

Анализ митохондриальной ДНК в нескольких поколениях одной семьи: значение для дифференциальной диагностики митохондриального заболевания

Н.А. Литвинова¹, В.С. Сухоруков^{1,2}, Н.С. Ардаширова², Д.Р. Ахмадуллина², Т.И. Баранич^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Analysis of mitochondrial DNA in several generations of the same family: implications for the differential diagnosis of mitochondrial disease

N.A. Litvinova¹, V.S. Sukhorukov^{1,2}, N.S. Ardashirova², D.R. Akhmadullina², T.I. Baranich^{1,2}

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia;

²Scientific Center of Neurology, Moscow, Russia

Митохондриальная недостаточность не всегда имеет яркие полисистемные проявления, клинически отражающие дисфункции этих органелл, ее диагностика сложна как с клинической, так и лабораторной точки зрения. В данном случае мы описываем семью со стертыми или неявными соответствующими клиническими проявлениями в 3 поколениях, полная геномная оценка митохондриальной ДНК у которых позволила выявить наследуемые патологические изменения. Такого рода результаты важны для понимания молекулярных процессов развития митохондриальных заболеваний и дальнейшей разработки специфической терапии.

Ключевые слова: дети, митохондриальная ДНК (мтДНК), митохондрии, митохондриальная энцефаломиопатия, гетероплазмия, нейродегенерация.

Для цитирования: Литвинова Н.А., Сухоруков В.С., Ардаширова Н.С., Ахмадуллина Д.Р., Баранич Т.И. Анализ митохондриальной ДНК в нескольких поколениях одной семьи: значение для дифференциальной диагностики митохондриального заболевания. Рос вестн перинатол и педиатр 2022; 67:(1): 108–111. DOI: 10.21508/1027-4065-2022-67-1-108-111

Mitochondrial insufficiency does not always have vivid polysystemic manifestations that clinically reflect the dysfunction of these organelles. Diagnosis can be difficult both from a clinical and laboratory point of view. In this case, the authors describe a family with erased or not obvious corresponding clinical manifestations in 3 generations. Complete genomic assessment of mitochondrial DNA gave enabled the authors to identify inherited pathological changes. These findings are very important for understanding the molecular processes of mitochondrial disease development and the further development of specific therapy.

Key words: children, mitochondrial DNA (mtDNA), mitochondria, mitochondrial encephalomyopathy, heteroplasmy, neurodegeneration.

For citation: Litvinova N.A., Sukhorukov V.S., Ardashirova N.S., Akhmadullina D.R., Baranich T.I. Analysis of mitochondrial DNA in several generations of the same family: meaning for the differential diagnosis of mitochondrial disease. Ros Vestn Perinatol i Peditr 2022; 67:(1): 108–111 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2022-67-1-108-111

Митохондрии как внутриклеточные органеллы занимают около четверти объема клетки и содержатся практически во всех эукариотических клетках, продуцируя клеточную энергию путем окислительного фосфорилирования и отвечая за множество других функций. Они содержат свой собственный геном: митохондриальную ДНК

(мтДНК), повреждения которого играют важную роль в развитии многих наследственно обусловленных заболеваний и особенностей метаболизма. Известно, что митохондриальный геном уникален и крайне вариателен. Часть вариантов мтДНК филогенетически развивалась по мере расселения человечества и закреплена наследованием на протяжении тысяч лет — эти полиморфизмы систематизированы в так называемые гаплогруппы [1]. Генные варианты мтДНК можно подразделить на четыре категории по сроку возникновения: 1) гаплогруппы — микроэволюционно закреплённые этноспецифические группы полиморфизмов мтДНК; 2) варианты, возникшие в недавних поколениях по материнской линии; 3) варианты *de novo*, появившиеся в яйцеклетке до или после оплодотворения; 4) соматические мутации [2]. К настоящему времени митохондриальный геном хорошо изучен, но распространенность патогенных вариаций мтДНК, гетероплазмии и их патогенный потенциал остаются недооценены, особенно в современном ожидании восстановления нормальной клеточной

© Коллектив авторов, 2022

Адрес для корреспонденции: Литвинова Наталья Александровна — науч. сотр. Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0000-0002-6672-7662

