

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

На правах рукописи

САЗОНОВА МАРГАРИТА АЛЕКСАНДРОВНА

**СВЯЗЬ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА
С ФОРМИРОВАНИЕМ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ
АРТЕРИАЛЬНОЙ СТЕНКИ**

03.02.07 – генетика

диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант
доктор биологических
наук, профессор
А.Н. Орехов

Москва - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	8
Актуальность проблемы.....	8
Цель исследования.....	11
Задачи исследования.....	11
Научная новизна.....	12
Теоретическая значимость.....	13
Практическая значимость.....	13
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	14
Личный вклад автора.....	15
Публикации.....	16
Внедрение результатов исследования в практику.....	16
Апробация диссертации.....	17
Структура и объем диссертации.....	18
Глава 1. Обзор литературы	18
1.1 Медицинские и социальные аспекты атеросклероза.....	19
1.2 Патогенез атеросклероза.....	21
1.2.1 Общие сведения об атеросклерозе.....	21
1.2.2 Строение стенки нормальной артерии.....	23
1.2.3 Воззрения на проблему атеросклероза.....	25
1.2.4 Гипотезы патогенеза атеросклероза.....	26
1.2.4.1 Роль эндотелия в атеросклерозе.....	32
1.2.4.2 Роль моноцитов-макрофагов в возникновении атеросклеротических поражений.....	34
1.2.4.3 Вовлеченность гладкомышечных клеток в атерогенез.....	35
1.3 Факторы риска атерогенеза.....	37
1.3.1 Факторы среды	37
1.3.1.1 Стресс.....	37

1.3.1.2	Факторы экологии.....	38
1.3.2	Факторы поведения.....	38
1.3.2.1	Курение, как фактор риска.....	38
1.3.2.2	Малоподвижный образ жизни.....	40
1.3.2.3	Факторы питания.....	40
1.3.3	Факторы биохимии.....	42
1.3.3.1	Избыточная масса тела.....	42
1.3.3.2	Сахарный диабет, как фактор риска.....	43
1.3.3.3	Дефекты обмена липидов.....	44
1.3.3.4	Факторы, вызывающие дефекты обмена липидов.....	45
1.3.4	Независимые факторы риска атерогенеза.....	46
1.3.4.1	Гендерный фактор	46
1.3.4.2	Возрастной фактор.....	46
1.3.5	Молекулярно-генетические дефекты.....	47
1.3.5.1	Укорочение теломеров.....	47
1.3.5.2	Повреждения ядерного генома.....	49
1.3.5.3	Патологии, связанные с митохондриальными дефектами.....	73
1.3.5.3.1	Симптомы митохондриальных цитопатий.....	75
1.3.5.3.2	Характеристика митохондриальных мутаций.....	76
1.3.5.3.2.1	Обширные делеции и дупликации	77
1.3.5.3.2.2	Однонуклеотидные замены, инсерции или делеции.....	78
1.3.5.3.2.3	Гаплотипы митохондриального генома.....	91
1.3.5.3.2.4	Гаплогруппы митохондриальной ДНК.....	92
1.3.5.3.2.5	Данные литературы, посвященные методам исследования мтДНК.....	93
1.3.5.3.2.6	Мутации мтДНК, атеросклероз и старение организма.....	93
	Глава 2. Материалы и методы.....	97
2.1	Исследуемые мутации.....	97
2.2	Материалы.....	99

2.3 Методы.....	102
2.3.1 Подготовка образцов интимы аорты для анализа.....	102
2.3.1.1 Пробоподготовка участков интимы аорты для электронно-микроскопического исследования.....	102
2.3.1.2 Пробоподготовка образцов интимы аорты для выделения ДНК.....	102
2.3.2 Ультрасонографическое исследование.....	103
2.3.3 Получение и подготовка образцов крови для анализа.....	105
2.3.4 Выделение ДНК.....	105
2.3.5 Гель/электрофорез образцов ДНК и ПЦР-фрагментов.....	107
2.3.6 ПЦР.....	108
2.3.7 Пиросиквенс.....	118
2.3.7.1 Методика пиросеквенирования.....	118
2.3.7.2 Пробоподготовка для пиросиквенса.....	121
2.3.7.3 Оборудование для пиросеквенирования.....	124
2.3.8 Определение митохондриальных гаплогрупп.....	126
2.3.9 Трансмиссионная электронная микроскопия.....	126
2.3.10 Статистическая обработка данных.....	127
Глава 3. Результаты.....	128
3.1 Сравнительный электронно-микроскопический анализ митохондрий клеток интимы в нормальных участках сосудистой стенки и атеросклеротических поражениях.....	128
3.2 Разработка метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома.....	131
3.2.1 Способы определения уровня гетероплазмии.....	132
3.2.2 Общая формула для подсчета процента гетероплазмии мутаций митохондриального генома.....	143
3.2.2.1 Общая формула.....	143
3.2.2.2 Пример расчета процента гетероплазмии мутации m.1555A>G митохондриального генома по общей формуле.....	144

3.2.3 Примеры гистограмм исследованных мутаций и уровня гетероплазмы, определенного по пирограммам ПЦР-фрагментов образцов ДНК.....	145
3.2.3.1 Для мутации m.3336T>C.....	145
3.2.3.2 Для мутации m.5178C>A.....	147
3.2.3.3 Для m.15059G>A.....	148
3.2.4 Оценка воспроизводимости метода измерения уровня гетероплазмы.....	148
3.3 Исследование интимы аорты человека с помощью метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома...	151
3.3.1 Цель исследования интимы аорт индивидов.....	151
3.3.2 Детекция уровня гетероплазмы 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорт.....	153
3.4 Теоретическое обоснование дальнейших исследований интимы артерий.....	170
3.5 Анализ уровня гетероплазмы в гомогенатах мутаций мтДНК нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт.....	172
3.6 Анализ уровня гетероплазмы мутаций мтДНК в участках морфологически картированной стенки аорт.....	175
3.6.1 Морфологическое и мутационное картирование аорт.....	175
3.6.2 Анализ 11 мутаций митохондриального генома в морфологически картированных аортах.....	180
3.6.3 Совокупная мутационная нагрузка 11 мутаций в морфологически картированных аортах.....	186
3.7 Преобладающие мутации в атеросклеротических поражениях аорт...	189
3.8 Анализ уровня гетероплазмы в клетках крови.....	190
3.8.1 Принцип исследования атеросклеротических поражений интимы сонных артерий.....	191
3.8.1.1 Оценка размера атеросклеротических бляшек сонных артерий	191

3.8.1.2	Оценка толщины интимо-медиального слоя сонных артерий.....	191
3.8.1.3	Демографические характеристики участников исследования.....	194
3.8.2	Ассоциация уровня гетероплазмии мутаций мтДНК с возрастом.....	196
3.8.3	Ассоциация мутаций митохондриального генома с атеросклеротическими бляшками сонных артерий.....	197
3.8.3.1	Анализ 11 мутаций.....	197
3.8.3.2	Уровень гетероплазмии мутации m.13513G>A, связанный с отсутствием АСБ СА.....	199
3.8.3.3	Совокупная мутационная нагрузка при атеросклеротических бляшках в сонных артериях.....	200
3.8.3.3.1	Логистическая регрессия.....	200
3.8.3.3.2	ROC-анализ.....	202
3.8.4	Ассоциация мутаций мтДНК с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий.....	204
3.8.4.1	Анализ 11 мутаций митохондриального генома.....	204
3.8.4.2	Совокупная мутационная нагрузка при утолщении интимо-медиального слоя сонных артерий.....	205
3.8.4.2.1	Логистическая регрессия.....	205
3.8.4.2.2	ROC-анализ.....	207
3.8.5	Генодиагностика атеросклероза.....	209
3.8.5.1	Пороговое значение процента гетероплазмии отдельных мутаций, ассоциированное с образованием атеросклеротических бляшек в сонных артериях.....	209
3.8.5.2	Пороговое значение процента гетероплазмии отдельных мутаций, ассоциированное с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий.....	210
3.8.6	Ассоциация мутаций с факторами риска атеросклероза.....	211
3.9	Гаплотипы мутаций митохондриального генома и атеросклероз.....	213
3.10	Ассоциация гаплогрупп митохондриального генома с	

атеросклеротическими поражениями.....	216
3.10.1 Анализ ассоциации гаплогрупп с атеросклеротическими бляшками.....	216
3.10.1.1 Гаплогруппа М у индивидов с атеросклеротическими бляшками.	216
3.10.1.2 Гаплогруппа Т у индивидов с атеросклеротическими бляшками..	220
3.10.1.3 Гаплогруппа U у индивидов с атеросклеротическими бляшками.	223
3.10.2 Анализ ассоциации гаплогрупп с факторами риска атеросклероза..	227
3.10.2.1 Гаплогруппа U у индивидов с артериальной гипертензией.....	227
3.10.2.2 Гаплогруппа U у индивидов с наличием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ).....	229
3.11 Ассоциация популяционных гаплогрупп с мутациями митохондриального генома.....	232
3.11.1 Гаплогруппа U и митохондриальные мутации.....	232
3.11.2 Гаплогруппа Н и митохондриальные мутации.....	233
3.11.3 Гаплогруппа Т и митохондриальные мутации.....	234
3.11.4 Гаплогруппа М и митохондриальные мутации.....	235
Глава 4. Обсуждение.....	237
Глава 5. Заключение.....	266
Список сокращений.....	266
Практические рекомендации.....	270
Выводы.....	271
Список литературы.....	273

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

В двадцать первом столетии наибольшее влияние на здоровье человечества оказывают социально значимые полигенные мультифакториальные патологии, такие как атеросклероз, диабет, рак [5-7, 9, 17, 24, 28-31, 34, 38, 44, 47-51, 55, 59-61, 68, 79-81, 89, 122, 144, 161, 299, 427, 563, 613]. Изучение их патогенетических механизмов и разработка профилактических методов - одна из главных задач медицинской науки. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают одно из первых мест в возникновении инвалидности, а также смерти, в том числе, внезапной [314, 447, 537, 580]. Кроме того, ССЗ ведут к многократному увеличению расходов на медицину [89, 285, 314, 447, 537, 580]. Часто атеросклеротические поражения стенки артерий являются морфологической основой смертности от ССЗ [5-8, 17, 18, 53, 54, 60, 68, 89, 137, 244, 274, 314, 322, 342, 427, 447, 537, 561, 562, 580]. При атеросклерозе развиваются дегенеративные изменения в интиме магистральных сосудов, следствием которых является окклюзия просвета артерий и уменьшение кровоснабжения органов человека [17, 18, 53, 54, 60, 68, 89, 137, 314, 322, 342, 427, 447, 537, 561, 562, 580]. В настоящее время возникновение и развитие атеросклероза у людей приобрело характер эпидемии [53, 54, 84, 85, 89, 137, 274, 314, 322, 342, 427, 447, 537, 561, 562, 580]. Поэтому изучение данного заболевания представляется весьма актуальным и своевременным.

Следует отметить, что атеросклероз трудно распознать с помощью клинических методов в начальных стадиях заболевания [53, 54, 427, 447, 537, 561, 562, 580]. Молекулярные маркеры, ассоциированные с данной патологией, могли бы помочь в ее ранней диагностике. В последнее время большое количество исследований ученых всего мира было проведено с целью поиска ядерных мутаций, ассоциированных с атеросклерозом и ССЗ [30, 44, 49, 51, 52, 89, 146, 163, 200, 201, 237, 238, 243, 255, 279-281, 299, 331, 334, 341, 349, 376, 423, 428, 454, 508, 581, 597]. Корреляция с атеросклерозом и сердечно-

сосудистыми заболеваниями была обнаружена для ряда полиморфизмов, локализованных в генах, продукты которых вовлечены в метаболизм артериальной стенки, таких как гены рецептора ангиотензина II типа 1 (AGTR1), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), селектина-E (SELE), адренорецептора альфа-2 (ADRA2B), эндотелина-1 и -2 (EDN1, EDN2), эндотелин-преобразующего фермента (ECE1), аполипопротеидов A2, A4, A5, C3, B и H, ангиотензин-превращающего фермента 1 (ACE), молекулы сосудистой клеточной адгезии 1 (VCAM1) [30, 44, 49, 51, 52, 89, 146, 149, 163, 200, 201, 237, 238, 243, 255, 279-281, 299, 331, 334, 341, 349, 376, 423, 428, 454, 508, 581, 597]. С атеросклеротическими поражениями и сердечно-сосудистыми заболеваниями могут быть связаны определенные изоформы белков, участвующих в процессах коагуляции, фибринолиза, воспаления, активации эндотелия, а также пролиферации гладкомышечных клеток [30, 44, 49, 51, 52, 89, 133, 146, 149, 151, 152, 164, 190, 191, 192, 197, 200, 201, 203, 205, 208, 222, 227, 237, 238, 240, 241, 243, 244, 255, 258, 266, 273, 279-281, 299, 300, 302, 323, 334, 336, 338, 341, 343, 349, 352, 353, 359-363, 365, 374, 376, 379, 381, 404, 411, 420, 423, 426, 428, 435, 454, 459-462, 472, 484, 485, 487, 492, 508, 523-525, 539, 542, 557, 568, 581, 586, 588, 589, 597, 607]. Однако прогностическая и диагностическая значимость ядерных мутаций значительно ниже, чем у каждого отдельного традиционного фактора риска атеросклероза и ССЗ. Относительный риск каждой из известных мутаций, ассоциированных с атеросклерозом или ССЗ, составляет 1,06–1,40 [89]. Суммарный риск наличия сердечно-сосудистых заболеваний по известным мутациям ядерного генома составляет приблизительно 5% [89, 331].

Однако дефекты не только ядерного, но и митохондриального генома могут быть связаны с возникновением патогенетических процессов в организме человека. Согласно литературным источникам, некоторые заболевания человека (инфаркт миокарда, стеноз коронарных артерий, диабет, миопатия, глухота, кардиомиопатия) связаны с определенными мутациями мтДНК. Довольно часто эти заболевания у пациентов могут встречаться совместно с

атеросклерозом [25, 26, 28, 29, 31, 47-50, 89, 130, 161, 162, 207, 252, 287, 294, 330, 351, 358, 367-372, 377, 378, 382, 385, 392, 393, 402, 412, 413, 417, 424, 427, 430, 432, 439, 440, 451, 464, 465, 467, 471, 475, 481, 489, 491, 512, 516, 517, 521, 522, 540, 544, 546, 548, 551-553, 555, 556, 566, 570-572, 575, 583, 584, 601, 603, 605, 611–613].

Митохондриальная ДНК человека – кольцевая двухцепочечная молекула, содержащая тридцать семь генов, из которых два гена кодируют рибосомальные РНК, 22 гена кодируют транспортные РНК и 13 генов кодируют белковые субъединицы комплексов дыхательной цепи: NADH-дегидрогеназы, цитохрома В, цитохром-С-оксидазы, АТФазы. Каждая митохондрия содержит несколько копий генома, наследуемого по материнскому типу. Митохондриальный геном нестабилен, в нем нередко возникают, в течение жизни человека, соматические мутации. Пенетрантность мутаций митохондриального генома зависит, в основном, от уровня гетероплазмии (соотношения мутантных и нормальных копий митохондриального генома). Поэтому при анализе связи мутаций мтДНК с заболеваниями требуется количественная оценка уровня гетероплазмии данных мутаций [89].

Отметим, что в исследовательских работах ученых всего мира анализируются, в основном, мутации ядерного генома, ассоциированные с атеросклеротическими поражениями [30, 44, 49, 51, 52, 89, 146, 151, 152, 164, 181, 191, 197, 200, 201, 203, 204, 208, 222, 227, 236, 237, 241, 243, 249, 255, 256, 259, 273, 279-281, 299, 316, 331, 334, 336, 338, 341, 343, 349, 352, 353, 355, 359, 361-363, 365, 374, 376, 379, 381, 394, 420, 423, 426, 428, 439, 442, 454, 459-462, 470, 472, 484, 485, 487, 492, 508, 525, 539, 542, 557, 568, 573, 586, 588, 589, 597, 606, 607]. Анализ мутаций мтДНК, связанных с атеросклерозом, представлен лишь в нескольких исследованиях [89, 156, 173, 180, 201, 229, 358, 402, 413, 424, 430, 440, 472, 553, 556, 560, 576, 595, 601]. В них, в основном, исследовались крупные делеции, результатом которых была полная

дисфункция митохондриальной ДНК [89, 156, 180, 229, 358, 413, 553, 556, 560, 601].

В связи с этим особенно актуальным представляется исследование при атеросклеротических поражениях точечных мутаций, микроделеций и микроинсерций, локализованных в митохондриальных генах [25, 26, 28, 29, 31, 47-50, 89].

Цель исследования

Выяснение связи мутаций митохондриального генома с патогенетическими процессами, приводящими к атеросклеротическим изменениям сосудистой стенки человека.

Задачи исследования

1. Разработать количественный метод определения степени гетероплазии в образцах ДНК, основанный на пиросеквенировании коротких фрагментов митохондриальной ДНК.
2. На основе созданной коллекции образцов ДНК участков интимы аорты с различной степенью выраженности атеросклеротических поражений, полученных от индивидов, погибших в результате внезапной смерти или несчастного случая, изучить роль мутаций митохондриального генома в мозаичности атеросклеротических поражений интимы аорты человека.
3. На основе созданной коллекции образцов ДНК клеток крови гетерогенной группы участников исследования с различной степенью выраженности атеросклероза сонных артерий изучить связь мутаций митохондриального генома в мононуклеарных клетках крови с предрасположенностью к развитию атеросклеротических бляшек и утолщению интимо-медиального слоя сонных артерий человека.
4. Выявить гаплотипы митохондриального генома, ассоциированные с атеросклеротическими поражениями.

5.Идентифицировать популяционные митохондриальные гаплогруппы, ассоциированные с атеросклерозом

Научная новизна

Впервые разработан оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома.

Обнаружены три новые мутации митохондриального генома m.652delG, m.961delC и m.5132insAA, ранее не описанные в литературе.

Впервые в мире проведено исследование уровня гетероплазии митохондриальных мутаций в участках морфологически картированной интимы аорты человека. Для 11 митохондриальных мутаций обнаружены отличия в уровне гетероплазии для разных участков как нормальной, так и пораженной атеросклерозом сосудистой стенки, что подтвердило мозаичное расположение атеросклеротических поражений в интима артерий.

Обнаружены мутации митохондриального генома, характерные для разных типов атеросклеротического поражения, а также суммарного атеросклеротического поражения.

Впервые обнаружено, что митохондриальные мутации m.652delG, m.3336T>C, m.12315G>A, m.14459G>A, m.13513G>A и m.14846G>A в клетках крови связаны с наличием атеросклеротических бляшек в сонных артериях, а мутации m.12315G>A, m.15059G>A, m.13513G>A и m.14846G>A □ с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий.

Впервые установлено, что совокупная мутационная нагрузка по исследованным 11 митохондриальным мутациям ассоциирована с атеросклеротическими поражениями артерий.

Впервые выявлены два гаплотипа m.1555A>G-m.5178C>A-m.13513G>A и m.652delG-m.12315G>A-m.3256C>T, ассоциированные с атеросклерозом, которые обусловлены сцепленными между собой мутациями мтДНК.

Впервые обнаружено, что с атеросклеротическими поражениями связана гаплогруппа митохондриального генома U. При этом митохондриальные гаплогруппы M и T ассоциированы с отсутствием атеросклероза у людей.

Теоретическая значимость данной диссертационной работы заключается:

- 1) В выявлении трех новых мутаций митохондриального генома, ранее не описанных в литературе: m.652delG, m.961delC и m.5132insAA.
- 2) В установлении факта, что генетическая предрасположенность к атеросклерозу определяется суммарной нагрузкой митохондриального генома, обусловленной сочетанием мутаций, ассоциированных с атеросклерозом и мутаций, связанных с отсутствием атеросклеротических поражений. В частности, риск возникновения атеросклероза определяется суммарной мутационной нагрузкой точечных мутаций мтДНК m.652delG, m.5178C>A, m.15059G>A, m.3336T>C, m.12315G>A, m.3256C>T, m.14459G>A, m.13513G>A, m.652insG, m.14846G>A и m.1555G>A.
- 3) В выявлении трех гаплогрупп митохондриального генома, связанных с атеросклеротическими поражениями. При этом гаплогруппа U оказалась ассоциирована с атеросклерозом, а гаплогруппы M и T – с его отсутствием у индивидов.

Практическая значимость

Разработанный оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля может быть использован при исследовании мутаций и полиморфизмов как митохондриального, так и ядерного генома при различных патологиях человека. Предложенная схема исследования позволяет идентифицировать мутации, гаплотипы и гаплогруппы митохондриального генома, являющиеся возможной причиной клинической картины индивида. Данный методологический подход перспективен для массового скрининга людей, в

целях определения предрасположенности индивидов к атеросклеротическим поражениям, ранней диагностики и семейного анализа атеросклероза.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Выявлена мозаичность распределения митохондриальных мутаций в интиме аорты человека: обнаружены отличия в уровне гетероплазмии 11 мутаций для разных участков как нормальной, так и пораженной атеросклерозом морфологически картированной интимы аорт человека.

2. Суммарное атеросклеротическое поражение интимы аорт ассоциировано с мутациями митохондриального генома m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A, а мутация m.13513G>A достоверно чаще встречалась у условно здоровых участников исследования.

3. Для разных типов атеросклеротических поражений интимы аорт, таких как начальное поражение, липофиброзная и фиброзная бляшка, характерен различный набор мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом или связанных с отсутствием подобных поражений. Липофиброзные бляшки и начальное атеросклеротическое поражение интимы аорт связаны с мутациями m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A. В то же время мутация m.1555A>G связана с отсутствием начального и суммарного атеросклеротических поражений, а мутация m.14846G>A – с отсутствием липофиброзных бляшек. С фиброзными бляшками ассоциированы m.5178C>A и m.3256C>T. Мутация m.12315G>A связана с отсутствием фиброзных бляшек в интиме аорты.

4. Атеросклеротические бляшки сонных артерий ассоциированы с мутациями m.652delG, m.3336T>C, m.12315G>A и m.14459G>A. Мутации m.13513G>A и m.14846G>A связаны с отсутствием бляшек. Утолщение интимо-медиального слоя сонных артерий ассоциировано с однонуклеотидными заменами m.12315G>A и m.15059G>A. Мутации m.13513G>A и m.14846G>A связаны с отсутствием утолщения интимо-медиального слоя.

5. Генетическая предрасположенность к атеросклерозу определяется суммарной нагрузкой митохондриального генома, обусловленной сочетанием мутаций, ассоциированных с атеросклерозом и мутаций, связанных с отсутствием атеросклеротических поражений. Совокупная мутационная нагрузка по исследованным 11 митохондриальным мутациям оказалась связана как с атеросклеротическими бляшками, так и с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий.

6. Гаплотипы m.1555A>G-m.5178C>A-m.13513G>A и m.652delG-m.12315G>A-m.3256C>T ассоциированы с атеросклеротическими поражениями сонных артерий.

7. Гаплогруппа U связана с атеросклеротическими поражениями сонных артерий. Гаплогруппы M и T ассоциированы с отсутствием каротидного атеросклероза.

Личный вклад автора

Личный вклад автора диссертации составляет более 90% и заключается в том, что Сазоновой М.А. самостоятельно проведен подбор и анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Кроме того, автором самостоятельно выполнены экспериментальные исследования по определению уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома в образцах интимы аорты; гомогенатах аорт; стенках аорт, морфометрически разделенных на участки нормальной интимы и атеросклеротического поражения различной степени тяжести. Сазоновой М.А. была проведена детекция уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома в 700 образцах клеток крови, взятых у участников исследования из Московского региона, здоровых или имеющих клинические проявления атеросклероза. Диссертантом самостоятельно проведены математическая и статистическая обработка полученных данных, анализ и обобщение результатов. Сазонова М.А. самостоятельно написала текст диссертации, а также подготовила публикации по теме диссертации.

Вместе с тем, в диссертации использованы данные, полученные и опубликованные в соавторстве с сотрудниками лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «НИИ Общей патологии и патофизиологии» Желанкиным А.В. и Чичёвой М.М. Электронно-микроскопические исследования морфологии митохондрий были выполнены при научном консультировании д.б.н. Бобрышева Ю.В. Исследование гаплогрупп митохондриального генома было проведено совместно с сотрудниками лаборатории популяционной генетики ФГБНУ «Медико-Генетический Научный Центр» Балановской Е.В. и Балановским О.П. В общей сложности, доля совместных исследований в диссертационной работе автора составила менее 10%.

Исследование в части диссертационной работы Сазоновой М.А. 3.8.4-6 выполнялось при поддержке Министерства образования и науки РФ (проект RFMEFI61314X0006, соглашение 14.613.21.0006).

Публикации

Основные результаты исследования опубликованы в 91 научной работе, из которых 35 статей и 16 тезисов опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в список ВАК Российской Федерации. Двадцать три опубликованные статьи цитируются РИНЦ. Восемнадцать статей и 16 тезисов опубликованы в зарубежных журналах, цитируемых Web of Science и Scopus, двадцать пять из них имеют импакт-фактор от 2,239 до 4,593. По результатам данной работы поданы 2 патентных заявки и опубликована монография.

