

Ассоциация полиморфизма Thr12Ser гена митохондриального фактора транскрипции А *TFAM* с ишемической болезнью сердца

Жейкова Т.В.¹, Голубенко М.В.¹, Буйкин С.В.¹, Макеева О.А.¹, Лежнев А.А.², Цимбалюк И.В.³, Шипулин В.М.², Пузырёв В.П.¹

Association of Thr12Ser polymorphism in mitochondrial transcription factor A *TFAM* gene with coronary artery disease

Zheikova T.V., Golubenko M.V., Buikin S.V., Makeeva O.A., Lezhnev A.A., Tsimbalyuk I.V., Shipulin V.M., Puzyryov V.P.

¹ НИИ медицинской генетики СО РАМН, г. Томск

² НИИ кардиологии СО РАМН, г. Томск

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Жейкова Т.В., Голубенко М.В., Буйкин С.В. и др.

Проанализировано распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта Thr12Ser (rs1937) гена *TFAM* в выборке лиц, больных ишемической болезнью сердца, и в популяционной выборке жителей г. Томска. Для проведения генотипирования использовали полиморфизм длин рестрикционных фрагментов. Выявлена статистически значимо более высокая частота генотипа СС у мужчин, больных ишемической болезнью сердца, — 4,52% по сравнению с популяционной выборкой мужчин — 0,45% ($\chi^2 = 6,315$; $p = 0,043$; OR = 10,45). Таким образом, генотип СС ассоциирован с ишемической болезнью сердца у мужчин в популяции г. Томска.

Ключевые слова: митохондриальный фактор транскрипции А, окислительный стресс, ишемическая болезнь сердца.

In this study we genotyped polymorphism Thr12Ser (rs1937) in *TFAM* gene in two groups: patients with coronary artery disease and control group (people from Tomsk population). For genotyping was used restriction fragment length polymorphism. We have found significant higher genotype CC frequency in men with coronary artery disease — 4.52% compared with control men — 0.45% ($\chi^2 = 6.315$; $p = 0.043$; OR = 10.45). Thus genotype CC is associated with coronary artery disease in men from Tomsk population.

Key words: mitochondrial transcription factor A, oxidative stress, coronary artery disease.

УДК 616.12-005.4-055.1:575.174.015.3

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) — одно из самых распространенных заболеваний в мире, основной причиной которого является атеросклероз коронарных артерий [7, 13, 16]. В патогенезе атеросклероза значимая роль отводится активным формам кислорода, таким как супероксид-анион [3, 14]. Главным источником супероксида служит дыхательная цепь митохондрий, компоненты которой кодируются митохондриальной ДНК (мтДНК) [5]. Ключевым активато-

ром митохондриальной транскрипции и участником процесса репликации мтДНК является митохондриальный фактор транскрипции А [12], кодируемый геном *TFAM*, расположенным на хромосоме 10q21 [11, 15]. Сверхэкспрессия *TFAM* у мышей приводит к повышению числа копий мтДНК на 60—70% [4, 6], а также значительно уменьшает проявления дисфункции миокарда, вызванной его инфарктом [9]. У нокаутированных по гену *TFAM*–/– мышей наблюдается резкое снижение количества мтДНК и, как следствие, сильное нарушение окислительного фосфорилирования, что фе-

нотипически выражается в виде пороков развития сердечно-сосудистой и нервной систем [10]. При разрушении митохондриального фактора транскрипции А в сердце и мышцах у трансгенных мышей наблюдалась мозаичная кардиоспецифичная недостаточность дыхательной цепи, дилатационная кардиомиопатия, атрио-вентрикулярная блокада и смерть в возрасте от 2 до 4 нед [17], что указывает на вероятный вклад полиморфизма гена *TFAM* в развитие сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ИБС.

Цель исследования — поиск и анализ ассоциации полиморфизма Thr12Ser (rs1937) гена *TFAM* с ишемической болезнью сердца. Данный полиморфизм характеризуется высокой степенью гетерозиготности и приводит к замене аминокислоты триптофан на серин. Соответственно, он может влиять на стабильность структуры и работу митохондриального фактора транскрипции А.

Материал и методы

Группа больных ИБС составила 172 человека (90% мужчин и 10% женщин). Средний возраст составил (55 ± 8) лет. Критериями включения в исследование служили наличие ИБС и перенесенного инфаркта миокарда в анамнезе. В качестве контрольной группы использовалась популяционная выборка численностью 412 человек (средний возраст (47 ± 10) лет; 54% мужчин и 46% женщин).

