

Сазонова М.А.<sup>1,2</sup>

## Ассоциация мутаций митохондриального генома с липофиброзными бляшками интимы аорты человека

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Российская федерация, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

<sup>2</sup> — Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15 а

*Атеросклероз лежит в основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний, которые лидируют среди причин смерти людей в XXI веке. Одной из возможных причин атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека. С целью выявления мутаций, ассоциированных с атеросклерозом, нами был проведен анализ 42 митохондриальных мутаций, выявленных при различных патологиях. Объектом исследования были лица, погибшие в результате несчастного случая или внезапной смерти. Материалом исследования служили участки нормальной интимы и липофиброзные бляшки 7 аорт, ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. ПЦР-фрагменты ДНК, содержащие область исследуемых мутаций, были проанализированы оригинальным методом количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. Этот метод был разработан в нашей лаборатории на основе технологии пиросеквенирования. Статистическая обработка данных была проведена с помощью программы IBM SPSS Statistics 21.0 и методом бутстрэп-анализа. Из 42 исследованных мутаций сорок оказались гетероплазмичными, а две — гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе. Разработанный метод прямой количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома позволил обнаружить три новые мутации — 652delG, 961delC и 5132insAA. Выявлено, что 11 митохондриальных мутаций (652insG, T3336C, C3256T, G14459A, G14846A, G15059A, 652delG, A1555G, C5178A, G13513A и G12315A), принадлежащих восьми митохондриальным генам: рРНК 12S, тРНК — Leu (кодон узнавания UUR) и тРНК — Leu (кодон узнавания CUN), субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы; и цитохрома В, потенциально ассоциированы с атеросклерозом, т.к. от 29% (2 из 7 аорт) до 86% (6/7) исследованных аорт имеют значительную разницу в уровне гетероплазмы данных мутаций в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной интимой аорт.*

**Ключевые слова:** митохондриальный геном, мутация, уровень гетероплазмы, интимы, ген, аорта, липофиброзная бляшка, атеросклероз

Sazonova M.A.<sup>1,2</sup>

## Association of mitochondrial genome mutations with lipofibrous plaques in human aortic intima

<sup>1</sup> — FSBSI «Institute of General Pathology and Pathophysiology»,

8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, The Russian Federation, tel. +7 (499) 151-17-56, niiopp@mail.ru

<sup>2</sup> — FSBI « Russian Cardiology Research-and-Production Complex» Ministry Of Health products therefore,

15a, 3<sup>rd</sup> Cherepkovskaya street, Moscow, 121552, The Russian Federation, tel. +7 (499) 140-93-36, info@cardioweb.ru

*Atherosclerosis is a basis of development for many cardiovascular diseases, which are leading causes of death among people in the 21-st century. One of possible causes of atherosclerosis may be somatic mutations of human mitochondrial genome. In order to identify mutations associated with atherosclerosis, we analyzed 42 mitochondrial mutations found in various pathologies. The subject of the study were individuals who died as a result of an accident or a sudden death. The material for the investigation were segments of intima from 7 aortas both normal and with lipofibrous plaques. DNA was isolated by a method of phenol-chloroform extraction. PCR-fragments of DNA containing the region of investigated mutations were analyzed by an original method of quantitative assessment of mitochondrial genome mutant alleles. This method was developed in our laboratory on the basis of pyrosequencing technology. Statistical data processing was performed using IBM SPSS Statistics 21.0 and by bootstrap analysis. 40 of 42 studied mutations were heteroplasmic and two were homoplasmic according to the absence of a mutant allele in atherosclerosis. The developed method of direct quantitative assessment of mitochondrial genome mutant alleles helped us to find three new mutations: 652delG, 961delC and 5132insAA. It was found that 11 of mitochondrial mutations (652insG, T3336S, C3256T, G14459A, G14846A, G15059A, 652delG, A1555G, C5178A, G13513A and G12315A), belonging to eight mitochondrial genes: rRNA 12S, tRNA — Leu (codon recognition UUR) and tRNA — Leu (codon recognition CUN), subunit 1, 2, 5 and 6 of NADH dehydrogenase and cytochrome B are potentially*

associated with atherosclerosis, because from 29% (2 of 7 aortas) to 86% (6/7) investigated aortas have a significant difference in the heteroplasmy level of these mutations in lipofibrous plaques compared to normal aortic intima.

**Key words:** mitochondrial genome, mutation, heteroplasmy level, intima, gene, aorta, lipofibrous plaque, atherosclerosis

Атеросклероз лежит в основе развития многих сердечно-сосудистых заболеваний, которые лидируют среди причин смерти людей в XXI веке [1—10].

Одной из возможных причин атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [11—17].

Митохондриальная ДНК человека представляет собой кольцевую двуцепочечную молекулу и содержит 37 генов: 22 гена транспортных РНК, 2 гена рибосомальных РНК и 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи: цитохрома В, АТФазы, цитохром-С-оксидазы, NADH-дегидрогеназы. В каждой митохондрии содержится несколько копий ее генома. Митохондриальный геном наследуется по материнскому типу. Он отличается выраженной нестабильностью, поэтому в нем нередки соматические мутации. Пенетрантность и экспрессивность таких мутаций варьируют в широких пределах между родственниками (по материнской линии) и зависят от многих факторов, но главным образом, от генотипа и уровня гетероплазмы (смесь мутантных и нормальных молекул ДНК). Поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями людей необходима не только качественная (есть мутация или нет), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (уровень гетероплазмы).

В настоящей работе был проведен пилотный анализ уровня гетероплазмы 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и участках нормальной интимы аорты человека.

## Методика

### Исследуемые мутации

Мутации митохондриального генома, исследованные в настоящей работе, приведены в табл. 1. Алгоритм исследования включал выделение ДНК из липофиброзных бляшек и участков нормальной интимы аорты, получение и пиросеквенирование ПЦР-фрагментов, содержащих область исследованных мутаций.

### Материалы

Объектом исследования были лица, погибшие в результате несчастного случая или внезапной смерти.

Материалом исследования служили образцы нормальной интимы и липофиброзные бляшки 7 аорт.

## Методы

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани аорты (10 мкг) проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. Для получения фрагментов митохондриальной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры, приведенные в табл. 2.

