РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА САЙТА *oriB* МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ

Д.А. Скуратовская[1], Ю.К. Софронова[1], П.А. Затолокин[2], М.А. Василенко[1], Л.С. Литвинова[1], И.О. Мазунин[1]*

[1]Балтийский федеральный университет им. И. Канта,
236038 Калининград, ул. Невского, 14; эл. почта: IMazunin@kantiana.ru
[2]Областная клиническая больница Калининградской области, 236019 Калининград, ул. Клиническая, 74

В развитии метаболического синдрома (МС) принимают участие многие гены. В литературе есть данные о связи полиморфизма в сайте *oriB* митохондриальной ДНК (мтДНК), так называемый полицитозиновый тракт, с развитием резистентности к инсулину, сахарного диабета 2-го типа (СД2) и других метаболических нарушений в различных этнических популяциях. Существует предположение об ассоциации определенных полиморфизмов в этом сайте с количеством копий мтДНК в клетке. В данной работе идентифицированы различные аллельные варианты сайта *oriB* мтДНК у пациентов с МС (n=106) и условно здоровых доноров (n=71) с помощью капиллярного секвенирования. Количество копий мтДНК в лейкоцитах крови определяли методом капельной цифровой полимеразной цепной реакции (кцПЦР). Выявлено, что вариант непрерывного полицитозиного тракта достоверно чаще встречается у больных МС с СД2 ($p<0,01$). В целом, содержание копий мтДНК в лейкоцитах крови больных МС было ниже по сравнению с контролем. Нами не обнаружено взаимосвязи между вариабельностью сайта *oriB* и количеством копий мтДНК.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, полиморфизм, митохондрии, метаболический синдром

DOI: 10.18097/PBMC20176306533

ВВЕДЕНИЕ

Метаболический синдром (МС) описывается исследователями и практикующими врачами как группа метаболических нарушений, в основе которых лежат инсулинорезистентность или нарушение толерантности к глюкозе (НТГ), абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия (АГ) и дислипидемия. В совокупности, эти нарушения являются факторами повышенного риска развития таких заболеваний, как сахарный диабет 2-го типа (СД2), сердечно-сосудистая патология, неалкогольная жировая болезнь печени и др.

Дисрегуляция внутриклеточного метаболизма считается главной причиной развития МС вследствие дисбаланса между потреблением и расходованием питательных веществ в процессе клеточной генерации энергии. Так, например, снижение эффективности окисления жирных кислот приводит к внутриклеточному накоплению ацетилкоэнзима А и ряда других молекул в адипоцитах, клетках скелетной мускулатуры, гепатоцитах. Эти процессы ингибируют передачу сигналов инсулина, что приводит к гиперинсулинемии и последующим метаболическим нарушениям [1]. Ключевым регулятором внутриклеточного метаболизма являются митохондрии – органеллы, в которых осуществляется окисление жирных кислот, синтез ATP и многие другие метаболические процессы. При митохондриальной дисфункции неизбежно повышается генерация активных форм кислорода (АФК), что в дальнейшем приводит к повреждениям митохондриальной ДНК (мтДНК). Кроме этого нарушается работа всей электронно-транспортной цепи митохондрий, снижается синтез ATP и активность ATP-зависимых ферментов, которые поддерживают мембранный потенциал клетки. В итоге эти процессы приводят к деполяризации мембран и активации митохондриального сигнального пути апоптоза [2, 3]. мтДНК при тесном взаимодействии с ядерными генами поддерживает слаженную работу митохондрий и их биогенез, а мутации в мтДНК могут приводить к развитию митохондриальной дисфункции и связанными с ней метаболическими нарушениями. Повышенный интерес вызывает гипервариабельный участок HVR1 D-петли мтДНК, в котором находится так называемый полицитозиновый тракт, расположенный в позиции 16184-16193 пар нуклеотидов (п.н.). У большинства людей m.16189T прерывает полицитозиновый тракт, разбивая его на два участка. Однако у некоторых индивидуумов в этой области находится полиморфизм m.16189T>C, формирующий непрерывный полицитозиновый тракт. Интерес к этой вариативной области связан с тем, что она находится в сайте, важном для репликации мтДНК, названном *oriB* [4]. Предполагается, что полиморфизм мтДНК m.16189T>C может нарушать работу митохондриальной γ-ДНК-полимеразы вследствие её проскальзывания в этом участке, что потенциально может приводить к ошибкам во время репликации и формированию дополнительных полиморфизмов мтДНК в этом участке. Другая гипотеза предполагает снижение сродства мтДНК к митохондриальному белку mtSSB, ответственному за стабилизацию D-петли [5], что также понижает качество репликации мтДНК. Влияние этих факторов негативно сказывается на репликацию мтДНК и, как следствие, вызывает снижение синтеза кодирумых митохондриальным геномом субъединиц комплексов дыхательной цепи,