Индекс Хирша диссертанта составляет 7,0 по базе «Scopus» и 9,0 по базе РИНЦ.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования планируется использовать для разработки тест-системы, необходимой для диагностики предрасположенности

к атеросклерозу, ранней генодиагностики и семейного анализа данной патологии. Кроме того, они могут быть полезны при создании молекулярно-клеточных и генно-инженерных моделей, необходимых для разработки подходов к лекарственной терапии атеросклероза.

Апробация диссертации

Результаты диссертации были доложены на 76-85 Европейских конгрессах по изучению атеросклероза (EAS) 2007-2017 годов; VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010»; международной телеконференции «Фундаментальные науки и практика», 2010 г.; XV Российском VII Всероссийской научно-практической конференции с международным национальным конгрессе «Человек и лекарство»; международной телеконференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине» 2011 г.; Пятой Международной научно-практической конференции с элементами научной школы для молодых ученых, аспирантов, магистрантов и студентов "Инновации и человек" (Актуальные инновационные вопросы в медицине, биологии, экологии, психологии, педагогике и социологии), 2014 г., Турция, Анталья; Итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы»; Десятой Международной научно-практической конференции «Стратегические вопросы мировой науки», 2014 г., Перемышль, Польша; Десятой научно-практической конференции "Перспективные научные исследования-2014", 2014 г., София, Болгария; Всероссийской научно-практической конференции по патологической анатомии, посвященной 155-летию кафедры патологической анатомии ВМедА 2014 г.; международной телеконференции «Актуальные проблемы современной науки» 2012 г.; 61-ой Международной конференции Израильского Общества Сердца

ассоциированного с Израильским Обществом Кардиоторакальной Хирургии, 2014 г., Тель Авив (Устный Доклад); Десятом Азиатском Тихоокеанском Конгрессе по гипертонии, 2014 г., Себу, Филиппины; Третьей конференции по воспалительным и иммунологическим маркерам, 2014 г., Сан Диего, США; международной телеконференции «Современный мир, природа и человек» 2011 г.; Второй Международной конференции «Сердце и Мозг», 2014 г., Париж, Франция; Третьем Всемирном Биотехнологическом Конгрессе, 2014 г., Дубай, ОАЭ, (Устный доклад (Лекция)); международной телеконференции «Проблемы и перспективы современной науки» 2011 г.; Пятом Всемирном Конгрессе по исследованию митохондрий, 2014 г., Берлин, Германия (Устный доклад); Третьей Международной конференции «Геномика и Фармакогеномика» («Геномика-2015»), 2015 г., Сан Антонио, США (Устный доклад), IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика -2017».

Апробация диссертации состоялась в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», на заседании межлабораторной конференции, протокол №1 от 25 апреля 2018 года.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 350 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение и выводы. Библиографический список литературы содержит 615 источников. Иллюстрации к тексту представлены 80 таблицами и 51 рисунком.

В главах диссертации «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение» автор ссылается на собственные опубликованные статьи, содержащие экспериментальные данные по теме диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Медицинские и социальные аспекты атеросклероза

Атеросклероз является полигенным мультифакториальным заболеванием, одной из наиболее грозных патологий 21 века. Спектр патологий, сопутствующих атеросклеротическим поражениям, включает в себя такие сердечно-сосудистые заболевания, как ишемическая болезнь сердца, фибрилляция предсердий, гипертрофическая кардиомиопатия, хроническая сердечная недостаточность, а также метаболические расстройства генерализованного характера, такие как диабет, клиническое ожирение, астма и т.д. [5-9, 17, 34, 35, 38, 43, 46-51, 53-56, 60, 61, 65, 67, 68, 70, 71, 79, 80, 89, 117, 122, 127, 135, 139, 140, 143, 148, 162, 166, 169, 171, 175, 181, 186, 196, 201, 203, 206, 210, 217, 235, 237, 243, 247, 253, 258, 259, 268, 270, 274, 281, 285, 295, 317, 324, 326, 332, 341, 360, 383, 395, 398, 401, 402, 406, 407, 410, 416, 425, 433, 440, 457, 460, 472, 478, 485, 507, 513, 573, 597, 607]. Данные заболевания считаются факторами риска атеросклероза [89].

В России сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают одно из первых мест в возникновении инвалидности, а также смерти, в том числе, внезапной, а также ведут к многократному увеличению расходов на медицину [53, 80, 81. 89, 122]. Раннее определение предрасположенности к возникновению атеросклероза и его факторов риска может помочь при их эффективной профилактике, что будет способствовать уменьшению смертности и снизит расходы на здравоохранение [53, 80, 81. 89, 122].

Следует отметить, что в России 53,5% смертельных случаев вызваны сердечно-сосудистыми заболеваниями. Около половины из случаев смерти от ССЗ приходится на ИБС, 36% – на острое нарушение мозгового кровообращения, 7% – на атеросклероз нижних конечностей и 5% – на острый инфаркт миокарда. С помощью морфологических исследований было

установлено, что атеросклеротические поражения артерий являются основной смертности от ССЗ [5-8, 17, 18, 53, 60, 68, 80, 81, 89, 122, 244, 274]. В Российской Федерации ежегодная общая смертность составляет, приблизительно, 1300000 человек в год. Значительная доля от этого количества вызвана смертью от атеросклероза и его факторов риска [53, 80, 81, 89, 274]. При этом стандартизованная сердечно-сосудистая смертность в России равна 375 случаям на 100000 человек, в то время как в Финляндии и Швеции – в два и три раза ниже (соответственно). В наиболее благополучной, в этом отношении, Франции, стандартизованная сердечно-сосудистая смертность равна 49 случаям из 100000 [274]. Однако клинических и биохимических методов терапии атеросклероза, для лечения и предельного предрасположенности к атеросклерозу, оказалось недостаточно. В частности, алгоритм оценки риска острого инфаркта миокарда, который учитывал совокупное влияние всех известных клинических, биохимических факторов риска и факторов среды, оказался в состоянии объяснить лишь 70% случаев инфаркта миокарда [322]. 30% подобных случаев оказались не связанными с данными факторами риска. Недостаточное количество выявленных биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний может быть одной из причин такого положения [89].

В сосудистой системе человека атеросклероз прогрессирует с различной скоростью. Самым вероятным районом для развития раннего атеросклероза является аорта [18-20, 80, 81, 89, 122, 157, 162, 169, 208, 210, 235, 262, 268, 272, 388, 389, 405, 408, 433, 449, 567, 577]. В научных статьях, посвященных исследованию жертв военных действий, было показано, что начальные атеросклеротические поражения, например, жировые полосы, встречаются в аорте даже у подростков и юношей [399] и в многоцентровом исследовании PDAY [408, 486]. Среди людей пожилого возраста частота атеросклероза артерий может достигать 100% [157, 169, 246, 328, 405, 433, 523, 543, 567, 568].

Вследствие этого системное изучение атеросклероза представляет собой одну из актуальнейших научных задач [89].

Атеросклероз труднораспознаваем на начальных стадиях возникновения и развития заболевания. Представляется необходимым детальное изучение патогенетических механизмов данного заболевания, а также молекулярно-генетических маркеров, являющихся ранними предикторами атеросклеротических поражений [89].

1.2 Патогенез атеросклероза

1.2.1 Общие сведения об атеросклерозе

В 1965 году А.Л. Мясников определил атеросклероз, как патологический процесс, в основе которого лежит липоидоз, или «отложение липидов, главным образом холестерина, в интима артерий эластического типа – с последующим образованием соединительнотканых очаговых уплотнений – бляшек» [52]. При этом для атеросклероза характерно хроническое очаговое поражение артерий [1-3, 5-9, 15, 17, 21, 24, 38, 53, 55, 57, 58, 60, 61, 67, 68, 80, 81, 89, 122]. Кроме того, фактором риска возникновения атеросклеротических поражений может быть гиперхолестеринемия [64, 89, 247, 253, 345, 417, 543, 545]. Холестерин циркулирует в кровеносном русле сосудов в связанном с белками и другими липидами (триглицеридами, фосфолипидами) состоянии, то есть в виде комплексов, которые называются липопротеидами. При этом две группы – липопротеиды очень низкой плотности (ЛНВП) и липопротеиды низкой плотности (ЛНП), активно переносят холестерин из кровотока в сосудистые ткани [53, 80, 81, 85, 89, 122]. Они могут участвовать в атерогенезе [89].

Вследствие возникновения атеросклеротической бляшки происходит стеноз сосуда. При этом уменьшается кровоток. Могут возникать его завихрения. Последствием этого может быть тромбоз артерии, хроническая недостаточность кровоснабжения обслуживаемого органа [53, 80, 81, 89, 122]. Следует подчеркнуть, что при стрессе может возникнуть инфаркт или инсульт

из-за недостатка кровотока в артерии, имеющей атеросклеротические поражения. При этом образование тромба не является обязательным условием подобных событий. Еще одной причиной инсульта или инфаркта является наличие в кровотоке кусочков распадающейся атеросклеротической бляшки (т.е. при эмболии) и последующая закупорка данными кусочками мелких артерий [53, 80, 81, 89, 122].

Диагноз атеросклероза ставится при наличии следующих параметров [53, 80, 81, 89, 122]:

- 1) Атеросклеротические поражения сосудов.
- 2) Выявление в крови повышенного уровня холестерина.
- 3) Детекция повышенного уровня жиров – предшественников холестерина (триглицеридов).
- 4) Дисбаланс фракций белков, транспортирующих жиры и холестерин.

Следует отметить, что бессимптомный или субклинический атеросклероз распространен достаточно широко. При этом атеросклероз артерий обнаружен даже у достаточно молодых людей. Данная патология прогрессирует в течение длительного времени, порой, десятилетиями, прежде чем приводит к возникновению клинических проявлений [18–20, 53, 54, 80, 81, 89, 122, 157, 162, 169, 208, 210, 235, 262, 268, 272, 342, 388, 389, 405, 408, 427, 433, 449, 567, 537, 577]. Обращает на себя внимание, что частота выявления атеросклеротических поражений сосудов в среднем и пожилом возрасте у индивидов без клинических проявлений атеросклероза приближается к 100% [53, 54, 80, 81, 89, 122, 157, 171, 246, 328, 342, 405, 427, 433, 523, 537, 543, 567, 568].

Вследствие того, что атеросклероз обнаруживается у большинства мужчин после 40 лет и женщин после 50 лет, большое внимание следует уделять профилактике и своевременному лечению данной патологии [89].

Атеросклеротический процесс чаще всего возникает в крупных и средних артериях мышечного типа [6–9, 17–20, 67, 68, 80, 81, 89, 122, 118, 260, 261,

486]. Все основные слои сосудистой стенки вовлечены в возникновение и развитие атеросклероза [3, 5, 8, 17, 18, 80, 81, 89, 122], поэтому представляется необходимым рассмотреть морфологическое строение артерии.

1.2.2 Строение стенки нормальной артерии

Крупные артерии человека по типу строения подразделяют на 2 подтипа - мышечные (например, артерии внутренних органов и поперечнополосатой мускулатуры) и эластические (наиболее крупные из артерий, например, аорта). Некоторые артерии относятся к мышечно-эластическому подтипу (например, подключичная и сонная) [89].

План строения нормальной сосудистой стенки продемонстрирован на рисунке 1 [53, 80, 81, 89, 122, 307].

Артерия мышечного типа имеет три оболочки [53, 80, 81, 89, 122, 261, 307]. Внутренняя оболочка, или интима, состоит из эндотелия, подэндотелиального слоя и внутренней эластической мембраны. Поверхность здорового эндотелия имеет антитромбогенные и антиадгезивные свойства. Эндотелий синтезирует и секретирует определенные регуляторные соединения, которые необходимы для нормального функционирования тканей сосуда. Средняя оболочка называется «медия». Состоит данная оболочка из гладких миоцитов, расположенных по спирали. При сокращении миоцитов происходит уменьшение просвета сосуда. Таким образом, они поддерживают кровяное давление и обеспечивают проталкивание крови в дистальные отделы. Эндотелин, оксид азота и некоторые простагландины являются основными эффекторами данной функции сосудистой стенки. Между гладкими миоцитами находится небольшое количество эластических волокон. Адвентиция (наружная оболочка артерии) состоит из рыхлой соединительной ткани, пронизанной кровеносными сосудами и нервными волокнами. Спаданию артерий препятствуют вышеупомянутые эластический каркас, эластические волокна и

эластические пограничные мембраны. Это обеспечивает непрерывность кровотока в сосудах [89].

Внутренняя эластическая мембрана отделяет интиму от меди, а наружная – адвентицию от меди [89].

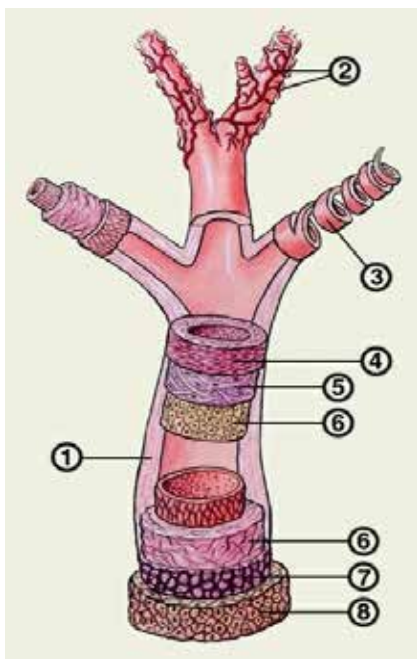


Рисунок 1 . Схема строения сосудистой стенки нормальной артерии [53, 80, 81, 89, 122, 261, 307]:

1. Нормальная артерия;
2. Сосуды, находящиеся в сосудистой стенке;
3. Спиральное расположение мышечных тяжей стенке артерии;
4. Медия;
5. Внутренняя эластическая мембрана;
6. Интима;
7. Наружная эластическая мембрана;
8. Адвентиция.

Из трех оболочек состоит и стенка артерии эластического типа. Интима такой артерии представлена эндотелием и подэндотелиальным слоем с тонкофибриллярной соединительной тканью, в которой много

гликозаминогликанов и фосфолипидов. В толстом подэндотелиальном слое содержится большое количество малодифференцированных звездчатых клеток. Можно видеть плотное сплетение эластических волокон на границе с медией. Средняя оболочка достаточно широкая, имеет большое количество эластических волокон и пластических окончатых мембран. В комплексе эластические волокна всех трех оболочек представляют собой эластический каркас, который поддерживает сосудистый тонус в период диастолы и смягчает толчки крови в период систолы. Артерия эластического типа лишена наружной эластической мембраны. В адвентиции находятся коллагеновые и эластические волокна, нервные стволы и сосуды сосудистой стенки [89].

1.2.3 Воззрения на проблему атеросклероза

Атеросклероз является системным заболеванием сердечно-сосудистой системы, вследствие чего необходимы четкие представления об этиологии, пато- и морфогенезе, а также генетических аспектах данной патологии. Это необходимо для разработки методов профилактики и лечения данного заболевания [53, 80, 81, 89, 122, 261, 307].

Первыми зарубежными исследователями, представившими гипотезы возникновения и развития атеросклероза являются Вирхов Р., Рокитанский С. [473] и Ашофф Л. [148]. Ross R. и Glomset J.A. пытались объяснить возникновение и развитие атеросклероза, как результат повреждения эндотелия [477]. Goldstein J.L. и Brown M.S. видели причину атерогенеза в дисфункции рецепторов к ЛПНП [275, 276]. Benditt E.P. предполагал, что данное заболевание вызывается моноклональной пролиферацией гладкомышечных клеток [89, 165, 166].

В отечественной науке основоположниками, выдвинувшими гипотезы возникновения и развития атеросклероза были выдающиеся отечественные ученые Аничков Н.Н. [6–9], Климов А.Н. [33–40] и Нагорнев В.А. [56–79, 429]. Широко известны и другие работы российских ученых, занимавшихся

данной проблемой [1–5, 18-23, 89, 106, 107, 154–156, 160], В течение последних десятилетий интерес к изучению механизмов атерогенеза существенно вырос. Об этом свидетельствует большое количество публикаций на эту тему [53, 54, 80, 81, 89, 102, 342, 427, 537]. Появились авторитетные научные журналы, посвященные исключительно атерогенезу (*Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Atherosclerosis; International Journal of Atherosclerosis; Hellenic Journal of Atherosclerosis; SM Atherosclerosis Journal*) [308-310]. Среди известных российских журналов можно указать такой, как «Атеросклероз и дислипидемии» [89].

Разумеется, в одной работе отсутствует возможность описать все аспекты такого мультифакториального, полигенного заболевания, как атеросклероз. Поэтому в настоящем обзоре литературы, посвященном структурно-функциональным и молекулярно-генетическим аспектам атеросклероза, будут проанализированы ключевые публикации по данной тематике. Кроме того, будет проведено краткое рассмотрение основных гипотез патогенеза атеросклероза [89].

1.2.4 Гипотезы патогенеза атеросклероза

Согласно определению Всемирной Организации Здравоохранения (1958), «атеросклероз - это переменная комбинация изменений в интиме артерий (в отличие от артериол), состоящая из очагового накопления липидов, сложных углеводов, крови и кровяных веществ, фиброзной ткани и кальциевых отложений и связанная с изменениями в меди» [53, 54, 80, 81, 89, 122, 314, 342, 427, 537]. К сожалению, данное определение отражает только морфологическую сущность атеросклероза, не затрагивая патогенетические аспекты заболевания [89].

В настоящее время имеется большое количество публикаций, посвященных клиническим и биохимическим аспектам атеросклероза, однако морфологические изменения, происходящие в атеросклеротических

поражениях, мало изучены. Особенно это касается ранних форм атеросклероза. Атеросклеротические модели, полученные на мышах и крысах, не дают достоверной картины, в связи с отсутствием атеросклероза у этих животных в дикой природе. Поэтому у них может быть смещена или полностью извращена реально существующая последовательность развития заболевания. Все это свидетельствует о том, что необходимо расширить существующие и искать новые подходы к исследованию материала, полученного при аутопсии аорт, в особенности, от молодых индивидов [89]. Как писал Аничков Н.Н., «особенно тщательно должны быть исследованы ранние стадии заболевания, так как от их выявления во многом зависит правильность представлений о морфогенезе, патогенезе и сущности заболевания» [6].

Ранние формы атеросклероза были исследованы несколькими научными группами. Однако ученые не смогли прийти к единодушному мнению и трактовали свои данные по-разному. Например, Velican C. и Velican D. обнаружили у детей липидные полосы и фиброзные бляшки [576, 577]. Ross R. подтвердил их данные, трактуя липидные полосы как ранние атеросклеротические поражения. Он полагал, что данный тип поражений в дальнейшем превращается в фиброзные бляшки [476-479]. Это подтвердили исследования его научной группы, полученные при изучении приматов, в пищу которых добавляли холестерин, а затем изучали возникновение атеросклеротических поражений в их артериях [247]. Однако McMahan C.A. с сотр. отметил, что дети моложе десяти лет могут иметь липидные полосы, которые занимают более, чем десять процентов интимы артерии. Они находятся обычно там, где фиброзные бляшки обнаруживаются не часто [89, 408, 409]. Некоторые известные ученые в области атеросклероза, такие как Вихерт А.М. и Жданов В.С., рассматривали очаги желатинозного набухания и ритмические структуры интимы в качестве ранних предатеросклеротических поражений сосудов индивидов [17, 18, 20, 21, 24, 127].

Ранние атеросклеротические поражения встречаются в виде трех основных форм [176, 177]:

- 1) фокального отека интимы артерий, обнаруживающегося в виде желатинозного набухания;
- 2) локальных липидных скоплений, видимых как зеленоватые пятна и полосы;
- 2) пристеночных микротромбов.

Woson с сотр. предположили, что данные формы могут впоследствии превратиться в фиброзные бляшки [176, 177].

Т.к. данные воззрения до сих пор не получили достоверного подтверждения или опровержения, до настоящего времени отсутствуют общепризнанные представления о возникновении ранних атеросклеротических поражений в артериях человека.

С помощью современных компьютерных программ было проведено картирование зон атеросклеротического поражения, которое позволило выявить ассоциацию топографии атеросклеротических поражений со степенью их выраженности [218–220]. В артериях были обнаружены зоны с особой предрасположенностью к поражению (ПП) атеросклерозом [218, 549]. Зоны ПП значительно отличались по степени поражения и его площади от соседних зон, резистентных к поражению (РП) атеросклерозом [218]. В частности, ПП-зоны грудного отдела аорты обычно были локализованы на ее задней стенке, а РП-зоны - на передней стенке [172, 218]. Отмечено, что липидные полосы в ПП-зонах детей, по мере их взросления, могут замещаться на липофиброзные и фиброзные бляшки [218, 220]. Bhagwat A.G. и Roberstson A.L. обнаружили, что, в отличие от в ПП-зон, в которых атеросклеротические поражения могут наблюдаться у детей и подростков, в РП-зонах сосудистая стенка может оставаться здоровой до 40 лет [172]. Ряд ученых считает, что при сравнении ПП-зон и РП-зон у индивидов разных возрастных групп можно выявить, чем отличается строение и клеточный состав стенки артерии при начальной и других, более поздних стадиях, развития атеросклеротических поражений [172, 218–220].

В настоящее время существует большое количество теорий и гипотез атерогенеза, основные из которых объединяют в две главные концепции. Одна

из данных концепций в качестве причины возникновения атеросклероза выдвигает липопропротеиды и такие белки, как фибриноген плазмы крови и иммуноглобулины («теории плазменной концепции»). Вторая из данных концепций объединяет гипотезы, в которых причиной возникновения атеросклеротических поражений считаются дефекты стенки артерии (клеточные, соединительнотканые и др.), которые образуются при воздействии факторов внутренней и внешней среды («гипотезы сосудистой концепции») [33–36].

Инфильтрационная гипотеза, разработанная Аничковым Н.Н. и его учениками, получила наиболее широкое признание [33–40, 62, 63]. Согласно данной гипотезе, значительная часть энергии, необходимой артериальной стенке, в том числе, ее структур, лишенных сосудов (всей интимы и части меди) восстанавливается с помощью липидов, содержащихся в плазме крови. В норме липиды, проникают сквозь интиму в адвентицию свободно, вовлекаясь в метаболизм клеток. «Излишки» липидов удаляются с помощью лимфатической системы. При повышении уровня липидов происходит их накопление, результатом которого является липоидоз сосудистой стенки, являющийся ранним и постоянным признаком атеросклеротического поражения [33–40, 62, 63]. Сходство по составу липопропротеидов низкой плотности (ЛПНП) крови наводит на мысль, что они могут быть возможным источником липидов, проникающих в стенки сосудов [41, 42, 315]. В качестве подтверждения данной гипотезы можно привести иммуноморфологические исследования, с помощью которых был обнаружен апопротеин В (основной белок ЛПНП) в жировых отложениях сосудов [41, 42]. Эпидемиологические исследования подтвердили эти данные, выявив корреляцию уровня ЛПНП крови со степенью атеросклеротического поражения [41, 42].

Однако с инфильтрационной гипотезой были согласны не все ученые, работающие над изучением проблемы возникновения и развития атеросклероза, т.к. она не давала ответа на следующие вопросы [89]:

1) Почему атеросклерозом не поражаются вены, т.к. его обнаруживают только в артериях?

2) Почему атеросклероз возникает локально?

3) Почему данная патология характерна, прежде всего, для пожилых индивидов?

4) Почему у некоторых людей атеросклеротические поражения возникают при низком уровне холестерина в крови?

В связи с необходимостью ответов на поставленные вопросы, возникли альтернативные гипотезы, в том числе «гипотеза повреждения эндотелия» [476–479]. Основной причиной развития атеросклеротических поражений в ней считаются дефекты эндотелиального монослоя, вызванные определенными веществами. Другой альтернативной гипотезой является «моноклональная», которая была разработана Benditt E.P. [165–167]. Исходя из того, что в пораженной атеросклерозом ткани происходит повышенное пролиферирование ГМК и обнаруживается повышенное количество эластина и коллагена, а также самой атеросклеротической бляшки [165–167], ученый сделал вывод, что бляшки могут представлять своеобразную доброкачественную опухоль, которая может расти и увеличиваться в размерах [165–167]. Согласно гипотезе Benditt E.P., при воздействии мутагена или вируса гладкомышечные клетки могут подвергнуться мутационным изменениям. Комплекс таких изменений принято называть «подпороговым неопластическим состоянием» [89, 165–167]. В этом состоянии клетки могут находиться много лет. Однако, в определенный момент, при воздействии определенных факторов, к которым Benditt E.P. относит гипертензию и гиперхолестеринемию, одна из клеток вдруг приобретает большую скорость пролиферации, по сравнению с соседними клетками. При этом возникают атеросклеротические бляшки, имеющие моноклональный набор клеток [89, 165–167].

Нагорнев В.А., Саркисов Д.С. и Аничков Н.Н. с сотр. рассматривали атеросклероз как иммунное воспаление [56-79, 117, 118]. Аутоиммунная

гипотеза разрабатывалась во второй половине прошлого века Климовым с сотр. [33, 35–40]. К настоящему времени сторонникам данной теории удалось выяснить, что стенки артерий подвергаются иммунному надзору, наравне с другими тканями организма человека [60, 61, 81, 82]. Установлены аутоантигены, ассоциированные с атеросклерозом, в том числе белки теплового шока и модифицированные липопротеиды низкой плотности [23, 81, 82, 344, 345].

