

Р.Ф. Еникеева, А.В. Казанцева, Ю.Д. Давыдова,
Р.Н. Мустафин, М.М. Лобаскова, С.Б. Малых, Ю.В. Ковас,
Э.К. Хуснутдинова

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ЧИСЛА КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК: РОЛЬ СОЦИАЛЬНО-ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

DOI 10.25789/YMJ.2022.78.03

УДК 576.311.347

Вариации числа копий мтДНК обусловлены комплексным воздействием различных средовых факторов, включая химический, биологический или физиологический стресс, возраст, особенности эмбрионального развития. Однако к настоящему времени остается неизвестным, какие факторы и в каком возрасте оказывают наиболее значимый эффект на изменение числа копий мтДНК и приводят к большей аллостатической нагрузке. Исходя из этого, целью данной работы являлась оценка вовлеченности различных социально-демографических параметров в формирование межиндивидуальных вариаций числа копий мтДНК у здоровых индивидов 18–25 лет. В рамках данного исследования были выявлены эффекты жестокого обращения в детстве и возраста на индивидуальные различия в числе копий митохондриальной ДНК.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, митохондрия, средовые факторы, митохондриальная теория старения, аллостатическая нагрузка.

Differences in mtDNA copy-number are caused by a complex effect of various environmental factors including chemical, biological or physiological stress, age, and embryonic development. However, to date it remains unknown, which factors and at what age have the most significant impact on mtDNA copy-number and cause greater allostatic load. Therefore, the present study aims to assess the involvement of various socio-demographic parameters in manifesting mtDNA copy-number in healthy individuals aged 18-25 years (N=1065). Within the framework of this study the effects of childhood maltreatment and age on individual differences in mitochondrial DNA copy number were revealed.

Keywords: mitochondrial DNA, mitochondria, environmental factors, mitochondrial theory of aging, allostatic load.

Введение. Митохондрии представляют собой внутриклеточные органеллы, присутствующие почти во всех эукариотических клетках, основная функция которых заключается в производстве биохимической энергии в форме аденозинтрифосфата (АТФ) [1]. Кроме того, митохондрии играют важную роль в регуляции гомеостаза железа и кальция, синтезе гормонов, апоптозе, а также в поддержании окис-

лительно-восстановительного баланса [18]. Митохондрии отличаются от всех других органелл животных наличием собственной ДНК (митохондриальной ДНК, мтДНК), которая у человека кодирует 37 генов: 2 гена рибосомной РНК, 22 гена транспортной РНК, 13 белок-кодирующих генов [4]. Согласно литературным данным, число копий мтДНК отражает эффективность работы митохондрий и, как следствие, количество вырабатываемой клетками энергии (АТФ), которая является важным показателем нормальной жизнедеятельности организма [9]. Молекулярно-эпидемиологические исследования продемонстрировали, что количество копий мтДНК в лейкоцитах может увеличивать риск развития онкологических заболеваний, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний, болезней, связанных со старением, а также психологических расстройств, таких как депрессия [11]. Количество копий мтДНК в организме человека строго регулируется во время дифференцировки клеток, причем потребность клеток в АТФ положительно коррелирует с числом копий мтДНК [8]. Кроме того, существует ряд исследований, демонстрирующих, что факторы окружающей среды могут влиять на число копий мтДНК. Наряду с экологическим стрессом, обусловленным загрязненностью окружающей среды, на число

копий мтДНК может влиять и психоэмоциональный стресс, связанный с обстановкой, в которой находился человек, особенно в раннем детстве [13]. Помимо этого важными факторами, оказывающими непосредственное влияние на оптимальную работу митохондрий, а также и на число копий мтДНК, являются общее состояние здоровья и образ жизни человека [19]. Однако к настоящему времени остается неизвестным, какие факторы и в каком возрасте оказывают наиболее значимый эффект на изменение числа копий мтДНК и приводят к большей аллостатической нагрузке. Выявление таких средовых предикторов числа копий мтДНК позволит лучше понять природу целого ряда социально-значимых заболеваний.