* - адресат для переписки

что отражается на продуктивности работы митохондрий в целом.

Неоднократно показана ассоциация между полиморфизмом мтДНК m.16189T>C и СД2, резистентностью к инсулину [4, 6-8], индексом массы тела (ИМТ) [9, 10], более низким весом при рождении [6], а также ишемической болезнью сердца [11]. Несмотря на то, что результаты последних исследований и мета-анализов показывают слабую корреляцию m.16189T>C с СД2, особенно в европейских популяциях [4, 12], тем не менее большая их часть сосредоточена только на самом факте присутствия полиморфизма, не рассматривая в целом вариативность полицитозинового тракта.

Целью данного исследования была оценка ассоциаций различных аллельных вариантов мтДНК в позиции 16184-16193 п.н. с основными критериями МС (повышенный ИМТ, АГ, СД2, дислипидемия), а также сравнительная характеристика количества копий мтДНК в клетках крови у пациентов с МС и здоровых людей при различных аллельных вариантах мтДНК.

МЕТОДИКА

В исследовании принимали участие 106 пациентов с МС, проходивших лечение в Областной клинической больнице Калининградской области (33 мужчины и 73 женщины в возрасте от 40 до 54 лет); контрольную группу составляли 71 здоровых доноров (35 мужчин и 36 женщин в возрасте от 35 до 52 лет), имеющих нормальные антропометрические и биохимические показатели углеводного и липидного обменов. Обе группы принадлежали к группе славянских (европеоидных) популяций.

Диагноз МС устанавливали после детального клинико-инструментального обследования в условиях специализированного стационара в соответствии с критериями Международной федерации диабета (IDF), критериев, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (1999) и NCEP-ATP-III (2002) в рамках Национальной образовательной программы по холестерину (США). Всем участникам исследования проводили антропометрические исследования: определяли рост, вес, объём талии и бёдер, индекс массы тела (ИМТ). Избыточной массой тела считали показатели ИМТ от 25 кг/м^2 до 29,9 кг/м^2, ожирением – ИМТ свыше 30 кг/м^2. При андроидном типе ожирения (характерном для МС) соотношение ОТ/ОБ у мужчин было больше 1,0, у женщин – больше 0,8. Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете (протокол №4 заседания Локального этического комитета Инновационного парка БФУ им. И. Канта от 23 октября 2013 года). Все группы обследованных лиц были сопоставимы по возрастным и гендерным характеристикам; со всеми пациентами было подписано добровольное информационное согласие на исследование.

Материалом для исследований служила периферическая венозная кровь, взятая утром натощак в вакуумные пробирки Vacuette с ЭДТА (“Greiner-bio-one”, Австрия). Далее, из лейкоцитарной фракции, полученной при центрифугировании (“Eppendorf 5810”, Германия) при 2000 g в течение 10 мин, выделялась тотальная ДНК с помощью набора QIAmpDNA MiniKit (“QIAGEN GmbH”, Германия), согласно протоколу фирмы-производителя. Концентрацию экстрагированной ДНК определяли спектрофотометрически (“Implen NanoPhotometer P-330”, Германия), а её качество по соотношению поглощений $A_{260}/A_{280} > 1,8$.