Сухоруков Владимир Сергеевич — д.м.н., проф. Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, зав. лабораторией нейроморфологии Научного центра неврологии, ORCID: 0000-0002-0552-6939

Баранич Татьяна Ивановна — к.м.н., доц. кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, ORCID: 0000-0002-8999-9986 117997 Москва, ул. Островитянова, д. 1

Ардаширова Наталья Сергеевна — асп. Научного центра неврологии, ORCID: 0000-0002-4813-9912

Ахмадуллина Дилара Робертовна — асп. Научного центра неврологии, ORCID: 0000-0001-6491-2891

125367 Москва, Волоколамское ш., д. 80

функции за счет трансплантации функционально жизнеспособных митохондрий.

В данной статье описана семья, в нескольких поколениях которой полное секвенирование мтДНК позволило объяснить имеющиеся признаки митохондриальной энцефалопатии. Об уникальности полученных данных свидетельствует практически полное отсутствие в научной литературе информации об особенностях митохондриальной ДНК у нескольких поколений одной семьи при таких заболеваниях.

Клинический случай. Пациентка (бабушка пробанда) Н., 1953 г.р., основное заболевание «митохондриальная энцефаломиопатия». Проходила обследование в ФГБНУ Научный центр неврологии в 2014 г. Жалобы при поступлении на общую слабость, головокружение, нарушение координации движений, онемение голеней и бедер (по наружной поверхности), эпизоды двоения в глазах, эпизоды заложенности уха, одышку, «перебои в сердце», судороги в мышцах голеней.

Анамнез заболевания: в возрасте 5 лет появились гиперкинезы рук и лица («гримасничанье»), был поставлен диагноз «ревматическая хорея». Гиперкинезы регрессировали спустя год. Примерно с этого же возраста отмечает утомляемость, плохую переносимость физических нагрузок, боли в мышцах голеней. На втором десятилетии жизни стали беспокоить частые интенсивные головные боли со рвотой. С 21 года — судороги в мышцах ног; с 48 лет отмечены инсультоподобные эпизоды с потерей сознания, сопровождающиеся головокружением, нарушением координации движений с преходящими парезами ног. В 2004 г. такой эпизод расценен как ишемический инсульт с картиной ишемического очага при магнитно-резонансной томографии головного мозга. В 2007 г. выполнена биопсия четырехглавой мышцы бедра, при которой выявлены морфологические и гистохимические признаки митохондриальной недостаточности. С этого времени принимает препараты митохондриальной группы с хорошим эффектом. Последняя госпитализация в 2009 г. Из обследования: лактат — норма; электроэнцефалограмма: билатерально-синхронная негрубая пароксизмальная активность в височно-лобных отделах (больше слева); акустические стволовые вызванные потенциалы — нарушение функции левого слухового нерва, нарушение функции слуховых структур на медулло-понтинном уровне; электромиография: на исследованном уровне данных, подтверждающих первично-мышечное поражение, нет; магнитно-резонансная томография головного мозга: без патологии; эхокардиография: размеры полостей сердца в норме, толщина миокарда левого желудочка в норме, локальных нарушений сократимости нет; электрокардиограмма: без патологических изменений. За последние годы отмечает учаще-

ние эпизодов головокружение, нарастание общей слабости, появление эпизодов двоения. L-лактат от 02.2014 г 6,2 ммоль/л, магнитно-резонансная томография головного мозга: единичные сосудистые очаги, вариант строения гипофиза (дифференцировать от микроаденомы). Пациентка принимает постоянно идебенон и другие препараты нейрометаболической группы курсами, а также кальций-D3-никомед форте 500 мг 2 раза в сутки; золедоновая кислота 5 мг внутривенно капельно 1 раз в год, на курс 6 вливаний в связи с непереносимостью пероральных бисфосфонатов.

Семейный анамнез. Мать пациентки страдала мигренеподобными головными болями, плохо переносила физические нагрузки. У пациентки (бабушка пробанда) есть сын (дядя пробанда) и дочь (мама пробанда), обоим поставлен диагноз «митохондриальная энцефаломиопатия». Сыну пациентки (дядя пробанда) 1988 г.р., в возрасте 8 лет было проведено исследование биоптата четырехглавой мышцы бедра в НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РФ, где он находился на обследовании с диагнозом «синдром Элерса—Данло, аутосомно-доминантный тип наследования, вероятнее всего, 3-го типа». По результатам биопсии поставлен диагноз «первичная митохондриальная недостаточность», позднее — «митохондриальная энцефаломиопатия». Дети сына пациентки (дядя пробанда) здоровы и не имеют проявлений или жалоб с неустановленным диагнозом.