В табл. 3 представлены условия для проведения полимеразной цепной реакции.

Для анализа мутаций использовалась технология пиросеквенирования митохондриального генома [38—41]. Праймеры для пиросеквенирования представлены в табл. 4. Последовательность праймеров была подобрана с помощью программы Primer3 [42].

На основе технологии пиросеквенирования в нашей лаборатории был разработан оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома [43—45]. Количественная оценка дефектного аллеля проводилась на основании анализа высоты пиков пирограммы в исследуемой области одноцепочечного ПЦР-фрагмента митохондриального генома.

### Статистическая обработка данных

Для статистической оценки полученных результатов использовали программу IBM SPSS Statistics 21.0 и бутстрэп-анализ [46, 47].

## Результаты и обсуждение

### Цель исследования интимы аорт индивидов

Полагают, что одним из объяснений локальности, а скорее фокальности, атеросклеротических поражений интимы сосудов может быть повреждающее действие гемодинамического стресса. Однако гемодинамический стресс не может объяснить сосуществования в артерии нормальных и пораженных атеросклерозом участков в области, которая подвержена примерно одинаковому воздействию гемодинамического стресса. В связи с системным действием традиционных факторов риска ССЗ, данные факторы тоже не являются объяснением фокальности атеросклеротических поражений. В последнее время все чаще высказывается предположение, что локальность атеросклероза может быть объяснена генетическими факторами.

**Для корреспонденции:** Сазонова М.А. — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

Локализация исследуемых мутаций в митохондриальном геноме

№ п/п	Мутация	Ген
1	652delG	Ген рРНК 12S
2	652insG	
3	T716G	
4	A750G	
5	961insC	
6	961delC	
7	A1555G	
8	C3256T	Ген тРНК-Leu (кодон узнавания UUR)
9	T3258C	
10	T3271C	
11	A3280G	
12	C3285T	
13	G3316A	Ген субъединицы 1 NADH-дегидрогеназы
14	T3336C	Ген субъединицы 2 NADH-дегидрогеназы
15	5132insAA	
16	C5178A	
17	G5540A	Ген тРНК-Trp
18	T5692C	Ген тРНК-Asn
19	T5814C	Ген тРНК-Cys
20	C6489A	Ген субъединицы 1 цитохром-С-оксидазы
21	T8362G	Ген тРНК- Lys
22	G8363A	
23	T8993G	
24	T8993C	
25	G9379A	Ген субъединицы 3 цитохром-С-оксидазы
26	9480del15	
27	9537insC	
28	G12315A	Ген тРНК-Leu (кодон узнавания CUN)
29	G13513A	Ген субъединицы 5 NADH-дегидрогеназы
30	G14459A	Ген субъединицы 6 NADH-дегидрогеназы
31	C14482G	
32	C14482A	
33	T14484C	
34	T14487C	
35	T14709C	Ген тРНК-Glu
36	G14846A	Ген цитохрома В
37	G15059A	
38	G15084A	
39	C15452A	
40	del 15498 to 15521	
41	G15723A	
42	G15762A	

Праймеры для ПЦР [18—31]

Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР
652delG	TAGACGGGCTCACATCAC (621 — 638)	bio-GGGGTATCTAATCCCAGTTTGG GGT (1087 — 1064)
652insG		
T716G		
A750G		
961insC		
961delC		
A1555G	TAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAA (1326 — 1355)	bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTGGG (1704 — 1684)
C3256T	bio-AGGACAAGAGAAAATA AGGCC (3129 — 3149)	ACGTTGGGGCCTTTGCGTAG (3422 — 3403)
T3258C		
T3271C		
A3280G		
C3285T		
G3316A		
T3336C		
5132insAA		
C5178A	ACACTCATCACCCCTTACCA (5451 — 5469)	bio-CGAATAAGGAGGCTTAGAG (6016 — 5998)
G5540A		
T5692C		
T5814C		
C6489A	GGGCCATCAATTCATCACAACAA (6382 — 6405)	bio-CAGCAGCTAGGACTGGGAGA GATAGGA (6516 — 6490)
T8362G	bio-AGATTAAGAGAACC AACACCTCTTTACA (8333 — 8360)	GGGGTAATTATGGTGGGCC (8410 — 8391)
G8363A		
G9379A	bio-CACTAACCATATACCA ATGA (9358 — 9377)	CTCCTGATGCGAGTAATACGGATGT(9630 — 9605)
9480del115		
9537insC		
G12315A	bio-CTCATGCCCCCATGT CТАА (12230 — 12249)	TTACTTTTATTTGGAGTTGCAC (12337 — 12317)
G13513A	CCTCACAGGTTTCTACTCCAAA (13491 — 13512)	bio-AAGTCCTAGGAAAGTGACAG CGAGG (13825 — 13806)
G14459A	CAGCTTCCTACACTATTAAGT (14303 — 14334)	bio-GTTTTTTTAAATTTATTTAGGG GG (14511 — 14489)
C14482G		
C14482A		
T14484C		
T14487C		
T14709C	bio-CATTATTCTCGCACG GACT (14671 — 14689)	GCTATAGTTGCAAGCAGGAG (15120 — 15100)
G14846A		
G15059A		
G15084A		
C15452A	bio-ACCTTCCACCCTTAC TACA (15401 — 15419)	TGTAGGCGAATAGGAAATATC (15581 — 15561)
del 15498 to 15521		
G15723A	GCCCCGAATGATATTCCTAT (15553 — 15572)	bio-GCTTTGGGTGCTAATGGTGG (15996 — 15977)
G15762A		

Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома [18—37]

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl <sub>2</sub> в буфере для ПЦР	Денатурация, °С	Отжиг, °С	Синтез, °С
G5540A, T5692C, T5814C	566 п.н.	2,5 мМ	94°	62°	72°
652delG, 652insG T716G, A750G, 961insC, 961delC	467 п.н.	2,5 мМ	94°	60°	72°
5132insAA, C5178A	383 п.н.				
C3256T, T3258C, T3271C, A3280G, C3285T, G3316A, T3336C	294 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
T8993G, T8993C	180 п.н.	1,5 мМ			
G9379A, 9480del115, 9537insC, 9537delC	273 п.н.	2,5 мМ			
G13513A	335 п.н.	1,5 мМ			
T14709C, G14846A, G15059A, G15084A	450 п.н.				
C15452A, del 15498 to 15521	181 п.н.	2,5 мМ			
G15723A, G15762A	444 п.н.	1,5 мМ			
A1555G	379 п.н.	2,5 мМ			
C6489A	135 п.н.	1,5 мМ			
G12315A	108 п.н.	2,5 мМ			
G14459A, C14482G, C14482A, T14484C, T14487C	209 п.н.	1,5 мМ	94°	50°	72°
T8362G, G8363A	78 п.н.	1,5 мМ	94°	45°	72°