Цель данной работы - оценка вовлеченности различных социально-демографических параметров в вариации числа копий мтДНК у здоровых индивидов уже в периоде ранней взрослости.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 1065 испытуемых (79,25% женщин 18–25 лет), которые являлись студентами вузов Республики Башкортостан и Удмуртской Республики. Анализируемая выборка состояла из представителей различных этнических групп: русских – 357 чел., татар – 340, удмуртов – 234,

Институт биохимии и генетики Уфимского ФИЦ РАН: **ЕНИКЕЕВА Рената Фануровна** – к.б.н., н.с., enikeevarf@gmail.com, **КАЗАНЦЕВА Анастасия Валерьевна** – к.б.н., с.н.с., **ДАВЫДОВА Юлия Дмитриевна** – м.н.с., **МУСТАФИН Рустам Наилевич** – к.м.н., доцент Башкирского ГМУ; Психологический институт Российской академии образования: **ЛОБАСКОВА Мария Михайловна** – к.психол.н., с.н.с., **МАЛЫХ Сергей Борисович** – д.психол.н., проф., действительный член РАО, зав. лаб.; **КОВАС Юлия Владимировна** – PhD, проф. генетики и психологии, директор Международной лаборатории междисциплинарных исследований индивидуальных различий в обучении (InLab) в колледже Голдсмит, Университет Лондона, Великобритания. ORCID 0000-0001-9633-6374, Researcher ID (WOS): L-7116-2019, Autor ID (Scopus): 8680670800. **ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна** – д.б.н., проф., чл.-корр. РАО, директор Института биохимии и генетики Уфимского ФИЦ РАН.

Таблица 1

Изученные социально-демографические показатели

Параметр	N (%)	Параметр	N (%)
Пол		Жестокое обращение в детстве	
Мужчины	221 (20,75)	Да	104 (9,78)
Женщины	844 (79,25)	Нет	961 (90,22)
Этническая принадлежность		Билингвизм	
Русские	357 (33,52)	Да	591 (55,49)
Татары	340 (31,92)	Нет	474 (44,51)
Удмурты	234 (21,97)		
Метисы	134 (12,59)		
Место воспитания		Наличие хронических заболеваний	
Городская местность	609 (57,14)	Да	344 (32,26)
Сельская местность	456 (42,86)	Нет	721 (67,74)
Порядок рождения		Табакокурение	
1	646 (60,65)	Да	95 (8,88)
2	327 (30,69)	Ранее	91 (8,57)
>3	92 (8,66)	Никогда	879 (82,55)
Число детей в семье		Уровень материнской заботы	
1	216 (20,29)	Высокий	772 (72,49)
2	564 (53,00)	Низкий	293 (27,51)
>3	285 (26,71)		
Доношенность		Уровень материнской опеки	
Да	964 (90,53)	Высокий	590 (55,44)
Нет	101 (9,47)	Низкий	475 (44,56)
Уровень дохода		Уровень отцовской заботы	
Ниже среднего	113 (10,57)	Высокий	564 (52,95)
Средний	878 (82,45)	Низкий	501 (47,05)
Выше среднего	74 (6,98)		
Состав семьи		Уровень отцовской опеки	
Полная	892 (83,72)	Высокий	500 (46,91)
Неполная	173 (16,28)	Низкий	565 (53,09)

смешанной этнической принадлежности – 134 чел. Участие в исследовании являлось добровольным, от всех участников было получено информированное согласие. Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом Института биохимии и генетики УФИЦ РАН. Информация по изученным социально-демографическим параметрам была собрана при помощи опросных листов, включающих в себя 16 различных показателей.