У дочери пациентки (мама пробанда) 1977 г.р., в 1 год имелись насильственные гиперкинезы лицевой мускулатуры и рук; в 4 года развился тетрапарез, был диагностирован детский церебральный паралич; с 5 лет беспокоят сильнейшие диффузные головные боли. В развитии не отставала, училась на «отлично», но отмечала снижение оперативной памяти. До 12 лет страдала анурезом. В 14 лет был приступ психомоторного возбуждения с галлюцинациями. С 16 лет начала «пришлепывать» стопами, наблюдалось изменение походки. В 17 лет появились слабость и онемение стоп. В 22 года развился птоз век, купированный самостоятельно. В 1997 г. (20 лет) обратилась в НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РФ в связи с диагнозом брата, где был поставлен диагноз «синдром Элерса—Данло, аутосомно-доминантный тип наследования, вероятнее всего, 3-го типа», там же была выполнена биопсия четырехглавой мышцы бедра и по результату поставлен диагноз «первичная митохондриальная недостаточность», позднее — «митохондриальная энцефаломиопатия». Внук пациентки — сын дочери (пробанд), 2015 г.р., проходил обследование в Национальном медицинском исследовательском центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова в возрасте 3,5 года с диагнозом «синдром мышечной дистонии с элементами гипотонии», психоре-

ческое, интеллектуальное и моторное развитие соответствовало возрасту. В возрасте 5 лет у мальчика отмечали утомляемость, плохую переносимость физических нагрузок, при стандартном обследовании нарушений не выявлено.

Было проведено генетическое исследование мтДНК семьи в 3 поколениях: пациентка (бабушка пробанда) 67 лет, дочь пациентки (мама пробанда) 45 лет и внук пациентки (пробанд) 5 лет, в которой пациентка и ее дочь с основным заболеванием митохондриальная энцефаломиопатия. Исследование осуществлялось согласно принципам экспертного использования молекулярно-генетических индивидуализирующих систем для анализа митохондриальной ДНК человека методом NGS.

Результаты

При секвенировании митохондриальной ДНК пациентки (бабушка пробанда) были выявлены вариации гаплогруппы, а также гетероплазмия — 2G при 101-кратном прочтении, уровень составил 20,79%, 310insC при 328-кратном прочтении, уровень составил 68,16%, 16565insG при 160-кратном прочтении, уровень составил 20%. При секвенировании мтДНК дочери пациентки (мама пробанда) были выявлены вариации гаплогруппы, а также гетероплазмия — 2G при 124-кратном прочтении, уровень составил 20,16%, 310insC при 407-кратном прочтении, уровень составил 69,23%. При секвенировании мтДНК внука пациентки (пробанда) были выявлены вариации гаплогруппы и 16365T вариант, а также гетероплазмия: 4insGATC при 86-кратном прочтении, уровень составил 20,83%, 310insC при 303-кратном прочтении, уровень составил 66,58%. В таблице представлены вариативные данные мтДНК между родственниками по материнской линии.

Обсуждение

Варианты расхождения в мтДНК между родственниками не являются гаплогрупповыми (определяется группа HV0f) и в основном представлены в виде гетероплазмии: 1) у пациентки (бабушка пробанда) и ее дочери (мама пробанда) вариант 2G, который не описан ранее; представлен в одинаковой степени гетероплазмии; казалось бы, явно

наследуемый вариант, но у внука пациентки (пробанда) он не определяется; 2) через 2 сайта у внука пациентки (пробанда) выявлена индивидуальная гетероплазмия 4insGATC — вариант, не описанный ранее; 3) индивидуальный вариант внука пациентки (пробанда) 16365T, часто встречается в нормальных мтДНК человека, но является соматическим; 4) у пациентки (бабушка пробанда) вариант 16565 insG располагается в контрольном регионе (CR) и затрагивает всю область управления (включая 7S DNA D-петлю смещения), попадая также на место крепления мембраны (АТТ). Данный вариант не относится к гаплогрупповым и не описан ранее, в данной семье не наследуется, т.е. является соматической мутацией в мтДНК или переданся от предков пациентки (бабушка пробанда).