Праймеры для пиросиквенса

№ п/п	Мутация	Праймер для сиквенса
1	652delG	CCCATAAACAAATA (639 — 651)
2	652insG	CCCATAAACAAATA (639 — 651)
3	T716G	GCATCCCCGTTCC (702 — 714)
4	A750G	TCACCACGATCAAAA (734 — 748)
5	961insC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 — 956)
6	961delC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 — 956)
7	A1555G	ACGCATTTATATAGAGGA (1537 — 1554)
8	C3256T	AAGAAGAGGAATTGA (3300 — 3286)
9	T3258C	
10	T3271C	
11	A3280G	
12	C3285T	
13	G3316A	GGAGTAGGAGGTTGG (3331 — 3317)
14	T3336C	TGCGATTAGAATGGGTAC (3354 — 3337)
15	5132insAA	TCGTGGTGCTGGAG (5148 — 5135)
16	C5178A	ATTAAGGGTGTTAGTCATGT (5200 — 5181)
17	G5540A	TAAATACAGACCAAGA (5524 — 5539)
18	T5692C	ACCCACAAACACTTA (5676 -5690)
19	T5814C	TTGCAATTCAATATGAAAA (5795 — 5813)
20	C6489A	AATCACAGCAGTCCTACT (6470 — 6487)
21	T8362G	TTTAGTTGGGGCATT (8379 — 8364)
22	G8363A	
23	T8993G	CATTCAACCAATAGCC (8976 — 8991)
24	T8993C	
25	G9379A	TCTCGTGTTACATCGC (9397 — 9382)
26	9480del15	TGGTAAAAGGCTCAGAA (9514 — 9498)
27	9537insC	CCAGTGCCCTCCTAAT (9554 — 9539)
28	G12315A	TTTGAGTTGCAC (12328 — 12316)
29	G13513A	AGGTTTCTACTCCAA (13497 — 13511)
30	G14459A	GATACTCCTCAATAGCCA (14439 — 14456)
31	C14482G	ATATCCAAGACAAC (14467 — 14481)
32	C14482A	
33	T14484C	
34	T14487C	
35	T14709C	ATACAACGATGGTTTTTC (14727 — 14710)
36	G14846A	GCGCCAAGGAGTGA (14861 — 14848)
37	G15059A	TTTCTGAGTAGAGAAATGAT (15080 — 15061)
38	G15084A	GGATAATGCCGATGTT (15101 — 15086)
39	C15452A	ATGTCATTAAGGAGAGAA (15470 — 15453)
40	del 15498 to 15521	GTGTTTAAGGGGTTGG (15537 — 15522)
41	G15723A	CACTAAGCCAATCACTTT (15701 — 15719)
42	G15762A	TCATTCTAACCTGAATCG (15744 — 15761)



Согласно моноклональной гипотезе возникновения и развития атеросклероза, в единственной гладкомышечной клетке возникает соматическая мутация, что приводит к ее неограниченной пролиферации, возникновению моноклона, экспансии в сосудистую стенку, утолщению интимы-медии, возникновению и росту атеросклеротической бляшки. Следует подчеркнуть, что интенсивность возникновения соматических мутаций ядерного генома является невысокой, поэтому не может служить объяснением возникновения и развития атеросклероза. В то же время митохондриальный геном менее стабилен, соматические мутации в нем возникают во много раз чаще. Соответственно, гораздо чаще могут появиться клетки интимы артерий, имеющие мутации митохондриального генома, обладающие, вследствие этого, неограниченной пролиферацией. Спонтанное появление подобных мутантных гладкомышечных клеток в различных участках интимы сосудов может служить объяснением фокальности атеросклеротических поражений. Кроме того, есть вероятность избирательного накопления мутантных митохондриальных хромосом, переданных от матери потомкам, при попадании клетки в неблагоприятные условия. Это может произойти во время митоза, когда, при случайном неравномерном распределении копий митохондриального генома, мутантные копии попадают, в основном, только в одну дочернюю клетку.

В результате накопления мутантных геномов в клетках возможны отличия уровня гетероплазмы между пораженными атеросклерозом и непораженными участками интимы аорты. С целью проверки данного предположения был проведен пилотный анализ уровня гетероплазмы 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и нормальных участках сосудистой стенки аорт.

*Детекция уровня гетероплазмы 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорт*

Анализ научной литературы позволил составить список из 42 мутаций митохондриального генома, для которых теоретически могла бы наблюдаться ассоциация уровня гетероплазмы с атеросклерозом. С помощью разработанного в нашей лаборатории метода прямой количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома проведен пилотный анализ данных мутаций в образцах ДНК из липофиброзных бляшек и участков нормальной интимы 7 аорт. Следует отметить, что при анализе данных пирогамм по известным мутациям с помощью нашего метода в образцах интимы аорты удалось выявить три новые, ранее не описанные мутации — 652delG, 961delC и 5132insAA.

Сорок из сорока двух исследованных мутаций оказались гетероплазмичными (652delG, T716G, A750G, 961delC, A1555G, C3256T, T3258C, T3271C, A3280G, C3285T, G3316A, T3336C, 5132insAA, C5178A, G5540A, T5692C, T5814C, C6489A, T8993G, T8993C, G9379A, 9480del15, 9537delC, G12315A, G13513A, G14459A, C14482A, C14482G, T14484C, T14487C, T14709C, G14846A, G15059A, 652insG, 961insC, G15084A, 5132delAA, del15498 to 15521, C15452A и G15762A), а две (T8362G и G8363A) — гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе.

Сравнение величины гетероплазмы в нормальных и атеросклеротических участках проводили методами непараметрической статистики с использованием рангового теста Уилкоксона (табл. 5).

