI 0.17–0.98;  $p = 0.043$ ), while compared with patients having this complication. Haplogroup *T* was more frequently detected in patients with left ventricle hypertrophy ( $OR = 6.16$ ; 95%CI 1.17–9.74;  $p = 0.018$ ). This result suggests implication of mitochondrial DNA in hypertension-induced left ventricular hypertrophy.

**Key words:** arterial hypertension, left ventricular hypertrophy, analysis of association, common disease, mtDNA, *POLG1*.

Изучение генетических основ подверженности сердечно-сосудистым заболеваниям представляет одну из наиболее интенсивно развивающихся областей медицинской генетики. Известно, что энергетический дисбаланс и окислительный стресс играют важную роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Главным источником молекул АТР и свободных кислородных радикалов в клетке служат митохондрии. Учитывая, что 13 субъединиц компонентов системы окислительного фосфорилирования кодируются митохондриальной ДНК (мтДНК) [2], гены этих белков можно рассматривать как

возможные гены-кандидаты предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям [3].

Несмотря на автономность мтДНК, для ее функционирования необходимы белки, кодируемые ядерным геномом [4]. Таким образом, функция митохондрий обеспечивается совместным действием так называемых “митохондриальных генов”, т.е. митохондриальных и ядерных генов. К ним относится ген *POLG1* (15q25), кодирующий митохондриальную ДНК-полимеразу  $\gamma$  [5]. Данный фермент обладает полимеразной и экзонуклеазной активностью и участвует в процессах репликации и репарации мтДНК [6]. Важную роль гена *POLG1* в

\* Эл. почта: stepan.buikin@medgenetics.ru

функционировании митохондрий подтверждают данные, полученные на мышцах с накаутом этого гена. У таких животных быстро развиваются признаки нарушения функции митохондрий [7]. В современной классификации митохондриальных болезней целый раздел посвящен клиническим состояниям, вызванным мутациями в гене *POLG1*, однако информация о вкладе его полиморфизма в возникновение многофакторных заболеваний человека отсутствует.

С целью изучения влияния полиморфных вариантов мтДНК и ядерного гена *POLG1* на развитие и течение артериальной гипертензии (АГ) исследовали полиморфизм мтДНК и гена *POLG1* в группах русских жителей г. Томска, больных АГ, и в группах здоровых доноров. Влияние полиморфных маркеров на формирование гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ) у больных АГ оценивали, сравнивая частоты этих маркеров у больных АГ с ГЛЖ и без этой патологии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Группа больных АГ** (147 человек – 51 женщина, 96 мужчин; средний возраст  $48.3 \pm 5.5$  лет) сформирована в ГУ НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН на основании общепринятых диагностических критериев этого заболевания.

**Группа здоровых русских** (222 человека – 87 женщин, 135 мужчин; средний возраст  $47.8 \pm 8.7$  лет) сформирована в ходе эпидемиологического исследования распространенности ишемической болезни сердца в г. Томске, проводимого на базе кафедры факультетской терапии СибГМУ. В эту группу вошли индивиды без клинических признаков сердечно-сосудистых нарушений, что подтверждено данными клинического обследования.

**Частоты полиморфного маркера rs2238296** (MspI-полиморфизм, замена Т/С в позиции 4840856 континга) в интроне 1 гена *POLG1* определяли согласно [8].

**Полиморфизм мтДНК** оценивали с помощью секвенирования гипервариабельного сегмента 1 (ГВС1) контрольного региона мтДНК (16024–16383 п. н.) с использованием праймеров, приведенных в [9]. мтДНК секвенировали на автоматическом ДНК-анализаторе ABI Prism 310 (“Perkin Elmer”) с применением набора BigDye terminators sequencing kit v.3.1 (“Applied Biosystems”) по протоколу производителя. Принадлежность мтДНК к отдельным гаплогруппам определяли с помощью рестрикционного анализа [10]. Для анализа ассоциаций полиморфизма мтДНК с фенотипом были выбраны наиболее частые замены в ГВС1, встречающиеся на фоне различных гаплогрупп и во многих гаплотипах, а также наиболее распространенные в европеоидных популяциях гаплогруппы мтДНК (H, U, T, J). Исходя из предположения о том, что функциональная значимость замен в D-петле мтДНК может быть связана с их влиянием на вторичную структуру этой области и, как след-

ствие, на транскрипцию и репликацию мтДНК, объединяли близлежащие замены. Таким образом, в качестве маркеров использовали замены в участках 16092–16093, 16126–16129, 16145–16148, 16222–16224, 16292–16298, 16304–16311, 16356–16362 (указан порядковый номер замены в соответствии с референсной последовательностью) мтДНК. Подавляющее число замен представлено транзициями (С ↔ Т и А ↔ G).