Точный нуклеотидный состав полицитозинового тракта в вариабельном участке 16184-16193 п.н. устанавливали методом капиллярного секвенирования (“Applied Biosystems PRISM 3500”, США). Для этого предварительно амплифицировали участок митохондриального генома со следующих олигонуклеотидных праймеров: forward_pr 5′-ctccaccattagcacccaaagc-3′, reverse_pr 5′-gaggatggtcaagggacc-3′. ПЦР смесь готовили в объеме 25 мкл, в соответствии с рекомендациями производителя набора EncycloPlus PCR kit (“Евроген”, Россия), следующего состава: 2,5 мкл 10× Encyclo buffer, 0,5 мкл 100 мкМ dNTP, 10 нг ДНК, 0,5 мкл 50× Encyclo polymerase и каждого праймера конечной концентрации 0,5 мкМ. Амплификацию проводили по протоколу: 95°C 5 мин, далее 35 циклов 95°C 30 с, 60°C 30 с, 72°C 30 с и заключительный цикл 72°C 3 мин. Ампликоны детектировали в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия (1 мкг/мл). Очистку реакционной смеси проводили с помощью ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США), смесь состояла из 5 мкл ПЦР-продукта, 2 мкл ExoSAP-IT, далее смесь инкубировали при 37°C 15 мин, 80°C 15 мин. Терминирующую реакцию проводили в объёме 10 мкл с помощью набора BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США): 4 мкл Terminator Ready Reaction Mix, 10 нг очищенного ПЦР-продукта, по 0,5 мкМ праймера прямого или обратного, температурный протокол терминирующей реакции: 96°C 1 мин; 30 циклов 96°C 10 с, 50°C 5 с, 60°C 4 мин; заключительный цикл 96°C 3 мин. Очистку терминирующей реакции проводили с использованием реагента BigDye® XTerminator Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”): 10 мкл терминирующей реакции, 45 мкл SAM Solution, 10 мкл BigDye® XTerminator Solution, смесь перемешивали при помощи мешалки Вортекс 30 мин при комнатной температуре. Далее, полученную взвесь центрифугировали 1 мин при 6000 *g* для осаждения частиц BigDye® XTerminator Solution (“Thermo Fisher Scientific”). Супернатант переносили в 96-луночные планшеты, которые помещали в капиллярный секвенатор Applied Biosystems PRISM 3500 (“Thermo Fisher Scientific”). Полученные хроматограммы анализировали, используя программное обеспечение SnapGene версии 3.3.

Количество копий мтДНК в расчёте на 1 клетку определяли методом мультиплексной капельной цифровой ПЦР (кцПЦР). Для этого образцы ДНК предварительно обрабатывали эндонуклеазой рестрикции ApaI (“New England BioLabs”, США) (1 мкл (10 единиц) ApaI, 5 мкл 10× CutSmart® buffer, ~30 нг образца ДНК), далее реакционную смесь инкубировали в термостате в течение 4 ч при 37°С. Компоненты самой кцПЦР реакции включали коммерческую ПЦР смесь, выбранные флуоресцентные TaqMan-зонды и олигонуклеотидные праймеры. Олигонуклеотидные праймеры и гидролизуемые зонды, меченные флуоресцентными красками HEX и FAM, были подобраны для амплификации соответствующих участков митохондриального гена *ND1* (кодирующего субъединицу 1 NADH-дегидрогеназного комплекса, ND1_forward 5′-ccctaaaacccgccacatct-3′, ND1_reverse 5′-gagcgatggtgagagctaaggt-3′, ND1_probe 5′-HEX-ccat-cacсctctacatcaccgccc-BHQ1-3′) и однокопийного ядерного гена *RPP30* (кодирующего рибонуклеазу *P/MRP* субъединицу *P30*, RPP30_forward 5′-gatttggac-ctgcgagcg-3′, RPP30_reverse 5′-gcggctgtctccacaagt-3′, RPP30_probe 5′-FAM-ctgacctgaaggctct-BHQ1-3′). Состав мультиплексной смеси кцПЦР включал 10 мкл коммерческого 2× ddPCR MasterMix (“Bio-Rad”, США), по 1 мкл каждого праймера (конечная концентрация 450 нМ) и FAM- и HEX-меченых гидролизуемых зондов (конечная концентрация каждого зонда в смеси 125 нМ) и 8 мкл образца ДНК. Затем приготовленная реакционная смесь загружалась в автоматический генератор капель QX200 Droplet Generator (“Bio-Rad”), где эмульсифицировалась примерно на 15–20 тысяч капель. Далее эмульсифицированная кцПЦР смесь амплифицировалась в стандартных 96-луночные планшеты в термоциклере (“Bio-Rad T100”, США) по следующему температурному протоколу: 95°С 10 мин, 40 циклов 94°С 30 с и 53°С 60 с и заключительный цикл 98°С 10 мин. Регистрацию флуоресцентных сигналов проводили по конечной точке с использованием модуля QX200 Droplet Reader (“Bio-Rad”), а полученные данные анализировались в программе QuantaSoft версии 1.7.4.0917. Абсолютное количество копий мтДНК в расчёте на клетку вычисляли по формуле:

$$\text{мтДНК копий/клетку} = \frac{2\times\ \text{мтДНК копий}}{\text{ядерные копии ДНК}}\ .$$

Статистическую обработку результатов проводили в программном обеспечении R Statistical Software (version 3.3.2). Проверку экспериментальных данных на нормальное распределение осуществляли с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Так как во всех выборках полученное значение p было <0,05, то дальнейшую оценку различий между выборками количественных данных рассчитывали с помощью непараметрических критериев Манна-Уитни-Уилкоксона для попарных сравнений и Краскела-Уоллиса для множественных сравнений. Оценку различий в распределении номинативных данных между группами при частотах в выборках <5 рассчитывали с помощью точного критерия Фишера с расчетом p-уровня достоверности по методу Монте-Карло, в остальных случаях применялся критерий χ^2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установленные аллельные варианты последовательностей мтДНК в позиции 16184-16193 п.н. приведены в таблице 1. Для последующего анализа все варианты последовательностей были разделены на 4 группы в зависимости от нуклеотидного состава: 1) дикий тип – m.16189T; 2) T-аллель – варианты мтДНК, в которых тимин прерывает полицитозиновый тракт, но в положениях отличных от m.16189T; 3) T_2-аллель – объединяет варианты мтДНК, в которых два остатка тимина прерывают полицитозиновый тракт; 4) C-аллель – варианты мтДНК с непрерывным полицитозиновым трактом из 10, 11 или 12 остатков цитозина. Как следует из таблицы 1, дикий тип (70,1% по всей выборке) превалирует среди остальных вариантов мтДНК, частота C-аллеля составила 15,3%, что немного превышает среднюю частоту данного аллеля 10% в европейских популяциях [12].

В таблице 2 приведены сравнительные характеристики пациентов с МС и контрольной группы. Согласно представленным данным, пациенты с МС отличались от контрольной группы

Таблица 1. Аллельные варианты мтДНК, согласно позициям 16184-16193 п.н., идентифицированные в исследуемых группах

Последовательность мтДНК 16184-16193 п.н.	Название аллельного варианта участка мтДНК 16184-16193 п.н.		Частота встречаемости в выборке (n=177)	
AAAACCCCC**T**CCCC	m.16189T	Дикий тип	**70,1%** (124)	
AAAACC**T**CCCCCCC	m.16186C>T	**T**-аллель	**0,60%** (1)	**3,9%** (7)
AAAACCC**T**CCCCCC	m.16187C>T		**1,1%** (2)	
AAAACCCCC**T**CCC	m.16190C>T		**0,60%** (1)	
AAAACCCCCCCC**T**C	m.16192C>T		**1,1%** (2)	
AAAACCCCCCCCC**T**	m.16193C>T		**0,60%** (1)	
AAAA**T**CCCC**T**CCCC	m.16189T; m.16184C>T	**T$_2$**-аллель	**1,7%** (3)	**10,7%** (19)
AAAAC**T**CCC**T**CCCC	m.16189T; m.16185C>T		**1,1%** (2)	
AAAACCC**T**C**T**CCCC	m.16189T; m.T16187C>T		**1,1%** (2)	
AAAACCCCC**T**CC**T**C	m.16189T; m.16192C>T		**5,6%** (10)	
AAAACCCCC**T**CCC**T**	m.16189T; m.16193C>T		**1,1%** (2)	
AAAACCCCCCCCCC	m.16189T>C	**C**-аллель	**10,2%** (18)	**15,3%** (27)
AAACCCCCCCCCCC	m.16183A>C, m.16189T>C		**3,4%** (6)	
AACCCCCCCCCCCC	m.16182A>C, m.16183A>C, m.16189T>C		**1,7%** (3)	