Кроме того, в возникновении и развитии атеросклероза участвует ряд семейств молекул воспаления, включая цитокины, белки острой фазы воспаления, интегрины, клеточные рецепторы, а также селектины [60, 61]. При этом цитокины могут оказывать как проатерогенный, так и антиатерогенный эффект [60, 61, 295, 296, 373]. Ключевым моментом возникновения атеросклероза является соотношение провоспалительных и противовоспалительных факторов [60, 61]. Атерогенными факторами являются интерлейкины (IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-18), E-селектин, хемоаттрактантный протеин макрофагов, C-реактивный белок, эндотоксин, продукты деградации липоксигеназы, фактор некроза опухоли, лейкотриены [60, 61, 290, 291, 295, 296, 364, 373] и т.д. Проатерогенными, являются, например, IL-10, IL-4, TGF β (трансформирующий ростовой фактор) и PDGF (фактор роста тромбоцитов) [295, 296, 373].

Модифицированные липопротеиды, в частности, окисленные, обладают наиболее выраженными провоспалительными свойствами. Окисленные ЛПНП индуцируют в бляшке локальный иммунный ответ, являясь аутоантигенами. Большинство Т-клеток, инфильтрирующих атеросклеротическую бляшку, специфически активированы против модифицированных липопротеидов низкой плотности [296]. Данные ЛПНП могут принимать участие в дестабилизации атеросклеротических бляшек, т.к. у них есть возможность стимулировать апоптоз [333, 348, 357, 453]. При этом защитные механизмы элиминации модифицированных ЛПНП (связывание с антителами или сквенджер-рецепторами) оказываются нарушенными [275, 276, 476].

Белки теплового шока также имеют большое значение при атерогенезе [60, 61, 174, 592]. При стрессе в клетках обнаружен высокий уровень шаперонов. Большая роль в атерогенезе принадлежит шаперону HSP60 [60, 61, 592], выявляемому в атеросклеротических бляшках, где он индуцирует реакцию иммунного воспаления [60, 61, 174, 592]. Для антител или Т-клеток, циркулирующих в крови и являющихся специфичными к HSP60, могут быть мишенями клетки, находящиеся в атеросклеротических поражениях интимы артерий [89].

Еще одна гипотеза «антигенной мимикрии» рассматривает влияние *Chlamydia pneumoniae*, которые содержат шаперон HSP60, на возникновение атеросклероза [72, 74-76, 128, 188, 209, 223, 356, 366, 386]. Данная гипотеза гласит, что при появлении специфических антител к HSP хламидий может произойти реакция с собственными HSP, имеющими гомологию с инфекционными [592].

1.2.4.1 Роль эндотелия в атеросклерозе

Следует отметить, что во всех гипотезах возникновения и развития атеросклероза рассматривают эндотелий в качестве важного звена атерогенеза [21, 64, 80, 81, 89, 102, 147, 149, 182, 184, 210, 216, 246, 249, 256, 332, 411, 415, 416, 441, 476, 507, 515, 518, 569, 574]. Локальное расположение атеросклеротических поражений, наличие разных стадий поражения на соседних участках артериальной стенки может свидетельствовать о важной роли интимы сосудов в возникновении отложений липидов, и, в том числе, – в дисфункции эндотелия при атеросклерозе [53, 80, 81, 89, 122].

Согласно одной из данных гипотез, перед развитием атеросклеротических поражений возникает первичное повреждение покрова эндотелия, которое обусловлено адгезией тромбоцитов, а также возникновением на его поверхности локальных дефектов [216, 217, 260, 415, 416, 545]. В гипотезе «ответа на повреждение» подчеркивается, что имеется много общего между

реакцией сосудистой стенки на повреждение, вызванной различными факторами, и возникновением атеросклероза [476, 477, 479]. Наличие структурных повреждений в эндотелиальном монослое, выстилающем атеросклеротические бляшки, позволило предположить, что необходимое условие атерогенеза – повреждение эндотелия [216, 217, 260, 415, 416, 545]. Согласно одной из оригинальных версий гипотезы “ответа на повреждение”, в тех местах интимы, где эндотелий отсутствует, может проявляться митогенный эффект фактора роста тромбоцитов, который выделяется при адгезии тромбоцитов к оголенной интимае сосудов. Это приводит к более высокой пролиферации эндотелия, который окружает очаг повреждения, и ГМК [476, 479].

Суммируя данные, полученные об эндотелии к настоящему времени, можно сделать вывод о том, что эндотелий представляет собой компактный монослой, имеющий многочисленные функции, с помощью которых избирательно регулируется проницаемость и питание слоев интимы, не имеющей своих сосудов. Кроме того, данными функциями являются адаптация к окружающей среде, например, к таким ее факторам, как состав плазмы крови или морфологическое изменение интимы и сохранение целостности эндотелия [80, 81, 89, 122].

Изучение механизмов проницаемости эндотелия в артериях, и, прежде всего, проницаемости атерогенных липопротеидов, представляет особый интерес. Согласно Климову А.Н. и Нагорневу В.А. именно взаимодействие артериальной стенки с липопротеидами плазмы крови является определяющим фактором для возникновения атеросклероза [33-42, 56-79, 216, 320, 321, 429]. Эти выдающиеся ученые подчеркивают важную роль сосудистой стенки в атерогенезе, считая, что только наличия дислипидемии для этого недостаточно. Таким образом, эндотелию отводится большая роль при иммунном воспалении, т.к. он осуществляет секрецию факторов, которые влияют на адгезию и проникновение клеток иммунитета в интиму артерий иммунных клеток [80, 81, 89, 102, 518, 574].

1.2.4.2 Роль моноцитов-макрофагов в возникновении атеросклеротических поражений

В последнее время начала активно изучаться роль моноцитов-макрофагов в возникновении атеросклероза [80, 81, 89, 122, 282, 283, 418, 429, 510, 511, 604]. В обзорных статьях на эту тему анализируется синтез данными клетками различных факторов; исследуется рецепторный аппарат моноцитов-макрофагов; выясняется, каким образом они взаимодействуют с липопротеидами [11, 80, 81, 89, 122, 282, 283, 510, 511, 604].

Созданы экспериментальные животные модели, в которых, в качестве подопытных животных, были использованы кролики, свиньи, крысы и обезьяны. В этих моделях проводили эксперименты по инфильтрации сосудов с помощью моноцитов-макрофагов [11, 57, 264, 265, 476]. Согласно результатам экспериментов, было выявлено большое количество моноцитов прямо под эндотелием, а макрофагов (которые считаются более зрелыми клетками, чем моноциты) – в более глубоком слое интимы. На луминальной поверхности артерий зафиксирована адгезия моноцитов [11, 282, 283, 429, 604].

Проведены исследования возрастной динамики возникновения атеросклеротических поражений в различных участках артерий, с использованием планиметрического метода [476]. Было обнаружено, что атеросклеротические поражения преимущественно локализуются в определенных участках артерий. Ученые считают, что это происходит из-за повреждающего действия гемодинамических факторов [225, 226, 270, 418, 510]. Последствием данного воздействия является синтез эндотелиальными клетками макрофагального хемореактивного фактора. При этом в интима артерий начинают накапливаться моноциты-макрофаги и возникают атеросклеротические поражения [171, 476, 549, 604].

Рассматривая вклад макрофагов в атерогенез, большое внимание уделяют активному поглощению макрофагами липидов и, впоследствии, образованию из макрофагов пенных клеток. Результаты ряда исследовательских групп

подтверждают, что пенистые клетки возникли именно из макрофагов [171, 476, 510, 511, 604].

Макрофаги секретируют активные вещества, участвующие в атерогенезе [41, 225, 270, 418, 510]. Фенотип моноцитов-макрофагов может указать на то, какие именно из активных веществ синтезируются данными клетками [270, 418, 510]. Нагорнев В.А., Gordon S., а также Yan Z.Q. и Hansson G.K. обнаружили различия в уровне экспрессии антигенных детерминант поверхности макрофагов из разных тканей, или даже из одной и той же ткани [283, 429, 604]. Кроме того, были выявлены функциональные отличия между моноцитами крови и моноцитами-макрофагами атеросклеротических бляшек [277, 417, 604]. Обнаружена ультраструктурная вариабельность моноцитов-макрофагов из сосудистой стенки. Это может говорить о различной специализации данных клеток. Возможно, такие моноциты-макрофаги вносят разный вклад в атерогенез [41, 225, 270, 418, 510]. Полагают, что моноцитами-макрофагами поглощаются и катаболизируются белки. Впоследствии эти клетки экспрессируют на своей поверхности короткие фрагменты данных пептидов, которые, с помощью белков активации, предназначенных для рецепторного связывания, передают Т-лимфоцитам [41, 225, 270, 418, 510].

1.2.4.3 Вовлеченность гладкомышечных клеток в атерогенез

Исследователи проблемы атеросклероза постоянно пытаются выявить структурно-функциональные отличия нормальных и пораженных атеросклерозом гладкомышечных клеток интимы артерий [89]. Ряд исследовательских групп обнаружили в клетках из атеросклеротических поражений человека и животных уменьшение или полное отсутствие миофиламентов, в отличие от нормальных ГМК [178, 187, 274, 450, 452]. При этом в пораженных клетках был хорошо развит аппарат Гольджи, в отличие от здоровых клеток. Пораженные атеросклерозом клетки с такими структурными особенностями назвали “модифицированными”, “секреторными” или

“активированными” ГМК. Также их называют «фиброцитами» или “фибробластоподобными клетками” [187, 189, 194, 347, 450, 452]. Отмечено спонтанное изменение «сократительного» фенотипа клеток ГМК артерий на «синтетический» в первичной культуре [187, 189, 194]. При такой фенотипической модуляции происходит ультраструктурная перестройка ГМК [194]. Например, хорошо развитый эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи замещали миофиламенты [187, 189, 194]. Также изменялся уровень экспрессии белков, входящих в состав цитоскелета и сократительного аппарата [187, 189, 194].

Полагают, что именно переходом ГМК в “секреторный” фенотип, при котором наблюдается повышенная пролиферация клеток и гиперпродукция волокон соединительной ткани, и можно объяснить утолщение интимы артерий и образование атеросклеротических бляшек [189, 194, 347, 450, 452]. В качестве подтверждения данной гипотезы пока приводятся всего лишь отличия между нормальными и пораженными атеросклерозом клетками по уровню экспрессии некоторых белков. Данные белки, уровень экспрессии которых повышается или понижается при изменении фенотипа, называются маркерами модуляции. К ним относятся такие белки, как миозин, десмин, актин и виментин [10, 12, 233, 300, 538].

Стереометрический анализ ультраструктуры ГМК из атеросклеротического поражения показал, что относительный объем миофиламентов в интимальном слое, прилежащем к атеросклеротической бляшке, в 1,5 раза меньше, чем в слое меди, в отличие от ГМК из нормальной сосудистой ткани, где эти показатели, приблизительно равны [187].

В участках атеросклеротического поражения артерий обнаружены ГМК, в которых экспрессируются антигены главного комплекса гистосовместимости класса II на очень высоком уровне [292, 320, 449, 450, 538]. Следует отметить, что такой высокий уровень экспрессии данных белков свойственен для Т-лимфоцитов и макрофагов. Эти белки принимают участие в передаче иммунной

информации с помощью рецепторов [296]. Это позволяет предположить, что ГМК принимают участие в механизмах иммунитета при атерогенезе [89].

1.3 Факторы риска атерогенеза

1.3.1 Факторы среды

1.3.1.1 Стресс

Психологический стресс возникает при различных воздействиях среды (внешней и внутренней) [80, 81, 89, 122]. Результатом стресса могут быть изменения метаболизма человека (повышается уровень липидов и глюкозы в крови). Это подготавливает организм к усилению мышечной деятельности, необходимой в борьбе за существование индивида в древние времена. Хотя в настоящее время человеку почти нет необходимости использовать активность мышц для собственного выживания, патогенетические механизмы стресса почти не изменились. Так как психологические конфликты современных людей не предполагают физических проявлений, это способствует чрезмерному накоплению глюкозы, липидов и других веществ, выработанных организмом в результате стресса, что провоцирует атерогенез [328]. Вследствие этого спортсмены или рабочие, много работающие физически, гораздо реже имеют атеросклеротические поражения, чем люди, занимающиеся умственным трудом и ведущие малоподвижный образ жизни [89].

Согласно исследованию финских ученых [210], у индивидов, имеющих высокий уровень потокозависимой дилатации, более медленное восстановление периода предварительного выброса является прогностическим фактором утолщения интимо-медиального слоя. Ученые полагают, что дисфункция эндотелия – один из патогенетических механизмов, связывающих с атеросклерозом медленное восстановление сердечной деятельности после выполнения задания, которое вызвано стрессом в проведенном эксперименте .

Гемодинамические реакции на психологический стресс также являются фактором риска атеросклероза. Ученые из США обнаружили, что повышение систолического артериального давления, спровоцированное психологическими проблемами, может быть прогностическим фактором атеросклероза у мужчин старше 40 лет [591]. В исследованной выборке данный факт не зависел от других факторов риска.

Исследователи из Бостона предположили, что атеросклеротические поражения могут повлиять на вазомоторные реакции коронарных артерий при психологическом стрессе [610]. Полученные учеными данные подтвердили, что вазомоторные реакции при атеросклерозе отличаются от нормальных.

1.3.1.2 Факторы экологии

Американские ученые, изучавшие различные экологические факторы, влияющие на атерогенез, считают, что термин «атеросклероз» объединяет в себе не одну, а несколько патологий [610]. При этом каждая из них имеет свои причины возникновения и развития. У молодых людей выявлялись, в большинстве случаев, фиброзные атеросклеротические бляшки. Наиболее часто подобный тип атеросклеротических поражений встречался у индивидов, работавших в химической промышленности и подвергавшихся воздействию ксенобиотиков.

1.3.2 Факторы поведения

1.3.2.1 Курение, как фактор риска

Исследователи из Колорадо сравнили у пациентов с различной степенью кальцификации сердечных артерий уровень физической активности, курения и факторов риска атеросклероза [175]. Обнаружено, что с высокой степенью кальцификации сердечных артерий достоверно коррелировали низкий уровень

физической активности и высокий уровень курения. В меньшей степени с данным параметром оказался ассоциирован диабет типа 1.

Группа исследователей во главе с Baldassarre обнаружила, что утолщение интимо-медиального слоя значимо связано с высокой интенсивностью курения [155]. Усугубляло ситуацию наличие у пациентов гипертонии или сахарного диабета.

Исследователи из Австралии провели популяционные исследования выборок из Азии и Австралии. Риск ишемической болезни сердца среди курящих индивидов оказался в 1,60 раз выше, чем у некурящих; а инсульта - в 1,19 раз выше (соответственно) [598]. Выявлена корреляция между ишемической болезнью сердца или инсультом и количеством сигарет, которые пациент выкуривал в течение дня для обеих выборок. При этом у курящих женщин был выявлен повышенный риск сердечно-сосудистых осложнений атеросклероза, по сравнению с мужчинами. Обращает на себя внимание, что риск ССЗ и инсультов был значительно выше у экс-курильщиков, чем у не куривших никогда индивидов.

Американские ученые подтвердили, что уровень потребления сигарет усугубляет атеросклероз, независимо от других факторов риска (гипертонии и сахарного диабета) [426].

Голландские ученые во главе с Geerts проанализировали связь воздействия курения во время пренатального развития и раннего атеросклероза исследуемых индивидов [262]. Каждого такого пациента подвергли ультразвукографическому исследованию и собрали информацию о том, курили ли их матери вовремя беременности. Дети куривших во время беременности матерей имели, в среднем, более толстый интимо-медиальный слой, по сравнению с детьми, матери которых не курили. Если в семье во время пренатального развития индивида курил только отец, у молодого человека также отмечалась большая толщина интимо-медиального слоя, чем у пациентов, в семье которых отец не курил.

1.3.2.2 Малоподвижный образ жизни

Ключевые факторы риска возникновения ССЗ – ожирение, курение и гиподинамия [80, 81, 89, 122].

Согласно исследованию Lee с сотрудниками, риск ишемической болезни сердца у некурящих и физически активных мужчин, имеющих нормальный обхват талии, оказался на 59% меньше, чем у мужчин, которые имели по ожирению, курению и гиподинамии нежелательные показатели [364].

Итальянские исследователи выдвинули гипотезу о том, что вялотекущее системное хроническое воспаление может быть фактором риска возникновения и развития таких патологий, как атеросклероз и сахарный диабет [458]. В то же время физическая активность способствует увеличению уровня цитокинов и хемокинов, имеющих противовоспалительные свойства. Обнаружены противовоспалительные миокины IL-6, IL-8 и IL-15.

Исследователи из Бостона выдвинули гипотезу, согласно которой основной целью регулярных физических упражнений является укрепление эндотелия сосудов [147]. Было обнаружено, что клетки-предшественники эндотелия попадают в кровь из костного мозга вследствие физических нагрузок, участвуя в укреплении сосудов.

1.3.2.3 Факторы питания

Согласно одной из гипотез, гиперосмолярная пища может способствовать возникновению атеросклероза [401]. Полагают, что генерация тепла в организме после употребления такой пищи является одним из факторов атерогенеза. Повышенный гликемический индекс продуктов питания и наличие у пациента диабета ведут к повышению в крови уровня глюкозы, что, в свою очередь, приводит к повышению температуры тела. Употребление гиперосмолярных аминокислот, сахаров и солей повышает температуру тела. По-видимому, это вынуждает магистральные сосуды организма изолировать

свои стенки, формировать атеросклеротические бляшки и утолщать интимо-медиальный слой. При попадании в организм человека воды снижается осмолярность продуктов питания. Поэтому у тех людей, которые употребляют большое количество воды, вероятность возникновения атеросклероза уменьшается.

По данным исследователей из Японии, в выборке больных с ишемической болезнью сердца, имеющих прогрессирующий стеноз, согласно коронарной ангиографии, чаще наблюдалась гипертония и более высокий уровень сахара и общего холестерина в крови [490]. При этом количество пациентов, соблюдающих лечебную диету, в данной выборке было выше, чем в общей выборке с ишемической болезнью сердца. Это доказывает необходимость соблюдения диеты для пациентов, имеющих факторы риска атеросклероза [80, 81, 89, 122].

Португальские исследователи обнаружили, что диета западного типа, для которой характерно высокое содержание соли, простых сахаров и насыщенных жиров, а также низкое содержание клетчатки, овощей и рыбы, ассоциирована с протромботическими, проокислительными и провоспалительными тенденциями [398]. Подобные факторы повышали риск дисфункции эндотелия, являющейся первой стадией атеросклероза. При этом диета средиземноморского типа, для которой характерно большее количество оливкового масла, вина, овощей, фруктов, рыбы и волокна, оказалась связана с пониженным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний, по сравнению с диетой западного типа.

Японский ученый Yamogі установил, что употребление рыбы и сои имеют профилактическое значение, способствуя предотвращению возникновения сердечно-сосудистых заболеваний [602]. Это подтверждается тем, что уровень выводящихся в течение 24 часов с мочой изофлавонов и таурина, которыми богаты соя и рыба, находится в обратной зависимости от смертности при ИБС.

1.3.3 Факторы биохимии

1.3.3.1 Избыточная масса тела

По данным ВОЗ, лишний вес имеет более чем миллиард индивидов. При этом 30% людей в экономически развитых странах поставлен диагноз «ожирение». У 25% россиян отмечена избыточная масса тела, а у 30% - ожирение [80, 81, 89, 122, 314].

Следует отметить, что на патогенез атеросклероза влияют секреторные адипокины и цитокины, которые производятся жировой тканью. Например, васпин имеет инсулиносенсибилизирующие свойства, он может обладать антиатерогенным эффектом. Апельин снижает риск атерогенеза из-за подавления потребности в еде и увеличения физической активности, способствуя потере веса у людей [259].

По мнению группы ученых из Бельгии, пусковым механизмом атеросклероза является проникновение в сосудистую стенку из крови клеток, которые были активированы по провоспалительному пути [317]. В стенке сосуда происходит выделение активных форм кислорода и окисление липопротеидов. При этом образуются пенистые клетки и происходит апоптоз эндотелиальных клеток. Начинается рост, эрозия и разрушение атеросклеротических бляшек. Взаимосвязь окислительного стресса и воспаления характерна как для стенки сосуда, так и для жировой ткани во время ожирения. Под воздействием окислительного стресса и воспаления происходят дефекты в созревании адипоцитов. Начинается, при воздействии инсулина, формирование неверного адипокинового сигнала. Создается впечатление, что при патогенезе сосудистой и жировой ткани действуют общие молекулы-регуляторы. Такими молекулами могут быть микроРНК, контролирующие генетическую экспрессию. Кроме того, данные микроРНК могут вызвать разрушение мРНК, а также блокировать трансляцию. С помощью этой гипотезы появилась возможность объяснения сходства и

одновременности возникновения молекулярных дефектов в жировой ткани и ткани сосуда [44, 80, 81, 89, 122].

Исследователи из Швейцарии изучали вазоактивные факторы, которые выделяли эндотелиальные клетки. При дисфункции эндотелия происходил аномальный синтез данных факторов, способствующий атерогенезу. Подобный процесс выявлен учеными и в жировой ткани. Это подтвердило связь ожирения и атерогенеза [162].

Итальянские ученые оценили связь между ожирением, пищевыми привычками и ранним атеросклерозом. Была обследована контрольная группа здоровых детей и подростков и группа, для которой были характерны тучность и факторы риска раннего атеросклероза. Выявлены значимые различия в уровне протеина PAI-1 между данными группами. Данный белок участвует в фосфорно-кальциевом метаболизме. Таким образом, дисбаланс в гомеостазе фосфора и кальция является еще одним возможным механизмом, с помощью которого ожирение способствует атерогенезу [268].

1.3.3.2 Сахарный диабет, как фактор риска

Как известно, нарушения в обмене углеводов при сахарном диабете способствуют изменениям в жировом обмене. В то же время дефекты в обмене липидов могут вызвать атерогенез [80, 81, 89, 122].

Патологические продукты гликолиза, сформированные внутри клеток, могут служить еще одним механизмом, с помощью которого при гипергликемии возникает повреждение артерий [161]. Данные продукты являются гетерогенной группой белков, липидов и нуклеиновых кислот, которые необратимо коагулируют при снижении уровня сахара. Они участвуют в патогенезе атеросклероза, в том числе, посредством рецепторов. Например, при взаимодействии продуктов гликозилирования с наиболее широко изученным рецептором RAGE происходит изменение сигналов внутри клетки. Это способствует генетической экспрессии и высвобождению цитокинов,

активированных по провоспалительному пути, вызывая прогрессию атеросклеротического процесса.

Исследователи из США показали, что метаболический синдром может быть предиктором ССЗ при сахарном диабете 2 типа, т.к. ими была выявлена связь кальцификации коронарных артерий с MELAS [410].

Женщины с диабетом имели более высокий риск атеросклероза, если они применяли в постменопаузальный период заместительную гормональную терапию. При данной терапии происходило снижение уровня липопротеидов и повышение ХС ЛПВП. Однако уровень липопротеидов у женщин-диабетиков снижался меньше по сравнению с контрольной группой. В то же время у женщин с диабетом меньше повышался ХС. При этом у них более сильно прогрессировала ишемическая болезнь сердца [360].

Классические ССЗ тоже могут быть предикторами атеросклероза у диабетиков. Голландские ученые обнаружили, что систолическая дисфункция левого желудочка может быть связана с наличием атеросклероза у пациента [513].

1.3.3.3 Дефекты обмена липидов

Классический метод лечения гиперлипидемий включает применение статинов. При данной терапии снижается уровень ХС-ЛПНП и отношение ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП. При этом у больных отмечалась меньшая степень выраженности атеросклеротических поражений [143].

Schreiner с сотрудниками проанализировали ассоциацию толщины интимо-медиального слоя с уровнем липопротеида А в крови пациентов [514]. Повышение концентрации данного липопротеида коррелировало с субклиническим атеросклерозом каротидных артерий у мужчин. В то же время у женщин подобная связь была опосредованной с помощью таких факторов риска, как курение и сахарный диабет.

При атеросклерозе в макрофагах отмечалось напряжение эндоплазматического ретикулума. Исследователи из США выявили центральную роль липидных шаперонов при регулировании гомеостаза эндоплазматического ретикулума макрофагальных клеток в процессе атерогенеза. Отмечено, что такой ответ макрофагальных клеток способен защищать человека от патологических процессов, спровоцированных гиперлипидемией [242].

Ряд исследователей пытается выявить маркеры для ранней диагностики атеросклероза и его факторов риска. Например, финские ученые занимались исследованием возможности прогнозировать развитие атеросклероза и гиперлипидемии по уровню липидов и липопротеидов в крови у детей [388, 389]. Однако данный маркер обнаружил низкую прогностическую значимость. Исследователи из Великобритании вели поиск факторов, необходимых при ранней диагностике гиперхолестеринемии [543]. Наиболее приемлемыми оказались маркеры генов рецепторов ХС ЛПНП.

1.3.3.4 Факторы, вызывающие дефекты обмена липидов

Общий стресс, вероятно, является опосредованным фактором, который влияет на липидный обмен [80, 81, 89, 122]. При стрессе воздействие на обмен липидов происходит с помощью усиления липолиза, при котором происходит высвобождение жирных кислот и глицерина, а также повышение в крови уровня триглицеридов. Кроме того, при остром психологическом стрессе может произойти сгущение крови, результатом которого является повышенный уровень общего холестерина и некоторых его субфракций. На последнем настаивают ученые из США, утверждая, что повышенный уровень триглицеридов и свободных жирных кислот может возникнуть в результате обмена при симпатической активации [153].