**Для сравнения частот аллелей** в различных группах использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона или точный тест Фишера–Ирвина с учетом поправок Йейтса и Бонферроне при множественных сравнениях [11]. Нулевая гипотеза отвергалась при уровне вероятности ошибки первого рода менее 0.05. Для оценки ассоциаций полиморфных маркеров с патологическим фенотипом рассчитывали отношение шансов (OR) по формуле:  $OR = ad/bc$ , где  $a$  – частота анализируемого аллеля у больных;  $b$  – частота анализируемого аллеля в контрольной выборке;  $c$  и  $d$  – суммарная частота остальных аллелей у больных и в контрольной группе соответственно [12]. Расчеты проводили с помощью программ “Statistica 6.0” и “Microsoft Excel 2000”.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение частот аллелей MspI-полиморфизма гена *POLG1* в группах здоровых лиц и больных АГ не выявило статистически значимых различий в распределении аллелей ( $OR = 0.75$ ; 95% CI 0.52–1.08;  $p < 0.127$ ) (табл. 1).

Не удалось также установить статистически значимых отличий в частотах гаплогрупп и полиморфных маркеров мтДНК между здоровыми индивидами и больными АГ. Это может быть связано с крайне малым эффектом изученных аллелей на подверженность гипертонии.

В процессе развития и прогрессирования АГ в органах-мишенях, одним из которых является сердце, происходят патологические изменения, в результате чего возникает ГЛЖ. Чтобы оценить влияние полиморфизма мтДНК и MspI-полиморфизма гена *POLG1* на развитие ГЛЖ, сравнили частоты полиморфных маркеров у больных АГ с/без ГЛЖ. Показано статистически значимое преобладание гаплогруппы H мтДНК ( $OR = 0.42$ ; 95% CI 0.17–0.98;  $p = 0.043$ ) у больных АГ без ГЛЖ по сравнению с группой, имеющей это осложнение (табл. 2). Противоположная картина наблюдалась у носителей гаплогруппы T: отмечено накопление этой гаплогруппы в группе больных с ГЛЖ ( $OR = 6.16$ ; 95% CI 1.17–9.74;  $p = 0.018$ ).

Представляет интерес возможная молекулярная основа обнаруженной ассоциации. Основной функцией митохондрий является выработка АТФ. Нуклеотидные замены, характерные для гаплогрупп мтДНК, могут влиять на эффективность работы системы окислительного фосфорилирования и на адаптаци-

**Таблица 1.** Частоты молекулярно-генетических маркеров (%) у больных артериальной гипертензией (АГ) и у здоровых лиц

Генетический маркер		Здоровые доноры	Больные АГ	OR	95%CI
MspI (T/C)	Аллель C	41.19 (196)	37.37 (71)	<b>0.75</b>	0.52–1.08
	$\chi^2$	2.32 $p = 0.127$			
Гаплогруппа H	+	45.49 (106)	52.83 (56)	1.34	0.83–2.18
	$\chi^2$	1.29 $p = 0.250$			
Гаплогруппа U	+	25.82 (63)	26.41 (35)	1.04	0.62–1.72
	$\chi^2$	0.00 $p = 0.980$			
16092–16093	+	5.97 (15)	4.00 (5)	0.66	0.2–1.99
	$\chi^2$	0.31 $p = 0.575^*$			
16126–16129	+	25.49 (64)	29.60 (37)	1.23	0.74–2.03
	$\chi^2$	0.52 $p = 0.470$			
16189	+	18.33 (46)	16.80 (21)	0.90	0.49–1.64
	$\chi^2$	0.05 $p = 0.825$			
16222–16224	+	19.12 (48)	20.00 (25)	1.06	0.59–1.87
	$\chi^2$	0.00 $p = 0.949$			
16292–16298	+	21.51 (54)	29.60 (37)	1.53	0.91–2.57
	$\chi^2$	2.55 $p = 0.110$			
16304–16311	+	18.72 (47)	25.60 (32)	1.49	0.87–2.57
	$\chi^2$	1.98 $p = 0.159$			
16354–16362	+	10.36 (26)	10.40 (13)	1.00	0.47–2.13
	$\chi^2$	0.03 $p = 0.867$			

\* Значения получены с помощью двустороннего теста Фишера–Ирвина.