Материалом для исследования являлась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров, подобранных в программе Primer3 (F: 5'-CCGGATGTTAGCAGATTTCC-3' и R: 5'-CAGCTCTGCTCCAGACCTTC-3') с последующим рестрикционным анализом рестриктазой DdeI в концентрации 1 единица активности (е. а.) (Fermentas, Латвия). Смесь для ПЦР содержала по 5 пмоль прямого и обратного праймеров, буфер для Taq-полимеразы производства «СибЭнзим» (г. Новосибирск) ($MgCl_2$ концентрацией 1,5 ммоль в реакционной смеси), 1 е. а. Taq-полимеразы производства «Биосан» (г. Новосибирск), по 2 нмоль каждого из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, около 100 нг геномной ДНК. Про-

дукты рестрикции фракционировали 30 мин в 3%-м агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием и регистрировали результаты с помощью геледокументирующей системы.

Анализ полученных данных осуществлялся с помощью программы MS Excel, статистического пакета Statistica 6.0. Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди—Вайнберга применяли критерий χ^2 Пирсона. Для попарного сравнения частот генотипов и аллелей между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса на непрерывность или двусторонний точный критерий Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Отношение шансов для отдельных генотипов и аллелей и доверительный интервал рассчитывали согласно Bland [2].

Результаты и обсуждение

В ходе исследования проанализировано распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта Thr12Ser гена *TFAM* в исследуемых выборках (табл. 1). Распределение генотипов в популяционной выборке жителей г. Томска соответствовало ожидаемому при равновесии Харди—Вайнберга ($\chi^2 = 0,6384$; $p > 0,05$). Различий по частотам генотипов и аллелей между мужчинами и женщинами в популяционной группе не выявлено. Данные сравнительного анализа частот генотипов и аллелей полиморфизма Thr12Ser гена *TFAM* представлены в табл. 2. Сравнительный анализ между мужчинами контрольной группы и группы больных ИБС по частотам генотипов показал статистически значимое различие ($\chi^2 = 6,315$, $p = 0,043$; OR = 10,45; CI 1,27—85,84) за счет более высокой частоты генотипа CC в выборке больных ИБС мужчин, которая составила 4,52% по сравнению с контрольной группой — 0,45%. Группа женщин, больных ИБС, была слишком малочисленной для анализа, поэтому сравнения их с популяционной выборкой женщин не проводили.

Известно, что количество копий мтДНК в клетках миокарда и экспрессия *TFAM* снижаются при сердечной недостаточности. На трансгенных мышцах с повышенной экспрессией *TFAM* показано, что сверхэкспрессия *TFAM* препятствует дефициту мтДНК в сердце, улучшает ремоделирование левого желудочка и

сердечную недостаточность после инфаркта миокар-

да,

Таблица 1

Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфизму Thr12Ser гена TFAM

TFAM (Thr12Ser)	Относительные частоты генотипов, %			Относительные частоты аллелей, %	
	CC	CG	GG	C	G
Контроль общий (412 человек)	1,21	23,30	75,49	12,86	87,14
Контроль, мужчины (222 человека)	0,45	21,62	77,92	11,26	88,74
Контроль, женщины (190 человек)	2,11	25,26	72,63	14,74	85,26
Больные ИБС (172 человек)	4,07	21,51	74,42	14,83	85,17
Больные ИБС, мужчины (155 человек)	4,52	20,65	74,83	14,84	85,16

Таблица 2

Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфизма Thr12Ser гена TFAM

Сравниваемые выборки	Генотипы	Аллели
Контроль общий и больные ИБС	$\chi^2 = 5,006; p = 0,082$	$\chi^2 = 0,643; p = 0,423; OR = 0,85$
Контроль, мужчины и больные ИБС, мужчины	$\chi^2 = 7,264; p = 0,026$	$\chi^2 = 1,793; p = 0,181; OR = 1,37$

Примечание. χ^2 — значение критерия, p — уровень значимости, OR — отношение шансов.

вызванного путем перевязывания левой коронарной артерии. Выживаемость в течение 4 нед выше у трансгенных мышей, хотя размеры зоны инфаркта соизмеримы с размерами у мышей дикого типа. Улучшение функционирования левого желудочка у трансгенных мышей сопровождалось снижением гипертрофии миоцитов, апоптоза и интерстициального фиброза [8, 9]. Анализ доступной литературы не выявил исследований, посвященных поиску ассоциаций полиморфизма Thr12Ser гена TFAM с ИБС.

Заключение

Таким образом, впервые показано, что носительство генотипа CC полиморфизма Thr12Ser гена TFAM является фактором риска ИБС у мужчин в популяции г. Томска.

Исследование выполнено при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры для инновационной России на 2009—2011 годы», ГК № П722 от 12.08.2009 г., П977 от 20.08.2009 г.