На липидный обмен также может повлиять использование женщинами пероральных контрацептивов. В результате этого в крови повышается

концентрация общего холестерина и триглицеридов. Врачи не рекомендуют пациенткам, имеющим гиперхолестеринемию и наследственные ССЗ, применять пероральные контрацептивы или советуют их использовать очень осторожно [234].

1.3.4 Независимые факторы риска атерогенеза

1.3.4.1 Гендерный фактор

Атеросклероз значительно раньше возникает у мужчин, из-за того, что в женском организме задержка развития данной патологии происходит под влиянием эстрогенов (женских половых гормонов) [80, 81, 89, 122, 537]. Поэтому прогрессирование атеросклероза у женщин начинается, в основном, в период менопаузы, после 50 лет [53, 54, 342, 427]. В это время у них уровень эстрогена резко снижается и увеличивается в крови уровень ЛПНП и холестерина. Сниженная выработка эстрогенов может также привести к раннему атеросклерозу артерий головного мозга и коронарных артерий [53, 89].

Маркеры воспаления, которые также влияют на возникновение и развитие атеросклероза, могут по-разному проявляться у мужчин и женщин. Например, группа пациенток, которая подверглась психологическому стрессу, имела более высокий уровень С-реактивного белка, чем контрольная группа женщин. У мужчин таких различий не было обнаружено [89, 524].

Таким образом, при обследовании пациентов необходимо учитывать пол, как фактор риска атеросклероза [53, 54, 80, 81, 89, 122, 342, 427, 537].

1.3.4.2 Возрастной фактор

Чем старше человек, тем большее количество дефектов накапливается в его обмене веществ (жировом, углеводном, витаминном). Происходит возникновение определенных нарушений в иммунной системе, в работе печени,

свертывающей системе крови. Все эти факторы способствуют возникновению и развитию атеросклероза, утяжеляют его течение у пожилых людей. Отмечено, что у 40-49-летних людей в 86% случаев выявлены атеросклеротические поражения, при этом у 25,5% они были резко выраженными [328].

Установлено, что у людей каждой возрастной группы имеются характерные именно для нее наиболее значимые факторы риска атеросклероза. Например, если у молодежи выявлен единственный предиктор инсульта – курение, то у пожилых людей такими предикторами были уже несколько заболеваний, объединенных под названием «метаболический синдром» [157].

1.3.5 Молекулярно-генетические дефекты

1.3.5.1 Укорочение теломеров

Yang с сотрудниками обнаружили, что у пациентов с гипертонией длина теломерных повторов (LTL) в лейкоцитах короче, чем в контрольной группе [606]. По прошествии пяти лет среди гипертоников с более короткими теломерами была отмечена склонность к развитию ишемической болезни сердца. При этом участники исследования, имеющие нормальное артериальное давление, но обладающие более короткими теломерами, в большинстве случаев, заболели гипертонией.

Как установлено Okuda с коллегами, длина теломерных повторов значительно отличалась у участников исследования, как у новорожденных, так и у индивидов одинакового возраста различных возрастных групп [443]. Выявлено, что при увеличении возраста длина теломерных повторов сокращалась, причем подобное сокращение более интенсивно происходило у детей и подростков [487]. Вероятно, быстрое распространение гемопоэтических стволовых клеток в данном возрасте, когда интенсивно идет рост и развитие организма человека, может служить объяснением данному явлению. Возможно, сокращением LTL данных стволовых клеток и объясняется укорочение

теломеров в процессе онтогенеза [136]. В соматических клетках, к которым относятся и гемопоэтические, теломераза имеет рудиментарную активность. На концах хромосом содержится множество коротких нуклеотидных последовательностей – TTAGGG, называемых теломерными повторами. Они сокращаются во время каждого репликационного цикла на размер последовательности, используемой ДНК-полимеразой для посадки на хромосому. Кроме того, большое влияние на укорочение теломеров имеет окислительный стресс, ввиду высокой чувствительности к гидроксид-радикалам (ОН.) триплетов, состоящих из трех гуанинов (GGG) [89, 582]. Гипотеза механизмов старения также учитывает сокращение длины теломерных повторов в течение жизни индивида, вследствие того, что после сокращения теломерных повторов до минимальной длины, начинается укорачиваться функциональная часть генома. Таким образом, длина теломерных повторов может быть индивидуальной характеристикой людей, обуславливая предрасположенность к определенному времени и интенсивности старения [89].

Еще одним возможным механизмом укорочения длины теломерных повторов в результате окислительного стресса является значительное увеличение числа лейкоцитов при хроническом воспалении, что приводит к возрастанию количества циклов репликации и укорочению длины теломерных повторов лейкоцитов [150]. Очевидно, что корреляцию болезней старения, в том числе, атеросклероза, с воспалением и окислительным стрессом можно объяснить сокращением LTL.

Исследователи Gutierrez с коллегами, Hansson и Libby установили, что существует связь между укорочением длины теломерных повторов и ограниченной способностью костного мозга вырабатывать нормально функционирующие эндотелиальные клетки-предшественники [291, 296]. Дисбаланс между системами защиты организма человека и повреждающими факторами провоцирует возникновение различных патологий. Нормальные эндотелиальные клетки-предшественники могут интегрироваться в стенку

сосуда в местах повреждения, участвуя в восстановительных процессах эндотелия [569]. Так как атеросклероз начинается с повреждения эндотелиального слоя, то при патогенезе данного заболевания можно наблюдать снижение общей численности эндотелиальных клеток-предшественников, их дисфункцию. Возможным объяснением данных процессов является уменьшение длины теломерных повторов. Кроме того, некоторые люди предрасположены к атеросклеротическим поражениям изначально, имея при своем рождении меньшую длину LTL [442].

1.3.5.2 Повреждения ядерного генома

В течение последних десятилетий при атеросклерозе велось выявление и анализ только мутаций ядерного генома, как маркеров предрасположенности к данной патологии (Таблицы 1–9). В частности, выявлена корреляция мутаций ядерного генома с нарушениями обмена липидов [200, 208, 379, 487, 523], ишемической болезнью сердца [180, 381, 454, 542], атеросклеротическими поражениями [146, 164, 336, 338].

Таблица 1. Мутации первой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
AGT	1q42.2	Ангиотензиноген	Риск хронической сердечной недостаточности и атеросклероза	[454]
APOA2	1q21-q23	Аполипопротеид А-II	Клинический атеросклероз,	[139]

			сочетающийся с высоким уровнем плазменного холестерина ЛПВП	
DOCK7	1p31.3	Белок, обеспечивающий цитокинез 7	Повышенный уровень холестерина	[379]
CRP	1q21-q23	С-реактивный белок	Атеросклероз сонных артерий	[164]
			Ожирение, сердечно-сосудистые заболевания	[135]
			Бессимптомный атеросклероз	[338]
ECE1	1p36.1	Эндотелин-преобразующий фермент	Атеросклероз у мужчин с артериальной гипертензией	[164]
EDN2	1p34	Эндотелин-2	Фибрилляция предсердий у пациентов, имеющих гипертрофическую кардиомиопатию	[428]
GALNT2	1q41-q42	N-ацетил-галактозаминил-трансфераза 2	Инсульт	[461]
GJA5	1q21.1	Белок разрыва связи альфа A5	Коронарная болезнь сердца (КБС)	[539]
FMN2	1q43	Формин 2	КБС	[181]
IL6R	1q21	Рецептор интерлейкина 6	Изменения липидного профиля (ХОЛ, ТГ, ХС	[208]

			ЛПВП, ХС ЛПНП) у подростков	
LEPR	1p31	Рецептор лептина	Ассоциация с ранним атеросклерозом и его факторами риска	[492]
MTHFR	1p36.3	Метилентетра- гидрофолат- редуктаза NADH	Атеросклероз сонных артерий. Факторы риска раннего атеросклероза	[336]
			Атеросклеротические бляшки в крупных артериях	[484]
NPPA	1p36.21	Натрийуретичес- кий пептид А	ССЗ. Повышенное АД	[381]
SELE	1q22-q25	Селектин-Е	КБС	[281]
			Атеросклероз аорты	[146]
NPPB	1p36.2	Натрийуретичес- кий белок В	Гипертрофическая кардиомиопатия	[205]
TGFBR3	1p33-p32	Третий рецептор фактора роста фибробластов	Инициация развития атеросклероза из-за ранозаживляющей терапии	[404]
PSRC1	1p13.3	Pro/Ser-богатый биспиральный белок 1	Болезнь Мойя-мойя	[472]
PROX1	1q41	Белок гомеобокса 1 prospero	Статус метилирования в клетках артерий, имеющих атеросклеротические поражения	[190]

SORT1	21.3- p13.1	Сортилин 1	Гиперхолестеринемия. Атеросклеротические поражения	[343]
			Повышение плазменного уровня холестерина ЛПНП у молодых людей	[523]
TGFB2	1q41	Транскрипционный фактор роста бета-2	Возникновение атеросклеротических поражений из-за модифицированных липопротеидов	[515]
CELSR2	1p21	Второй рецептор кадгерина типа G (семи-повторный)	Повышение общей концентрация холестерина	[487]
VCAM1	1p32-p31	Молекула сосудистой клеточной адгезии 1	Атеросклеротические бляшки с выраженной кальцификацией	[256]
USF1	1q22-q23	Upstream-связывающий транскрипционный фактор 1	Фиброзные бляшки каротидных артерий, КБС	[363]
			Атеросклеротические повреждения коронарных артерий	[353]

Таблица 2. Мутации второй хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ADAM17	2p25	Металло-пептидаза, домен 17 (TNF альфа-превращающий фермент)	Атеросклероз	[455]
			Инфаркт миокарда	[519]
CAPN10	2q37.3	Калпин 10	СД2. Атеросклероз.	[279]
ADRA2B	2p13-q13	Адренорецептор альфа 2В	Доклинический атеросклероз артерий. Эндотелиальная дисфункция	[299]
			Сужения микрососудов эпикарда. Атеросклеротические поражения. КБС	[163]
APOB	2p24-p23	Аполипротеид В	Риск ССЗ у пациентов, имеющих наследственную гиперхолестеринемию	[316]
CXCR4	2q21	Хемокин (С-Х-С мотив) рецептор 4	Торможение адгезии моноцитов в эндотелии.	[590]
			Атеропротективный	[411]

			эффект	
ADRA2B	2p13-q13	Адренорецептор альфа 2В	Субклинический атеросклероз плечевой и сонной артерии. Нарушение функции эндотелия	[299]
			Микрососудистые сужения в структуре эпикарда. Атеросклероз. КБС	[163]
IL1B	2q14	Интерлейкин 1В	Фактор риска развития артериальной гипертензии у пациентов с КБС	[281]
			Патологическое изменение обмена липидов	[227]
			Полнота, опосредованная ассоциацией с действием С-реактивного белка	[241]

Таблица 3. Мутации четвертой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ADD1	4p16.3	Аддуктин альфа 1	Атеросклеротические поражения, сердечно-сосудистые заболевания, цереброваскулярные заболевания, преимущественно у пациентов с артериальной гипертензией	[573]
			Сердечно-сосудистые заболевания	[420]
KDR	4q11-q12	Рецептор тирозинкиназы третьего типа	Атеросклеротические поражения в аорте. Бедренная и сонная артерии также могут быть поражены атеросклерозом	[204]
			Утолщение интимомедиального слоя сонных артерий	[246]
PDGFC	4q32	Тромбоцитарный фактор роста C	Атерогенез, стимулируемый аномальной миграцией и пролиферацией гладкомышечных клеток	[184]

			сосудов	
PDGFRA	4q12	Полипептид альфа (рецептор тромбоцитарного ростового фактора)	Возникновение атеросклероза из-за окислительного стресса	[581]
			Утолщение интимо-медиального слоя сонных артерий из-за нарушения миграционных процессов клеток гладкой мускулатуры сосуда	[323]

Таблица 4. Мутации семнадцатой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ACE	17q23.3	Ангиотензин-превращающий фермент 1	Тяжелый атеросклероз сонных артерий	[349]
			Атеросклеротические поражения, инфаркт миокарда и артериальная гипертензия	[597]
			Атеросклеротические поражения сосудов	[508]
ERBB2	17q21.1	Второй гомолог вирусных онкогенов эритробласти-	Повышение риска развития атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний	[441]

		ческой лейкемии		
HNF1B	17cen- q21.3	HNF1- содержащий белок гомеобокса В	Более высокий уровень холестерина ЛВП в сыворотке крови, риск возникновения атеросклеротических поражений	[151]
АРОН	17q23- qter	Аполипо- протеид Н	Наличие более высокого уровня антител IgM и IgG к холестерину липопротеидов низкой плотности среди пациентов, имеющих подтвержденный диагноз КБС	[200]

Таблица 5. Мутации пятой и шестой хромосом ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локали- зация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
<i>Пятая хромосома</i>				
DRD1	5q35.1	Дофаминовый рецептор D1	Атеросклеротические поражения, вызванные дефектами миграционных и пролиферационных механизмов в гладкомышечных	[608] [609]

			клетках артерий	
Шестая хромосома				
EDN1	6p24.1	Эндотелин 1	Атеросклеротические поражения и осложнения в артериях у диабетиков	[456]
			Атеросклеротические поражения у больных с хроническим гемодиализом	[375]
			Атеросклеротические поражения, спровоцированные G-белком	[325]
			Атеросклероз, вызванный воздействием провоспалительных цитокинов	[554]
			Вызывает клеточный рост и повышает тонус сосудов в начальном атеросклеротическом поражении, затем происходит его концентрация в области атеросклеротических бляшек	[320]
ENPP1	6q22-q23	Эктонуклеотидная пирофосфа-	Полиморфизм K121Q - маркер	[153]

		таза /фосфо- диэстераза 1	<p>предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям. При наличии сахарного диабета второго типа может усугубляться ожирением</p> <p>У младенцев может выявляться сосудистая кальцификация</p>	[470]
MTNFD 1L	6q25.1	Метилентетра- гидрофолат дегидрогеназа (NADP+ зависимая)	Исследователями предположена общая причина возникновения болезни Мойя-мойя и атеросклероза. Мутации в гене ассоциированы с болезнью Мойя-мойя	[472]
SRF	6p22.3	Сывороточный фактор	Выполняет в интима артерий роль регулятора клеточного старения и пролиферативной активности. Антиатерогенная мутация	[591]
			Более высокая вероятность атеросклеротических поражений сосудов даже при низколипидной диете	[170]

LPA	6q26	Липопротеид А	Ассоциация с провоспалительными цитокинами в атеросклеротических бляшках	[278]
			Участвует в формировании атеросклеротических бляшек посредством активации тромбоцитов	[340]
			Независимый предиктор более тяжелой воспалительной реакции у пациентов с инфарктом миокарда	[277]
SOD2	6q25.3	Супероксид-дисмутаза 2	Пониженный риск ишемической болезни сердца ассоциирован с мутантным генотипом	[557]
			Происходит стабилизация атеросклеротических бляшек у больных с ишемической болезнью сердца. При начальных атеросклеротических поражениях предотвращает дисфункцию эндотелия	[149]
SRF	6p22.3	Сывороточный	Регулятор пролиферации	[591]

		фактор	клеток интимы. Может участвовать в механизмах старения клеток. Мутация имеет антиатерогенный эффект	
--	--	--------	---	--

Таблица 6. Мутации седьмой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
CAV1	7q31.1	Кавеолин 1	Размер бляшки при атеросклерозе ассоциирован с уровнем негемопоэтического кавеолина-1. В то же время гемопоэтический кавеолин-1 связывают с регуляцией лимфоидной иммунной системы. Данные молекулы коррелируют с прогрессированием атеросклеротических поражений	[240]
			Генетические дефекты кавеолина-1 повышают уровень общего холестерина и усугубляют	[315]

			атеросклероз у мышей, нокаутированных по apoE	
			Мутации SAV-1 снижают инфильтрацию липопротеидов низкой плотности в интиму сосуда, стимулируют выделение азотистых соединений, уменьшают уровень экспрессии лейкоцитарных молекул адгезии. Ассоциированы с ранним появлением атеросклероза	[249]
ELN	7q11.23	Эластин	Более высокий риск Мойя-мойя, имеющей сходные патологические механизмы с атерогенезом	[472]
			Изменяет структуру актиновых волокон, уменьшает пролиферативную и миграционную активность, а также напряженность гладкомышечных клеток сосудистой стенки	[335]
			Увеличивает жесткость	[519]

			сосудистой стенки	
			Продукты частичного разложения эластина имеют гораздо более высокий уровень у детей, имеющих высокий риск возникновения атеросклеротических поражений	[272]
KRIT1	7q21.2	Белок, содержащий повтор анакирина	Участвует в регуляции морфогенеза стенки артерий. Ассоциируется с КБС	[558]
			Ассоциируется с коронарным атеросклерозом	[586]
PON1	7q21.3	Параоксоназа 1	Ассоциируется с атеросклеротическими поражениями сонных артерий у больных, имеющих повышенную концентрацию холестерина липопротеидов высокой плотности	[273]
EGFR	7p12	Рецептор ростового фактора эпидермиса	Коррелирует с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий у женщин,	[324]

			имеющих диагноз «альбуминурия»	
			Атеросклеротические поражения сонных артерий	[206]
NOS3	7q36	Синтетаза оксида азота 3	У курильщиков детерминирует более высокий риск инсульта и ИБС	[365]
LEP	7q31.3	Лептин	Оказывает влияние на увеличение давления и толщины интимо- медиального слоя сонных артерий. Участвует в аутокринной и паракринной системе регуляции тонуса сосуда	[258]
			Коррелирует с ранним атеросклерозом у больных с ревматоидным артритом	[255]
GHRHR	7p14	Рецептор рилизинг гормона, гормон роста	Если в GHRHR имеется мутация, после терапии дефектным гормоном роста возникают атеросклеротические поражения	[144]

PDGFA	7p22	Тромбоцитарный фактор роста альфа-полипептид	Вовлечен в миграционные механизмы гладкомышечных клеток в интиме артерий. Ассоциируется с утолщением интимомедиального слоя сонных артерий	[263]
PON3	7q21.3	Параоксоназа 3	Уменьшение уровня клеточного апоптоза. Антиатерогенная мутация	[589]

Таблица 7. Мутации восьмой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ADAM9	8p11.22	ADAM металлопептидаза, домен 9	Регулирует миграционную активность клеток и действие интегринов, проводит моделирование неоинтимальной прогрессии в сосудах, имеющих атеросклеротические поражения	[133]
CYP11B2	8q21-q22	Цитохром P450,	Ассоциируется	[355]

		относящийся к семейству 11, подсемейству В, полипептид 2	с артериальной гипертензией	
			Генетические мутации ассоциированы с повышенным риском ишемического инсульта и артериальной гипертензии	[426]
ADRA1A	8p21.2	Адренорецептор альфа 1А	Вызывает сужение сосудов. Антиатеросклеротический эффект при гиперхолестеринемии: понижение уровня в гладкомышечных клетках, в результате чего замедляется формирование бляшки	[253]
HAS2	8q24.12	Гиалауронан-синтаза типа 2	Вовлечена в механизмы накопления гиалаурона при формировании атеросклеротической бляшки	[547]
			В гладкомышечных клетках способствует накоплению гиалаурона.	[192]

			Макроангиопатия при диабете. Стимулирование патогенеза атеросклероза	
			Во время формирования атеросклеротической бляшки, с помощью накопления гиалаурона, происходит взаимодействие с ингибиторами циклооксигеназы	[399]
LPL	8p22	ЛipoppOTEИД-липаза	Мутация в гене, снижающая липолиз, является проатерогенной	[485]
NRG1	8p12	Неурегулин 1	NRG-1 – новый терапевтический кандидат для терапии атеросклеротических поражений и рестеноза	[214]
GATA4	8p23.1-p22	GATA-связывающий белок 4	Ассоциирован с гиперхолестеринемией	[359]
WRN	8p12	RecQ хеликаз-подобные	Ассоциирован с ожирением,	[191]

			тенденцией к хроническим воспалительным процессам	
TRIB1	8q24.13	Триблл гомолог 1	Повышенный уровень триглицеридов. Способствует образованию атеросклеротических бляшек	[395]

Таблица 8. Мутации одиннадцатой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
APOA4	11q23	Аполипопротеид А4	При сахарном диабете первого типа способствует кальцификации коронарных артерий	[352]
			Способствует раннему атеросклерозу. Нарушается гомеостаз холестерина	[334]
APOC3	11q23.1-q23.2	Аполипопротеид С3	Увеличивается вероятность возникновения	[243]

			атеросклеротических бляшек у пациентов, имеющих гипертриглицеридемию третьего типа	
			Атеропротективная мутация, выявленная при анализе выборки амишей	[462]
			Ишемическая болезнь сердца, выявленная при ангиографии	[423]
			Повышенный уровень триглицеридов крови	[376]
INS	11p15.5	Инсулин	Выявлены отличия между нормальной и пораженной атеросклерозом интимой по уровню метилирования ДНК	[232]
			U-аллель – маркер атеросклеротических поражений	[394]
			U-аллель проявляет атерогенные свойства, L-аллель – антиатерогенные	[568]
MYBPC3	11p11.2	Сердечный миозин-связывающий	Сердечная недостаточность у пациентов	[542]

		белок	с ангиографически подтвержденной КБС	
			Гипертрофическая кардиомиопатия	[374]
DRD4	11p15.5	Рецептор дофамина D4	У мужчин – повышенный уровень холестерина липопротеидов высокой плотности	[238]
ROBO4	11q24.2	Каруселеподобный центральный рецептор аксона (четвертый гомолог)	Участвует в поддержке целостности сосудов в начальном атеросклеротическом поражении	[331]
APOA5	11q23	Аполипопротеид А4	Изменение плазменного уровня холестерина липопротеидов высокой плотности и триглицеридов	[203]
			Атеросклероз сонных артерий	[237]

Таблица 9. Мутации третьей хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями [89]

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ADIPOQ	3q27	Адипонектин,	Сердечно-сосудистые	[589]

		C1Q	заболевания	
CHRD	3q27	Хордин	Кальцификация атеросклеротических бляшек	[431]
AGTR1	3q24	Рецептор ангиотензина II, тип 1	У египтян – более раннее возникновение КБС	[140]
TNNC1	3p21.1	Тропонин С первого типа	Дилатационная кардиомиопатия	[459]
GPX1	3p21.3	Глутатион пероксидаза 1	Предрасположенность к атеросклеротическим поражениям коронарных артерий у больных, имеющих сахарный диабет второго типа. Сниженная способность утилизации активных форм кислорода	[435]
			Диабетические сердечно-сосудистые заболевания и гиперлипидемия. Сахарный диабет второго типа.	[199]
MYL3	3p21.3-p21.2	Миозин, легкая цепь 3	Ишемические поражения, опосредованные нефункциональностью гладких мышц стенки сосуда	[585]
		Кавеолин 3	Проявление	[362]

CAV3	3p25		антиатерогенного эффекта	
RARB	3p24.2	β -рецептор ретиноевой кислоты	Атеросклеротические поражения. Выявление дислипидемии и воспаления	[326]
PPARG	3p25	Перокси-сомальный рецептор гамма, который активируется посредством пролиферации	Прогрессирование атеросклеротических поражений сонных артерий	[266]
			Ассоциируется с атеросклеротическими поражениями с помощью регуляции интерлейкина-6	[525]
TGFBR2	3p22	β -рецептор фактора роста	Диабетические атеросклеротические поражения	[457]

Следует отметить, что при выявлении любой мутации ядерного генома, имеющей значимую корреляцию с ССЗ, относительный риск атеросклероза равен 1,06–1,40 [331]. Это является определенным ограничением для молекулярно-генетической диагностики атеросклероза с помощью таких маркеров, как мутации митохондриального генома. Как оказалось, они имеют довольно низкую значимость для диагностики и прогноза данной патологии. Для сравнения, при анализе такого традиционного фактора риска, как уровень триглицеридов в крови, относительный риск возникновения атеросклеротических поражений оказался равным 1,60 [331]. Значения относительного риска некоторых других традиционных факторов риска также оказались существенно выше, чем у мутаций ядерного генома. В сумме, все

известные мутации ядерного генома ассоциированы приблизительно 5% случаев ССЗ [89, 331].

1.3.5.3 Патологии, связанные с митохондриальными дефектами

Митохондрии клеток человека представляют собой органеллы, окруженные двумя мембранами [32, 89. 583]. Они содержат собственный геном – кольцевые двухцепочечные молекулы, состоящие приблизительно из 16 500 пар нуклеотидов. Митохондриальная ДНК человека имеет 37 генов. Из них 22 кодируют транспортные РНК, 2 – рибосомальные РНК и 13 кодируют белковые субъединицы комплексов дыхательной цепи, к которым относятся цитохром В, АТФаза, цитохром-С-оксидаза, NADH-дегидрогеназа (рисунок 2) [32, 89. 583].

Для митохондрий характерны явления гомо- и гетероплазмии. Для гомоплазмии характерно наличие в митохондриях клетки 100% нормальных копий ДНК. Однако, в связи с нестабильностью митохондриального генома, в процессе онтогенеза в нем часто появляются мутации. Возможно, это связано с тем, что процесс дыхания протекает именно в митохондриях, поэтому митохондриальная ДНК может быть повреждена активными формами кислорода (АФК). Часть мутаций может иметь наследственную природу, передаваясь с помощью митохондрий от матери потомству. Для гетероплазмии характерно одновременное присутствие мутантных и нормальных копий митохондриального генома в митохондриях. Полагают, что соматические мутации митохондриального генома могут накапливаться в течение жизни индивида, приводя к возникновению и развитию различных заболеваний [32, 89. 583].