Таблица 2. Сравнение характеристик групп с метаболическим синдромом и контрольной группы

		Пациенты с метаболическим синдромом (n=83)	**Контрольная группа (n=71)**	**p**	
ИМТ, кг/м^2		40,9 (33,9; 47,7)	24,2 (23,2; 25,0)	<0,0001**	
Возраст, лет		46,5 (39,8; 54,0)	40,0 (35,0; 52,0)	-	
Пол женский/мужской		73/33	36/35	-	
СД2 типа		68/106	0/71	<0,0001**	
Дислипидемия (снижение уровня ХС ЛПВП <1,0 ммоль/л у мужчин и <1,2 ммоль/л у женщин; уровень ТГ ≥1,7 ммоль/л)		32/106	1/71	<0,0001**	
Артериальная гипертензия (АД ≥130/85 мм рт. ст)		52/106	0/71	<0,0001**	
Группы вариантов мтДНК	**Дикий тип**	68/106 (64,2%)	56/71 (79%)	0,4088	<0,011*
	Т-аллель	2/106 (1,9%)	5/71 (7,0%)	0,1271	
	T_2-аллель	14/106 (13,2%)	5/71 (7,0%)	0,3238	
	С-аллель	22/106 (20,7%)	5/71 (7,0%)	<0,033*	
Копии мтДНК на клетку	**По всем аллелям**	163 (130; 262)	180 (145; 300)	0,2428	
	Дикий тип	178,0 (131,5; 268)	180,4 (146,2; 281,8)	0,5968	
	Т-аллель	277 (250; 280)	176,0 (161,0;196,5)	0,4358	
	T_2-аллель	144,0 (121; 171)	361,1 (245,0; 408,1)	0,1148	
	С-аллель	161,0 (135; 266,5)	162 (111; 203)	0,7354	

Примечание. Здесь и в таблице 3 данные представлены как медиана (25-й процентиль; 75-й процентиль); * - статистически значимо на уровне p<0,05; ** - статистически достоверно на уровне p<0,01.

повышенным ИМТ (40,9 кг/м^2 против 24,2 кг/м^2), наличием СД2, дислипидемии и АГ (68 против 0, 28 против 1, 32 против 0 и 52 против 0, соответственно). Распределение вариантов участка мтДНК 16184-16193 п.н. статистически достоверно различалось между группами: при попарном сравнении частот каждого аллельного варианта частота С-аллеля была достоверно выше у пациентов с МС, чем в контрольной группе (p<0,0001). Количество копий мтДНК статистически достоверно не отличалось как между аллельными вариантами мтДНК внутри исследуемых групп, так и между группами пациентов с МС и контрольной группой. В целом, по всем аллелям количество копий мтДНК на клетку у пациентов с МС было ниже, чем в контроле, но это различие было недостоверным (p=0,2428).

При сравнении индивидов с различными вариантами мтДНК в позиции 16184-16193 п.н. (табл. 3) значимая взаимосвязь была обнаружена между присутствием С-аллеля и наличием МС (p<0,000631) наличием СД2 типа (p<0,00884), а также наличием дислипидемии (p<0,007996), АГ (p<0,002897). При этом, Т-аллель объединял все варианты мтДНК с прерванным тимином полицитозиновым трактом: Т-аллель, T_2-аллель и дикий тип. Индивиды при наличии С-аллеля имели более высокий ИМТ, но эта связь не была статистически достоверной (p<0,06263).