Количественный анализ числа копий мтДНК проводился с помощью ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 («BioRad», США) согласно протоколу Wang с коллегами [16]. Каждый экспериментальный образец был анализирован в трех повторениях. Для дальнейшего анализа использовалось среднее значение порогового цикла C_t для генов *ND1* и *HGB*. Относительное число копий мтДНК оценивали по формуле $2^{-\Delta\Delta C_t}$, где $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ мтДНК}} (\text{образца}) - C_{t \text{ мтДНК}} (\text{калибратор})) - (C_{t \text{ HGB}} (\text{образца}) - C_{t \text{ HGB}} (\text{калибратор}))$. Смесь ДНК нескольких здоровых индивидов (калибратор) использовалась в качестве контрольного образца и была идентичной в каждом запуске прибора. Статистическая обработка проводилась с использованием множественного линейного регрессионного анализа, независимыми переменными в котором являлся весь массив изученных социо-демографических параметров с последующим пошаговым исключением наименее значимого предиктора до достижения наиболее оптимальной модели. В процессе пошагового выбора переменных для оптимизации размера модели (количества переменных) использовался информационный критерий Акайке, коэффициент детерминации (r^2) и уровень статистической значимости (p -value). Статистическая обработка и визуализация полученных данных проводилась в среде R v.4.1.2. Уровень статистической значимости принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение. Наименование и среднее значение изученных социально-демографических показателей представлены в табл. 1.

В результате множественного регрессионного анализа, включающего 16 различных социально-демографических факторов в качестве предикторов относительного числа копий мтДНК, была выявлена оптимальная модель ($R^2 = 0,03$; $F = 10,83$; $P < 0,05$), включающая возраст ($\beta = -0,02$; $P < 0,01$) и наличие жестокого обращения в детстве ($\beta = 0,05$; $P = 0,05$) (табл. 2). Исходя из сконструированной моде-

ли, относительное число копий мтДНК было выше у индивидов, имевших опыт жестокого родительского отношения в детстве, в то время как негативная зависимость отмечена с возрастом испытуемых (рисунок).

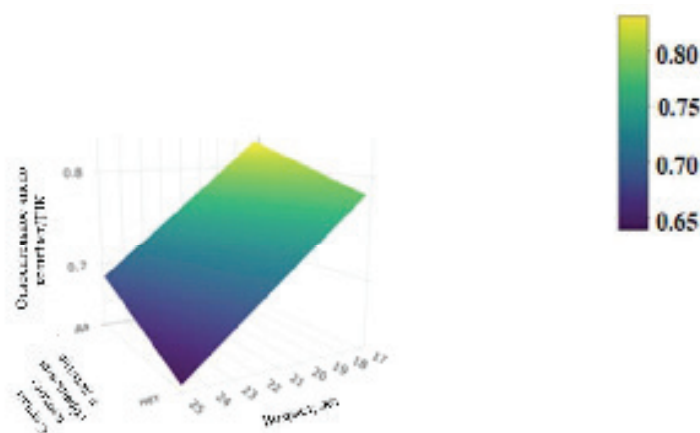
Согласно литературным данным, раннее неблагоприятное воздействие может привести к необратимым изменениям в ряде биохимических и молекулярно-генетических показателей [21], отражаясь, в том числе, и в изме-

нении числа копий мтДНК [14]. Одной из потенциальных систем, которая может быть задействована в модуляции этих изменений, является эндокринная система, функционирование которой опосредовано активацией гипоталамо-гипофизарной оси у лиц, переживших жестокое обращение в детстве [7]. Известно, что стресс индуцирует синтез глюкокортикоидов, которые запускают молекулярные механизмы [12], приводящие к изменениям в плотности

Таблица 2

Расчет параметров уравнения линейной регрессии

Предиктор	β	Стандартная ошибка	t-критерий	p
Константа	1,09	0,10	11,46	<0,01
Жестокое обращение в детстве	0,05	0,02	1,96	0,05
Возраст	-0,02	< 0,01	-3,92	<0,01



Зависимость относительного числа копий мтДНК от возраста и опыта жестокого обращения в детстве