Примечание. В скобках указано количество человек. OR – отношение шансов, 95%CI – 95% доверительный интервал.

онные способности как отдельных органов, так и организма в целом [13–15]. В частности, установлено, что эффективность работы первого комплекса дыхательной цепи митохондрий у носителей гаплогруппы T мтДНК на 23%, а четвертого комплекса – на 29% ниже, чем у носителей гаплогруппы H [16]. В этой же работе выявлена ассоциация гаплогруппы T с астенозооспермией у европейцев. Авторы предложили гипотезу о возможном вкладе относительного энергетического дефицита в развитие этой патологии [16]. Учитывая универсальность набора замен, характерных для определения гаплогрупп, можно экстраполировать полученные данные об эффективности работы системы окислительного фосфорилирования на другие европейские популяции. Известно, что нарушение энергетического баланса в кардиомиоцитах приводит к развитию более выраженной дисфункции

сердца за счет нарушения работы  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой АТФазы, снижения скорости реадсорбции  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазматический ретикулум и апоптоза клеток [17, 18]. Таким образом, причиной увеличения частоты носителей гаплогруппы T в выборке больных АГ с ГЛЖ может быть энергетический дисбаланс. В пользу данной гипотезы также говорят результаты изучения частот гаплогруппы мтДНК у больных гипертрофической кардиомиопатией в Испании. В результате исследования показана более высокая частота гаплогруппы T у больных гипертрофической кардиомиопатией по сравнению с контрольной группой [19].

Анализ полиморфизма GVC1 мтДНК выявил статистически значимые отличия только в случае замены 16126–16129 (OR = 3.57; 95%CI 1.26–10.43;  $p = 0.017$ ). Этот вариант чаще встречался у больных с ГЛЖ, чем без этого осложнения (табл. 2). Учиты-

**Таблица 2.** Частоты молекулярно-генетических маркеров (%) у больных артериальной гипертонией (АГ) с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ) и без этого осложнения

Генетический маркер		Группа		OR	95%CI
		ГЛЖ–	ГЛЖ+		
MspI (T/C)	Аллель С	36.84 (28)	43.88 (43)	0.83	0.42–1.61
	$\chi^2$	0.61 $p = 0.435$			
Гаплогруппа Н	+	67.57 (25)	44.93 (31)	<b>0.42</b>	<b>0.17–0.98</b>
	$\chi^2$	<b>4.09 <math>p = 0.043</math></b>			
Гаплогруппа U	+	27.03 (10)	26.09 (18)	0.95	0.35–2.59
	$\chi^2$	0.02 $p = 0.899$			
Гаплогруппа J	+	2.70 (1)	8.83 (6)	3.43	0.38–5.59
	$\chi^2$	0.63 $p = 0.417^*$			
Гаплогруппа Т	+	2.70 (1)	20.59 (14)	<b>6.16</b>	<b>1.17–9.74</b>
	$\chi^2$	<b>4.88 <math>p = 0.018^*</math></b>			
Гаплогруппа К	+	5.55 (2)	4.41 (3)	0.80	0.10–7.2
	$\chi^2$	0.05 $p = 1.000^*$			
16092–16093	+	4.44 (2)	3.75 (3)	0.11	0.11–7.5
	$\chi^2$	0.08 $p = 0.775^*$			
16126–16129	+	15.55 (7)	37.50(30)	<b>3.57</b>	<b>1.26–10.43</b>
	$\chi^2$	<b>5.64 <math>p = 0.017</math></b>			
16126	+	11.11 (5)	32.50(26)	<b>3.87</b>	<b>1.32–12.96</b>
	$\chi^2$	<b>5.96 <math>p = 0.015</math></b>			
16189	+	13.33 (6)		1.44	0.46–4.66
	$\chi^2$	0.28 $p = 0.597$			
16222–16224	+	22.22 (10)	18.75 (15)	0.75	0.27–2.09
	$\chi^2$	0.05 $p = 0.816$			
16292–16298	+	26.67 (12)	31.25 (25)	1.18	0.47–3.01
	$\chi^2$	0.11 $p = 0.738$			
16304–16311	+	17.78 (8)	30.00 (24)	1.93	0.70–5.43
	$\chi^2$	1.66 $p = 0.197$			
16354–16362	+	17.78 (8)	6.25 (5)	0.28	0.07–1.07
	$\chi^2$	0.19 $p = 0.665$			

Примечание. Обозначения, как в табл. 1.