Литература

1. Aydin J., Andersson D.C., Hanninen S.L. et al. Increased mitochondrial Ca^{2+} and decreased sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} in mitochondrial myopathy // Hum. Molec. Genet. 2009. V. 18, № 2. P. 278—288.
2. Bland J.M., Altman D.G. Statistics notes. The odds ratio // British Medical J. 2000. V. 320. № 7247. P. 1468.
3. Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney J.F. Antioxidants and

- atherosclerotic heart disease // N. Engl. J. Med. 1997. V. 337, № 6. P. 408—416.
4. Ekstrand M.I., Falkenberg M., Rantanen A. et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals // Hum. Molec. Genet. 2004. V. 13, № 9. P. 935—944.
5. Fariss M.W., Chan C.B., Patel M. et al. Role of mitochondria in toxic oxidative stress // Mol Interv. 2005. V. 5, № 2. P. 94—111.
6. Hance N., Ekstrand M. I., Trifunovic A. Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis // Hum. Molec. Genet. 2005. V. 14, № 13. P. 1775—1783.
7. Hirashiki A., Yamada Y., Murase Y. et al. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in low or high risk subjects defined by conventional risk factors // J. Am. Coll. Cardiol. 2003. V. 42, № 8. P. 1429—1437.
8. Ikeuchi M., Matsusaka H., Kang D. et al. Overexpression of mitochondrial transcription factor A ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction // Circulation. 2005. V. 112, № 5. P. 683—690.
9. Kang D., Kim S.H., Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions // Mitochondrion. 2007. V. 7, № 1. P. 39—44.
10. Larsson N.G., Wang J., Wilhelmsson H. et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice // Nature Genet. 1998. V. 18, № 3. P. 231—236.
11. Milatovich A., Parisi M.A., Poulton J. et al. Sequences homologous to MTF1, mitochondrial transcription factor 1, are located on human chromosomes 7 (7pter-cen), 10 and 11 (11cen-qter) // Cytogenet. Cell Genet. 1992. V. 58. P. 1924.
12. Parisi M.A., Clayton D.A. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins // Science. 1991. V. 252, № 5008. P. 965—969.

Жейкова Т.В., Голубенко М.В., Буйкин С.В. и др. Ассоциация полиморфизма Thr12Ser гена митохондриального фактора...

13. Samani N.J., Erdmann J., Hall A.S. et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease // *N. Engl. J. Med.* 2007. V. 357, № 5. P. 443—453.
14. Steinberg D. Low-density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272, № 34. P. 20963—20966.
15. Tiranti V., Rossi E., Ruiz-Carrillo A. et al. Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis // *Genomics.* 1995. V. 25, № 2. P. 559—564.
16. Tobin M.D., Braund P.S., Burton P.R. et al. Genotypes and haplotypes predisposing to myocardial infarction: A multilocus case-control study // *Eur. Heart J.* 2004. V. 25, № 6. P. 459—467.
17. Wang J., Wilhelmsson H., Graff C. et al. Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression // *Nature Genet.* 1999. V. 21, № 1. P. 133—137.

Поступила в редакцию 14.03.2012 г.

Утверждена к печати 09.10.2012 г.

Сведения об авторах

Т.В. Жейкова — мл. науч. сотрудник лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

М.В. Голубенко — канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

С.В. Буйкин — канд. мед. наук, науч. сотрудник лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

О.А. Макеева — канд. мед. наук, руководитель группы организации научных исследований, лаборатория популяционной генетики НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

А.А. Лежнев — канд. мед. наук, врач-кардиохирург кардиохирургического отделения НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск).

И.В. Цимбалюк — канд. мед. наук, ассистент кафедры факультетской терапии СибГМУ (г. Томск).

В.М. Шипулин — д-р мед. наук, профессор, научный руководитель отделения сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск).

В.П. Пузырёв — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. лабораторией популяционной генетики НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск).

Для корреспонденции

Жейкова Татьяна Владимировна, тел. 8-903-915-7186; e-mail: zheykova@mail.ru

Порядок рецензирования статей в журнале «Бюллетень сибирской медицины»

Все поступающие в редакцию рукописи после регистрации проходят этап обязательного двойного конфиденциального рецензирования членами редакционного совета либо внешними рецензентами. Рецензенты не имеют права копировать статью и обсуждать ее с другими лицами (без разрешения главного редактора).

При получении положительных рецензий работа считается принятой к рассмотрению редакционной коллегией журнала, которая окончательно решает вопрос о публикации материала в «Бюллетене сибирской медицины».

Редакция журнала извещает основного автора о результатах прохождения рецензирования и сроках публикации.

Редакция не принимает рукописи научно-практического характера, опубликованные ранее в других изданиях.

Все полученные редакцией журнала «Бюллетень сибирской медицины» рукописи будут рассмотрены без задержек и при получении положительных рецензий и решения редакционной коллегии опубликованы в течение одного года.

С правилами оформления работ можно ознакомиться в Интернете на сайте СибГМУ: <http://ssmu.tomsk.ru>.

Статьи и информация для журнала принимаются в редакционно-издательском отделе СибГМУ.