

АНАЛИЗ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ МУТАЦИИ C5178A ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ 2 NADH ДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ГОМОГЕНАТАХ ПОРАЖЕННОЙ ИНТИМЫ АОРТЫ

Косогорова С.А.⁽³⁾, Сазонова М.А.^(1,2,3), Чичёва М.М.^(1,3), Митрофанов К.Ю.^(1,3), Желанкин А.В.^(1,3), Коробов Г.А.⁽³⁾, Собенин И.А.^(1,2,3)

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН», г.Москва, ул. Балтийская, д.8, тел +7 (499) 151-17-56, niiorp@mail.ru;

²ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздравсоцразвития России, г.Москва, Черепковская 3-я ул., 15-а, тел. +7 (499) 140-93-36, info@cardioweb.ru;

³Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, Московская обл., Сколково, ул. Новая, д.100; тел +7 (495) 414-50-41, office@inat.ru.

Резюме

Проведен анализ уровня гетероплазмы митохондриальной мутации C5178A гена субъединицы 2 NADH дегидрогеназы в образцах ДНК, выделенных из тотальных гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт. Выявлено, что уровень гетероплазмы мутантного аллеля C5178A в гомогенатах атеросклеротического поражения существенно выше по сравнению с тотальными гомогенатами нормальной интимы.

Ключевые слова: Митохондриальные мутации, тотальный гомогенат интимы, атеросклероз, ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ, МУТАЦИЯ.

**ANALYSIS OF MUTATION OF MITOCHONDRIAL GENE HETEROPLASMY C5178A
NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 2 IN AORTIC INTIMA DAMAGED
GOMOGENATAH**

Kosogorova S.A.⁽³⁾, Sazonova M.A.^(1,2,3), Chicheva M.M.^(1,2), Mitrofanov K.Yu.^(1,2), Zhelankin A.V.
^(1,2), Korobov G.A.^(1,2), Sobenin I.A.^(1,2,3)

SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF GENERAL PATHOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY
RUSSIAN CARDIOLOGY RESEARCH AND PRODUCTION COMPLEX

Research Institute of atherosclerosis

Abstract

An analysis of heteroplasmy level was made in DNA samples with mutation of mitochondrial genome C5178A NADH dehydrogenase subunit 2 in DNA samples isolated from total homogenates of normal and atherosclerotic intimal 10 aortas. It was revealed that the heteroplasmy level of the mutant allele C5178A in homogenates of atherosclerotic lesions is significantly higher compared to total homogenates of normal intima.

Keywords: mitochondrial mutations, total intimal homogenates, atherosclerosis, heteroplasmy, mutation

Введение

В начале XXI века сердечно-сосудистые заболевания остаются важнейшей медицинской проблемой для всех стран, в том числе и для России. На сегодняшний день 35% мужчин и 38% женщин умирают от болезни сердца и сосудов. Атеросклероз лежит в основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний. Причинами развития атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [1-3]. Митохондриальная ДНК человека имеет вид кольцевой молекулы, содержащей 16 569 пар нуклеотидов. Она кодирует 13 белков, 22 транспортные РНК, 2 рибосомные РНК. 60% генов, кодирующих митохондриальные белки, приходится на семь субъединиц комплекса NADH дегидрогеназы [4].

В данной работе был проведен анализ уровня гетероплазмии мутации C5178A в образцах

ДНК, выделенных из гомогенатов нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 10 аорт. Мутация C5178A, при возникновении которой происходит замена лейцина на метионин, локализована в гене субъединицы 2 NADH дегидрогеназы митохондриального генома. По данным литературы, мутация C5178A приводит к дефекту второй белковой субъединицы данного фермента и ассоциирована с предрасположенностью к острому инфаркту миокарда [1,5].

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили ткани интимы аорты лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти. Пораженные участки интимы аорты гомогенизировали. Для выделения ДНК брали 10 мкг гомогенизированного участка аорты. По той же схеме проводилось исследование нормальных гомогенизированных интимы участков аорты. Для исследования было взято 10 аорт.