Согласно ранговому тесту Уилкоксона было выявлено 18 мутаций, у которых арифметическая разница между количеством положительных и отрицательных рангов была не менее 2, направление связи совпадало как по среднему значению ранга, так и по суммарным рангам. Разница между значениями одного из видов рангов (среднего или суммарного) была не менее двухкратной. Такими мутациями оказались 652delG, T716G, A1555G, C3256T, G3316A, C3336T, 5132delAA, C5178A, C6489A, G9379A, 9480del15, G12315A, G13513A, G14459A, C14482G, T14487C, G14846A, G15059A.

В то же время, корреляционный анализ, проведенный методом бутстрэп, показал, что мутации 652delG, C3256T, G12315A, G14459A и G15059A высокодостоверно ассоциированы с липофиброзной бляшкой аорты ( $p \leq 0,05$ ), а G13513A и G14846A — значимо на уровне  $p \leq 0,1$ . Мутации A1555G и C5178A являются антиатерогенными по отношению к липофиброзной бляшке на уровне значимости  $p \leq 0,05$  (табл. 6).

Примеры достоверности отличий уровня гетероплазмы мутации G14846A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт представлены на блочных диаграммах (рис. 1—3).

Помимо формального статистического подхода, был использован такой подход, при котором в качестве критерия использовалась частота выявления различий между показателями гетероплазмы в нормальных и атеросклеротических поражениях в образцах, полученных от одного и того же донора аутопсийного материала.

Обнаружено 11 митохондриальных мутаций, принадлежащих митохондриальным генам: рРНК 12S; тРНК-Leu (кодон узн.UUR); тРНК-Leu (кодон узнавания CUN); субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы; и цитохрома В, которые ассоциированы с липофиброзными бляшками.

Сравнение уровня гетероплазии 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзной бляшке и нормальной интиме по ранговому тесту Уилкоксона

Мутации	Вид ранга	Количество рангов	Средний ранг	Суммарный ранг
1	2	3	4	5
652delG	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		
652insG	Отрицательный	2	2,50	5,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	3		
T716G	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	5		
A750G	Отрицательный	2	4,50	9,00
	Положительный	4	3,00	12,00
	Нейтральный	1		
961insC	Отрицательный	3	2,67	8,00
	Положительный	3	4,33	13,00
	Нейтральный	1		
961delC	Отрицательный	1	1,00	1,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	6		
A1555G	Отрицательный	4	2,50*	10,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	3		
C3256T	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	5	6,00*	42,00*
	Нейтральный	0		
T3258C	Отрицательный	1	6,00	6,00
	Положительный	5	3,00	15,00
	Нейтральный	1		
T3271C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	6		
A3280G	Отрицательный	1	1,50	1,50
	Положительный	2	2,25	4,50
	Нейтральный	4		
C3285T	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		
G3316A	Отрицательный	1	1,50*	1,50*
	Положительный	4	3,38*	13,50*
	Нейтральный	2		
T3336C	Отрицательный	1	2,00*	4,00*
	Положительный	3	4,00*	6,00*
	Нейтральный	3		



Таблица 5 (продолжение)

1	2	3	4	5
5132insAA	Отрицательный	3	3,00	9,00
	Положительный	2	3,00	6,00
	Нейтральный	2		
5132delAA	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	2	3,50*	7,00*
	Нейтральный	3		
C5178A	Отрицательный	4	4,00*	11,00*
	Положительный	1	2,75*	4,00*
	Нейтральный	2		
G5540A	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	3	4,00	12,00
	Нейтральный	0		
T5692C	Отрицательный	4	3,00	12,00
	Положительный	2	4,50	9,00
	Нейтральный	1		
T5814C	Отрицательный	2	1,50	3,00
	Положительный	1	3,00	3,00
	Нейтральный	4		
C6489A	Отрицательный	4	3,38*	13,50*
	Положительный	1	1,50*	1,50*
	Нейтральный	2		
T8362G	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
G8363A	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
T8993G	Отрицательный	5	3,40	17,00
	Положительный	2	5,50	11,00
	Нейтральный	0		
T8993C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
G9379A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	5	4,70*	23,50*
	Нейтральный	0		
9480del15	Отрицательный	3	2,33*	7,00*
	Положительный	3	4,67*	14,00*
	Нейтральный	1		
9537delC	Отрицательный	2	4,00	8,00
	Положительный	4	3,25	13,00
	Нейтральный	1		
G12315A	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	5	4,00*	20,00*
	Нейтральный	1		
G13513A	Отрицательный	1	3,58*	6,50*
	Положительный	6	6,50*	21,50*
	Нейтральный	0		

Таблица 5 (окончание)

1	2	3	4	5
5132insAA	Отрицательный	3	3,00	9,00
G14459A	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	3	3,67*	11,00*
	Нейтральный	2		
C14482C	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	1		
C14482G	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	3	3,00*	9,00*
	Нейтральный	3		
T14484C	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	2	2,00	4,00
	Нейтральный	4		
T14487C	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	4	4,25*	17,00*
	Нейтральный	1		
T14709C	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		
G14846A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	4	4,13*	16,50*
	Нейтральный	1		
G15059A	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		
G15084A	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	5		
del14598to15521	Отрицательный	2	2,25	4,50
	Положительный	2	2,75	5,50
	Нейтральный	3		
C15452C	Отрицательный	2	4,75	9,50
	Положительный	4	2,88	11,50
	Нейтральный	1		
G15762A	Отрицательный	3	2,33	7,00
	Положительный	2	4,00	8,00
	Нейтральный	2		

Примечание. \* — более чем двукратное различие между положительными и отрицательными значениями рангов.

Таблица 6

Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции между уровнем гетероплазмии и наличием липофиброзной бляшки

Мутация	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость (двусторонняя)
652delG	0,485**	0,012**
652insG	0,075	0,186
A1555G	-0,401**	0,001**
C3256T	0,608**	0,001**
T3336C	0,086	0,175
C5178A	-0,302**	0,024**
G12315A	0,401**	0,042**
G13513A	0,335*	0,097*
G14459A	0,470**	0,015**
G14846A	0,315*	0,101*
G15059A	0,436**	0,026**

Примечание. \* — высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками ( $p \leq 0,05$ ); \* — корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками значима на уровне  $p \leq 0,1$ .