Для изучения влияния других факторов на вариабельность количества копий мтДНК был проведён пошаговый множественный регрессионный анализ отдельно для группы пациентов с МС для контрольной выборки и в целом по всей выборке (табл. 4). В модель были включены следующие параметры: ИМТ, возраст, наличие варианта мтДНК (С-аллель или Т-аллель), диагноз СД2, наличие дислипидемии, АГ. Значимым параметром в контрольной группе оказался возраст (скорректированный R^2=0,092, p =0,02896), а в группе больных МС значимое влияние оказывал ИМТ (скорректированный R^2=0,054, p=0,0187). Остальные параметры не оказывали значимого влияния на вариабельность количества копий мтДНК.

Согласно представленным нами данным, С-аллель достоверно чаще встречается у больных МС, чем в контрольной группе. При изучении связи наличия С-аллеля с конкретными компонентами МС достоверная связь обнаружена между присутствием С-аллеля с наличием СД2 и АГ. В научной периодике существуют спорные мнения об этой ассоциации. Изначально предполагалось, что полиморфизм m.16189T>C связан с более высоким риском развития инсулинорезистентности и СД2, что было подтверждено при исследовании большой когорты азиатского населения (отношение шансов (OR) 1,26, 95% CI 1,08 – 1,46, p=0,003) [8], тогда как по данным исследований в европейских популяциях и обобщённом мета-анализе связь оказалась куда более скромной (OR 1,10, 95% CI 1,01 – 1.20, p=0,03) [4]. В целом, это связывают с тем, что распространенность полиморфизма m.16189T>C в азиатских популяциях выше, чем европейских [13].

Таблица 3. Сравнение характеристик исследуемых индивидов при разных вариантах мтДНК по позициям 16184-16193 п.н.

	Дикий тип (n=124)	**Т-аллель (n=7)**	**T_2-аллель (n=19)**	**С-аллель (n=27)**	**p**	**p (С-аллель и Т-аллель)**
ИМТ, кг/м^2	29,5 (24,2; 41,6)	24,9 (23,0; 35,7)	38,9 (26; 44,7)	39,1 (30,5; 47,3)	0,06513	0,06263
Возраст, лет	41 (34,0; 52,0)	42 (37,0;45,5)	45 (36; 48,8)	48 (40,0; 55,0)	0,2576	0,06063
Наличие МС	68/124	2/7	14/19	22/27	0,0113*	0,000631**
СД 2 типа	40/124	1/7	10/19	17/27	0,00669**	0,00884**
Дислипидемия (снижение уровня ХС ЛПВП <1,0 ммоль/л у мужчин и <1,2 ммоль/л у женщин; уровень ТГ ≥1,7 ммоль/л)	18/124	1/7	3/19	10/27	0,06313	0,007996**
Артериальная гипертензия (АД ≥130/85 мм рт. ст)	36/124	0/7	5/19	16/27	0,0039**	0,002897**
Копии мтДНК на клетку	179 (135; 282)	196,5 (168,5; 232)	145 (126,0; 196,5)	162,5 (134,2; 271,5)	0,6283	0,676

Таблица 4. Пошаговый множественный регрессионный анализ факторов, влияющих на количество копий мтДНК

Исследуемая группа	Предикторы	Коэффициент	Стандартная ошибка	p	Скорректированный R^2
Контрольная группа	интерсепт	1,9932	0,142		0,092
	возраст	0,008081	0,00356	0,02896*	
Пациенты с МС	интерсепт	2,49	0,097		0,054
	ИМТ	-0,0053	0,002215	0,01847*	
Вся выборка	интерсепт	2,29	0,097		0,021
	ИМТ	-0,00378	0,00188	0,00394**	
	возраст	0,002757	0,0023	0,02516*	

Примечание: * - статистически достоверно на уровне p<0,05; ** - статистически достоверно на уровне p<0,01.

