

doi 10.18699/vjgb-25-74

Редкие миссенс-замены в генах митохондриальной ДНК у пациентов с желудочковыми тахикардиями

М.В. Голубенко , Н.П. Бабушкина , В.А. Корепанов , Н.Р. Валиахметов , Т.А. Атабеков ,
К.Н. Витт , А.А. Зарубин , О.А. Макеева , С.А. Афанасьев , Р.Е. Баталов , А.А. Гарганеева ,
М.С. Назаренко , В.П. Пузырёв 

¹ Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

² Научно-исследовательский институт кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

 maria-golubenko@medgenetics.ru

Аннотация. Митохондриальная ДНК (мтДНК) характеризуется высоким полиморфизмом в популяциях. При этом некоторые патогенные варианты мтДНК могут приводить к развитию наследственных митохондриальных синдромов, симптоматика которых включает в том числе нарушения ритма сердца. С другой стороны, жизнеугрожающие аритмии в виде желудочковой тахикардии являются фактором риска внезапной смерти у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Целью работы стало исследование редких («приватных») миссенс-замен в мтДНК пациентов с зарегистрированными эпизодами желудочковой тахикардии в анамнезе в сравнении с пациентами с ишемической болезнью сердца без жизнеугрожающих нарушений ритма и индивидами без клинических проявлений сердечно-сосудистых заболеваний. Определение последовательности мтДНК проводили с помощью методов высокопроизводительного секвенирования, для оценки эффекта миссенс-замен использовали специализированные алгоритмы-предикторы эффекта генных вариантов. Сравнительный анализ спектра выявленных аминокислотных замен в исследованных группах показал, что во всех трех группах около 40 % индивидов были носителями «приватных» миссенс-вариантов в мтДНК, однако среди них в группе пациентов с нарушениями сердечного ритма чаще встречались варианты, классифицируемые предиктором APOGEE2 как «варианты неопределенного значения» (VUS), по сравнению с контрольной группой, в которой «приватных» миссенс-замен категории VUS не обнаружено ($p = 0.0063$ для точного критерия Фишера). Кроме того, группы различались по значениям rhrd -ранжированных значений CADD (Combined Annotation Dependent Depletion), которые были ниже для индивидов из контрольной группы. Полученные результаты указывают на то, что редкие варианты мтДНК могут вносить вклад в предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям, в частности в риск развития желудочковой тахикардии у некоторых пациентов.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК; аритмия; желудочковая тахикардия; эффект миссенс-замен; оценка патогенности генетических вариантов

Для цитирования: Голубенко М.В., Бабушкина Н.П., Корепанов В.А., Валиахметов Н.Р., Атабеков Т.А., Витт К.Н., Зарубин А.А., Макеева О.А., Афанасьев С.А., Баталов Р.Е., Гарганеева А.А., Назаренко М.С., Пузырёв В.П. Редкие миссенс-замены в генах митохондриальной ДНК у пациентов с желудочковыми тахикардиями. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(5):676-684. doi 10.18699/vjgb-25-74

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 24-24-00527.

Rare missense substitutions in the mitochondrial DNA genes in patients with ventricular tachycardia

M.V. Golubenko , N.P. Babushkina , V.A. Korepanov , N.R. Valiakhmetov , T.A. Atabekov ,
K.N. Vitt , A.A. Zarubin , O.A. Makeeva , S.A. Afanasiev , R.E. Batalov , A.A. Garganeeva ,
M.S. Nazarenko , V.P. Puzyrev 

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

 maria-golubenko@medgenetics.ru

Abstract. Human mitochondrial DNA (mtDNA) exhibits high population-level polymorphism. While certain pathogenic mtDNA variants are known to cause hereditary mitochondrial syndromes, often presenting with cardiac arrhythmias, life-threatening ventricular tachycardia (VT) itself is a major risk factor for sudden death in cardiovascular diseases.

The aim of the work was to study rare ("private") missense substitutions in the mtDNA of patients with documented episodes of ventricular tachycardia in comparison with patients with ischemic heart disease without life-threatening heart arrhythmias and individuals without clinical manifestations of cardiovascular diseases. The sequencing of mtDNA was performed using high-throughput sequencing methods. Specialized algorithms predicting the effect of gene variants were used to assess the effect of missense substitutions. Comparative analysis of the spectrum of the identified amino acid substitutions in the studied groups showed that about 40 % of the individuals in all three groups were carriers of "private" missense variants in mtDNA. However, among such substitutions, the variants classified by the APOGEE2 predictor as "variants of uncertain significance" (VUS) were more common in the group of patients with heart arrhythmias than in the control group, where "private" missense substitutions of the VUS category were not detected ($p = 0.0063$ for Fisher's exact test). In addition, the groups differed in their phred-ranked Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) scores, which were lower for individuals in the control group. The results indicate that rare mtDNA variants may contribute to predisposition to cardiovascular disease – in particular, to the risk of developing ventricular tachycardia by some patients.

Key words: mitochondrial DNA; heart arrhythmia; ventricular tachycardia; missense substitutions effects; genetic variant pathogenicity assessment

For citation: Golubenko M.V., Babushkina N.P., Korepanov V.A., Valiakhmetov N.R., Atabekov T.A., Vitt K.N., Zarubin A.A., Makeeva O.A., Afanasiev S.A., Batalov R.E., Garganeeva A.A., Nazarenko M.S., Puzyrev V.P. Rare missense substitutions in the mitochondrial DNA genes in patients with ventricular tachycardia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(5):676-684. doi 10.18699/vjgb-25-74

Введение

Митохондриальная ДНК (мтДНК) человека отличается высокой степенью полиморфизма, соответственно, полиморфными являются и белки, кодируемые митохондриальными генами. Вместе с тем эти белки выполняют ключевую функцию в энергетическом метаболизме, входя в состав комплексов дыхательной цепи митохондрий. В условиях постоянного роста численности популяции, что характерно для человеческого вида, увеличивается число редких, так называемых частных генетических вариантов (Gao, Keinan, 2014), повышается вероятность сохранения в популяции вновь возникающих генных вариантов (в том числе миссенс-замен мтДНК), даже если они обладают слабым отрицательным эффектом. Такие варианты не достаточны для того, чтобы вызвать тяжелое наследственное заболевание, но они могут повышать риск развития многофакторных заболеваний.