Согласно данным литературы, выявлена связь некоторых патологий людей с митохондриальными мутациями. Митохондриальными цитопатиями принято называть гетерогенную группу системных расстройств, которые вызваны дефектами функционирования митохондрий [89].

Подобные заболевания, в большинстве случаев, вызывают поражение мышечной и нервной систем, их клинические проявления начинаются поздно. Дефекты окислительного фосфорилирования могут возникнуть в одном или одновременно в нескольких белковых комплексах. При гетероплазмии клетка может определенное время нормально функционировать за счет нормальных копий митохондриального генома. Предполагают, что если количество копий мутантной митохондриальной ДНК превысит определенное пороговое значение, выработка энергии в митохондриях уменьшается и оказывается значительно ниже необходимого уровня. При увеличении количества дефектных органелл происходит нарастание энергетической потребности клетки, что вызывает компенсаторную пролиферацию митохондрий, в том числе, содержащих мутации [89].



Рисунок 2.

Схема расположения генов в митохондриальном геноме человека [89].

Это продолжает ухудшать ситуацию, особенно для тканей организма, потребляющих самое большое количество энергии - мышечной и нервной. Поэтому у индивида с гетероплазмией по мутации может быть вначале длительный бессимптомный период, характерный для ряда митохондриальных цитопатий. Если мутантные копии митохондриального генома накапливаются в достаточном количестве, патологические признаки начинают проявляться. Хотя манифестация патологии может начинаться в разном возрасте, при возникновении болезни в более раннем возрасте ее течение проходит тяжелее, а прогноз – менее утешителен [89].

1.3.5.3.1 Симптомы митохондриальных цитопатий

Характерными симптомами митохондриальных цитопатий являются [28. 31. 89]:

1. Для скелетных мышц – низкая толерантность к физическим нагрузкам, артериальная гипотензия, проксимальная миопатия, офтальмоплегия.
2. Для сердца – гипертрофическая кардиомиопатия, аритмия.
3. Для центральной нервной системы – пигментная ретинопатия, атрофия зрительного нерва, инсульт, психические заболевания.
4. Для эндокринной системы – нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, гипопаратиреоз, диабет.
5. Для периферической нервной системы – аксональная нейропатия, нарушения двигательных функций желудка.

Комплексы часто встречающихся симптомов клиницисты объединили в синдромы (большинство их названий состоит из первых букв английских названий симптомов) [28. 31. 89]:

1. MELAS – метаболический синдром, в состав которого входит митохондриальная миопатия, лактацидоз, энцефалопатия и инсультоподобные эпизоды.
2. Синдром Альпера, объединяющий прогрессивную дегенерацию нейронов и прогрессивную полидистрофию.
3. MIDD – синдром, включающий глухоту и диабет, которые наследуются от матери.
4. CPEO/PEO – синдром, включающий офтальмопарез, связанный с поражением глазодвигательных мышц и офтальмопарез с синдромом.
5. Leigh syndrome – синдром детской острой некротизирующей энцефалопатии
6. KSS – синдром Кернса-Сейра, включающий ретинопатию, аритмию, слабость проксимальных мышц и атаксию.
7. MERRF – синдром, включающий миоклоническую эпилепсию с красными волокнами или мышечными волокнами с измененными митохондриями.
8. NAPR – синдром, включающий нейропатию, атаксию и пигментную ретинопатию.
9. LHON – синдром наследственной оптической нейропатии Лебера.
10. NIDDM – синдром проявления инсулинонезависимого сахарного диабета.

1.3.5.3.2 Характеристика митохондриальных мутаций

Мутации митохондриального генома, вызывающие заболевания человека, подразделяются на крупные структурные перестройки (обширные делеции, инсерции и дупликации) и однонуклеотидные замены, микроделеции и микроинсерции в генах белковых субъединиц ферментов дыхательной цепи, транспортных и рибосомальных РНК (таблицы 11–17) [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562].

1.3.5.3.2.1 Обширные делеции и дупликации

Обширные делеции и дупликации являются наиболее изученными крупными структурными перестройками митохондриального генома (таблица 10). Они исследуются такими методами, как гнездная ПЦР [451], ПЦР-ПДРФ с выбором двух сайтов рестрикции [229], рестрикционный анализ с последующим гель-фракционированием тотальной ДНК [553].

Таблица 10. Обширные делеции и дупликации митохондриального генома [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]

Мутация	Патология	Ссылка на статью
Делеция мтДНК (5788-15448 п.о.)	Дисфункция паращитовидных желез. Синдром KSS	[553]
Делеция мтДНК (4308-14874 п.о.)	MIDD	[156]
Делеция митохондриального генома с 8469 по 13447 пару оснований	ИБС	[180]
	Семейный фокальный сегментарный гломерулосклероз с нефротическим синдромом	[601]
	Выявление мерцательной аритмии сердца	[358]
	Возникновение одностороннего поражения периферических артерий	[173]

Дубликации пар оснований (тандемные повторы CCCCCTCCCC, локализующиеся в позиции 305-314 и позиции 956-965, удваивающие фрагмент из 652 пар нуклеотидов)	Выявление непереносимости физических нагрузок, миопатии, хронического прогрессирующего паралича наружных мышц глазного яблока	[385]
--	---	-------

1.3.5.3.2.2 Однонуклеотидные замены, инсерции или делеции

Данные мутации могут затрагивать как кодирующий, так и некодирующий регионы митохондриального генома [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]. Если данные мутации находятся в операторе или промоторе (т.е. участке регуляции транскрипции) или кодирующей части митохондриального гена, они могут проявиться фенотипически, повлиять на механизмы обмена веществ (таблицы 11–16).

Таблица 11. Митохондриальные мутации генов малой (12S) и большой (16S) субъединиц рибосомальной РНК [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]

Мутация	Ген	Номер нуклеотида в субъединице рРНК	Патология	Ссылка на статью
<i>Однонуклеотидные замены</i>				
m.716T>G	MT-RNR1	69	Рак желудка	[294]
m.1095T>C		448	Наследуемая по материнской линии	[369]
m.1494C>T		847	аминогликозид-индуцированная	[612]

			и бессимптомная глухота	
m.1555A>G		908	Матерински наследуемая артериальная гипертензия	[198]
			Матерински наследуемая тугоухость	[269, 289, 369]
m.3200T>C	MT-RNR2	1529	Выявление сахарного диабета второго типа	[605]
<i>Микроделеции и микроинсерции</i>				
m.652insG	MT-RNR1	5	Онкологические заболевания желудка	[294]
m.961insC		314	Аминогликозид- индуцированная потеря слуха	[369, 370]

Таблица 12. Митохондриальные мутации генов транспортных РНК [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]

Мутация	Ген	Номер нуклеотида в тРНК	Патология	Ссылка на статью
m.1658T>C	MT-TV	Нуклеотид 61,	СРЕО	[603]

		входит в состав стебелька Т-петли		
m.3242G>A	MT-TL1	13 (регион терминации транскрипции DHU-петли)	Выявление миелодиспласти- ческого синдрома	[257]
m.3243A>G		14 (регион терминации транскрипции DHU-петли)	MELAS	[596]
			Выявление сахарного диабета второго типа	[469]
			Выявление гломерулонефрита и нефротического синдрома	[378, 522]
			MIDD	[346]
m.3252A>C		23 (регион терминации транскрипции DHU-петли)	Выявление сахарного диабета второго типа	[421]
m.3256C>T		25 (регион терминации транскрипции стебелька DHU- петли)	Выявление интсультподобного удара, оксидативного дефекта мышечного метаболизма, MELAS	[330]

m.3260A>G		29 (регион стебелька антикодоновой петли)	Выявление кардиомиопатии, миопатии	[565]
m.3264T>C		33 (регион антикодоновой петли)	Выявление сахарного диабета второго типа	[548]
m.3271T>C		40 (регион стебелька антикодоновой петли)	MELAS	[544]
m.3285C>T		54 (регион стебелька антикодоновой петли)	Выявление сахарного диабета второго типа	[382]
m.4269A>G		7 (регион акцепторного стебелька)	Выявление дилатационной кардиомиопатии, энцефалопатии, глухоты, эпилепсии	[565]
m.4316A>G	MT-TI	58 (регион петли T)	Возникновение гипертрофической кардиомиопатии, глухоты	[193]
m.4295A>G		37 (регион антикодоновой петли)	Матерински наследуемая артериальная гипертензия	[371]
m.4300A>G		42 (регион	Выявление	[145]

		стебелька антикодоновой петли)	гипертонической кардиомиопатии из-за дефекта тяжелой цепи миозина	
m.4317A>G		59 (регион петли T)	Фатальная детская кардиомиопатия	[560]
m.5540G>A	MT-TW	30 (регион антикодоновой петли)	Энцефаломиопатия, имеющая такие проявления, как деменция, спинномозговая атаксия и нейросенсорная глухота	[517]
m.5692T>C	MT-TN	38 (регион антикодоновой петли)	СРЕО	[516]
m.5814T>C	MT-TC		Окулофарин- геальная миопатия	[556]
m.8296A>G	MT-TK	2 (регион акцепторного стебелька)	Выявление гипертрофической кардиомиопатии	[193]
m.8326A>G		37 (регион антикодоновой петли)	Муковисцидоз	[578]
m.8344A>G		55 (регион петли T)	Миоклоническая эпилепсия, MERRF	[230, 595, 596]

m.8348A>G		59 (регион петли T)	Выявление кардиомиопатии	[555]
m.8356T>C		65 (регион стебелька петли T)	MERRF	[230]
m.8363G>A		72 (регион акцепторного стебелька)	Гипертрофическая кардиомиопатия	[489]
			Выявление энцефаломиопатии, нейросенсорной тугоухости, MERRF, гипертрофической кардиомиопатии	[179]
m.12192G>A	MT-TH	59 (регион петли T)	Кардиомиопатия	[521]
m.12297T>C	MT-TL2	33 (регион антикодоновой петли)	Возникновение дилатационной кардиомиопатии (ДКМП)	[286]
m.12315G>A		52 (регион стебелька петли T)	Энцефалопатия	[252]
m.14709T>C	MT-TE	37 (регион антикодоновой петли)	Выявление врожденной миопатии, а также медленно прогрессирующих миопатии и диабета, отставания	[392]

			в умственном развитии	
m.15995G>A	MT-TP	31 (регион стебелька антикодоновой петли)	Муковисцидоз	[578]

Таблица 13. Митохондриальные мутации генов субъединиц NADH-дегидрогеназы (комплекса I) [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]

Мутация	Ген	Замена аминокислоты при мутации	Патология	Ссылка на статью
m.3316G>A	MT-ND1	Аминокислота 4: аланин→треонин	Выявление сахарного диабета второго типа	[432]
m.3336T>C		Молчащая мутация. Замена изолейцина на другую аминокислоту в позиции 10 не происходит		[402]
m.3337G>A		Аминокислота 11: валин→изолейцин		DIDMOAD. Выявление несахарного мочеизнурения, сахарного диабета,

			атрофии зрительных нервов, глухоты	
m.3394T>C		Аминокислота 30: тирозин→ гистидин	Выявление сахарного диабета второго типа	[301]
m.3395A>G		Аминокислота 30: тирозин→ серин	Гипертрофическая кардиомиопатия, потеря слуха	[193]
m.3460G>A		Замена аланина на треонин в белковой цепи в позиции 52	Синдром Лебера	[81, 294, 295, 314, 367, 432, 477]
m.3421A>G		Замена валина на изолейцин в белковой цепи в позиции 39	Диабет и глухота	[175]
m.3635G>A		Аминокислота 110: серин→ аспарагиновая кислота	LHON	[611]
m.3866T>C		Аминокислота 187: изолейцин→ треонин	LHON и хромота	[377]
m.4132G>A		Аминокислота 276: аланин→ треонин	Наследственная потеря зрения	[250]
	MT-ND2	Замена лейцина	Предрасположен-	

m.5178A>C		на изолейцин в белковой цепи в позиции 237	ность к острому инфаркту миокарда	[400]
m.4833A>G		Замена треонина на аланин в белковой цепи в позиции 122	Инсулинонезависимый сахарный диабет	[327]
m.11778G>A	MT-ND4	Замена аргинина на гистидин в белковой цепи в позиции 340	Синдром Лебера	[226, 294, 314, 361, 376, 413, 438, 444, 540, 541]
m.11253T>C		Замена изолейцина на треонин в белковой цепи в позиции 165	Синдром Лебера	[343]
m.13513G>A	MT-ND5	Замена аспарагиновой кислоты на аспарагин в белковой цепи в позиции 393	Выявление синдрома Вульфа-Паркинсона-Уайта, синдрома Ли с пониженной активностью CO1, атипичного синдрома Ли	[186, 454]

m.13042G>A		Замена аланина на треонин в белковой цепи в позиции 236	Метаболический синдром. Миоклонус-эпилепсия с разорванными красными мышечными волокнами	[405]	
m.14459G>A	MT-ND6	Замена аланина на валин в позиции 72	LHON, дисфункция базальных ганглиев, энцефалопатия	[183, 287]	
m.14482C>A		Аминокислота 64: метионин→изолейцин	LHON	[571]	
m.14482C>G		Аминокислота 64: метионин→изолейцин	LHON, митохондриальные миопатии	[318, 337, 385, 512, 555]	
m.14484T>C				Выявление LHON	[571]
		Замена метионина на валин в позиции 64	Выявление двухстороннего некроза бледного шара, хвостатого ядра и черного вещества головного мозга	[540]	
m.14577T>C		Аминокислота 33:	Выявление сахарного диабета	[552]	

		изолейцин→ валин	второго типа	
--	--	---------------------	--------------	--

Таблица 14. Митохондриальные мутации генов субъединиц цитохром-С-оксидазы (комплекса 4) [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]

Мутация	Ген	Замена аминокислоты при мутации	Патология	Ссылка на статью
m.6489C>A	MT-CO1	Замена лейцина изолейцин в белковой цепи в позиции 196	Выявление парциальных эпилептический припадков	[575]
m.7671T>A	MT-CO2	Замена метионина на лизин в белковой цепи в позиции 29	Выявление лактацидоза и миопатии	[440]
m.7706G>A		Замена аланина на пролин в белковой цепи в позиции 41	Диффузный склероз Альпера	[527]
m.7587T>C		Замена метионина на треонин	Выявление сниженной экспрессии пептидов. Выявление митохондриальной энцефаломиопатии	[190]
m.9379G>A	MT-CO3	Аминокислота	Миопатия,	[305]

		58: триптофан→ стоп-кодон Amber	молочнокислый ацидоз, замедленный рост	
m.9480del15		Делеция аминокислот с 92 по 96 включительно	Миоглобинурия и недостаток активности цитохром-С- оксидазы	[302]
m.9804G>A		Аминокислота 200: аланин→ треонин	LHON	[512]
m.9957T>C		Аминокислота 251: фенилаланин→ лейцин	Гипертоническая кардиомиопатия, ассоциированная с повреждением тяжелой цепи миозина	[145]

Таблица 15. Митохондриальные мутации гена цитохрома В [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]

Мутация	Замена аминокислоты при мутации	Патология	Ссылка на статью
m.14846G>A	Аминокислота 34: глицин→серин	Лактацидоз в покое, непереносимость физических нагрузок	[141]
m.15084G>A	Аминокислота 113: триптофан→стоп-кодон охра		
m.15059G>A	Аминокислота 105:	Митохондриальные	

	глицин→аргинин	миопатии	
m.15168G>A	Аминокислота 141: триптофан→стоп-кодон охра	Лактацидоз в покое, непереносимость физических нагрузок	
m.15533A>G	Замена аспарагина на аспарагиновую кислоту в позиции 263	Возникновение гипертонии, цианоза, эпизодов удушья, молочнокислого ацидоза	[267]
m.15257G>A	Аминокислота 171: аспарагиновая кислота→аспарагин	LHON	[318, 512]
m.15723G>A	Замена триптофана на стоп-кодон охра в позиции 326	Лактацидоз в покое. Выявление непереносимости физической нагрузки	
m.15762G>A	Замена глицина на глутамин в позиции 339	Выявление прогрессирующей непереносимости физической нагрузки, патологических процессов в скелетных мышцах, проксимальной слабости	[141]

Таблица 16. Митохондриальные мутации генов субъединиц АТФ-синтазы и некодирующего региона [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89, 562]

Мутация	Ген	Замена аминокислоты при мутации	Патология	Ссылка на статью
m.8993T>G	MT-АТР5, комплекс 5	Аминокислота 156: лейцин→ аргинин	NARP (нейропатия, атаксия, пигментный ретинит)	[595]
m.8993T>C	MT-АТР6, комплекс 5	Аминокислота 156: лейцин→ пролин	NARP (нейропатия, атаксия, пигментный ретинит)	[595]
m.4401A>G	Некодирующий регион	-	Матерински наследуемая гипертония	[475]

1.3.5.3.2.3 Гаплотипы митохондриального генома

Гаплотипом митохондриального генома является совокупность мутаций, находящихся в пределах одной и той же копии мтДНК. Часто с заболеванием связана не одна мутация, а гаплотип, состоящий из нескольких, связанных между собой, мутаций [89].

Ассоциации гаплотипов ядерного генома с заболеваниями человека посвящено достаточно большое количество работ [134, 199, 339, 350, 587]. Значительно меньшее количество работ посвящено связи гаплотипов митохондриальной ДНК с патологиями у людей [390, 600, 614].

Исследования гаплотипов митохондриального генома при сосудистых заболеваниях, в том числе заболеваниях атеросклеротического генеза, среди литературных источников не обнаружены.

1.3.5.3.2.4 Гаплогруппы митохондриальной ДНК

Гаплогруппа мтДНК объединяет несколько гаплотипов, имеющих общую мутацию. Как полагают, данный однонуклеотидный полиморфизм, располагающийся, как правило, в некодирующем регионе митохондриального генома, мог быть передан общим предком людям, несущим гаплотипы, принадлежащие к определенной гаплогруппе. Разные расы и этносы имеют набор характерных для них гаплогрупп [236, 321, 414, 488, 509].

В том числе, славянские народы имеют общие для них гаплогруппы. Преобладающей среди русских является гаплогруппа Н (43,07%). Кроме того, среди русских распространены гаплогруппы Т (12,35%), J (7,56%), HV (6,8%), К (3,78%), М(2,02%) и подгаплогруппы U5a (9,57%), N1 и N2 (4, 79%). Следует отметить, что гаплогруппа Н наиболее распространена у европейцев, а гаплогруппа Т встречается у 10% населения Европы. Для гаплогруппы J характерна одинаковая частота среди населения Ближнего Востока, и европейской части нашего континента (12%). Гаплогруппа HV встречается в Западной Европе, а гаплогруппа К характерна как для европейцев, так и для евреев-ашкенази. Гаплогруппа М распространена в Индии. Подгаплогруппу U5 часто называют «северным гаплотипом», т.к. она характерна для Финляндии и Эстонии. Подгаплогруппы N1 и N2 встречаются у населения Центральной Европы. Остальные гаплогруппы выявлены только у 0,75% русских [213].

1.3.5.3.2.5 Данные литературы, посвященные методам исследования мтДНК

Методами исследования мутаций митохондриального генома являются [25, 26, 28, 29, 31, 48, 49, 50, 52, 89]:

1. Прямое секвенирование [599].
2. Пиросеквенирование [132, 312, 474].
3. ПЦР в реальном времени [522].
4. Аллель-специфическая ПЦР [290].
5. Блот-гибридизация фрагментов ПЦР по Саузерну [372].
6. ПЦР-ПДРФ-анализ [417].

1.3.5.3.2.6 Мутации мтДНК, атеросклероз и старение организма

Исходя из данных литературы можно предположить, что мутации митохондриального генома могут оказывать определенное влияние на процесс атерогенеза. В интима артерий человека при раннем атеросклеротическом поражении возникают патогенетические процессы, которые могут повышать уровень метаболической активности клеток. Другим результатом мутации или гаплотипа митохондриального генома может быть снижение концентрации АТФ, ведущее, в конечном итоге, к усугублению атеросклероза [89].

Полагают, что митохондриальные мутации, атеросклероз и старение организма – взаимосвязанные процессы. В настоящее время есть две гипотезы биологического старения клетки. Первая гипотеза, разработанная Orgel в 60-ые годы, гласит, что старение является производной от суммы всех имеющихся повреждений на уровне белковых молекул, РНК и ДНК ("катастрофа ошибок") [435]. Предположительно, эти факторы запускают цепную реакцию общеклеточного разрушения, т.к. данные повреждения вызывают другие дефекты обмена веществ в организме человека.

Вторая гипотеза, разработанная в 70-ые годы Cutler, связывает продолжительность жизни с возможностью репарации ДНК [221]. Люди с более совершенной системой репарации дезоксирибонуклеиновых кислот живут дольше. Одной из основных причин клеточной дисфункции могут быть митохондрии человека, вследствие того, что они имеют более слабую систему репарации, по сравнению с митохондриальным геномом. Литературные данные о том, что ультраструктурные изменения в митохондриях мышечных клеток, нарушение дыхания митохондрий, повышение дефицита цитохром-С-оксидазы и увеличение процента делеций в митохондриальном геноме ассоциированы с продолжительностью жизни индивидов, подтверждает данную гипотезу [129, 595].

Обращает на себя внимание, что делеции митохондриального генома начинают возникать уже у детей. Например, одна из самых крупных делеций, называемая "обширной", накапливается в течение жизни индивида, начиная с детского возраста. При этом клетки мозга, скелетных и сердечных мышцы и другие медленно обновляющиеся ткани накапливают намного больше мутантных молекул митохондриального генома, по сравнению с быстро обновляющимися популяциями клеток [129, 304].

Показано, что компенсаторное увеличение количества митохондрий при нарушениях энергетического обмена в клетках у детей сказывается на клинических показателях, когда они становятся взрослыми [129]. Например, у детей первых трех лет жизни незначительно выражены количество и размер аномальных скоплений митохондрий. С возрастом у ряда пациентов происходит их увеличение. При семейном анализе обнаружена большая выраженность аномальных скоплений митохондрий у старших братьев и сестер, по сравнению с младшими. Кроме того, матери, у которых отсутствовала клиническая симптоматика нарушений клеточного энергообмена, могли иметь значительно больше аномальных скоплений митохондрий, чем их дети с тяжелыми митохондриальными заболеваниями. Можно предположить, что увеличение количества митохондрий происходит

для компенсации качественных нарушений энергетического обмена клетки. Это наводит на мысль, что при лечении митохондриальных болезней необходимо использовать те методы, которые приведут к увеличению количества митохондрий в клетках, а также их повышенной пролиферации [129].

Учеными было продемонстрировано, что процент мутаций митохондриальной ДНК у пациентов с митохондриальной патологией значительно выше, чем у их здоровых сверстников. При этом с увеличением возраста значительно повышается чувствительность тканей некоторых отделов мозга к действию митохондриальных ингибиторов. Обнаружено, что данные показатели у индивида среднего возраста с митохондриальной кардиомиопатией соответствовали 78-летнему возрасту здорового человека [129, 580].

В первую очередь при старении происходит дисфункция ферментов и полимеризация митохондриальных липидов. Полагают, что эти явления могут лежать в основе общих возрастных изменений. Кроме того, они могут послужить причиной дегенеративных патологий, сопровождающих старение, а именно – сахарного диабета, болезней Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, ишемической болезни сердца и т.д. [304, 327, 328, 358, 424, 479, 593, 595].

Группа ученых из США обнаружила целый спектр точечных мутаций митохондриального генома, количество которых значительно увеличивается у здоровых индивидов при старении. Особенно большое количество мутантных вариантов однонуклеотидных замен было выявлено в некодирующем регионе [593].

Гипотеза, гласящая, что ключевую роль при старении играет изменяющаяся функциональная активность митохондрий, логически является квинтэссенцией первых двух гипотез [580].

Моноклональная гипотеза возникновения атеросклероза в качестве причины возникновения одного или нескольких клеточных клонов, начинающих неограниченно пролиферировать, результатом чего являются,

например, атеросклеротические бляшки на стенках сосудов, выдвигает генетические мутации, в том числе, митохондриальные. Данные мутации могут иметь соматическую природу и возникнуть в результате стресса, а также неблагоприятного воздействия внешней или внутренней среды организма. Кроме того, генетические дефекты могут иметь наследственную природу, но начать проявляться в результате попадания организма человека в критические условия, провоцирующие гладкомышечные клетки к неограниченной пролиферации [89,118,121].

Отметим, что в рамках гипотезы «ответа на повреждение» макрофаги, пришедшие из кровотока в интиму артерий и послужившие причиной возникновения атеросклеротических бляшек, могут также иметь митохондриальные мутации. Возможно, мутантные макрофаги избирательно проникают именно в интиму артерий, инициируя процесс атерогенеза [89].

В последнее время большинство ученых склоняются к мнению, что в возникновении патологий, и, в частности, цитопатий, играет роль суммарный мутантный фон, который формируют все мутации митохондриального генома, а не только каждая в отдельности [440, 546, 615]. Полагают, что именно после достижения определенного порога мутационной нагрузки организма начинают возникать симптомы заболевания. Эти сведения могут помочь в поиске возможных причин такого тяжелого и грозного заболевания, как атеросклероз [89].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Исследуемые мутации

Мутации митохондриального генома, исследованные в настоящей работе, приведены в таблице 17. Алгоритм исследования включал выделение ДНК из образцов интимы аорты или клеток крови, получение и пиросиквенс ПЦР-фрагментов, содержащих область мутации [89].