Нами не было обнаружено значимой корреляции между вариантами мтДНК в позиции 16184-16193 п.н. и количеством копий мтДНК. В ранее опубликованных работах была выдвинута гипотеза о связи между наличием определенного варианта мтДНК 16184-16193 п.н. и количеством копий мтДНК в клетках. Предполагается, что варианты мтДНК с непрерывным цитозиновым трактом в этой области ассоциированы со снижением содержания мтДНК в клетках [14]. Кроме того, установлено, что на уровень репликации мтДНК влияет не только наличие непрерывного полицитозинового тракта но и его длина [12], то есть, чем больше остатков цитозина содержит тракт, тем меньше копий мтДНК в клетке. Напротив, наличие вариантов мтДНК с несколькими разрывами полицитозинового тракта остатками тимина приводит к увеличению количества копий мтДНК. Такие изменения в количестве копий мтДНК связывают с тем, что наличие неразрывного полицитозинового тракта может вызывать ошибки во время репликации и проскальзывания γ-ДНК полимеразы в этом участке, в то время как присутствие одного или даже нескольких остатков тимина в этой области облегчает процесс репликации за счёт изменения трёхмерной структуры в области D-петли.

Возможно, различия полученных нами данных с другими работами связаны с недостаточным объёмом изученной выборки. Тем не менее, в целом по всем вариантам мтДНК намечена тенденция к уменьшению количества копий мтДНК в расчёте на клетку в группе пациентов с МС по сравнению с контролем, что согласуется с данными литературы [15, 16]. Коллективом авторов обнаружена реципрокная связь между тяжестью МС и содержанием мтДНК в лейкоцитах крови. Следует отметить, что уровень содержания мтДНК в клетках разных тканей определяется не только генетическими факторами. На изменение уровня репликации мтДНК влияют также окислительно-антиоксидатный статус индивида, антропометрические характеристики, инсулинорезистентность, гипергликемия и др. [12, 17].

Проведённый нами множественный регрессионный анализ показал, что в контроле и группе больных МС имеются отличия в силе влияния факторов на уровень репликации мтДНК. Так, ИМТ значимо влияет на изменение количества копий мтДНК в когорте больных МС, но не в контрольной группе.

Интерпретируя вышесказанное, следует учитывать тот факт, что рост ИМТ связан в том числе и с увеличением висцеральной жировой ткани, которая является основным местом секреции противовоспалительных медиаторов, таких как TNF-α, IL-6 и др., оказывающих влияние на сигнальные пути, связанные с митохондриальным биогенезом. Кроме того, в висцеральной жировой ткани накапливаются свободные жирные кислоты, из которых могут образовываться токсичные метаболиты. Последние повышают уровень окислительного стресса и приводят к митохондриальной дисфункции и снижению количества копий мтДНК [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы предполагаем наличие ассоциации между вариантом непрерывного полицитозинового тракта и развитием СД2 при МС. Нами не было обнаружено достоверных корреляций между аллельными вариантами полицистронного тракта с количеством копий мтДНК в исследуемых группах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 гг” при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России, соглашение № 14.575.21.0108 от 27 ноября 2014 г., уникальный идентификатор RFMEFI57514X0108.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sorriento D., Pascale A.V., Finelli R., Carillo A.L., Annunziata R., Trimarco B., Iaccarino G.* (2014) Scientific World J., ID 604685, http://dx.doi.org/10.1155/2014/604685
2. *Du C., Fang M., Li Y., Li L., Wang X.* (2000) Cell, **102**(1), 33-42.
3. *Marchetti P., Castedo M., Susin S.A., Zamzami N., Hirsch T., Macho A., Haeffner A., Hirsch F., Geuskens M., Kroemer G.* (1996) J. Exp. Med., **184**(3), 1155-1160.
4. *Ye Z., Gillson C., Sims M., Khaw K.T., Plotka M., Poulton J., Langenberg C., Wareham N.J.* (2013) Diabetologia, **56**(9), 1907-1913.
5. *Park K.S., Chan J.C., Chuang L.M., Suzuki S., Araki E., Nanjo K., Ji L., Ng M., Nishi M., Furuta H. et al.* (2000) Diabetologia, **51**(4), 602-608.
6. *Poulton J., Luan J., Macaulay V., Hennings S., Mitchell J., Wareham N.J.* (2002) Hum. Mol. Genet., **11**(13), 1581-1583.
7. *Liou C.W., Lin T.K., Huei Weng H., Lee C.F., Chen T.L., Wei Y.H., Chen S.D., Chuang Y.C., Weng S.W., Wang P.W.* (2007) J. Clin. Endocrinol. Metab., **92**(1), 235-239.
8. *Chinnery P.F., Elliott H.R., Patel S., Lambert C., Keers S.M., Durham S.E., McCarthy M.I., Hitman G.A., Hattersley A.T., Walker M.* (2005) Lancet, **366**(9497), 1650-1651.
9. *Mohlke K.L., Jackson A.U., Scott L.J., Peck E.C., Suh Y.D., Chines P.S., Watanabe R.M., Buchanan T.A., Conneely K.N., Erdos M.R. et al.* (2005) Hum. Genet., **118**(2), 245-254.
10. *Kim J.H., Park K.S., Cho Y.M., Kang B.S., Kim S.K., Jeon H.J., Kim S.Y. Lee H.K.* (2002) Diabet Med., **19**(8), 681-684.
11. *Mueller E.E., Eder W., Ebner S., Schwaiger E., Santic D., Kreindl T., Stanger O., Paulweber B., Iglseder B., Oberkofler H. et al.* (2011) PLoSOne, **6**(1), e16455, doi: 10.1371/journal.pone.0016455.
12. *Liou C.W., Lin T.K., Chen J.B., Tiao M.M., Weng S.W., Chen S.D., Chuang Y.C., Chuang J.H., Wang, P.W.* (2010) J. Med. Genet., **47**(11), 723-728.
13. *Kwak S.H., Park K.S.* (2016) Front. Biosci. (Landmark Ed.), **21**, 1151-1167.
14. *Palmieri V.O., De Rasmo D., Signorile A., Sardanelli A.M., Grattagliano I., Minerva F., Cardinale G., Portincasa P., Papa S., Palasciano G.* (2011) Nutrition, **27**(7-8), 773-777.
15. *Huang C.H., Su S.L., Hsieh M.C., Cheng W.L., Chang C.C., Wu H.L., Kuo C.L., Lin T.T., Liu C.S.* (2011) J. Atheroscler. Thromb., **18**(10), 867-873. DOI: 10.5551/jat.8698
16. *Peinado J.R., Diaz-Ruiz A., Fruhbeck G., Malagon M.M.* (2014) Proteomics, **14**(4-5), 452-466.
17. *Xu F.X., Zhou X., Shen F., Pang R., Liu S.M.* (2012) Diabet Med., **29**(7), e47-54.
18. *Lee J.Y., Lee D.C., Im J.A., Lee J.W.* (2014) Int. J. Endocrinol., ID 586017, http://dx.doi.org/10.1155/2014/586017