Миокард – одна из самых энергозатратных тканей организма. В основе большинства заболеваний сердечно-сосудистого континуума лежит ишемия миокарда, для которой характерны гипоксия, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс (Kibel et al., 2020; Severino et al., 2020; Yang et al., 2022). В свою очередь, митохондриальная дисфункция может иметь аритмогенный эффект как за счет снижения синтеза АТФ, так и через окислительный стресс и усиление деполяризации клеточных мембран (Montaigne, Pentiah, 2015; Gambardella et al., 2017; van Orbergen et al., 2019). При митохондриальных заболеваниях, обусловленных патогенными мутациями мтДНК или ядерных генов, участвующих в обеспечении функции митохондрий, часто регистрируются нарушения ритма сердца (Ng, Turnbull, 2016). С другой стороны, тяжелые нарушения ритма сердца (НРС), в частности пароксизмальные желудочковые тахикардии, связаны с высоким риском внезапной сердечной смерти (Koplan, Stevenson, 2009; Chao et al., 2017), поэтому выявление наследственных факторов риска для этих состояний – актуальная задача.

Поиск вариантов мтДНК, связанных с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, раньше был сосредото-

чен на анализе ассоциаций с частыми популяционными вариантами и/или их сочетаниями (гаплогруппами) (Palacín et al., 2011; Hudson et al., 2014; Голубенко и др., 2015, 2021; Kytövuori et al., 2020; Roselló-Díez et al., 2021). С развитием технологий секвенирования стало возможным изучать полную последовательность митохондриального генома, и роль редких вариантов мтДНК в развитии заболеваний все чаще является предметом исследования (Govindaraj et al., 2014, 2019; Hagen et al., 2015; Piotrowska-Nowak et al., 2019).

Целью данной работы стало изучение миссенс-полиморфизма мтДНК у пациентов с желудочковыми тахикардиями в сравнении с пациентами без желудочковых тахикардий и относительно здоровыми индивидами.

Материалы и методы

Лица, включенные в настоящее исследование, были распределены по трем группам. Основная группа была сформирована из пациентов, госпитализированных в отделение хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции НИИ кардиологии Томского НИМЦ. Всем пациентам данной группы была проведена плановая операция по имплантации кардиовертера-дефибриллятора (ИКД) по поводу желудочковой тахикардии (ЖТ) в анамнезе в качестве первичной или вторичной профилактики внезапной сердечной смерти (Бокерия и др., 2017). Общая численность группы составила 127 человек. Для всех пациентов были собраны и проанализированы анамнез, истории болезни, проведены необходимые диагностические исследования. Пациентов с тяжелой сопутствующей патологией (онкологические заболевания, хроническая сердечная недостаточность IV функционального класса по NYHA, хроническая болезнь почек IV–V стадий) в исследование не включали. В выборке преобладали мужчины (74.8 %), средний возраст был 64.0 (59.0; 71.0) года.

Группу сравнения составили пациенты со стабильным течением ишемической болезни сердца: без инфаркта миокарда в анамнезе, без ЖТ в анамнезе и без показаний

Таблица 1. Клинико-демографические характеристики исследованных групп пациентов

Показатель	Основная группа (n = 127)	Группа сравнения (n = 53)	p
Демографические характеристики			
Возраст, лет, Ме (Q ₁ ; Q ₃)	64.0 (59.0; 71.0)	67.0 (63.5; 71.5)	0.08420
Мужчины, n (%)	95 (76.7)	23 (43.4)	0.00005
Женщины, n (%)	32 (23.3)	30 (56.6)	0.00005
Клинические характеристики и сопутствующие заболевания			
ИБС, n (%)	102 (80.3)	53 (100)	< 0.001
Инфаркт миокарда, n (%)	72 (56.7)	0	< 0.001
Гипертоническая болезнь, n (%)	118 (92.9)	53 (100)	0.046772
Дислипидемия, n (%)	91 (71.7)	30 (56.6)	0.049927
Ожирение, n (%)	79 (62.2)	32 (60.4)	0.818220
Сахарный диабет 2-го типа, n (%)	25 (19.7)	6 (11.3)	0.017902
Нарушение толерантности к глюкозе, n (%)	10 (7.9)	3 (5.7)	0.601015
Индекс массы тела, кг/м ² , Ме (Q ₁ ; Q ₃)	28.4 (25.6; 32.1)	29.6 (26.2; 33.8)	0.072343

Примечание. p – уровень значимости при сравнении групп с помощью критерия χ^2 Пирсона (для частот) или критерия Манна–Уитни (для количественных признаков).

к имплантации ИКД. Численность этой группы была 53 человека. Средний возраст в группе сравнения 67.0 (63.0; 71.0) лет. Характеристика обследованных пациентов приведена в табл. 1.

Кроме двух групп пациентов, была сформирована контрольная группа, которую составили жители г. Томска, не имевшие симптомов сердечно-сосудистых заболеваний в анамнезе, в том числе эпизодов нарушения сердечного ритма. В группу были включены индивиды, у которых, по результатам УЗИ, стеноз просвета сонных артерий отсутствовал или не превышал 30 %. Численность этой группы была 58 человек. Медианное значение возраста в этой выборке – 69.0 (62.0; 73.0) лет, соотношение мужчин и женщин 40:28 (69 % мужчин).

От всех лиц, включенных в рассматриваемые выборки, получено информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен комитетами по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики и НИИ кардиологии Томского НИМЦ.

От каждого пациента получен образец венозной крови в объеме 6–10 мл (в пробирке с консервантом ЭДТА), из которой затем было проведено выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции.