Данные по образцам аорт, имеющих значительные отличия в проценте гетероплазмии по данным мутациям в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью, представлены в табл. 7.

Как видно из табл. 7, по мутациям 652insG и T3336C такие отличия имеются в 29% аорт; по мутациям C3256T, G14459A, G14846A и G15059A — в 43%. Более половины образцов имеют значительные отличия в проценте гетероплазмии по мутациям 652delG, A1555G и C5178A — в 57%. И, наконец, в наибольшем количестве липофиброзных бляшек преобладают, по сравнению с нормальной интимой, мутации G12315A и G13513A — в 71% и 86% (соответственно).

Таким образом, при количественной оценке мутантного аллеля митохондриального генома обнаружены значительные отличия процента гетероплазмии по 11 мутациям между образцами из липофиброзной бляшки и нормальной интимы аорты.

### Заключение

В настоящем пилотном исследовании впервые были получены данные о том, что различные участки интимы аорты, как нормальной, так и имеющей атеросклеротические поражения различной степени тяжести, могут различаться между собой по уровню гетероплазмии мутантного аллеля митохондриального

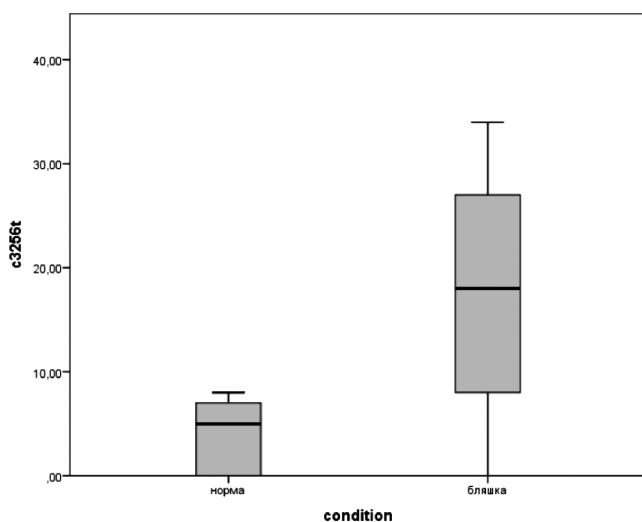


Рис. 1. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации C3256T в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме.

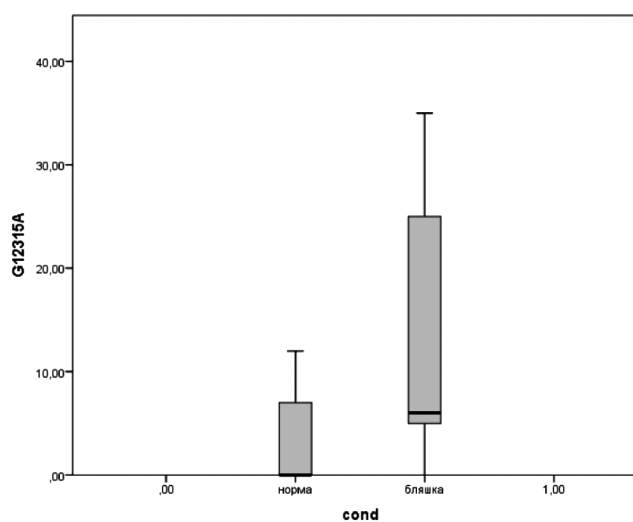


Рис. 2. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации G12315A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме.

Сравнение процента 11 митохондриальных мутаций в атеросклеротических бляшках и нормальной интиме аорта

Ген	Мутация	№ аорты	Норма	Бляшка
12S рРНК	652delG	A1	0	2
		A2	0	17
		A3	4	22
		A5	2	28
	652insG	A6	0	9
		A7	0	8
	A1555G	A1	14	11
		A2	15	7
		A3	54	8
		A5	19	7
тРНК — Leu (кодон uzn.UUR)	C3256T	A1	8	18
		A3	11	22
		A5	12	27
		A6	13	34
Субъединицы 1 NADH дегидрогеназы	T3336C	A1	3	6
		A3	0	17
Субъединицы 2 NADH дегидрогеназы	C5178A	A2	14	7
		A3	14	8
		A5	10	5
		A6	31	18
тРНК — Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	A1	8	35
		A2	0	5
		A3	0	6
		A4	0	15
		A5	12	35
Субъединицы 5 NADH дегидрогеназы	G13513A	A1	45	60
		A2	20	30
		A3	20	40
		A4	15	25
		A6	45	60
		A7	30	45
Субъединицы 6 NADH дегидрогеназы	G14459A	A3	2	4
		A5	2	10
		A6	0	53
Цитохрома В	G14846A	A1	8	14
		A2	2	7
		A6	3	8
	G15059A	A1	31	41
		A3	28	52
		A5	43	66

генома. Из 42 исследованных мутаций сорок оказались гетероплазмичными, а две — гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе.

Разработанный метод прямой количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома позволил обнаружить три новые мутации — 652delG, 961delC и 5132insAA.

Выявлено, что преобладающими мутациями в липофиброзных бляшках являются 652delG, A1555G, C3256T, T3336C, C5178A, G12315A, G13513A, G14459A, 652insG, G14846A, G15059A. Данные мутации локализованы в восьми митохондриальных генах, два из которых кодируют транспортные РНК-Leu, один — субъединицу 12S рибосомальной РНК, четыре — белковые субъединицы NADH дегидрогеназы и один — цитохрома В. Это позволяет предположить, что повреждения генов субъединиц ферментов дыхательной цепи митохондрий, а также генов тРНК и рРНК митохондриального генома ведут к окислительному стрессу эндотелиальных клеток сосудов, конечным итогом которого является возникновение и развитие атеросклеротических поражений.

Данная статья может быть полезна как медицинским генетикам, так и практикующим врачам, проводящим диагностику сердечно-сосудистых патологий и атеросклероза.

*Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 14-14-01038.*

### Список литературы

1. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Baha M.J. et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 21; 129(3):e28-e292. doi: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80. Epub 2013 Dec 18.
2. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. European Heart Network and European Society of Cardiology. 2012.
3. Орехов А.Н. *Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия*. Palmarium Academic Publishing, 2013. 536 с. ISBN: 978-3-659-98213-2.
4. Давыдов Д.М. Асимметрия в деятельности сердечно-сосудистой системы: её природа и роль в поддержании устойчивости и адаптации организма к стрессовым воздействиям. *Патогенез*. 2013; №2.
5. Захарова Е.И., Дудченко А.М. Холинацетилтрансфераза и её роль в регуляции обмена и секреции ацетилхолина. *Патогенез*. 2012. №4.
6. Кжышковска Ю.Г., Грачев А.Н. Маркеры моноцитов и макрофагов для диагностики иммунопатологий. *Патогенез*. 2012; №1.
7. Лыско А.И., Дудченко А.М. Каталитические антиоксиданты: потенциальные терапевтические средства

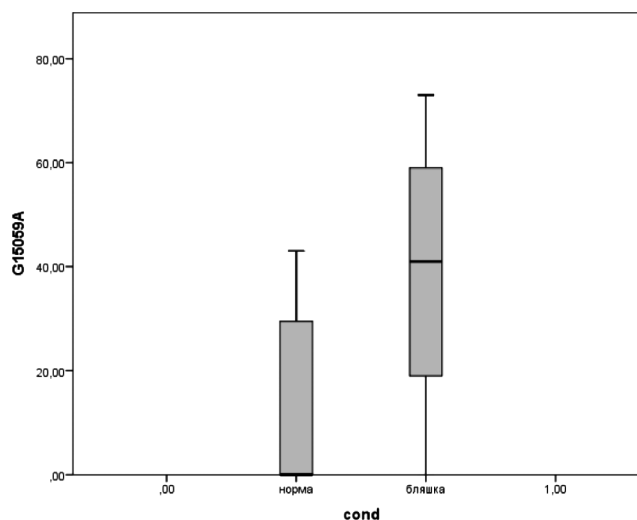


Рис. 3. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмичной мутации G15059A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме.

для коррекции патологий, вызываемых окислительным стрессом. *Патогенез*. 2013. — №3.

8. Медведев И.Н., Скорятин И.А. Цитоархитектоника эритроцитов и тромбоцитов у больных артериальной гипертензией с дислипидемией. *Патогенез*. 2013; №2.

9. Мельникова С.В., Запорожец Т.Н. Сравнительный анализ показателей сердечно-сосудистой системы у врачей-стоматологов и курсантов-стоматологов. *Патогенез*. 2012; №4.

10. Санюк Н.В., Мацеевский Д.Д., Лебедева М.А. Влияние острой гипоксии на легочное и системное кровообращение. *Патогенез*. 2012; №4.

11. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертензией и различными видами кардиомиопатии. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2012; 3:124-9.

12. Иванова М.М., Бородачев Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома с развитием инфаркта миокарда. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2012; 3: 115-22.

13. Иванова М.М., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Некоторые мутации митохондриального генома человека, ассоциированные с цитопатиями. *Биомед. журн. Medline.ru*. 2012; Т. 13, Ст. 26. — С. 309-30.

14. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Ассоциация мутаций митохондриального генома с развитием инфаркта миокарда. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2013; 2: 56-61.

15. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Ассоциация точковых мутаций ядерного и митохондриального генома человека с ишемической болезнью сердца. *Пат. физиол. и эксп. тер.* 2012; 2: 51-6.

16. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека. *Кардиол. вестн.* 2012. -Т.7 (19), №1. С.57-61.

17. Сазонова М., Орехов А., Собенин И. *Дефекты митохондриального генома и атеросклероз. Роль патологии митохондриального генома в формировании атеросклеротических поражений артериальной стенки*. Palmarium Academic Publishing. 2014. 354 с. ISBN: 978-3-639-88097-7.
18. Andreu A.L., Hanna M.G., Reichmann H., Bruno C., Penn A.S., Tanji K., Pallotti F., Iwata S., Bonilla E., Lach B., Morgan-Hughes J., DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*. 1999; 303(14): 1037-44.
19. Andreu A.L., Bruno C., Dunne T.C., Tanji K., Shanske S., Sue C.M., Krishna S., Hadjigeorgiou G.M., Shtilbans A., Bonilla E., DiMauro S. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol*. 1999; 45(1): 127-30.
20. Andreu A.L., Bruno C., Shanske S., Shtilbans A., Hirano M., Krishna S., Hayward L., Systrom D.S., Brown R.H. Jr., DiMauro S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology*. 1998; 51(5): 1444-7.
21. Chol M., Lebon S., Benit P., Chretien D., de Lonlay P., Goldenberg A., Odent S., Hertz-Pannier L., Vincent-Delorme C., Cormier-Daire V., Rustin P., Rotig A., Munnich A. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. *J Med Genet*. 2003; 40(3): 188-91.
22. Han C.B., Ma J.M., Xin Y., Mao X.Y., Zhao Y.J., Wu D.Y., Zhang S.M., Zhang Y.K. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol*. 2005; 7;11(1): 31-5.
23. Tanimoto H, Nishio H., Matsuo M., Nibu K. A novel mitochondrial mutation, 1556C → T, in a Japanese patient with streptomycin-induced tinnitus. *Acta Otolaryngol*. 2004; 124(3): 258-61.
24. Yamagata K., Muro K., Usui J., Hagiwara M., Kai H., Arakawa Y., Shimizu Y., Tomida C., Hirayama K., Kobayashi M., Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13(7): 1816-23.
25. Matsunaga H., Tanaka Y., Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Nomiyama T., Ogawa O., Ogihara T., Yamada Y., Yagi K., Kawamori R. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24(3): 500-3.
26. Wong L.J., Chen T.J., Tan D.J. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004; 25(15): 2602-10.
27. Fu K., Hartlen R., Johns T., Genge A., Karpati G., Shoubridge E.A. A novel heteroplasmic tRNA<sup>Leu</sup>(CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(11): 1835-40.
28. Solano A., Roig M., Vives-Bauza C., Hernandez-Pena J., Garcia-Arumi E., Playan A., Lopez-Perez M.J., Andreu A.L., Montoya J. Bilateral Lateral Necrosis Associated with a Novel Mutation in the Mitochondrial ND6 Gene. *Ann Neurol*. 2003; 54(4): 527-30.
29. Horvath R., Scharfe C., Hoeltzenbein M., Do B.H., Schroder C., Warzok R., Vogelgesang S., Lochmuller H., Muller-Hocker J., Gerbitz K.D., Oefner P.J., Jaksch M. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene. *J Med Genet*. 2002; 39(11): 812-6.
30. Kim D.-S., Jung D.-S., Park K.-H., Kim I.J., Kim C.M., Lee W.H., Rho S.K. Histochemical and molecular genetic study of MELAS and MERF in Korean patients. *J Korean Med Sci*. 2002; 17(1): 103-12.
31. Varlamov D.A., Kudin A.P., Vielhaber S., Schröder R., Sassen R., Becker A., Kunz D., Haug K., Rebstock J., Heils A., Elger C.E., Kunz W.S. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. *Hum Mol Genet*. 2002; 1; 11(16): 1797-805.
32. Gropman A., Chen T.J., Peng C.L., Krasnewich D., Chernoff E., Tiffit C., Wong L.J. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. *Am J Med Genet A*. 2004; 1; 124(4): 377-82.
33. Man P.Y., Griffiths P.G., Brown D.T., Howell N., Turnbull D.M., Chinnery P.F. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2003; 72(2):333-9. Epub 2002; Jan 7.
34. Nishigaki Y., Marten R., Copeland W.C., Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest*. 2003; 111(12): 1913-21.
35. Baracca A., Barogi S., Carelli V., Lenaz G., Solaini G. Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem*. 2000; 11; 275(6): 4177-82.
36. Jeppesen T.D., Schwartz M., Hansen K., Danielsen E.R., Wibrand F., Vissing J. Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C → T point mutation of mitochondrial DNA. *J Neurol Sci*. 2003; 15; 214(1-2): 17-20.
37. Wallace D.C. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 13; 91(19):8739-46. *Review. Neurological Sciences*. 2003; V. 214:17- 20.
38. Alderborn A., Kristofferson A., Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res*. 2000; 10(8): 1249-58.
39. Chen D.C., Saarela J., Nuotio I., Jokiahio A., Peltonen L., Palotie A. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping. *J Mol Diagn*. 2003; 5(4): 243-9.
40. Sinclair A., Arnold C., Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(11): 3620-2.
41. Adelson M.E., Feola M., Trama J., Tilton R.C., Mordechai E. Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol*. 2005; 33(1): 25-34.
42. (дата обращения 27. 03.2014).
43. Sazonova M.A., Postnov A.Iu., Orekhov A.N., Sobenin I.A. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; 4: 81-4. (in Russian)
44. Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul,