и функционировании митохондрий вследствие модифицирования экспрессии митохондриальных и ядерных генов [17]. Кроме того, глюкокортикоиды могут регулировать процессы функционирования митохондрий посредством активации глюкокортикоидных рецепторов на мембранах митохондрий, регулируя их мембранный потенциал и приводя к запуску внутриклеточных сигнальных путей, оказывающих значительное влияние на биогенез и функциональную активность митохондрий [12, 17]. Ко всему прочему, известно, что стрессовые события в раннем возрасте, к которым, безусловно, относится жестокое обращение в детстве, могут увеличивать окислительный стресс, что, в свою очередь, приводит к повреждению митохондрий [15]. На сегодняшний день неизвестны конкретные механизмы регуляции числа копий мтДНК, однако существует гипотеза о связи запуска репликации мтДНК с дисфункцией митохондрий, вызванной действием гормонов гипоталамо-гипофизарной системы [5]. В экспериментах на модельных животных было показано, что в группе мышей, подвергшихся стрессу, или в ответ на введение кортикостерона количество мтДНК увеличивалось на 210% по сравнению с контрольной группой [3]. Таким образом, количество копий мтДНК, по-видимому, отражает функциональные изменения в митохондриях, влияя на производство энергии клетками. Исходя из вышеизложенного, стресс оказывает значимое влияние на состояние организма в целом, в первую очередь, на гомеостаз клеток, органов и тканей, приводя к повышенному спросу на энергию, за синтез которой отвечают митохондрии.

Вторым важным результатом, полученным в рамках данной работы,

является отрицательная связь между возрастом испытуемых и количеством копий мтДНК, что согласуется с митохондриальной теорией старения. Согласно этой теории накопление повреждений при репликации мтДНК (мтДНК имеет более низкую точность репликации и эффективности репарации по сравнению с ядерной ДНК) приводит к нарушению процессов окислительного фосфорилирования и процессов синтеза АТФ [10]. В свою очередь, эти нарушения сопровождаются увеличением концентрации активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид, пероксид водорода и гидроксильный радикал. АФК способны вызывать окислительные повреждения белков, липидов, нуклеиновых кислот, окислительно-восстановительных ферментов, а также мембран клеток и органелл, включая митохондрии, также сопутствуя снижению синтеза АТФ [20]. Кроме того, АФК способны вызывать новые повреждения в мтДНК, ведущие к еще большему увеличению концентрации АФК в организме. Митохондриальная теория старения подтверждается литературными данными, свидетельствующими об увеличении гетероплазмы и уменьшении числа копий мтДНК с возрастом [6, 18], а также результатами настоящего исследования.

Заключение. Было изучено влияние ряда социально-демографических показателей на межиндивидуальные вариации числа копий мтДНК у здоровых индивидов возрастной группы 18–25 лет. Из 16 показателей статистически значимые результаты были показаны для таких переменных, как «жестокое обращение в детстве» и «возраст», подтверждая участие митохондрий в качестве ключевых компонентов физиологической реакции на

стресс у человека. Ранее считалось, что снижение числа копий мтДНК начинается в возрасте ~50 лет [18], однако в рамках данного исследования впервые было показано, что отрицательная корреляция между возрастом и числом копий мтДНК статистически значима уже в студенческом периоде, а следовательно, и процессы постепенного снижения энергоэффективности митохондрий начинаются уже в этом возрасте. В литературе уже существует ряд исследований, описывающих изменение числа копий мтДНК, сопровождающее клиническую картину депрессии [11] и посттравматического стрессового расстройства [2], что свидетельствует о вовлеченности митохондриальной дисфункции в патофизиологические механизмы психических заболеваний. Зависимость числа копий мтДНК от психоэмоционального состояния человека подтверждается и результатом нашего исследования, так, число копий мтДНК у индивидов варьировало в зависимости от наличия негативного детского опыта, однако причинно-следственные связи еще предстоит изучить. Таким образом, полученные в данной работе результаты открывают новые возможности для дальнейших исследований в направлении геронтологии и психиатрии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 17–78–30028) в части сбора психологических данных и биологических образцов, мегагранта Правительства РФ (проект № 075-15-2021-595) в части статистической обработки и биоинформатического анализа данных, мегагранта Правительства Республики Башкортостан в части генотипирования изученных вариантов.