Полную последовательность митохондриального генома пациентов определяли методом массового параллельного секвенирования (секвенирование следующего поколения, NGS). Для этого мтДНК амплифицировали с помощью ПЦР длинных фрагментов (Long range PCR). Для каждого образца ДНК проводили две реакции ПЦР в отдельных пробирках, используя праймеры, специфичные для митохондриального генома, которые позволяют получить два ПЦР-продукта, полностью перекрывающих мтДНК: 1) длиной 9065 п. н. (последовательности праймеров соответствуют позициям 9397-9416 и 1892-1873 референсной последовательности мтДНК человека)

и 2) длиной 11 170 п. н. (позиции праймеров 15195-15214 и 9796-9777). Таким образом, полученные ПЦР-продукты перекрывались друг с другом в областях 9397-9796 и 15195-1873.

ПЦР длинных фрагментов осуществляли с помощью набора реактивов «БиоМастер LR HS-ПЦР (2х)» («Биолабмикс», Новосибирск). Концентрацию ПЦР-продуктов определяли на приборе Qubit (Thermo Fisher Scientific, США), используя реактивы для измерения концентрации ДНК Spectra Q BR (Raissol, Россия). Затем два ПЦР-продукта для каждого индивида смешивали в эквимоллярных количествах до концентрации ДНК 20 нг/мкл. ДНК-библиотеки готовили с применением наборов реактивов для приготовления ДНК-библиотек, предназначенных для работы с геномной ДНК. Для этого использовали наборы DNA Prep (Illumina, США) и наборы SG GM Plus (Raissol), с помощью двойного индексирования. При приготовлении ДНК-библиотек следовали протоколу производителя.

Секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США), набор реагентов MiSeq reagent v.2 kit 300 циклов, а также на секвенаторе GenoLab M (GeneMind, Китай), набор реагентов GenoLab M V2.0 FCM, 150 циклов.

После демультиплексирования данных нуклеотидные прочтения в формате fastq выравнивали на референсную последовательность генома человека (hg38) с использованием программного обеспечения DRAGEN 3.9.5, DNA pipeline (Illumina, США). Полученные файлы формата bam анализировали с помощью специализированного для мтДНК программного обеспечения MtDNA-Server 2 (Weissensteiner et al., 2024). В результате получали перечень нуклеотидных замен по сравнению с референсной последовательностью мтДНК человека (Andrews et al., 1999) и оценку принадлежности выявленного гаплотипа к гаплогруппе мтДНК, согласно общепринятой классификации (van Oven, Kayser, 2008). Последовательности

мтДНК в формате *.fasta или *.txt анализировали также с помощью программы mtPhyl (Eltsov, Volodko, 2011), которая позволяет построить филогению анализируемых последовательностей и получить перечень миссенс-замен, характерных для гаплогрупп мтДНК, «приватных» аминокислотных замен, а также рассчитать индекс консервативности аминокислот.

Для классификации эффекта миссенс-замен в генах мтДНК использовали оценки метапредикторов: APOGEE 2, который был разработан специально для митохондриальной ДНК (Bianco et al., 2023), и CADD (Rentzsch et al., 2021). Результаты этих и других алгоритмов оценки миссенс-замен мтДНК доступны онлайн по адресу проекта MitImpact: <http://bioinformatics.css-mendel.it/> (Castellana et al., 2015). Статистические расчеты выполняли в программе JASP 0.19.3 (JASP Team, 2024).

Результаты

Результаты секвенирования мтДНК продемонстрировали высокое разнообразие митохондриального генома в исследованных выборках: почти все индивиды обладали уникальными гаплотипами мтДНК. Только два гаплотипа встретились дважды (в основной группе пациентов). Распределение наиболее частых гаплогрупп мтДНК в выборках было следующим: частота гаплогруппы Н составила в основной группе, группе сравнения и контрольной группе 34, 34 и 41 % соответственно; частота гаплогруппы J – 8, 9 и 14 %, частота гаплогруппы Т – 12, 9 и 3 %; частота гаплогруппы U – 30, 34 и 34 %. В популяции г. Томска частоты этих гаплогрупп составляют 39 % (Н), 7 % (J), 10 % (Т) и 25 % (U) (Голубенко и др., 2021). Несмотря на тенденцию к снижению частоте гаплогруппы Т и повышенной частоте гаплогруппы J в контрольной группе, а также к повышенной частоте гаплогруппы U в контрольной группе и у пациентов группы сравнения, эти различия не были статистически значимыми.

У пациентов основной группы выявлен 61 «приватный» миссенс-вариант, в то время как 85 различных миссенс-вариантов были ассоциированы с гаплогруппами (табл. 2). Всего в основной группе пациентов 50 человек (39 % от всей группы) имели в своей мтДНК «приватные» миссенс-замены, в том числе 7 человек имели по два «приватных»

миссенс-варианта, а 2 человека – три варианта. В группе сравнения обнаружено 28 «приватных» миссенс-замен по сравнению с 45 миссенс-вариантами, ассоциированными с гаплогруппами. Эти 28 замен зарегистрированы у 23 человек (43 % выборки), в том числе 5 человек имели по два варианта. В контрольной группе найдено 35 «приватных» миссенс-замен у 23 человек (40 % выборки), при этом 8 человек имели одновременно два «приватных» миссенс-варианта и 2 человека – три «приватных» миссенс-варианта.

Выполнение теста на нейтральность по J.L. Elson с коллегами (2004) не выявило статистически значимых отклонений отношения числа синонимичных и несинонимичных замен в изучаемых выборках от ожидаемого при отсутствии отбора. Также не было показано статистически значимых различий между «приватными» и гаплогрупп-ассоциированными заменами по среднему значению индекса консервативности аминокислот.