Turkey, April 26-29, 2008. *Atherosclerosis Suppl.* 2008; 9(1):113.

45. Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta. 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10-13, 2007. *Atherosclerosis Suppl.* 2007; 8(1): 45-6.

46. Weir B.S. *Genetic Data Analysis*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 377 p.

47. <http://spss.ru.joydownload.com/> &c=20?gclid=COTnxtbesLwCFaHbcgodiiMAtQ (дата обращения 17. 09.2014).

Поступила 16.12.14

## References

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014; Jan 21; 129(3):e28-e292. doi: 10.1161/01.cir.0000441139.02102.80. Epub 2013; Dec 18.

2. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. European Heart Network and European Society of Cardiology. 2012 — 127 p.

3. Orekhov AN. *Atherosclerosis. Molecular-cellular mechanisms of human atherosclerosis; antiatherosclerotic therapy*. Palmarium Academic Publishing, 2013 — 536 p. ISBN: 978-3-659-98213-2. (in Russian)

4. Davydov DM. Asymmetry in the activity of cardiovascular system: its nature and role in sustaining stress tolerance and adaptation of an organism to stress. *Pathogenesis.* 2013 (2). (in Russian)

5. Zakharova YeI, Dudchenko AM. Choline acetyl transferase and its role in regulation of acetylcholine exchange and secretion *Pathogenesis.* 2012 (4).

6. Kzhyshkowska JG, Gratchev AN. Monocyte and macrophage markers for immunopathological diagnostics. *Pathogenesis.* 2012 (1). (in Russian)

7. Lysko AI, Dudchenko AM. Catalytic antioxidants: potential therapeutic agents for correction of pathologies caused by oxidative stress. *Pathogenesis.* 2013 (3). (in Russian)

8. Medvedev IN, Skoryatina IA. Cytoarchitectonics of erythrocytes and thrombocytes in patients with arterial hypertension and dyslipidemia. *Pathogenesis.* 2013; (2). (in Russian)

9. Melnikova SV, Zaporozhets TN. A comparative analysis of cardiovascular system indicant of doctors-stomatologists and students-stomatologists. *Pathogenesis.* 2012; (4). (in Russian)

10. Sanotskaya NV, Matsievskii DD, Lebedeva MA. Influence of acute hypoxia on pulmonary and systematic circulation. *Pathogenesis.* 2012 (4). (in Russian)

11. Zhelankin AV, Sazonova MA. Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension

and different types of cardiomyopathy. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; Jul-Sep; (3):123-8. Review. (in Russian)

12. Ivanova MM, Borodachev EN, Sazonova MA. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; Jul-Sep;(3):115-22. (in Russian)

13. Ivanova MM, Sazonova MA, Orekhov AN, Sobenin IA. Some human mitochondrial genome mutations associated with cytopathies. *Biomeditsinskiy journal Medline.ru.* 2012; Vol.13, Art.26:309-330. (in Russian)

14. Mitrofanov KLu, Zhelankin AV, Sazonova MA, Sobenin IA, Postnov Alu. Association of mitochondrial genome mutations with myocardial infarction development. *Atherosclerosis and dyslipidemii.* 2013; (2):56-61. (in Russian)

15. Mitrofanov KLu, Sazonova MA. Association of point mutations in human nuclear and mitochondrial genome with coronary artery disease. *Patol Fiziol Eksp Ter.* 2012; Apr-Jun; (2):51-5. Review. (in Russian)

16. Mitrofanov KLu, Zhelankin AV, Sazonova MA, Sobenin IA, Postnov Alu. Chronic diseases of noninflammatory genesis and human mitochondrial genome mutations. *Cardiologicheskiy vestnik.* 2012; 7 (19), №1:57-61.