Таблица 17. Локализация исследуемых мутаций в митохондриальном геноме [13, 27, 88, 89, 90-116, 119, 123, 495, 502, 504, 527, 528, 531, 532, 534]

№ п/п	Мутации	Гены
1	m.961insC	MT-RNR1
2	m.652insG	
3	m.716T>G	
4	m.750A>G	
5	m.652delG	
6	m.961delC	
7	m.1555A>G	
8	m.3258T>C	MT-TL1
9	m.3271T>C	
10	m.3280A>G	
11	m.3256C>T	
12	m.3285C>T	
13	m.3336T>C	MT-ND1
14	m.3316G>A	
15	m.5692T>C	MT-TN
16	m.5814T>C	MT-TC
17	m.6489C>A	MT-CO1

18	m.5540G>A	MT-TW
19	m.8362T>G	MT-TK
20	m.8363G>A	
21	m.8993T>G	
22	m.8993T>C	
23	m.9379G>A	
24	m.9480del15	MT-CO3
25	m.9537insC	
26	m.12315G>A	
27	m.13513G>A	MT-TL2
28	m.13513G>A	MT-ND5
29	m.5178C>A	MT-ND2
30	m.5132insAA	
31	m.14459G>A	MT-ND6
32	m.14482C>G	
33	m.14482C>A	
34	m.14484T>C	
35	m.14487T>C	
36	m.14709T>C	MT-TE
37	m.14846G>A	MT-CYTB
38	m.15059G>A	
39	m.15084G>A	
40	m.15452C>A	
41	m.15498del24	
42	m.15723G>A	
43	m.15762G>A	

2.2 Материалы

Для проведения данной работы были использованы [89]:

I. Образцы нормальной интимы и липофиброзные бляшки 7 аорт индивидов, которые погибли из-за внезапной смерти или несчастного случая [13, 27. 83. 87, 89, 91, 93-98, 102-106, 109, 111, 112, 114-116, 120, 121, 123, 160, 463, 483, 493-498, 505, 528-531].

II. 265 участков морфологически картированной стенки аорт пяти индивидов, среди которых были как участки нормальной интимы, так и участки сосудистой стенки, пораженные атеросклерозом различной степени тяжести [89, 113, 116, 500, 502].

Аутопсийный материал был взят из грудного отдела интимы аорты людей, возраст которых составлял от 30 до 65 лет. Данные индивиды погибли из-за внезапной смерти или несчастного случая [89]. Отметим, что в исследование не брались люди, погибшие из-за электротравм или отравления. У индивидов было проведено продольное вскрытие аорт с последующим промыванием сосудов изотоническим фосфатным буфером, pH 7,6 [89].

Был проведен анализ пораженных атеросклерозом и нормальных участков аорт, при котором использовалась классификация атеросклеротических поражений, разработанная Советом по атеросклерозу Американского Общества по исследованию сердца [89, 116, 274].

Гладкая люминальная поверхность была характерна для нормальных участков аорт. Наблюдалось два слоя на вертикальных срезах интимы: протеогликановый, который прилежал к просвету сосуда, и мышечно-эластический, который прилежал к меди [89, 116].

I тип (начальное поражение) был представлен участками интимы с гладкой желтоватой поверхностью, реже – имел мелкие желтые точки. Микроскопические изменения были минимальны. В соединительно-тканном матриксе наблюдались накопления капель липидов вне клеток. Имелось

большее, по сравнению с нормальной интимой, количество мононуклеарных клеток. Отсутствовали дефекты в структуре ткани [89, 116].

II тип (жировые полосы) имели вид желтых полосок и точек, слегка выступавших над поверхностью интимы. Иногда, при слиянии жировых полосок, происходило образование более крупных структур (кластеров). На полученных вертикальных срезах ткани обнаруживалось внутриклеточное накопление липидов. Внеклеточные липиды были видны в матриксе соединительной ткани. В ряде случаев в данном типе поражения обильно разрастался внеклеточный матрикс [89, 116].

Va тип поражения (липофиброзные бляшки). Имели вид сильно выступающих над поверхностью сосуда желтоватых или перламутровых, круглых или эллипсоидных образований при макроскопическом анализе. При микроскопии внутри клеток выявлялось накопление липидов, имелось разрастание внеклеточного матрикса. В ЛФБ можно было видеть крупное некротическое ядро, и над ним – покрывку из соединительной ткани. Также обнаруживались участки, морфологически походящие на жировые полосы, называемые плечами ЛФБ [89, 116].

Vc тип поражения (фиброзные бляшки). Фиброзные бляшки макроскопически выглядели как высоко приподнятые, жемчужного цвета, овальные или округлые образования. При микроскопии можно было видеть, что они состоят, как правило, из грубого соединительнотканного матрикса, в который “замурованы” клетки. Липидный компонент в фиброзных бляшках был минимален или отсутствовал [89, 116].

В настоящем исследовании было проведено морфологическое картирование интимы аорт. Сосудистая стенка была разделена на участки с атеросклеротическими поражениями различной степени тяжести и участки с нормальной интимой [89, 116].

III. Суммарные гомогенаты нормальной или пораженной атеросклерозом интимы аорты 10 человек [45, 88-90, 92, 100, 101, 107, 108, 110, 119, 482].

Все пораженные атеросклерозом участки интимы гомогенизировались и тщательно перемешивались. Аналогично был получен суммарный гомогенат интимы нормальных участков аорты. Для выделения ДНК использовалось по 10 мг образца гомогената [45, 88-90, 92, 100, 101, 107, 108, 110, 119, 482].

Следует отметить, что гистологический анализ образцов интимы аорты проводился на базе ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития России [89].

IV. Образцы клеток крови гетерогенной выборки из Московского региона, состоящей из 700 участников исследования [89, 99, 115, 494, 501, 503, 504].

Следует подчеркнуть, что все участники исследования были проинформированы о целях и конкретном предмете исследования и дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Данное исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 года (редакция 1983 года). Оно получило одобрение комитета по биоэтике ФГБУ НИИ ОПП [89, 99, 115, 494, 501, 503, 504].

Мужчины были старше 40 лет, а женщины – старше 50. Средний возраст участников выборки был 62,3 года (SD=8,7). Соотношение мужчин и женщин было 362:338 (51,7%/48,3%). Среди участников исследования были как здоровые индивиды, так и пациенты, входящие в группу риска по атеросклерозу, т.к. они имели одно из заболеваний, наиболее часто ассоциированное с данной патологией (артериальную гипертонию, сахарный диабет 2 типа, ишемическую болезнь сердца, острый инфаркт миокарда, бронхиальную астму, нарушение мозгового кровоснабжения) [89, 99, 115, 494, 501, 503, 504, 530].

Критериями исключения были: анатомическая организация шейных и сонных артерий, препятствующая качественной ультрасонографии; заболевания, опасные для жизни пациента; отказ от подписания информированного согласия на исследование. Такие пациенты, а также люди, у которых были диагностированы рак молочной железы, узловатая форма мастопатии, инсульт, дисфункция печени, хроническая болезнь почек, легочная

эмболия или тромбоз глубоких вен были исключены из исследования [53, 54, 137, 342, 427, 530, 537].

2.3 Методы

2.3.1 Подготовка образцов интимы аорты для анализа

2.3.1.1 Пробоподготовка участков интимы аорты для электронно-микроскопического исследования

Из пораженных атеросклерозом (начальные поражения, жировые полосы, липофиброзные и фиброзные бляшки) и нормальных участков вырезали кусочки необходимого размера перпендикулярно длинной оси сосуда [89, 98, 104, 111, 114-116, 495, 501, 502, 504, 562]. Образцы для вертикальных срезов фиксировали в течение 18 часов метакарне (метанол : хлороформ : ледяная уксусная кислота в объемных соотношениях 6:3:1). После фиксации образцы дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации, просветляли в хлороформе и заливали в парапласт (Sigma Chemical Co., St-Louis, MS, USA), затем готовили серийные срезы толщиной 5 мкм. Срезы каждого образца окрашивали гематоксилином-эозином по стандартной методике для идентификации изучаемого участка методами световой микроскопии [89, 111, 114-116, 495, 501, 502, 504, 562].

2.3.1.2 Пробоподготовка образцов интимы аорты для выделения ДНК

Во всех образцах артериальной ткани, соответствующих норме, начальному атеросклеротическому поражению, липофиброзной бляшке, жировой полосе и фиброзной бляшке был отделен слой интимы от слоя меди. Интиму замораживали в жидком азоте, а затем растирали, при помощи пестика и ступки. Полученные образцы интимы аорты в порошкообразном состоянии

хранили при -75°C [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

2.3.2 Ультрасонографическое исследование

Тип поражения артерий участников исследования из поликлиник Москвы и Московской области определяли с помощью ультрасонографии с высоким разрешением в В-режиме [53, 54, 342, 427, 530, 537]. Методика данного исследования была предварительно разработана сотрудниками нашей лаборатории [53, 54, 342, 427, 530, 537]. При этом использовался ультразвуковой сканер SonoScape SSI-1000 (Китай) с линейным сосудистым датчиком (частота 7,5 МГц) [53, 54, 342, 427, 530, 537]. В зависимости от наличия атеросклеротических бляшек и толщины интимо-медиального слоя в сонных артериях (ТИМС СА) участников исследования им мог быть поставлен диагноз «атеросклероз». ТИМС СА измеряли с использованием программы Prosound (R.Selzer, США) [53, 54, 342, 427, 530, 537]. Измерения производились в соответствии с критериями Манхейма и исследования Improve [137, 561].

Чтобы получить изображение сонных артерий человека, при ультрасонографии применяли ультразвук с частотой около 30 000 Гц. Ультразвуковой луч направлялся на артерию через специальный датчик, эхо отраженного звука использовалось для получения электронного изображения сонной артерии [53, 54, 342, 427, 530, 537].

Алгоритм ультразвукового сканирования участников исследования включал сканирование [53, 54, 137, 342, 427, 530, 537, 561]:

- 1) левой сонной артерии;
- 2) наружной сонной артерии;
- 3) синуса сонных артерий;
- 4) правой сонной артерии;
- 5) внутренней сонной артерии.

Для сканирования использовались три проекции сонных артерий: заднебоковая, боковая и переднебоковая [53, 54, 137, 342, 427, 530, 537, 561]. При этом для фокусирования использовалась задняя стенка сосудов. Среднее арифметическое измерений в трех проекциях принято было считать показателем ТИМС участника исследования. Всю процедуру сканирования записывали в цифровом формате для последующего анализа с помощью специализированного программного пакета M'Ath 3.0 (ИМТ, Франция) [53, 54, 137, 342, 427, 530, 537, 561]. Атеросклеротические бляшки (АСБ) оценивались, в зависимости от размера бляшки, согласно 4-бальной шкале [53, 54, 80, 81, 122, 137, 342, 427, 530, 537, 561]:

- 1) 0 баллов присваивалось в случае, если возвышенные атеросклеротические поражения в сонной артерии не были обнаружены;
- 2) 1 балл присваивался в случае наличия стабильных атеросклеротических бляшек и стеноза просвета сонной артерии до 20%;
- 3) 2 балла присваивалось в случае наличия стабильных атеросклеротических бляшек и стеноза просвета сонной артерии от 20 до 50%;
- 4) 3 балла присваивалось в случае гемодинамически значимых атеросклеротических бляшек и стеноза просвета сонной артерии более 50%.

На рисунке 3 представлен пример сканированного изображения, полученного при ультразвукографическом исследовании сонной артерии человека [53, 54, 80, 81, 122, 137, 342, 427, 530, 537, 561].

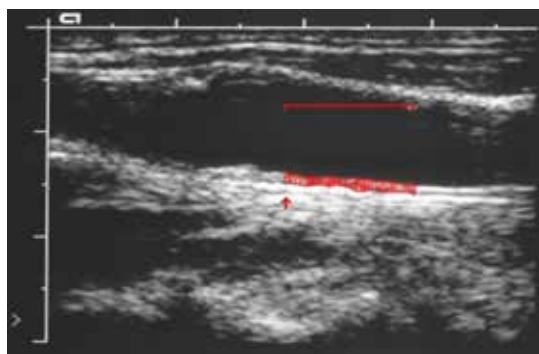


Рисунок 3. Пример сканированного изображения сонной артерии человека, полученного при ультрасонографии, в целях определения толщины интимо-медиального слоя, при использовании программы «ProSound» [53, 54, 80, 81, 122, 137, 342, 427, 530, 537, 561].

2.3.3 Получение и подготовка образцов крови для анализа

Образцы крови (9 мл) брали из локтевой вены в пробирку объемом 10 мл, рано утром натощак. Антикоагулянтом служила Na_2 -ЭДТА. Использовался маточный раствор 0,1 М Na_2 -ЭДТА в воде (рН 8,0). Соотношение свежей крови и Na_2 -ЭДТА составляло 9:1. В итоге конечная концентрация Na_2 -ЭДТА оказывалась равной 10 ммоль/л. Хранили образцы крови в морозильнике при -20°C [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Отметим, что кроме молекулярно-генетического исследования, у пациентов был проведен биохимический анализ крови для измерения уровней сахара, общего холестерина, ЛНП, ЛВП и ТГ [53, 54, 342, 427, 530, 537].

2.3.4 Выделение ДНК

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани аорты (10 мкг) или крови (5мл) проводилось методом фенол-хлороформной экстракции [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

К размороженной крови добавляли лизирующий буфер А в соотношении 1:10 (соответственно) (состав буфера А: 0,32 М сахароза; 100% тритон X-100; 5мМ MgCl_2 ; 0,01М трис-НСl, рН 7,6). Пробирки были объемом 50 мл. В течение 40 минут при $+4^{\circ}\text{C}$ проводили гемолиз крови. После этого проводилось центрифугирование в течение 20 минут при 4 тыс. об/мин при охлаждении, при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Надосадочная жидкость сливалась. К преципитату добавляли буфер В объемом 700 мкл (состав буфера В: 75 мМ NaCl ; 25 мМ ЭДТА рН 8,0) и подвергали ресуспендированию. Полученную суспензию переносили в

пробирки объемом 1,5 мл. К ней была добавлена протеиназа К объемом 30 мкл (в концентрации 20 мкг/мкл). Пробы инкубировали при +56°C в течение 16-24 часов [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Затем пробы были перенесены в пробирки на 2 мл с целью фенол-хлороформной очистки. В каждую пробирку был добавлен фенол объемом 900 мкл и проведено центрифугирование при 13 400 об/мин в течение пятнадцати минут. Верхняя водная фаза центрифугата, содержащая ДНК и межфазную пленку была перенесена в другие пробирки (2 мл), в которые затем было добавлено 450 мкл фенола и 450 мкл хлороформа. Полученные пробы были вновь центрифугированы при тех же условиях. Верхняя водная фаза центрифугата, содержащая ДНК и межфазную пленку была перенесена в другие пробирки (2 мл), в которые затем был добавлен хлороформ объемом 900 мкл. Полученные пробы были вновь центрифугированы при тех же условиях. После этого в новые 2 мл пробирки была перенесена только водная фаза, содержащая ДНК [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Осаждали ДНК изопропанолом объемом 900 мкл. Затем было проведено центрифугирование при 13 400 об/мин в течение пяти минут. Аккуратно была слита надосадочная жидкость. Пробы с ДНК подсушивали в течение пяти минут при 20°C. Была проведена отмывка выделенных образцов ДНК от примесей с помощью охлажденного этилового спирта (70%) объемом 900 мкл. После пятнадцатиминутной инкубации при комнатной температуре было проведено центрифугирование проб при 13 400 об/мин в течение пяти минут. Надосадочную жидкость сливали. Преципитат, содержащий ДНК, был хорошо высушен на воздухе в течение 30 минут. Затем в него было добавлено 200 мкл буфера TE (состав буфера TE: 1мМ ЭДТА; 10мМ Трис-НСl, рН 8,0;). Для полного растворения ДНК в буфере TE полученные пробы оставляли на 5 суток при температуре плюс четыре градуса Цельсия [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Концентрация ДНК в полученных образцах определялась на наноспектрофотометре IMPLEN NanoPhotometr™ (см. раздел 2.2.2.). Образцы

ДНК хранились при температуре минус двадцать градусов Цельсия [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Рабочая концентрация ДНК в образцах для исследования мутаций и гаплогрупп составляла 0,03 мкг/мкл [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

2.3.5 Электрофорез в агарозном геле амплификатов и образцов ДНК

Электрофорез в агарозном геле амплификатов и образцов ДНК проводили на приборе фирмы «Хеликон» в горизонтальном агарозном геле. Для электрофореза использовался буфер TBE (0,5X). Была взята агароза фирмы «Fluka». Для анализа образцов ДНК был взят гель с концентрацией агарозы 0,8%. В то же время для анализа ПЦР-фрагментов был взят гель с концентрацией агарозы 1,5-2,0 % [96, 466]. Агарозный гель окрашивали раствором бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Красителем для образцов ДНК и амплификатов служил бромфеноловый синий. Его добавляли к образцу в соотношении 1:10 [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

ДНК-маркеры 1 Kb (содержащий 13 фрагментов ДНК размером от 0.25 до 10 Kb) и 100 bp (содержащий 10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.) были использованы для того, чтобы идентифицировать молекулярный вес изучаемых амплификатов (рисунки 4 и 5). Данные маркеры выпускает фирма ЗАО «Сибэнзим», Россия [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Состав 10X TBE: борная кислота - 55 г; TrisHCl - 108 г; 0,5 М ЭДТА pH 8,0 - 40 мл на 1000 мл буфера [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530]. Примеры электрофорезов в агарозном геле амплификатов, содержащих исследованные митохондриальные мутации, продемонстрированы на рисунках 6-13 [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

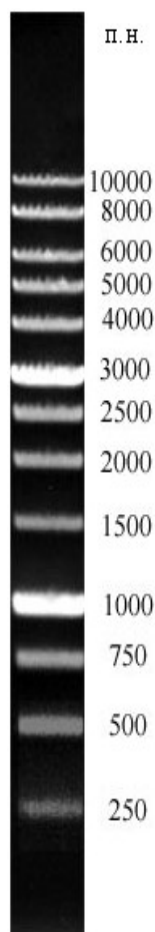


Рисунок 4. ДНК-маркер «1 Kb» (13 фрагментов от 0.25 до 10 т.п.н.).

2.3.6 ПЦР

Для исследованных мутаций митохондриального генома информация об условиях для ПЦР и последовательностях использованных праймеров была взята из литературных источников [89, 141, 158, 159, 179, 207, 252, 287, 294, 297, 330, 341, 391, 402, 439, 530, 540, 551, 575, 594, 595, 601].

Для измерения концентрации образцов ДНК (нг/мкл) использовался наноспектрофотометр IMPLEN NanoPhotometrTM с микрокюветой LabelGuardTM. Применялся режим «DSDNA» (при длине волны 260 нанометров) [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Для ПЦР была взята ДНК в концентрации 0,1 мкг/мл и праймеры в концентрации 10 пмоль/мкл [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

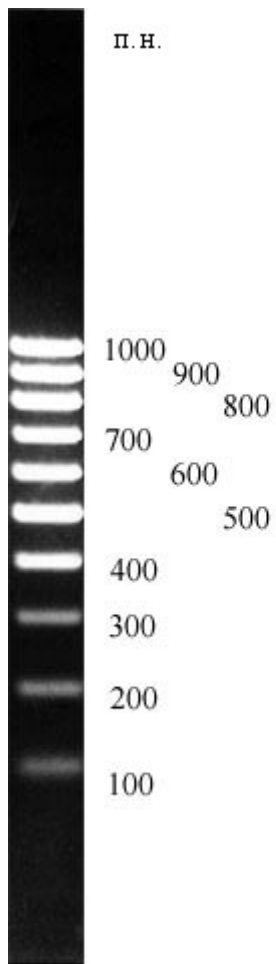
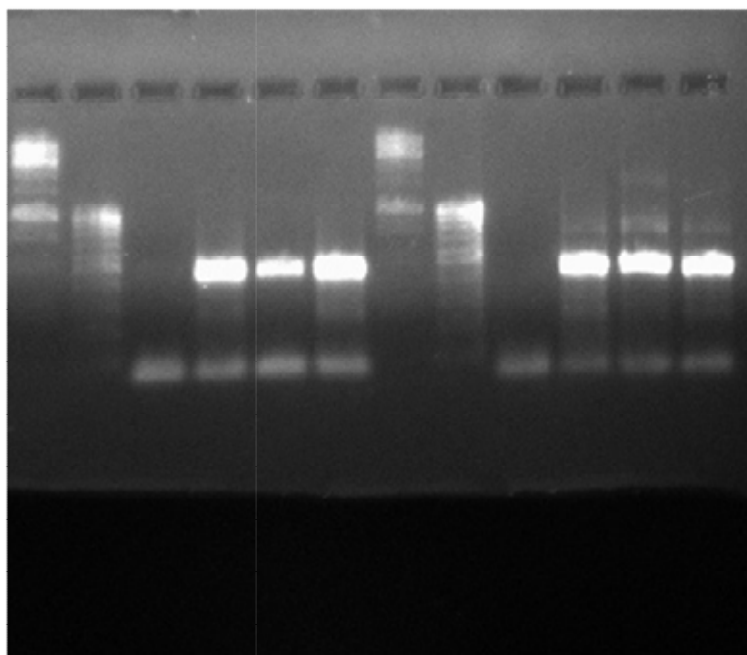


Рисунок 5. ДНК-маркер «100 бр» (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



- 467 п.н.

Рисунок 6. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутаций 716T>G, т.750A>G, т.652delG, т.961insC и т.652insG [89]:

1 и 7. ДНК-маркер «1 Kb» (13 фрагментов ДНК от 0.25 до 10 т.п.н.);

2 и 8. ДНК-маркер «100 бр» (содержащий 10 ДНК фрагментов от 100 до 1000 п.н.);

3 и 9. Отрицательный контроль;

4-6 и 10-12. Амплификаты с областью мутаций 716T>G, т.750A>G, т.652delG, т.961insC и т.652insG.

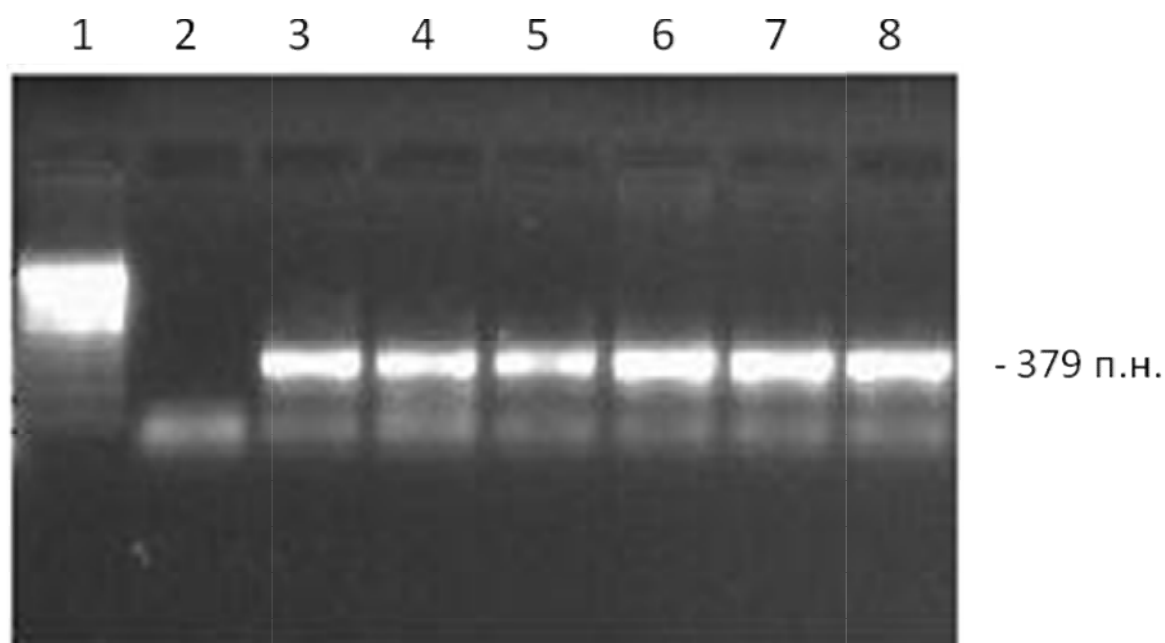


Рисунок 7. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутации т.1555A>G [89]:

1. ДНК-маркер 100 бр (10 фрагментов ДНК от 100 до 1000 п.н.);

2. Отрицательный контроль;

3-8. Амплификаты с областью мутации т.1555A>G.