Литература

1. Фомченко Н.Е. Биологическая роль митохондрий в старении организма/ Н.Е. Фомченко, Е.В. Воропаев, А.В. Скачков //Проблемы здоровья и экологии. -2015; -4 (46): 8-13.
2. Fomchenko N.E. The biological role of mitochondria in the aging of the body/ Fomchenko N.E., Voropaev E.V., Skachkov A.V. 2015; 4 (46): 8-13. doi.org/10.51523/2708-6011.2015-12-4-2
3. Bersani F, Morley C, Lindqvist C, et al. Mitochondrial DNA copy number is reduced in male combat veterans with PTSD. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry. 2016; 64:10–17. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.012
4. Cai N, Chang S, Li Y, et al. Molecular signatures of major depression. Current biology. 2015; 9 (25): 1146–1156. doi: 10.1016/j.cub.2015.03.008
5. Calvo SE, Clauser KR, Mootha VK, et al. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian

mitochondrial proteins. Nucleic Acids Research. 2016; 44: D1251. doi: 10.1093/nar/gkv1003

5. Clay M, Deng JJ, Bai Y, et al. Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. Journal of genetics and genomics. 2009; 3 (36):125. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60099-5

6. Ding J., Sidore C., Butler TJ, et al. Assessing Mitochondrial DNA Variation and Copy Number in Lymphocytes of ~2,000 Sardinians Using Tailored Sequencing Analysis Tools. PLoS Genetics. 2015; 7 (11): 1005306. doi: 10.1371/journal.pgen.1005306

7. Kazantseva A, Davydova Yu, Enikeeva R, et al. AVPR1A main effect and OXTR-by-environment interplay in individual differences in depression level. Heliyon. 2020;10 (6): e05240. doi: 10.1016/j.heliyon. 2020.e05240

8. Lee W, Johnson J, Gough DJ, et al. Mitochondrial DNA copy number is regulated by DNA methylation and demethylation of POLGA in stem and cancer cells and their differentiated progeny. Cell Death & Disease. 2015; 2 (6): e1664–e1664. doi: 10.1038/cddis.2015.34

9. Liu X, Longchamps RJ, Wiggins KL, et al. Association of mitochondrial DNA copy number with cardiometabolic diseases. Cell Genomics. 2021; 1:100006. doi: 10.1016/j.xgen.2021.100006

10. Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. The

mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005; 52 (102):18769–18770. doi: 10.1073/pnas.0509776102

11. Picard M. Blood mitochondrial DNA copy number: What are we counting? Mitochondrion. 2021; 60:1–11. doi: 10.1016/j.mito.2021.06.010

12. Picard M, Juster RP, McEwen BS. Mitochondrial allostatic load puts the «gluc» back in glucocorticoids. Nature reviews. Endocrinology. 2014; 5 (10): 303–310. doi: 10.1038/nrendo.2014.22

13. Picard M, McEwen BS. Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review. Psychosomatic medicine. 2018; 2 (80): 141. doi: 10.1097/PSY.0000000000000545

14. Ridout KK, Khan M, Ridout SJ. Adverse Childhood Experiences Run Deep: Toxic Early Life Stress, Telomeres, and Mitochondrial DNA Copy Number, the Biological Markers of Cumulative Stress. BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2018; 9 (40): e1800077. doi: 10.1002/bies.201800077

15. Tyrka AR, Parade SH, Price LH, et al. Alterations of Mitochondrial DNA Copy Number and Telomere Length with Early Adversity and Psychopathology. Biological psychiatry. 2016; 2 (79): 78. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.025

16. Wang L, Lv H, 1, Ji P, et al. Mitochondrial DNA copy number is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma in Chinese population. Cancer Medicine. 2018; 6 (7): 2776. doi: 10.1002/cam4.1452

17. Zhang L, Zhou R, Li X et al. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. Medical hypotheses. 2006; 6 (66): 1205–1208. doi: 10.1016/j.mehy.2005.11.041