Метапредиктор APOGEE2 классифицирует миссенс-варианты в соответствии с принятой в настоящее время системой выделения пяти классов патогенности для генетических вариантов: «доброкачественные», «вероятно доброкачественные», «варианты неопределенного значения» (variant of uncertain significance, VUS), «вероятно патогенные» и «патогенные» (McCormick et al., 2020). В качестве VUS рассматриваются варианты со значением APOGEE2 score в диапазоне 0.265–0.716; при более высоких значениях варианты относятся к категории вероятно патогенных или патогенных, при более низких значениях – к категории вероятно доброкачественных или доброкачественных (Bianco et al., 2023). Согласно этим оценкам, ни один «приватный» миссенс-вариант в изученных нами выборках не может быть отнесен к категориям «патогенный» и «вероятно патогенный». В основной группе пациентов 11 «приватных» миссенс-вариантов (18 % от всех приватных миссенс-замен) были классифицированы как VUS, в группе сравнения – три варианта (10.7 % от всех приватных миссенс-замен в этой группе), а в контрольной группе вариантов категории VUS не выявлено (см. табл. 2). Таким образом, наблюдается накопление недоброкачественных «приватных» миссенс-вариантов мтДНК в основной группе ($p = 0.0063$ для точного критерия Фи-

Таблица 2. Характеристика миссенс-полиморфизма мтДНК у пациентов в исследованных выборках

Показатель	Группа		
	основная (n = 127)	сравнения (n = 53)	контрольная (n = 58)
Общее число «приватных» миссенс-вариантов, n	61	28	35
Общее число неприватных (ассоциированных с гаплогруппами) миссенс-вариантов, n	75	40	37
Среднее значение индекса консервативности для «приватных» миссенс-вариантов, % (по MtPhyl)	49.54	49.82	52.98
Число «приватных» миссенс-вариантов, классифицированных как VUS (доля VUS от всех «приватных» миссенс-вариантов), n (%)	11 (18.0)	3 (10.7)	0 (0)
Число индивидов с «приватными» миссенс-вариантами, n (%)	50 (39.4)	23 (43.4)	23 (39.7)

Примечание. VUS (variant of uncertain significance) – вариант неопределенного значения.

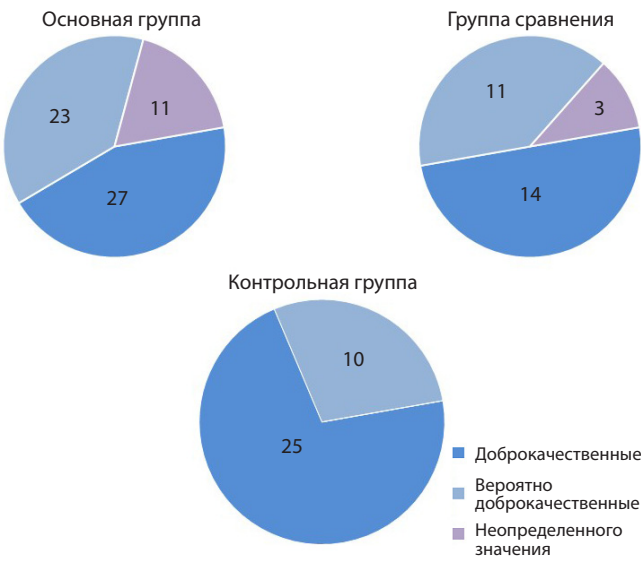


Рис. 1. Различные классы патогенности «приватных» миссенс-вариантов мтДНК в исследованных группах (цифрами указано число вариантов в соответствующей категории).

шера при сравнении с контрольной группой). Различия между пациентами группы сравнения и контрольной группой, а также между двумя группами пациентов не были статистически значимыми. Соотношение числа «приватных» вариантов различных категорий в исследованных группах приведено на рис. 1.

Перечень обнаруженных миссенс-замен, которые были отнесены к категории VUS, представлен в табл. 3. Примечательно, что два варианта, T3394C и G13708A, были «приватными» для обследованных пациентов, однако они

присутствуют на родословном древе мтДНК человека в составе нескольких гаплогрупп, в частности G13708A – в гаплогруппе J. Следует также отметить, что один из выявленных «приватных» вариантов приводил не к замене одной аминокислоты на другую, а к замене стоп-кодона в гене *ATP6* на кодон для глутамина. Для таких вариантов программа APOGEE2 не дает оценки эффекта, но этот вариант классифицирован как VUS в базе данных ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/693124/>, дата обращения 24.02.2025). Еще один подобный вариант, замена стоп-кодона на кодон для лизина (A7444G, *MT-COI* Ter514Lys), ассоциирован с гаплогруппой V7, и так же, как и первый, был обнаружен в основной группе. Ранее этот вариант считался патогенным (так как изменяет длину белка), однако сейчас, согласно данным ресурса ClinVar, он отнесен к категории «вероятно доброкачественный» по итогам рассмотрения экспертами (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/9663/>, дата обращения 24.02.2025).

Из всех идентифицированных VUS 50 % расположено в генах, кодирующих субъединицы первого комплекса дыхательной цепи (NADH-дегидрогеназы), что согласуется с общей длиной этих генов, занимающих 65 % от суммарной длины всех белок-кодирующих генов мтДНК. Интересно, однако, что все три VUS, обнаруженные среди пациентов группы сравнения, располагались не в генах NADH-дегидрогеназы, а в гене цитохрома *b* (два варианта) и цитохром *c*-оксидазы (один вариант). Также можно отметить, что выявленные VUS связаны с различными гаплогруппами мтДНК, среди которых можно выделить значительную долю (36 %) принадлежащих к гаплогруппе U (U5a2a1b, U5a1b, K1, K1b1, U5a1), также 36 % относились к кластеру R2*JT (J1b1a1, T, J1a1v1, R2, T1a), в то время как с самой частой у европейцев гаплогруппой H (около 40 % в популяции) ассоциировано всего три VUS

Таблица 3. «Приватные» миссенс-замены мтДНК, классифицированные как VUS (APOGEE2)