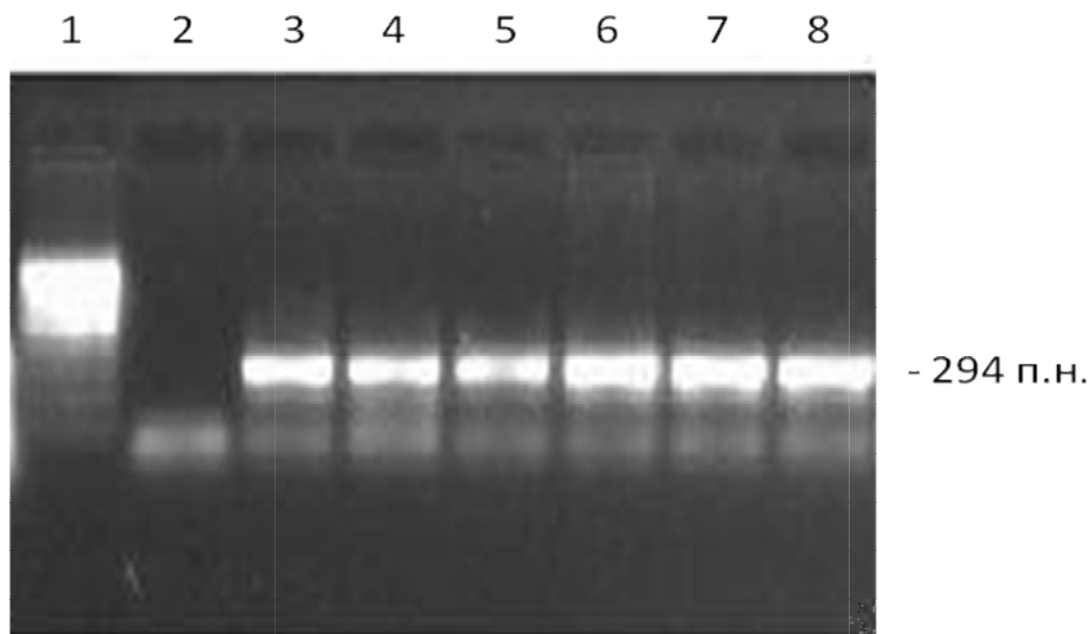


Рисунок 8. Электрофорез в агарозном геле амплификатов с областью мутаций *m.3256C>T*, *m.3258T>C*, *m.3271T>C*, *m.3280A>G*, *m.3285C>T*, *m.3316G>A* и *m.3336T>C* [89]:

1. Маркер ДНК 100 бр (10 фрагментов ДНК от 100 до 1000 п.н.);

2. Отрицательный контроль;

3-8. Амплификаты с областью мутаций *m.3256C>T*, *m.3258T>C*, *m.3271T>C*, *m.3280A>G*, *m.3285C>T*, *m.3316G>A* и *m.3336T>C*.

Состав реакционной смеси для ПЦР: смесь дезоксирибонуклеотидов (десятикратная), с концентрацией каждого дезоксирибонуклеотида (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 2 мМ – четыре микролитра; MgCl₂ (концентрация 25мМ) – 2,4 мкл (при необходимой концентрации 1,5 мМ) или четыре микролитра (при необходимой концентрации 2,5 мМ); Taq-полимераза – 1,33 мкл; H₂O (MQ) – 4,6 мкл; десятикратный буфер (67 мМ tris-HCl (pH 8,8), 16,6 μM (NH₄)₂SO₄) – четыре микролитра; по 2,7 мкл прямого и обратного праймера, ДНК – четыре микролитра [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Общий объем реакционной смеси для полимеразной цепной реакции составлял сорок микролитров [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

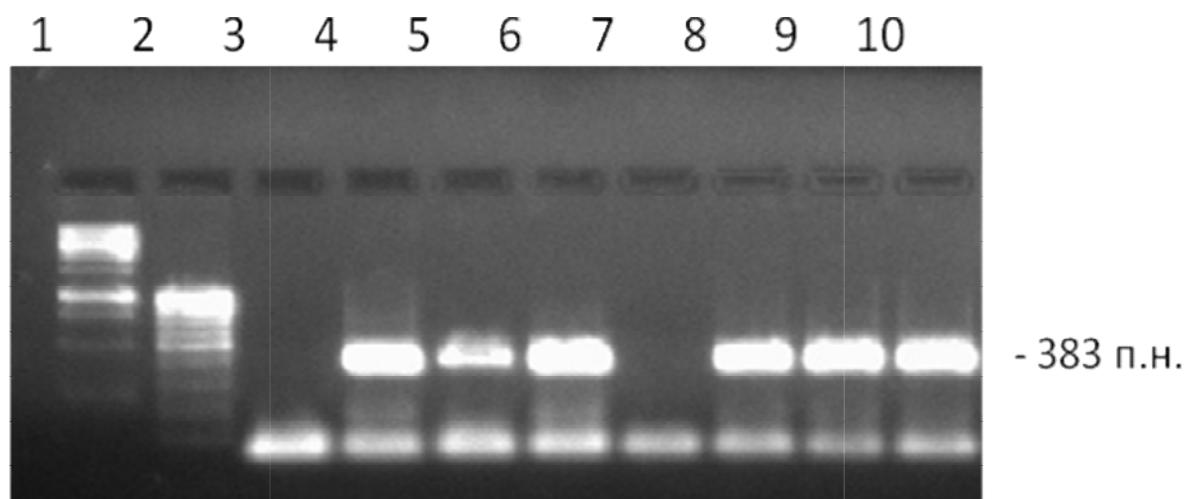


Рисунок 9. Электрофорез в агарозном геле амплификатов с областью мутаций *m.5132insAA* и *m.5178C>A* [89]:

- 1. ДНК-маркер 1 Кб (13 фрагментов ДНК от 0.25 до 10 т.п.н.);**
- 2. ДНК-маркер 100 бр (10 фрагментов ДНК от 100 до 1000 п.н.);**
- 3 и 7. Отрицательный контроль;**
- 4-6 и 8-10. Амплификаты с областью мутаций *m.5132insAA* и *m.5178C>A*.**

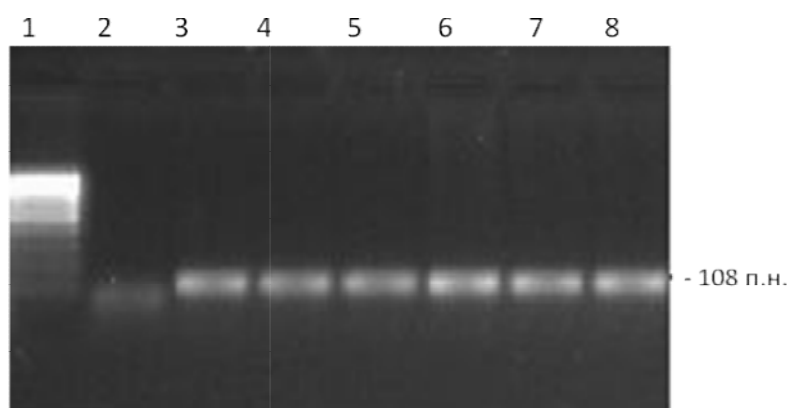


Рисунок 10. Электрофорез в агарозном геле амплификатов с областью мутации *m.12315G>A* [89]:

- 1. ДНК-маркер 100 бр (10 фрагментов ДНК от 100 до 1000 п.н.);**
- 2. Отрицательный контроль;**
- 3-8. Амплификаты с областью мутации *m.12315G>A*.**

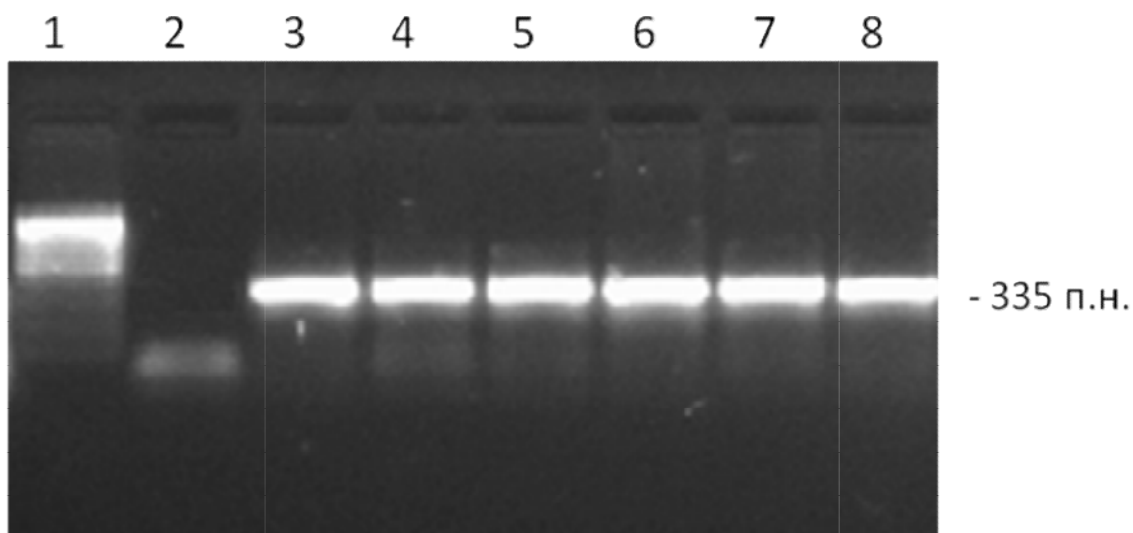


Рисунок 11. Электрофорез в агарозном геле амплификатов с областью мутации *m.13513G>A* [89]:

1. ДНК-маркер 100 бр (10 фрагментов ДНК от 100 до 1000 п.н.);
2. Отрицательный контроль;
- 3-8. Амплификаты с областью мутации *m.13513G>A*.

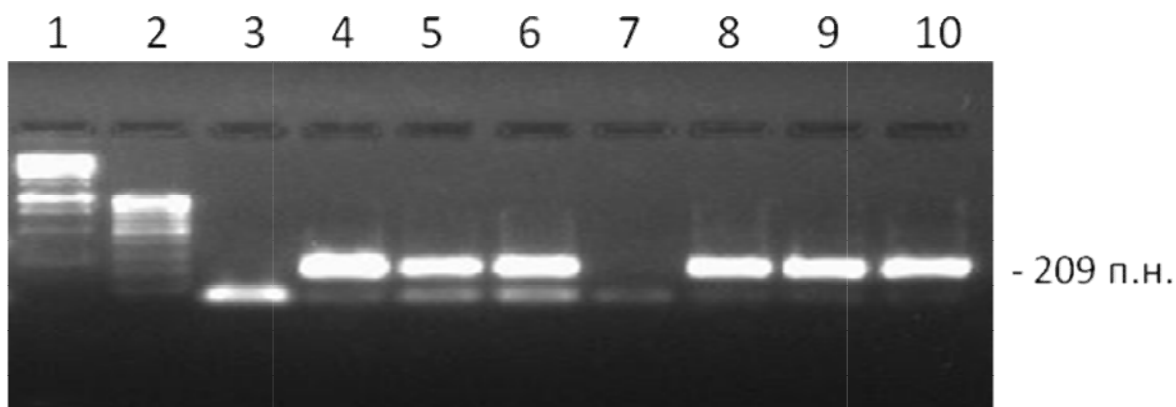


Рисунок 12. Электрофорез в агарозном геле амплификатов с областью мутаций *m.14459G>A*, *m.14482C>G*, *m.14482C>A*, *m.14484T>C* и *m.14487T>C* [89]:

1. ДНК-маркер 1 Кб (13 фрагментов ДНК от 0.25 до 10 т.п.н.);
2. ДНК-маркер 100 бр (10 фрагментов ДНК от 100 до 1000 п.н.);
- 3 и 7. Отрицательный контроль;
- 4-6 и 8-10. Амплификаты с областью мутаций *m.14459G>A*, *m.14482C>G*, *m.14482C>A*, *m.14484T>C* и *m.14487T>C*.

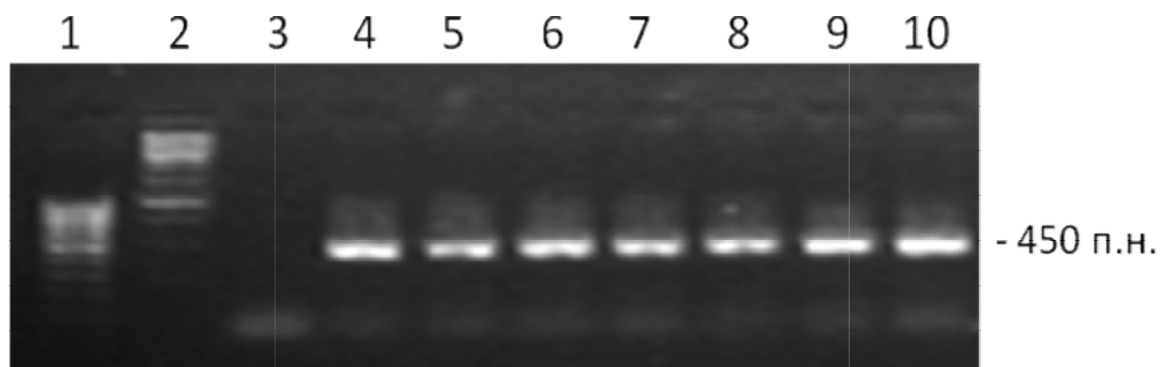


Рисунок 13. Электрофорез в агарозном геле амплификатов с областью мутаций *m.14709T>C*, *m.14846G>A*, *m.15059G>A* и *m.15084G>A* [89]:

1. ДНК-маркер 100 бр (10 фрагментов ДНК от 100 до 1000 п.н.);

2. ДНК-маркер 1 Кб (13 фрагментов ДНК от 0.25 до 10 т.п.н.);

3. Отрицательный контроль;

4-10. Амплификаты с областью мутаций *m.14709T>C*, *m.14846G>A*, *m.15059G>A* и *m.15084G>A*.

В таблице 18 содержатся последовательности праймеров, необходимых для получения ПЦР-фрагментов, содержащих области исследованных мутаций [89, 111, 114-116, 120, 141, 158, 159, 179, 207, 252, 287, 294, 297, 330, 341, 391, 402, 439, 494, 495, 501, 502, 504, 540, 551, 575, 594, 595, 601].

Таблица 18. Праймеры для ПЦР [89, 111, 114-116, 120, 141, 158, 159, 179, 207, 252, 287, 294, 297, 330, 341, 391, 402, 439, 494, 495, 501, 502, 504, 540, 551, 575, 594, 595, 601]

Мутации	Прямые праймеры	Обратные праймеры
m.652delG	TAGACGGGCTCACATCAC (621 - 638)	bio-GGGGTATCTAATCCCAGTTTG GGT(1087 - 1064)
m.652insG		
m.716T>G		
m.750A>G		
m.961insC		
m.961delC		
m.9379G>A	bio-CACTAACCATATACCAATGA	CTCCTGATGCGAGTAATACGGATG

m.9480del15	(9358 – 9377)	T(9630 - 9605)
m.9537insC		
m.3285C>T		
m.3258T>C		
m.3271T>C	bio-AGGACAAGAGAAATAAGGCC (3129 - 3149)	ACGTTGGGGCCTTTGCGTAG (3422 - 3403)
m.3280A>G		
m.3256C>T		
m.3316G>A		
m.3336T>C		
m.1555A>G		
m.8362T>G	bio-AGATTAAGAGAACCAACACC	GGGGTAATTATGGTGGGCC (8410 - 8391)
m.8363G>A	TCTTTACA(8333 - 8360)	
m.6489C>A	GGGCCATCAATTCATCACAACA A(6382 – 6405)	bio-CAGCAGCTAGGACTGGGAGA GATAGGA(6516 - 6490)
m.13513G>A	CCTCACAGGTTTCTACTCCAAA (13491 – 13512)	bio-AAGTCCTAGGAAAGTGACAG CGAGG(13825 - 13806)
m.5178C>A	bio-GCAGTTGAGGTGGATTAAC	GGAGTAGATTAGGCGTAGGTAG (5366 - 5345)
m.5132insAA	(4963 - 4982)	
m.14459G>A	CAGCTTCCTACACTATTAAAGT (14303 – 14334)	bio-GTTTTTTTAATTTATTAGG GGG(14511 – 14489)
m.14482C>G		
m.14482C>A		
m.14484T>C		
m.14487T>C		
m.12315G>A	bio-CTCATGCCCCCATGTCTAA (12230 – 12249)	TTACTTTTATTTGGAGTTGCAC (12337 -12317)
m.14709T>C	bio-CATTATTCTCGCACGGACT (14671 – 14689)	GCTATAGTTGCAAGCAGGAG (15120 – 15100)
m.14846G>A		
m.15059G>A		
m.15084G>A		
m.15452C>A	bio-ACCTTCCACCCTTACTACA	TGTAGGCGAATAGGAAATATC (15581 - 15561)
m.15498del24	(15401 – 15419)	
m.5692T>C	ACACTCATCACCCTTACCA	bio-CGAATAAGGAGGCTTAGAG (6016 - 5998)
m.5814T>C	(5451 - 5469)	

m.5540G>A		
m.15723G>A	GCCCGAATGATATTTTCCTAT	bio-GCTTTGGGTGCTAATGGTGG
m.15762G>A	(15553 – 15572)	(15996 - 15977)

В таблице 19 представлены условия для проведения полимеразной цепной реакции, необходимые для получения фрагментов ДНК, содержащих область исследованных мутаций [89, 111, 114-116, 120, 141, 158, 159, 179, 207, 252, 287, 294, 297, 330, 341, 391, 402, 439, 494, 495, 501, 502, 504, 530, 540, 551, 575, 594, 595, 601]

Таблица 19. Условия для проведения полимеразной цепной реакции [89, 111, 114-116, 120, 141, 158, 159, 179, 207, 252, 287, 294, 297, 330, 341, 391, 402, 439, 494, 495, 501, 502, 504, 540, 551, 575, 594, 595, 601]

Мутации	Размер амплификата	MgCl ₂	Температура для денатурации ДНК	Температура для отжига праймеров	Температура для синтеза фрагментов ДНК
m.3256C>T, m.3258T>C, m.3271T>C, m.3280A>G, m.3285C>T, m.3316G>A, m.3336T>C	294 п.н.	2,5 мМ	94 ⁰	55 ⁰	72 ⁰
m.9537delC, m.9480del15, m.9537insC, m.9379G>A	273 п.н.				
m.15498del24	181 п.н.				

m.15452C>A,					
m.8993T>G, m.8993T>C	180 п.н.	1,5 мМ			
m.15723G>A, m.15762G>A	444 п.н.				
m.15084G>A m.14709T>C, m.15059G>A, m.14846G>A	450 п.н.				
m.13513G>A	335 п.н.				
m.5814T>C, m.5692T>C, m.5540G>A	566 п.н.	2,5 мМ	94 ⁰	62 ⁰	72 ⁰
m.8363G>A, m.8362T>G	78 п.н.	1,5 мМ	94 ⁰	45 ⁰	72 ⁰
m.12315G>A	108 п.н.	2,5 мМ			
m.1555A>G	379 п.н.				
m.6489C>A	135 п.н.	1,5 мМ	94 ⁰	50 ⁰	72 ⁰
m.14482C>G, m.14487T>C, m.14482C>A, m.14459G>A, m.14484T>C	209 п.н.				
m.5178C>A, m.5132insAA	383 п.н.				
m.961delC, m.652delG, m.750A>G, m.961insC,	467 п.н.				
		2,5 мМ	94 ⁰	60 ⁰	72 ⁰

m.716T>G, m.652insG					
------------------------	--	--	--	--	--

Следует отметить, что один из двух праймеров, использованных при полимеразной цепной реакции, был подвергнут биотинилированию, т.к. при последующем пиросеквенировании использовалась биотинилированная цепь амплификата [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504].

Полимеразные цепные реакции были проведены на приборе «PTC DNA Engine 200» [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

2.3.7 Пиросиквенс

2.3.7.1 Методика пиросеквенирования

Проведение реакции пиросеквенирования включает в себя четыре этапа [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Первый этап

Праймер для сиквенса гибридизировался с одноцепочечным ПЦР-фрагментом, использовавшимся как матрица. Затем проводилась инкубация полученного фрагмента ДНК с ферментами, такими как ДНК-полимераза, АТФ-сульфурилаза, люцифераза и апираза. Кроме того, была проведена инкубация исследуемого фрагмента ДНК с субстратами, такими как аденозин-5-фосфосульфат и люциферин (рисунок 14) [89, 111, 114, 132, 312, 474, 495, 501, 502, 504, 530].

Второй этап

Проводилось последовательное добавление нуклеотидов в реакционную смесь для пиросиквенса. В частности, при добавлении очередного нуклеотида ферментом ДНК-полимеразой проводилась комплиментарная

достройка его к исследуемой цепи ДНК. При этом выделялся пирофосфат (PPi). Количество молекул пирофосфата было кратно количеству встроенных нуклеотидов (рисунок 14) [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

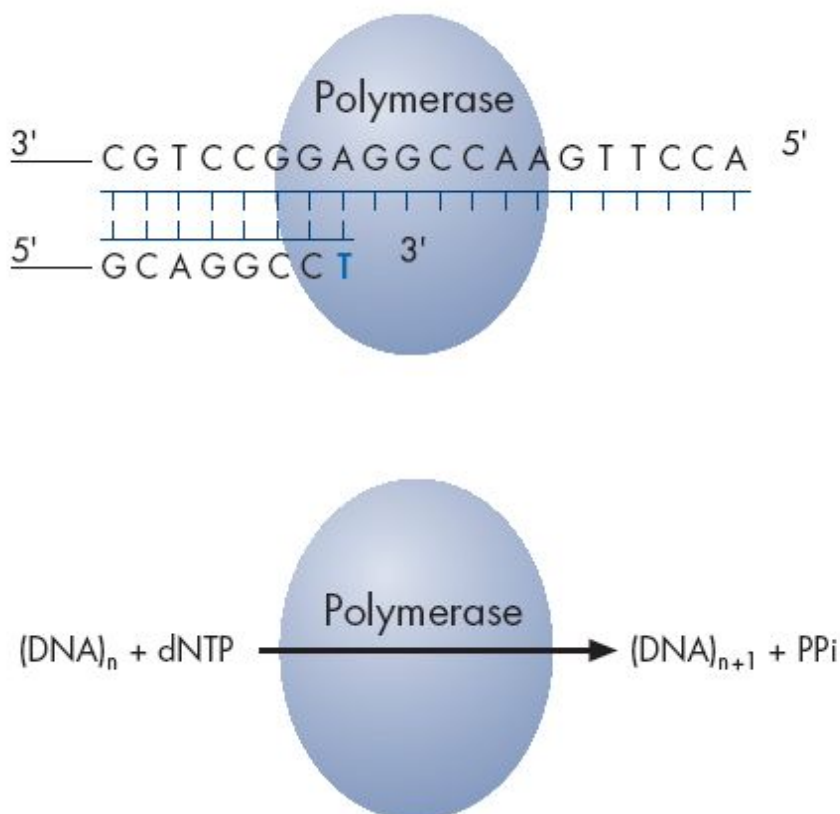


Рисунок 14. Технология пиросеквенирования: этапы 1 и 2 [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Третий этап

Происходило преобразование пирофосфата с помощью АТФ-сульфуриказы в АТФ. Субстратом служил аденозин-5-фосфосульфат. В результате этого процесса люциферин преобразовывался в оксилуциферин. Возникала вспышка света, интенсивность которой была кратно количеству молекул АТФ. Программа пиросеквенатора детектировала эту вспышку света и преобразовывала ее в пик пириграммы. Величина пика нуклеотида была

пропорциональна интенсивности световой вспышки, и, следовательно, количеству встроенных в цепь ДНК нуклеотидов (рисунок 15). Например, если в определенном положении ПЦР-фрагмента находился единственный нуклеотид Т – размер пика данного нуклеотида на пирограмме соответствовал однократной вспышке света. Если в определенном положении ПЦР-фрагмента находились четыре тимина подряд – размер пика на пирограмме соответствовал четырехкратной вспышке света [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 501, 502, 504, 530].