Указанные изменения произошли на участке мтДНК МТ-АТТ с 15925 по 499 нуклеотид, это место крепления мембраны, связанное с репликацией митохондриальной ДНК [3, 4]. Вариант может приводить к нарушению суперспирализации мтДНК или распутыванию взаимосвязанных молекул мтДНК после репликации мтДНК, что может приводить к дефектам функции митохондрий [5]. К.Е. Menger и соавт. (2021) [5] предположили, что степень упаковки мтДНК с помощью TFAM (транскрипционный фактор А, митохондриальный) регулирует активность транскрипции и репликации в митохондриях. Так как непонятно, каким образом происходит упаковка при увеличении митохондриальной ДНК-цепи в указанной локализации, то существует вероятность, что это и отражается на вышеуказанных активностях. Варианты малой гетероплазмии могут частично искажать суперспирализацию мтДНК или мешать распутыванию взаимосвязанных молекул мтДНК после их репликации, что может приводить к дефектам функции митохондрий и усугубляться в случае накопления гетероплазмии патогенных вариантов.

Заключение

При слабых клинических проявлениях митохондриальной недостаточности в дошкольном возрасте со стертым или неявным семейным анамнезом очень важно оценить мтДНК в разных поколениях (провести глубокое секвенирование мтДНК для выявления

Таблица. Вариативные данные мтДНК полученных результатов, между родственниками по материнской линии
Table. Variable mtDNA data obtained between maternal relatives

Позиция мтДНК	Референс	Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Гетероплазмия
2	A	G	G	0	+
4	C	0	0	ins GATC	+
16365	C	0	0	T	—
16565	C	insG	0	0	+

Примечание. Позиция мтДНК указывает на место расположение в гене. Референс — эталонная последовательность (rCRS) в GenBank NC_012920.1. Вариант 1 — данные пациентки (бабушка пробанда). Вариант 2 — дочь пациентки (мама пробанда). Вариант 3 — внук пациентки (пробанд). Гетероплазмия выявленная «+», невыявленная «—».

любых вариаций и низкого уровня гетероплазмий). Это, несомненно, может отразиться на будущем диагнозе пациента. Полученные данные могут быть

важны для создания таргетной терапии заболевания и внести вклад в изучение и понимание обеспечения долголетия на молекулярном уровне.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Литвинова Н.А., Сухоруков В.С., Николаева Е.А., Артемьева С.Б., Воронкова А.С., Шербо С.Н. Генетические вариации митохондриальной ДНК при отсутствии признаков гипоксической недостаточности. Медицинский алфавит 2018; 2(31): 45–49. [Litvinova N.A., Suhorukov V.S., Nikolaeva E.A., Artem'eva S.B., Voronkova A.S., Shherbo S.N. Genetic variations of mitochondrial DNA in absence of hypoxic deficiency signs. Meditsinskii alfavit 2018; 2(31): 45–49. (in Russ.)]
2. Сухоруков В.С., Воронкова А.С., Литвинова Н.А., Баранич Т.И., Иллариошкин С.Н. Роль индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК в патогенезе болезни Паркинсона. Генетика 2020; 56(4): 392–400. [Suhorukov V.S., Voronkova A.S., Litvinova N.A., Baranich T.I., Illarioshkin S.N. The Role of Mitochondrial DNA Individuality in the Parkinson's Disease Pathogenesis. Genetika 2020; 56(4): 392–400. (in Russ.)]
3. Albring M., Griffith J., Attardi G. Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74 (4): 1348–1352.
4. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 1981; 290 (5806): 457–465
5. Menger K.E., Rodríguez-Luis A., Chapman J., Nicholls T.J. Controlling the topology of mammalian mitochondrial DNA. Open Biol 2021;11(9):210168. DOI: 10.1098/rsob.210168

Поступила: 23.12.21

Received on: 2021.12.23

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-015-00009.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 19-015-00009.

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.