№ п/п	Замена в мтДНК	Ген	Замена аминокислоты	APOGEE2 score	Группа пациентов	Гаплогруппа пациента
1	T3394C	MT-ND1	Y30H	0.5822	Основная группа	J1b1a1
2	C6489A	MT-CO1	L196I	0.3289		T
3	G6510A	MT-CO1	A203T	0.2836	Группа сравнения	H6a1a
4	C8369T	MT-ATP8	P2S	0.2767	Основная группа	U5a2a1b
5	T9205C	MT-ATP6	227Q	–		J1a1b1
6	G9738A	MT-CO3	A178T	0.3554		R2
7	T10237C	MT-ND3	I60T	0.6661		HV
8	G11696A	MT-ND4	V313I	0.3383		K1
9	T12075C	MT-ND4	M439T	0.3560		U5a1b
10	C13036T	MT-ND5	P234S	0.4992		K1b1
11	G13708A	MT-ND5	A458T	0.3070		T1a
12	T14291A	MT-ND6	E128V	0.4046	Группа сравнения	H36
13	A14841G	MT-CYTB	N32S	0.2743		H1j8
14	G15152A	MT-CYTB	G136S	0.2924		U5a1

(H6a1a, H36, H1j8), т.е. 21 %. Можно предположить, что появление VUS на фоне гаплогруппы R2'JT может быть фактором риска развития НРС, в том числе ЖТ, но общее число найденных нами VUS очень мало для выполнения каких-либо статистических тестов, поэтому этот вопрос требует проведения дополнительных исследований.

Классификация вариантов по классам патогенности является «категориальной», но она опирается в том числе на количественные шкалы оценки эффекта. Один из таких показателей – CADD (combined annotation dependent depletion) – интегральная метрика, основанная на машинном обучении, для расчета которой используется более 60 инструментов аннотирования всех возможных генетических вариантов, с последующим расчетом вероятности их появления в геноме и ранжированием всех возможных вариантов согласно этой вероятности. Логарифм данной оценки (phred-подобное ранжирование) используется для идентификации наименее «вероятных» в геноме вариантов, которые, следовательно, являются вариантами с наибольшим эффектом. Согласно рекомендации разработчиков, минимальное (пороговое) значение phred-оценки CADD, при котором есть вероятность функциональной значимости варианта, – 10; это означает, что вариант входит в 10 % наиболее значимых из всех теоретически возможных вариантов генома (Rentzsch et al., 2021).

Распределение значений phred-оценки CADD для всех «приватных» миссенс-вариантов приведено на рис. 2. Во всех группах встречались миссенс-замены со значением этого показателя больше 10, однако в контрольной группе только 26.6 % «приватных» миссенс-замен находились в этой зоне, и медианное значение этого параметра составило 8.3, тогда как в группах пациентов медианное значение было равно 13 (основная группа) и 13.2 (группа сравнения). Всего в основной группе 61.7 % приватных замен имели CADD phred больше 10, а в группе сравнения – 64.3 %. Эта дифференциация была статистически значима как по результатам дисперсионного анализа ($p = 0.014$), так и по непараметрическому критерию Краскела–Уоллиса ($p = 0.011$).

Обсуждение

В отличие от эволюционно «устоявшихся» комбинаций вариантов мтДНК, идентифицируемых как гаплогруппы, вновь возникающие варианты являются «приватными», т.е. присутствуют только у обследованного индивида и его ближайших родственников по материнской линии. Если численность популяции растет, то в ней имеет место избыток «приватных» генных вариантов (Gao, Keinan, 2014). Такие недавно возникшие варианты мтДНК могут иметь значение для фенотипа. Если вариант обладает сильным отрицательным влиянием на фенотип, то он может элиминироваться из популяции под действием отбора, однако если величина эффекта невелика, то вариант может сохраняться в популяции в течение многих поколений и даже распространяться в результате генетического дрейфа.

Оценка влияния миссенс-замены в гене на структуру и функцию кодируемого этим геном белка – актуальная проблема современной генетики. Несмотря на множество алгоритмов и предикторов, разработанных для оценки

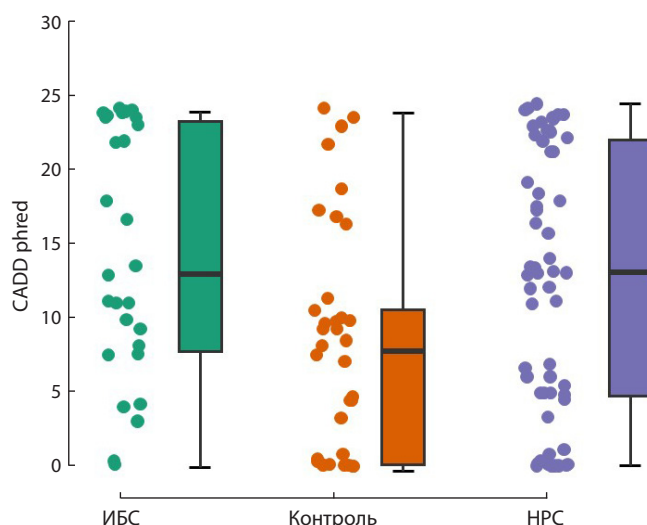


Рис. 2. Распределение значений phred CADD для «приватных» миссенс-замен в исследованных группах (ИБС – группа сравнения, НРС – основная группа).

данного эффекта *in silico*, результаты таких исследований не всегда соответствуют истинному эффекту конкретных миссенс-замен. Отчасти это связано с недостаточным объемом экспериментальных данных о патогенности тех или иных вариантов, поскольку в этом отношении исследована лишь малая часть всех возможных аминокислотных замен, и экстраполяция этих закономерностей на весь массив данных не всегда корректна. Кроме того, свой вклад в варибельность эффекта может вносить эпистатическое взаимодействие аминокислотных остатков в одной или в разных белковых субъединицах, при котором наличие дополнительных замен аминокислот может компенсировать или усугублять эффект анализируемой замены.