вая, что полиморфизм 16126 служит маркером гаплогруппы Т [20], его накопление у индивидов с ГЛЖ может отражать эффект гаплогруппы Т.

В результате сравнения частот полиморфных маркеров мтДНК и гена *POLG1* в группах больных АГ и здоровых русских жителей г. Томска показан вклад полиморфизма мтДНК в развитие предрасположенности к осложнениям АГ. В частности, обнаружен протективный эффект гаплогруппы Н мтДНК в развитии ГЛЖ при АГ, а также ассоциация гаплогруппы Т с ГЛЖ при АГ. Обнаруженные нами ассоциации гаплогрупп мтДНК с осложнениями АГ могут указывать на патогенетическую значимость

изученных локусов в формировании и развитии данного заболевания. Одной из причин полученной ассоциации может быть влияние полиморфизма мтДНК на процессы окислительного фосфорилирования и выработку макроэргических соединений, наиболее значимых для нормального функционирования сердечно-сосудистой системы.

Авторы выражают благодарность К.В. Пузыреву и И.В. Цимбалюку за предоставленный клинический материал.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-01526-а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stanley W.C., Rechia F.A., Lopaschuk G.D. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev.* **85**, 1093–1129.
2. Guy L., Roten C.A. 2004. Genometric analyses of the organization of circular chromosomes: a universal pressure determines the direction of ribosomal RNA genes transcription relative to chromosome replication. *Gene*. **29**, 45–52.
3. Пузырев В.П., Голубенко М.В., Фрейдin М.Б. 2001. Сфера компетенции митохондриального генома. *Вестник РАМН*. **10**, 31–37.
4. Stuart J.A., Brown M.F. 2006. Mitochondrial DNA maintenance and bioenergetics. *Biochem. Biophys. Acta*. **1757**, 79–89.
5. Walker R.L., Anziano P., Meltzer P.S. 1997. A PAC containing the human mitochondrial DNA polymerase gamma gene (*POLG*) maps to chromosome 15q25. *Genomics*. **40**, 376–378.
6. Lecrenier N., van der Bruggen P., Foury F. 1997. Mitochondrial DNA polymerases from yeast to man: a new family of polymerases. *Gene*. **185**, 147–152.
7. Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., et al. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. **429**, 417–423.
8. Буйкин С.В., Голубенко М.В., Погребенкова В.В. и др. 2006. Ген митохондриальной гамма-полимеразы (*POLG*): частота и анализ сцепления двух SNP в популяциях народов Сибири. *Молекуляр. биология*. **40**, 1081–1083.
9. Torroni A., Lott M.T., Cabell M.F., Chen Y.-S., et al. 1994. mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am. J. Hum. Genet.* **55**, 760–776.
10. Torroni A., Huoponen K., Francalacci P., et al. 1996. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics*. **144**, 1835–1850.
11. Лакин Г.Ф. 1990. Биометрия. М.: Наука.
12. Pearce N. 1993. What does the odds ratio estimate in a case-control study? *Int. J. Epidemiol.* **26**, 1189–1192.
13. Chen X.J., Butow R.A. 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 815–825.
14. Mishmar D., Ruiz-Pesini E., Golik P., Macaulay V., et al. 2003. Natural selection shaped mtDNA variation in human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 171–176.
15. Kivisild T., Shen P., Wall D., Do B., et al. 2006. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*. **172**, 373–387.
16. Ruiz-Pesini E., Lapena A.C., Diez-Sanchez C., et al. 2000. Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 682–696.
17. Goffart S., von Kleist-Retzow J.K., Weisner R.J. 2004. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **64**, 198–207.
18. Nouette-Gaulain K., Malgat M., Rocher C., et al. 2005. Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc. Res.* **66**, 132–140.
19. Castro M.G., Huerta C., Reguero J.R., et al. 2006. Mitochondrial DNA haplogroups in Spanish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* **112**, 202–206.
20. Wallace D.C. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 8739–8746.