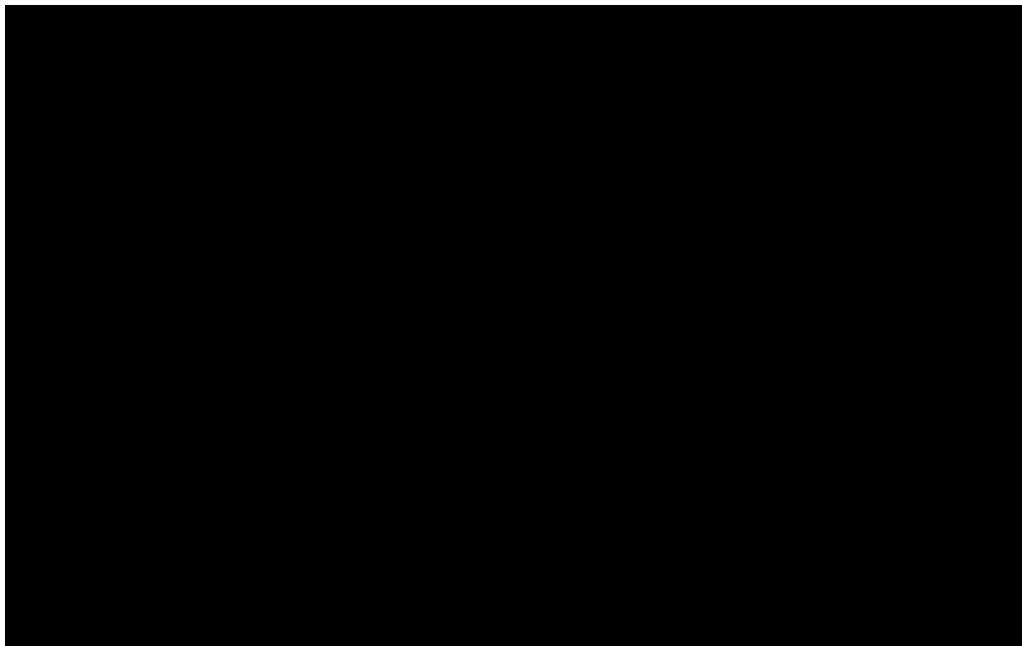
Из образцов ткани выделялось тотальная ДНК методом фенол-хлороформной экстракции. Исследуемые образцы амплифицировали методом ПЦР на MJ Research, PTC-200, USA. Условиями для проведения амплификации были следующие: прямой праймер – bio-GCAGTTGAGGTGGATTAAC, обратный праймер –GGAGTAGATTAGGCGTAGGTAG, 94⁰-денатурация, 62⁰-отжиг, 72⁰-синтез, 35 циклов.

Для выявления процента гетероплазии полученные амплификаты были пиросеквенированы. Исследования проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQ96MA. Использовался сиквенс-праймер для детекции C5178A : TCGTGGTGCTGGAG.

Расчет процента гетероплазии, согласно оригинальному методу, разработанному в нашей лаборатории на основе технологии пиросеквенирования, проводился на основе пиков, в соответствие с интенсивностью люминесценции при последовательном встраивании различных нуклеотидов в цепь анализируемого фрагмента [6,7].

Результаты и обсуждение

Данные по гомогенатам интимы аорт представлены в гистограмме 1:



Гистограмма 1. Уровень гетероплазмии гомогенатов интимы аорт по мутации C5178A

Согласно полученным данным по исследованной мутации C5178A, в 4 из 10 аорт (то есть в 40% случаев) уровень гетероплазмии в гомогенатах атеросклеротического поражения значительно выше по сравнению с тотальными гомогенатами из нормальной сосудистой ткани. На гистограмме 1 видно, что мутация C5178A имеет достоверные различия между пораженной и нормальной интимой. Следовательно, можно говорить об ассоциации мутантного аллеля 5178A с суммарным атеросклеротическим поражением интимы аорты.

Полученные результаты позволяют предположить, что мутации митохондриального генома, локализованные в генах ферментов дыхательной цепи, приводят к дисфункции данных ферментов, из-за чего возникает окислительный стресс клеток интимы, следствием которого является атеросклеротический процесс в интимае аорты человека.

Данная статья может быть полезна медицинским генетикам и практикующим врачам, специализирующимся в области атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Литература

1. Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин

- И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Мутации митохондриального генома в патологии человека. //Фундаментальные науки и практика. 2010. т.1. №4. с.164-167.
2. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертонии и различных видов кардиомиопатии. // Проблемы и перспективы современной науки. 2011.3(1) с.85-87.
3. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца. // Проблемы и перспективы современной науки. 2011.3(1). с.92-96.
4. Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий. // Соросовский образовательный журнал , том 6 , № 1 , 2000, стр. 3.
5. Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. // Genetics. 1992 Jan; 130(1), 163-73.
6. Sazonova M.A., Budnikov E.Y., Khasanova Z.B., Sobenin I.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. // Atherosclerosis. 2009.т.204. №1. с. 184–190.
7. Sazonova MA, Budnikov YY, Khazanova ZB, Postnov AY, Sobenin IA, Orekhov AN. 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 8(1):45-46.
8. Сазонова МА, Иванова ММ, Желанкин АВ, Митрофанов КЮ, Хасанова ЗБ, Собенин ИА, Мясоедова ВА, Постнов АЮ, Орехов АН. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома. // Фундаментальные науки и практика, Материалы трудов второй международной телеконференции, 2010 г., т.1, №2, стр.19-21.