APOGEE2 – метапредиктор, использует для своей оценки эволюционную консервативность; структурные характеристики белков, в том числе данные об их третичной структуре и изменение энергии Гиббса ($\Delta\Delta G$); оценки эффекта, полученные в различных программах-предикторах: PolyPhen2, SIFT, Fathmm, PROVEAN, MutationAssessor, EFIN, CADD, PANTHER, PhDSNP, SNAP, MutationTaster2 (Bianco et al., 2023). Этот инструмент имеет наибольшие значения чувствительности (87 %) и специфичности (90 %) по сравнению с другими предикторами.

Распределение значений количественного предиктора функциональной значимости вариантов (CADD) показало, что приватные миссенс-замены мтДНК в контрольной группе характеризовались в среднем более низкими значениями данного показателя, и эти различия статистически значимы. Так же, как и для доли VUS, две группы пациентов, основная и группа сравнения, не отличались друг от друга по средним значениям показателя CADD.

Сравнение доли вариантов с неопределенной значимостью (VUS) среди «приватных» миссенс-замен показало более высокую долю VUS у пациентов основной группы по сравнению с контрольной группой. В то же время миссенс-замены категории VUS зарегистрированы и у пациентов в группе сравнения, хотя значения APOGEE2 score

для них были минимальными (см. табл. 3). Отношение числа таких вариантов к общему числу «приватных» миссенс-замен в этой выборке (3/28, т.е. 10.7 %), хотя и ниже, чем в основной группе пациентов (11/61, т.е. 18 %), но эти различия статистически незначимы ($p > 0.05$ для точного критерия Фишера). Таким образом, высокая частота миссенс-замен категории VUS может быть связана не с риском развития НРС, а с предрасположенностью к сердечно-сосудистым заболеваниям в целом. В некоторых работах по исследованию мтДНК также выявлены редкие и «приватные» замены, в том числе миссенс-замены, которые можно отнести к VUS или даже к вероятно патогенным вариантам: например, у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией (Govindaraj et al., 2014; Hagen et al., 2015), с дилатационной кардиомиопатией (Govindaraj et al., 2019), с атеросклерозом (Piotrowska-Nowak et al., 2019).

Обращает на себя внимание факт, что два из выявленных вариантов, отнесенных к категории VUS, могут быть характерны для некоторых гаплогрупп мтДНК. Замена G13708A – одна из определяющих для гаплогруппы J, которая известна как фактор, усиливающий проявление патогенного варианта G11778A, вызывающего атрофию зрительного нерва Лебера в европейских популяциях (Torroni et al., 1997). Замена T3394C также усиливает проявление патогенного варианта G11778A, но в азиатских популяциях (Ji et al., 2019). Обе эти замены неоднократно встречаются в филогении мтДНК человека (www.phylotree.org). Примечательно, что в нашем исследовании у пациента с «приватной» заменой T3394C мтДНК принадлежала к гаплогруппе J, а именно J1b1a1 (см. табл. 3), т.е. имела также и замену G13708A. Таким образом, в данном случае у одного индивида присутствовали две миссенс-замены, каждая из которых – это неблагоприятный «фон», способствующий проявлению патогенных вариантов мтДНК. В связи с этим следует отметить, что, по данным литературы, аналогичные комбинации вариантов мтДНК обнаружены у пациентов с болезнью Паркинсона, у которых чаще, чем в контроле, были зарегистрированы в качестве «приватных» варианты, обычно ассоциированные с определенными гаплогруппами – так называемые out of place варианты (Müller-Nedebock et al., 2022). Атрофия зрительного нерва Лебера и болезнь Паркинсона не являются сердечно-сосудистыми заболеваниями, однако приведенные примеры могут отражать общие закономерности проявления эффекта вариантов мтДНК.

Отнесение генетического варианта к категории VUS не означает, что он обязательно имеет негативный эффект, это говорит лишь о более высокой вероятности того, что такой вариант как-то влияет на фенотип, что и обуславливает название «вариант с неопределенным значением». Тем не менее избыток таких вариантов в группе пациентов с жизнеугрожающими нарушениями ритма сердца (желудочковой тахикардией) и высоким риском внезапной смерти, выявленный в нашем исследовании, может говорить о том, что по крайней мере в некоторых случаях риск внезапной смерти может быть обусловлен наличием в геноме редких вариантов мтДНК с негативным эффектом, приводящим в результате к снижению эффективности работы митохонд-

рий. Можно предположить, что в нормальных условиях небольшие отклонения от оптимальной функции митохондриальных белков могут компенсироваться увеличением уровня экспрессии митохондриальных генов или числа митохондрий, а также активизацией или супрессией отдельных биохимических путей. Однако в условиях клеточного стресса такая «пограничная» митохондриальная дисфункция может становиться критической для развития патологии миокарда.

Вопрос о том, являются ли такие варианты фактором риска развития нарушений ритма сердца или же они в целом повышают риск сердечно-сосудистых заболеваний, требует дальнейших исследований на выборках пациентов с различными патологиями сердечно-сосудистой системы. Также для оценки влияния генетического фона на эффект редких миссенс-замен (возможное эпистатическое взаимодействие) необходимо увеличение выборки, так как приватные миссенс-варианты категории VUS обнаруживаются менее чем у 10 % пациентов. Кроме того, следует отметить, что в нашем исследовании не учитывалось такое явление, как гетероплазмия, при котором только часть молекул мтДНК имеет какой-либо вариант, который может быть как соматически возникшим *de novo* вариантом, так и унаследованным от матери. В связи с отсутствием возможности анализа ДНК родителей (матерей) мы не исследовали вероятность возникновения вариантов *de novo*. Все описанные нами варианты мтДНК были гомоплазмичными.