17. Sazonova MA, Orekhov AN, Sobenin IA. Mitochondrial genome defects and atherosclerosis. Role of mitochondrial genome pathologies in atherosclerotic lesions formation of an arterial wall. Palmarium Academic Publishing, 2014; 354 p. ISBN: 978-3-639-88097-7. (in Russian)

18. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, DiMauro S. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.* 1999; Sep 30; 341(14): 1037-44.

19. Andreu AL, Bruno C, Dunne TC, Tanji K, Shanske S, Sue CM, Krishna S, Hadjigeorgiou GM, Shtilbans A, Bonilla E, DiMauro S. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol.* 1999; Jan; 45(1): 127-30.

20. Andreu AL, Bruno C, Shanske S, Shtilbans A, Hirano M, Krishna S, Hayward L, Systrom DS, Brown RH Jr, DiMauro S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. *Neurology.* 1998; 51(5): 1444-7.

21. Chol M, Lebon S, Benit P, Chretien D, de Lonlay P, Goldenberg A, Odent S, Hertz-Pannier L, Vincent-Delorme C, Cormier-Daire V, Rustin P, Rotig A, Munnich A. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. *J Med Genet.* 2003; Mar; 40(3): 188-91.

22. Han CB, Ma JM, Xin Y, Mao XY, Zhao YJ, Wu DY, Zhang SM, Zhang YK. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol.* 2005; Jan 7; 11(1): 31-5.

23. Tanimoto H, Nishio H, Matsuo M, Nibu K. A novel mitochondrial mutation, 1556C → T, in a Japanese patient with streptomycin-induced tinnitus. *Acta Otolaryngol.* 2004; Apr; 124(3): 258-61.

24. Yamagata K, Muro K, Usui J, Hagiwara M, Kai H, Arakawa Y, Shimizu Y, Tomida C, Hirayama K, Kobayashi M, Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol.* 2002; Jul;13(7): 1816-23.

25. Matsunaga H, Tanaka Y, Tanaka M, Gong JS, Zhang J, Nomiyama T, Ogawa O, Ogihara T, Yamada Y, Yagi K, Kawamori R. Antiatherogenic mitochondrial geno-



type in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001; Mar; 24(3): 500-3.

26. Wong LJ, Chen TJ, Tan DJ. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Electrophoresis*. 2004; Aug; 25(15): 2602-10.

27. Fu K, Hartlen R, Johns T, Genge A, Karpati G, Shoubridge EA. A novel heteroplasmic tRNA<sup>Leu</sup> (CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum Mol Genet*. 1996; Nov; 5(11): 1835-40.

28. Solano A, Roig M, Vives-Bauza C, Hernandez-Pena J, Garcia-Arumi E, Playan A, Lopez-Perez MJ, Andreu AL, Montoya J. Bilateral Striatal Necrosis Associated with a Novel Mutation in the Mitochondrial ND6 Gene. *Ann Neurol*. 2003; Oct; 54(4): 527-30.

29. Horvath R, Scharfe C, Hoeltzenbein M, Do BH, Schroder C, Warzok R, Vogelgesang S, Lochmuller H, Muller-Hocker J, Gerbitz KD, Oefner PJ, Jaksch M. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene. *J Med Genet*. 2002; Nov; 39(11): 812-6.

30. Kim D-S, Jung D-S, Park K-H, Kim IJ, Kim CM, Lee WH, Rho SK. Histochemical and molecular genetic study of MELAS and MERF in Korean patients. *J Korean Med Sci*. 2002; Feb; 17(1): 103-12.

31. Varlamov DA, Kudin AP, Vielhaber S, Schröder R, Sassen R, Becker A, Kunz D, Haug K, Rebstock J, Heils A, Elger CE, Kunz WS. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. *Hum Mol Genet*. 2002; Aug 1; 11(16): 1797-805.

32. Gropman A, Chen TJ, Perng CL, Krasnewich D, Chernoff E, Tift C, Wong LJ. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. *Am J Med Genet A*. 2004; Feb; 1; 124(4): 377-82.

33. Man PY, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet*. 2003; Feb; 72(2): 333-9. Epub 2002; Jan 7.

34. Nishigaki Y, Marten R, Copeland WC, Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J Clin Invest*. 2003; Jun; 111(12): 1913-21.

35. Baracca A, Barogi S, Carelli V, Lenaz G, Solaini G. Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem*. 2000; Feb 11; 275(6): 4177-82.

36. Jeppesen TD, Schwartz M, Hansen K, Danielsen ER, Wibrand F, Vissing J. Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C→T point mutation of mitochondrial DNA. *J Neurol Sci*. 2003; Oct 15; 214(1-2): 17-20.

37. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 13; 91(19): 8739-46. *Review. Neurological Sciences*. 2003; V. 214, P.17- 20.

38. Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res*. 2000; Aug; 10(8): 1249-58.

39. Chen DC, Saarela J, Nuotio I, Jokiaho A, Peltonen L, Palotie A. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping. *J Mol Diagn*. 2003; Nov; 5(4): 243-9.

40. Sinclair A, Arnold C, Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; Nov; 47(11): 3620-2.

41. Adelson ME, Feola M, Trama J, Tilton RC, Mordechai E. Simultaneous detection of herpes simplex virus types 1 and 2 by real-time PCR and Pyrosequencing. *J Clin Virol*. 2005; May; 33(1): 25-34.

42. (date of addressing 27. 03.2014).

43. Sazonova MA, Postnov Alu, Orekhov AN, Sobenin IA. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011 Oct-Dec; (4): 81-4. (in Russian)

44. Sazonova M, Andrianova I, Khasanova Z, Sobenin I, Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26-29, 2008. *Atherosclerosis Suppl*. 2008, 9(1): 113.

45. Sazonova MA, Budnikov YY, Khazanova ZB, Postnov AY, Sobenin IA, Orekhov AN. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta. 76th Congress of the European Atherosclerosis Society, Helsinki, Finland, June 10-13, 2007. *Atherosclerosis Suppl*. 2007; 8(1): 45-6.

46. Weir BS. *Genetic Data Analysis*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1996; 377 p.

47. <http://spss.ru.joydownload.com/&c=20?gclid=COTnxtbesLwCFaHbcgodiMATQ> (date of addressing 17. 09.2014).

Received 16.12.14