Поступила: 10. 08. 2017.
Принята к печати: 19. 09. 2017.

THE ASSOCIATION OF THE MITOCHONDRIAL DNA *oriB* VARIANTS WITH METABOLIC SYNDROME

D.A. Skuratovskaia[1], J.K. Sofronova[1], P.A. Zatolokin[2], M.A. Vasilenko[1], L.S. Litvinova[1], I.O. Mazunin[1]

[1]Immanuel Kant Baltic Federal University,
14 Nevskogo str., Kaliningrad, 236038 Russia; e-mail: IMazunin@kantiana.ru
[2]Kaliningrad Region Hospital, 74 Klinicheskaya str., Kaliningrad, 236019 Russia

Different genes are involved in the development of pathology and formation the metabolic syndrome (MS) phenotype. In the literature, there is a data connection to the site *oriB* polymorphisms of mitochondrial DNA (mtDNA), known as 16184-16193 polycytosine tract, with insulin resistance, type 2 diabetes (T2DM) and other metabolic abnormalities in different ethnic populations. It is supposed that for certain polymorphisms at this site decreases mtDNA copy number in the cells. In this study, we have identified different allelic variants of the mtDNA *oriB* site in MS patients (n=106) and healthy individuals (n=71) using capillary sequencing, and determined the amount of mtDNA copy blood leukocytes by droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR). The continuous polycytosine tract was significantly more common in MS patients, and such a link was particularly strong in MS patients with type 2 diabetes (p<0.01). No significant correlation has been found between mtDNA copy number and the *oriB* site variants, but in general there is a tendency to decreased mtDNA copy number in MS patients.

Key words: mitochondrial DNA polymorphism, the mitochondria, the metabolic syndrome, diabetes type 2