Заключение

В результате сравнительного анализа спектра редких («приватных») миссенс-замен в белковых генах мтДНК у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, главным образом в группе пациентов с жизнеугрожающими нарушениями сердечного ритма, выявлен ряд миссенс-замен, которые можно отнести к категории VUS, т.е. эти варианты, возможно, оказывают значимое влияние на функцию белков дыхательной цепи митохондрий. В контрольной группе индивидов без клинических симптомов со стороны сердечно-сосудистой системы подобных вариантов не обнаружено.

По общим характеристикам миссенс-полиморфизма мтДНК (общее число миссенс-замен, доля носителей приватных миссенс-замен в выборке, более одной приватной миссенс-замены у одного индивида, индекс консервативности аминокислот) рассматриваемые группы были схожи между собой. Однако различия в доле VUS среди всех «приватных» миссенс-вариантов выборки между основной группой (с желудочковой тахикардией в анамнезе и высоким риском внезапной смерти) и контрольной группой были статистически значимы. Кроме того, распределение значений количественного показателя, характеризующего вероятность функциональной значимости вариантов (CADD), различалось между группами. На основании полученных результатов можно говорить, что именно редкие миссенс-замены мтДНК могут иметь функциональное значение и вносить вклад в предрасположенность к заболеваниям сердечно-сосудистого континуума, в частности к развитию желудочковой тахикардии.

Список литературы / References

- Бокерия Л.А., Неминуший Н.М., Михайличенко С.И., Новичков С.А., Ачкасов Е.Е. Имплантируемые кардиовертеры-дефибрилляторы в профилактике внезапной сердечной смерти. *Терапевтический архив*. 2017;89(12):103-109. doi 10.17116/terarkh20178912103-109
- [Bockeria L.A., Neminushchiy N.M., Mikhaylichenko S.I., Novichkov S.A., Achkasov E.E. Implantable cardioverter defibrillators in the prevention of sudden cardiac death. *Terapevticheskiy Arkhiv = Therapeutic Archive*. 2017;89(12):103-109. doi 10.17116/terarkh20178912103-109 (in Russian)]
- Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Макеева О.А., Гончарова И.А., Кашталап В.В., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Ассоциации полиморфизма митохондриальной ДНК с инфарктом миокарда и прогностически значимыми признаками атеросклероза. *Молекулярная биология*. 2015;49(6):968-976. doi 10.7868/S0026898415050080
- [Golubenkov M.V., Salakhov R.R., Makeeva O.A., Goncharova I.A., Kshatalap V.V., Barbarash O.L., Puzirev V.P. Association of mitochondrial DNA polymorphism with myocardial infarction and prognostic signs for atherosclerosis. *Mol Biol*. 2015;49(6):867-874. doi 10.1134/S0026893315050088]
- Голубенко М.В., Шумакова Т.В., Макеева О.А., Тарасенко Н.В., Салахов Р.Р., Шипулин В.М., Назаренко М.С. Полиморфизм митохондриальной ДНК и ишемия миокарда: ассоциация гаплогруппы Н. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2021;36(4):70-77. doi 10.29001/2073-8552-2021-36-4-70-77
- [Golubenkov M.V., Shumakova T.V., Makeeva O.A., Tarasenko N.V., Salakhov R.R., Shipulin V.M., Nazarenko M.S. Mitochondrial DNA polymorphism and myocardial ischemia: association of haplogroup H with heart failure. *Sibirskiy Zhurnal Klinicheskoy i Eksperimental'noy Meditsiny = Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2021;36(4):70-77. doi 10.29001/2073-8552-2021-36-4-70-77 (in Russian)]
- Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowler R.N., Turnbull D.M., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*. 1999; 23(2):147. doi 10.1038/13779
- Bianco S.D., Parca L., Petrizelli F., Biagini T., Giovannetti A., Liorini N., Napoli A., ... Zhang S., Vescovi A.L., Wallace D.C., Caputo V., Mazza T. APOGEE 2: multi-layer machine-learning model for the interpretable prediction of mitochondrial missense variants. *Nat Commun*. 2023;14(1):5058. doi 10.1038/s41467-023-40797-7
- Castellana S., Rónai J., Mazza T. MitImpact: an exhaustive collection of pre-computed pathogenicity predictions of human mitochondrial non-synonymous variants. *Hum Mutat*. 2015;36(2):E2413-E2422. doi 10.1002/humu.22720
- Chao T.F., Liu C.J., Tuan T.C., Chen S.J., Chen T.J., Lip G.Y.H., Chen S.A. Risk and prediction of sudden cardiac death and ventricular arrhythmias for patients with atrial fibrillation – a nationwide cohort study. *Sci Rep*. 2017;7:46445. doi 10.1038/srep46445
- Elson J.L., Turnbull D.M., Howell N. Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection. *Am J Hum Genet*. 2004;74(2):229-238. doi 10.1086/381505
- Eltsov N., Volodko N. MtPhyl: Software tool for human mtDNA analysis and phylogeny reconstruction. Version 5.003. [Computer software]. 2011. <https://sites.google.com/site/mtphyl/home/>
- Gambardella J., Sorriento D., Ciccarelli M., Del Giudice C., Fiorde-lisi A., Napolitano L., Trimarco B., Iaccarino G., Santulli G. Functional role of mitochondrial DNA in arrhythmogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2017;982:191-202. doi 10.1007/978-3-319-55330-6_10
- Gao F., Keinan A. High burden of private mutations due to explosive human population growth and purifying selection. *BMC Genomics*. 2014;15(Suppl. 4):S3. doi 10.1186/1471-2164-15-S4-S3
- Govindaraj P., Khan N.A., Rani B., Rani D.S., Selvaraj P., Jyothi V., Bahl A., Narasimhan C., Rakshak D., Premkumar K., Khullar M., Thangaraj K. Mitochondrial DNA variations associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Mitochondrion*. 2014;16:65-72. doi 10.1016/j.mito.2013.10.006
- Govindaraj P., Rani B., Sundaravadeivel P., Vanniarajan A., Indumathi K.P., Khan N.A., Dhandapany P.S., ... Rakshak D., Rathinavel A., Premkumar K., Khullar M., Thangaraj K. Mitochondrial genome variations in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Mitochondrion*. 2019;48:51-59. doi 10.1016/j.mito.2019.03.003
- Hagen C.M., Aidt F.H., Havndrup O., Hedley P.L., Jensen M.K., Kanters J.K., Pham T.T., Bundgaard H., Christiansen M. Private mitochondrial DNA variants in danish patients with hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124540. doi 10.1371/journal.pone.0124540
- Hudson G., Gomez-Duran A., Wilson I.J., Chinnery P.F. Recent mitochondrial DNA mutations increase the risk of developing common late-onset human diseases. *PLoS Genet*. 2014;10(5):e1004369. doi 10.1371/journal.pgen.1004369
- JASP Team. Version 0.19.3. [Computer software]. 2024. Available: <https://jasp-stats.org/>
- Ji Y., Zhang J., Yu J., Wang Y., Lu Y., Liang M., Li Q., ... Zhu T., Mo J.Q., Huang T., Jiang P., Guan M.X. Contribution of mitochondrial ND1 3394T>C mutation to the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy. *Hum Mol Genet*. 2019;28(9):1515-1529. doi 10.1093/hmg/ddy450
- Kibel A., Lukinac A.M., Dambic V., Juric I., Selthofer-Relatic K. Oxidative stress in ischemic heart disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2020; 2020:6627144. doi 10.1155/2020/6627144
- Koplan B.A., Stevenson W.G. Ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(3):289-297. doi 10.4065/84.3.289
- Kytövuori L., Junttila J., Huikuri H., Keinänen-Kiukaanniemi S., Majamaa K., Martikainen M.H. Mitochondrial DNA variation in sudden cardiac death: a population-based study. *Int J Legal Med*. 2020;134(1):39-44. doi 10.1007/s00414-019-02091-4
- McCormick E.M., Lott M.T., Dulik M.C., Shen L., Attimonelli M., Vitale O., Karaa A., ... Zhang S., Procaccio V., Wallace D.C., Gai X., Falk M.J. Specifications of the ACMG/AMP standards and guidelines for mitochondrial DNA variant interpretation. *Hum Mutat*. 2020;41(12):2028-2057. doi 10.1002/humu.24107
- Montaigne D., Pentia A.D. Mitochondrial cardiomyopathy and related arrhythmias. *Card Electrophysiol Clin*. 2015;7(2):293-301. doi 10.1016/j.ccep.2015.03.008
- Müller-Nedebock A.C., Pfaff A.L., Pienaar I.S., Köks S., van der Westhuizen F.H., Elson J.L., Bardien S. Mitochondrial DNA variation in Parkinson's disease: Analysis of "out-of-place" population variants as a risk factor. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:921412. doi 10.3389/fnagi.2022.921412
- Ng Y.S., Turnbull D.M. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol*. 2016;263(1):179-191. doi 10.1007/s00415-015-7884-3
- Palacin M., Alvarez V., Martín M., Díaz M., Corao A.I., Alonso B., Díaz-Molina B., ... Cannata-Andía J., Batalla A., Ruiz-Ortega M., Martínez-Camblor P., Coto E. Mitochondrial DNA and TFAM gene variation in early-onset myocardial infarction: evidence for an association to haplogroup H. *Mitochondrion*. 2011;11(1):176-181. doi 10.1016/j.mito.2010.09.004
- Piotrowska-Nowak A., Elson J.L., Sobczyk-Kopciol A., Piwonska A., Puch-Walczak A., Drygas W., Ploski R., Bartnik E., Tonska K. New mtDNA association model, MutPred variant load, suggests individuals with multiple mildly deleterious mtDNA variants are more likely to suffer from atherosclerosis. *Front Genet*. 2019;9:702. doi 10.3389/fgene.2018.00702
- Rentzsch P., Schubach M., Shendure J., Kircher M. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med*. 2021;13(1):31. doi 10.1186/s13073-021-00835-9
- Roselló-Díez E., Hove-Madsen L., Pérez-Grijalba V., Muñoz-Guijosa C., Artigas V., Maria Padró J., Domínguez-Garrido E. Mitochondrial