18. Zhang R, Wang Y, Ye K et al. Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. BMC Genomics. 2017; 1 (18): 890. doi: 10.1186/s12864-017-4287-0

19. Zhao H, Chang D, Ye Y. Associations of blood mitochondrial DNA copy number with social-demographics and cancer risk: results from the Mano-A-Mano Mexican American Cohort. Oncotarget. 2018; № 39 (9): 25491. doi: 10.18632/oncotarget.25321

20. Ziada AS, Smith MSR, Côté HCF. Updating the Free Radical Theory of Aging. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2020; 8: 908. doi: 10.3389/fcell.2020.575645

21. Mustafin RN, Khusnutdinova EK, Kazantseva AV et al. Epigenetics of aggressive behavior. Russian Journal of Genetics. 2019; 55 (9):1051–1060. doi: 10.1134/S0016675819090091

Е.В. Тапьев, А.Ю. Асанов, О.И. Симонова, А.Л. Сухомясова, К.К. Павлова, И.Ю. Чебеляев ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ МУТАЦИИ Z ГЕНА *PI* У ПАЦИЕНТОВ С ДЕФИЦИТОМ АЛЬФА-1 АНТИТРИПСИНА

DOI 10.25789/YMJ.2022.78.04

УДК 61:575

В статье предложен простой метод выявления одной из наиболее частых мутаций PiZ, ассоциированных с дефицитом альфа-1 анти-трипсина, с использованием технологии полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Приоритетное исключение мутации PiZ как наиболее значимой может позволить ускорить диагностику и сделать её более доступной для практического здравоохранения.

Ключевые слова: SERPINA1, дефицит альфа-1-антитрипсина, ПЦР реального времени.

The aim of this study is to develop a method for diagnosing PiZ mutation associated with alpha-1 antitrypsin deficiency using real-time PCR technology.

A simple method is proposed for detecting one of the most frequent mutations of the *Pi* gene PiZ associated with alpha-1 antitrypsin deficiency. Priority exclusion of the PiZ mutation as the most significant one may provide rapid diagnosis and make it more accessible to practical healthcare.

Keywords: SERPINA1, alpha-1-antitrypsin deficiency, real-time PCR.

ТАПЬЕВ Евгений Викторович – врач-лаборант-генетик ГАУ РС(Я) «Республиканская больница №1-Национальный центр медицины» (РБ№1-НЦМ), genetika@inbox.ru; **АСАНОВ Алий Юрьевич** – д.м.н., проф. ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; **СИМОНОВА Ольга Игоревна** – д.м.н., гл.н.с., врач-педиатр ФГАОУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России; **СУХОМЯСОВА Айталиа Лукична** – к.м.н., зав. Медико-генетическим центром РБ№1-НЦМ; **ПАВЛОВА Юнна Константиновна** – к.м.н., врач-лаборант-генетик РБ№1-НЦМ; **ЧЕБЕЛЯЕВ Игорь Юрьевич** – к.м.н., доцент Первого МГМУ им. И. М. Сеченова.

Введение. Целью данного исследования является разработка метода диагностики мутации PiZ, ассоциированной с дефицитом альфа-1 анти-трипсина (ААТ), с использованием технологии полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Дефицит альфа-1 анти-трипсина (ААТД) является наследственным заболеванием, ассоциированным с рядом мутаций в гене протеазного ингибитора *Pi*. Ген, контролирующий структуру ААТ – SERPINA1, располагается на длинном плече хромосомы

14 (14q31-32.2), содержит 7 экзонов (четыре кодирующих (2-4 и 5) и три некодирующих (1a, 1b, 1c)), для которых известно более 200 [1] аллельных вариантов, наследующихся по ауто-сомно-кодминантному типу (OMIM 107400).

Обозначение аллелей гена *Pi* осуществляется буквами латинского алфавита от A до Z в зависимости от положения продукта в геле при электрофорезе. Наиболее частыми вариантами аллелей являются аллели PiM, при которых