- drial genetic effect on atrial fibrillation: a case-control study. *Mitochondrion*. 2021;56:15-24. doi 10.1016/j.mito.2020.11.007
- Severino P., D'Amato A., Pucci M., Infusino F., Birtolo L.I., Mariani M.V., Lavalle C., Maestrini V., Mancone M., Fedele F. Ischemic heart disease and heart failure: role of coronary ion channels. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9):3167. doi 10.3390/ijms21093167
- Torroni A., Petrozzi M., D'Urbano L., Sellitto D., Zeviani M., Carrara F., Carducci C., Leuzzi V., Carelli V., Barboni P., De Negri A., Scozzari R. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet*. 1997;60(5):1107-1121
- van Opbergen C.J.M., den Braven L., Delmar M., van Veen T.A.B. Mitochondrial dysfunction as substrate for arrhythmogenic cardiomyopathy: a search for new disease mechanisms. *Front Physiol*. 2019;10:1496. doi 10.3389/fphys.2019.01496
- van Oven M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat*. 2008;30(2):E386-E394. doi 10.1002/humu.20921
- Weissensteiner H., Forer L., Kronenberg F., Schönherr S. mtDNA-Server 2: advancing mitochondrial DNA analysis through highly parallelized data processing and interactive analytics. *Nucleic Acids Res*. 2024;52(W1):W102-W107. doi 10.1093/nar/gkae296
- Yang L., Wang S., Wu J., Ma L.L., Li Y., Tang H. Editorial: mitochondrial metabolism in ischemic heart disease. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:961580. doi 10.3389/fcvm.2022.961580

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 11.03.2025. После доработки 15.04.2025. Принята к публикации 30.05.2025.