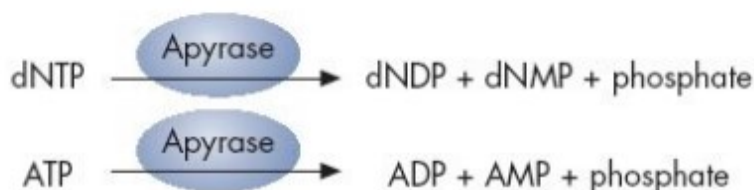
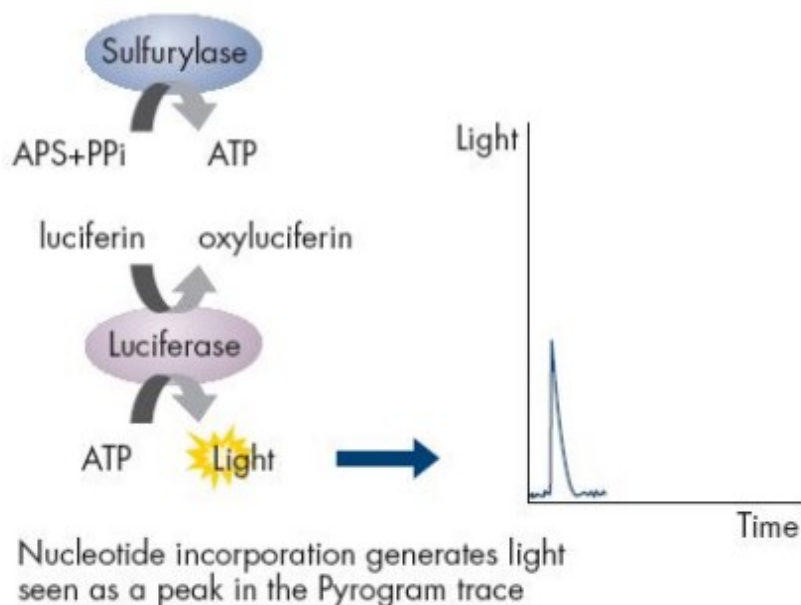


Рисунок 15. Технология пиросеквенирования: этапы 3 и 4 [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Четвертый этап

Происходило разрушение нуклеотидов, которые оказались не присоединенными к биотинилированной цепи ПЦР-фрагмента, с помощью апиразы. Также данный фермент разрушал не вступившие в реакцию молекулы АТФ. После этого происходило добавление следующего нуклеотида в реакционную смесь для пиросеквенса (рисунок 15) [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

2.3.7.2 Пробоподготовка для пиросеквенса

Биотинилированный праймер для ПЦР (таблица 2) был необходим, чтобы к одной цепи ПЦР-фрагмента могла присоединиться частица стрептавидин-сефарозы. Это давало возможность исследовать мутации в одноцепочечном амплификате [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

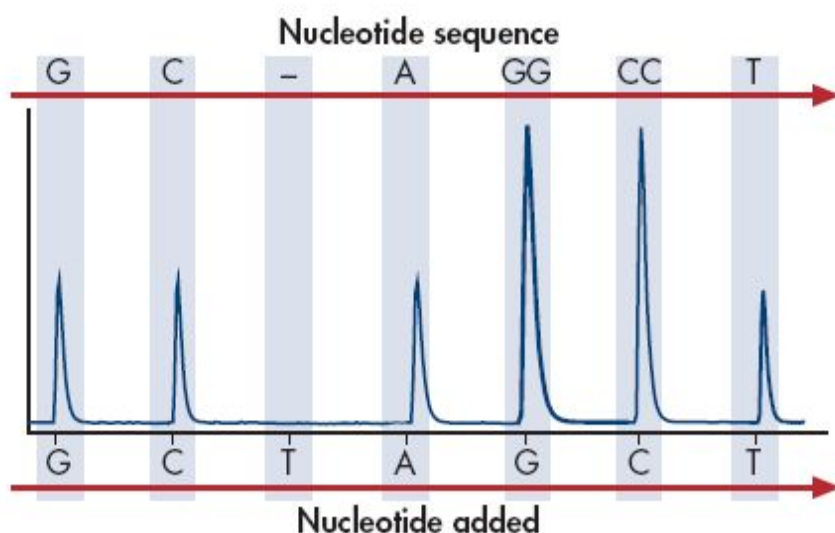


Рисунок 16. Технология пиросеквенирования: пример пирограммы исследуемого фрагмента ДНК [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Использовали следующие растворы для пробоподготовки [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530]:

1) 2X Binding buffer (BB)

100 мл раствора содержали EDTA – 0,0292 г; $C_4H_{11}NO_3$ – 0,121 г; Tween 20 – 100 мкл; NaCl – 11,7 г. Доводили pH буфера до 7,6 с помощью 1 М HCl [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

2) 1X Annealing buffer (AB) (на 100 мл раствора – $C_4H_{11}NO_3$ – 0,242 г; $C_4H_6MgO_4 \cdot 4H_2O$ – 0,043 г. Доводили pH буфера до 7,6 с помощью 4 М CH_3COOH) [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

3) Washing buffer (WB) (на 100 мл раствора – $C_4H_{11}NO_3$ – 0,121 г. Доводили pH буфера до 7,6 с помощью 4 М CH_3COOH) [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

4) 0,2 М NaOH

Растворяли 0,8 г гранул NaOH в 100 мл воды [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Стрептавидин-сефарозу готовили в растворе. Для каждой пробы было необходимо семь микролитров μQ H_2O , три микролитра частиц стрептоavidин-сефарозы, сорок микролитров 2X BB, Затем, с помощью компьютерной программы, задавали необходимый режим для проведения пиросиквенса. В каждую пробу добавляли 50 мкл раствора, содержащего стрептавидин-сефарозу [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530]. Пробы перемешивали на шейкере в течение 5 минут. В лунки плашки для пиросеквенирования было добавлено по тридцать девять микролитров 1X AB и по три микролитра праймера (2 о.е.). Следует отметить, что в лунку добавлялся праймер для пиросиквенса, соответствующий исследуемой мутации. Плашку помещали в вакуумную станцию, используемую при пробоподготовке. Кроме того, в данную станцию были помещены ванночки с такими реактивами, как спирт ректифицированный 70%; Washing buffer; μQ H_2O и 0,2 М NaOH. Было

проведено помещение насадки, содержащей фильтры, в $\mu\text{Q H}_2\text{O}$, с включением вакуума, на двадцать секунд. Затем насадка 10 секунд просушивалась на воздухе. Потом данная насадка была помещена в плашку, содержащую пробы. Через тридцать секунд насадка была последовательно помещена на пять секунд в ванночки, содержащие следующие реактивы [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530]:

- 1)Спирт ректифицированный 70%;
- 2)0,2М NaOH;
- 3)Washing buffer;
- 4) $\mu\text{Q H}_2\text{O}$.

Затем данная насадка была расположена над плашкой для пиросеквенирования. Вакуум отключали. Потом фильтры, находящиеся на насадке, были опущены в плашку на две минуты. Затем фильтры насадки были вынуты из плашки с пробами. Проводилась инкубация проб в течение двух минут при восьмидесяти градусах Цельсия [89, 111, 114, 132, 312, 474, 495, 501, 502, 504, 530]. Потом плашке с пробами давали остыть до комнатной температуры. Помещали предварительно разведенные в $\mu\text{Q H}_2\text{O}$ фермент E, субстрат S, dCTP dATP, dGTP и dTTP в кювету в количестве, которое было указано в компьютерной программе после задания режима для пиросеквенирования. Заполненную необходимыми реактивами кювету помещали в соответствующее место пиросеквенатора. Аналогично поступали с плашкой, содержащей исследуемые пробы [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Последовательности праймеров для пиросеквенса приведены в таблице 20 [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Компьютерная программа, которая прилагалась при установке пиросеквенатора, была использована для визуализации пинограмм исследуемых образцов [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

2.3.7.3 Оборудование для пиросеквенирования

Пиросеквенирование осуществлялось с помощью пиросеквенатора «PSQ96MA», вакуумной станции для пробоподготовки «Biotage», термостата «НК-120», микроцентрифуги «ЦиклоТемп-901» шейкера «ST-3» [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504, 530].

Таблица 20. Праймеры для пиросеквенса [89, 111, 114-116, 120, 132, 312, 474, 494, 495, 501, 502, 504]

№ п/п	Мутации	Праймеры для секвенса
1	m.961delC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 – 956)
2	m.15723G>A	CACTAAGCCAATCACTTT (15701 – 15719)
3	m.3316G>A	GGAGTAGGAGGTTGG (3331 – 3317)
4	m.14482C>A	ATATCCAAAGACAAC (14467 – 14481)
5	m.750A>G	TCACCACGATCAAAA (734 – 748)
6	m.5178C>A	ATTAAGGGTGTTAGTCATGT (5200 – 5181)
7	m.14459G>A	GATACTCCTCAATAGCCA (14439 – 14456)
8	m.652insG	CCCATAAACAATA (639 – 651)
9	m.3280A>G	AAGAAGAGGAATTGA (3300 – 3286)
10	m.716T>G	GCATCCCCGTTCC (702 – 714)
11	m.14484T>C	ATATCCAAAGACAAC (14467 – 14481)
12	m.8363G>A	TTTAGTTGGGGCATT (8379 – 8364)
13	m.1555A>G	ACGCATTTATATAGAGGA (1537 – 1554)
14	m.9537insC	CCAGTGCCCTCCTAAT (9554 – 9539)
15	m.652delG	CCCATAAACAATA (639 – 651)
16	m.8993T>G	CATTC AACCAATAGCC (8976 – 8991)
17	m.961insC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 – 956)
18	m.14709T>C	ATACAACGATGGTTTTTC (14727–14710)

19	m.3258T>C	AAGAAGAGGAATTGA (3300 – 3286)
20	m.15498del24	GTGTTTAAGGGGTTGG (15537 – 15522)
21	m.3256C>T	AAGAAGAGGAATTGA (3300 – 3286)
22	m.5692T>C	ACCCACAAACACTTA (5676 – 5690)
23	m.15059G>A	TTTCTGAGTAGAGAAATGAT (15080–15061)
24	m.3336T>C	TGCGATTAGAATGGGTAC (3354 – 3337)
25	m.12315G>A	TTTGGAGTTGCAC (12328 – 12316)
26	m.5132insAA	TCGTGGTGCTGGAG (5148 – 5135)
27	m.9379G>A	TCTCGTGTTACATCGC (9397 – 9382)
28	m.5540G>A	TAAATACAGACCAAGA (5524 – 5539)
29	m.14487T>C	ATATCCAAAGACAAC (14467 – 14481)
30	m.5814T>C	TTGCAATTCAATATGAAA (5795 – 5813)
31	m.13513G>A	AGGTTTCTACTCCAA (13497 – 13511)
32	m.3285C>T	AAGAAGAGGAATTGA (3300 – 3286)
33	m.6489C>A	AATCACAGCAGTCCTACT (6470 – 6487)
34	m.15452C>A	ATGTCATTAAGGAGAGAA (15470 – 15453)
35	m.14846G>A	GCGCCAAGGAGTGA (14861– 14848)
36	m.3271T>C	AAGAAGAGGAATTGA (3300 – 3286)
37	m.9480del15	TGGTAAAAGGCTCAGAA (9514 – 9498)
38	m.15084G>A	GGATAATGCCGATGTT (15101–15086)
39	m.8362T>G	TTTAGTTGGGGCATT (8379 – 8364)
40	m.14482C>G	ATATCCAAAGACAAC (14467 – 14481)
41	m.8993T>C	CATTCAACCAATAGCC (8976 – 8991)
42	m.15762G>A	TCATTCTAACCTGAATCG (15744 – 15761)

2.3.8 Определение митохондриальных гаплогрупп

Гаплогруппы митохондриального генома в образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов крови участников исследования, были определены согласно общепринятым в мире стандартам. Были проанализированы определенные однонуклеотидные полиморфизмы кодирующего региона митохондриального генома, а также первый гипервариабельный сегмент (ГВС1) мтДНК (позиции генома 16024–16400) [89,142]. При этом основные гаплогруппы были определены с помощью анализа однонуклеотидных полиморфизмов, согласно классификации, разработанной Torroni A. с коллегами [89, 564]. Определение подгаплогруппы, к которой относится образец ДНК, было проведено посредством секвенирования ГВС1 и детекции мутаций, характерных для подгаплогрупп [89].

2.3.9 Трансмиссионная электронная микроскопия

Электронномикроскопический анализ проводили на базе ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития России [89, 98, 104, 115, 506].

Из нормальных участков интимы и из атеросклеротических бляшек вырезали по 4-5 кусочков ткани размером 1 мм³. Проводили их фиксацию с помощью 2,5% глутарового альдегида. При этом использовался какодилатный буфер (имеющий рН, равный 7,2) [89, 98, 104, 115, 506]. После этого в участках нормальной интимы и атеросклеротических бляшек проводили постфиксацию с помощью 1% OsO₄, используя тот же самый буфер [89, 98, 104, 115, 506]. Затем было проведено последовательное помещение образцов в спирт, каждый из которых был более концентрированным, чем предыдущий. Потом образцы были помещены в оксид пропилена. После этого исследуемые участки нормальной интимы и атеросклеротических бляшек были помещены в аралдит. С помощью ультрамикротомов Leica SM2400 и LKB-III, при использовании свежеприготовленных стеклянных или алмазных ножей, были приготовлены

ультратонкие срезы исследуемых образцов ткани [89, 98, 104, 115, 506]. Для обработки данных срезов были использованы цитрат свинца и уранилацетат. Потом ультратонкие срезы участков нормальной интимы и атеросклеротических бляшек изучали с помощью электронного микроскопа Hitachi H7000 [89, 98, 104, 115, 506].

2.3.10 Статистическая обработка данных

Полученные, в ходе настоящего исследования, результаты, обрабатывали с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics версии 21.0 (SPSS Inc., США) [311]. Был применен U-тест для независимых выборок Манна-Уитни. Также использовался H-тест Краскелла-Уоллиса. Определение границ квартилей при распределениях уровня гетероплазмии отдельных мутаций было проведено при анализе частот [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504]. Коэффициент корреляции Спирмена был вычислен на основе анализа таблиц сопряженности. Метод линейной регрессии и дисперсионный анализ применяли для определения направления связи между уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома и стадиями атеросклеротического поражения. Факториальная регрессия была использована для того, чтобы оценить степень ассоциации уровня гетероплазмии мутаций мтДНК с определенными атеросклеротическими поражениями и атеросклерозом в целом [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504].

При распределении признака, отличавшегося от нормального, для статистической оценки значимости различий использовались методы непараметрической статистики (знаково-ранговые тесты по Уилкоксоу и Манну-Уитни), а также бутстрэп-анализ. Достоверными (статистически значимыми) считались различия средних значений показателей при 95% вероятности безошибочного прогноза [89, 111, 114-116, 120, 494, 495, 501, 502, 504].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Собственные данные

3.1 Сравнительный электронно-микроскопический анализ митохондрий клеток интимы в нормальных участках сосудистой стенки и атеросклеротических поражениях

Для того, чтобы выяснить, имеются ли отличия между митохондриями клеток нормальной и пораженной атеросклерозом интимы сосудов, был проведен ультраструктурный анализ с помощью электронного микроскопа [89, 98, 104, 115, 506]. В подавляющем большинстве клеток нормальной интимы, кристы митохондрий в основном были хорошо различимы и окружающие мембраны не имели каких-либо структурных дефектов (рисунок 17а) [89, 98, 104, 115, 506]. Напротив, анализ митохондрий в клетках, присутствующих в атеросклеротических поражениях, выявил наличие в них структурных альтераций (рисунок 17б-17е) [89, 98, 104, 115, 506]. Хотя в некоторых митохондриях кристы были различимы и окружающие мембраны изменений не имели (рисунок 17б), другие митохондрии характеризовались нарушением структуры крист (рисунок 17б-17е). В матриксе митохондрий с нарушенной структурой крист отмечалось формирование вакуолеподобных структур (рисунок 17б-17е). В зонах митохондрий, где отмечалось образование вакуолеподобных структур, наблюдался также отек матрикса, выражающийся в локальной потере матриксом электронной плотности (рисунок 17б-17е). В некоторых интимальных клетках, присутствующих в атеросклеротических бляшках, отмечалось также формирование "миелиноподобных" структур в отечном матриксе митохондрий (рисунок 18а-18г) [89, 98, 104, 115, 506]. Сравнительный анализ количеств митохондрий со структурными изменениями в нормальной интиме и в атеросклеротических бляшках показал, что в то время как количество митохондрий со структурными изменениями в образцах ткани,

полученных из нормальной интимы, варьировало от 0,4% до 3,5%, количество митохондрий со структурными повреждениями в атеросклеротических бляшках варьировало от 5,8% до 23,6% [89, 98, 104, 115, 506].

Следует отметить, что хотя классические электронно-микроскопические исследования содержат описания изменения структуры артериальных клеток в атерогенезе [1-3], ультраструктурные исследования, посвященные изучению морфологических изменений митохондрий при атеросклерозе, до настоящего времени отсутствовали. Данные настоящего исследования выявили большое разнообразие структурных изменений в митохондриях из атеросклеротических бляшек [89, 98, 104, 115, 506].

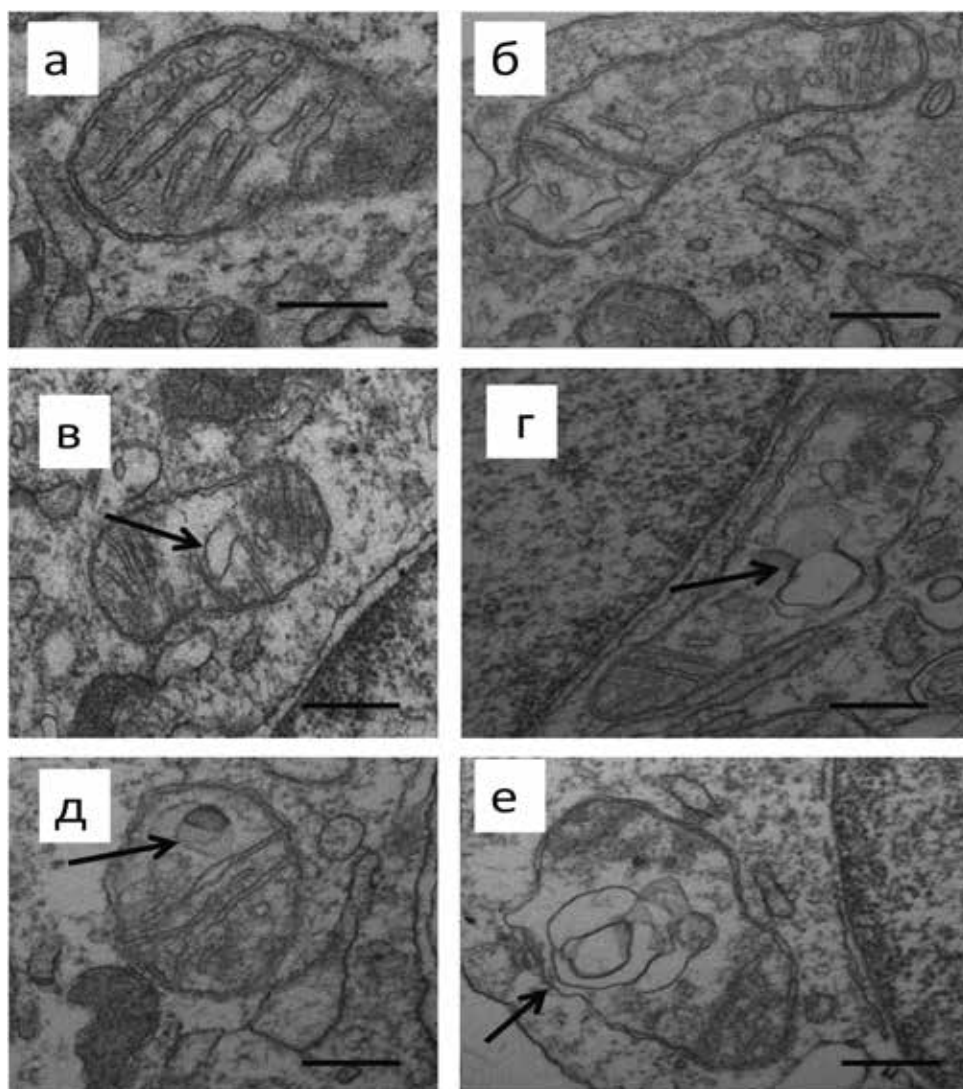


Рисунок 17. Ультраструктура митохондрий в интиме аорты [89, 98, 104, 115, 506]:

(а): типичный вид митохондрии в нормальной интиме аорты.

(б): митохондрия с четко выраженными кристами и хорошо выраженной окружающей мембраной в клетке атеросклеротической бляшки.

(в-е): структурные варианты митохондрий, демонстрирующие наличие деструктивных изменений крист митохондрий в клетках атеросклеротических бляшек.

На рисунке *(в-е)*, стрелки указывают на вакуолеподобные структуры в зонах отека митохондриального матрикса. *(а-е)*. Электронная микроскопия. Линейка = 200 нм

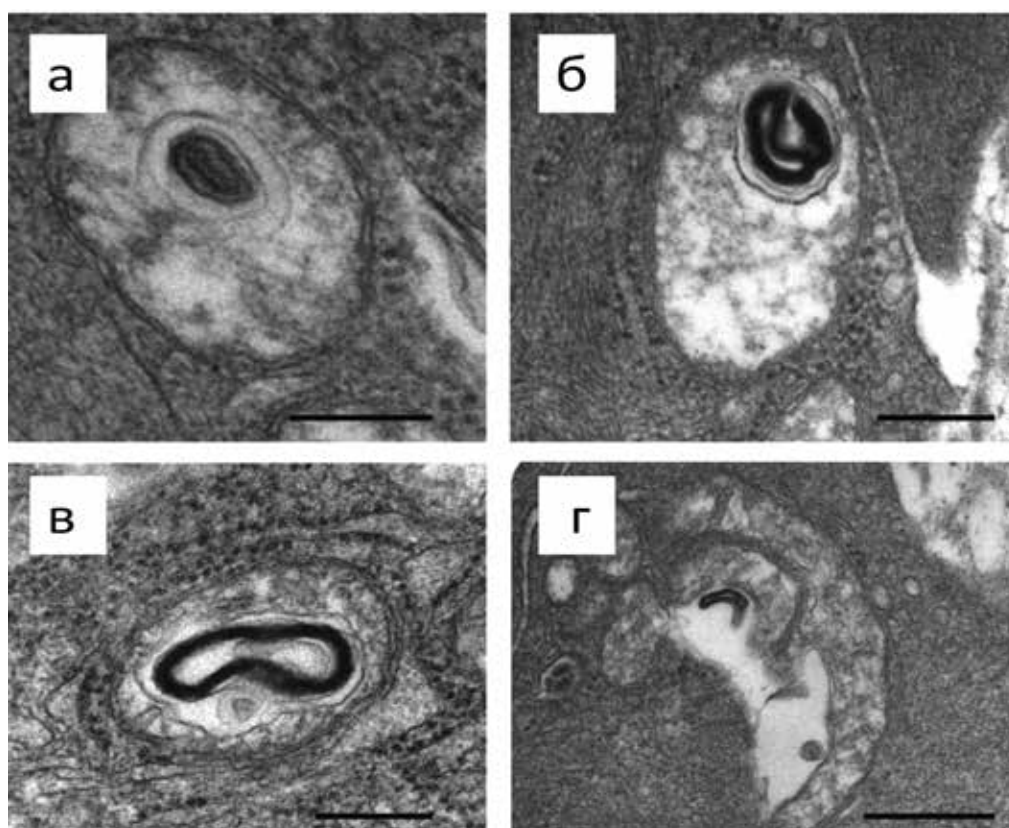


Рисунок 18. Миелиноподобные структуры в отекающих митохондриях, наблюдаемые в клетках атеросклеротических бляшек (а-г). Электронная микроскопия. Линейка = 200 нм [89, 98, 104, 115, 506].

Наличие структурных изменений в митохондриях в клетках, присутствующих в атеросклеротических поражениях, позволяет предполагать, что в митохондриях могут иметься нарушения на биохимическом и генетическом уровне. Последующие разделы настоящей работы посвящены анализу генетических характеристик митохондрий при атеросклерозе [89, 98, 104, 115, 506].

3.2 Разработка метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома

В целях определения порогового уровня гетероплазии митохондриальных мутаций, ассоциированного с возникновением и развитием патологий в организме человека, автор с коллегами разработали новый оригинальный метод количественной оценки митохондриального генома, который основан на пиросеквенировании короткоцепочечных фрагментов ДНК [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 535].

В настоящее время описаны различные методы количественной оценки уровня гетероплазии, например, с помощью технологии ПЦР в режиме реального времени (методов инвазивного расщепления олигонуклеотидного зонда (Invader) и РТ РАСА-кПЦР), методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), анализа гетеродуплексов, анализа гетероплазии с использованием Surveyor nuclease, секвенирования по Сенгеру, SNaPshot, HRM, TGGE, секвенирования нового поколения на оборудовании 454/Roche, Applied Biosystems SOLiD, серии приборов Illumina [89, 154, 158, 179, 202, 215, 231, 239, 271, 293, 298, 303, 365, 380, 384, 387, 396, 397, 434, 436, 437, 445, 466, 521, 535, 541, 550, 563, 579]. Однако эти методы имеют довольно существенный недостаток – значительно меньшую точность (чувствительность и специфичность). Кроме того, пиросеквенирование обеспечивает возможность анализа области исследуемой мутации на очень короткой последовательности нуклеотидов – 5-10 п.н., что значительно увеличивает точность измерения

уровня гетероплазмии мутантного аллеля [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 535].

Метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанный и апробированный автором с сотрудниками, базируется на детекции высоты пиков нуклеотидов на исследуемой пирограмме в анализируемом районе одноцепочечного амплификата ДНК [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 535]. Пирограммы митохондриальных и ядерных генов отличаются между собой. Для ядерного гена имеется четкое разделение на гомо- и гетерозигот по мутантному аллелю, которое делает фиксированной высоту пиков пирограммы (0% – гомозигота, в обоих аллелях мутации нет; 50% – гетерозигота, один из аллелей имеет мутацию; и 100% – гомозигота, в которой оба аллеля несут мутацию). В то же время, вследствие большого количества копий митохондриального генома в митохондриях, уровень гетероплазмии мутаций в них может варьировать от 0% до 100%. Определить уровень гетероплазмии исследованной мутации в образце мтДНК индивида можно, сравнив размер пиков пирограммы при 100% гомоплазмии по наличию исследованной мутации и 100% гомоплазмии по ее отсутствию [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 535].

Вначале для каждой из исследованных мутаций был разработан способ определения уровня гетероплазмии в ПЦР-фрагменте ДНК индивида [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 535].

3..2.1 Способы определения уровня гетероплазмии

можно разделить на несколько типов [89]:

I тип

Делеция одной пары оснований

В исследуемом одноцепочечном фрагменте ДНК исчезает один нуклеотид. Таким образом, в случае 100% нормальных молекул ДНК мы видим

исследуемый пик равным “n” единиц, а в случае 100% мутантных молекул ДНК мы видим исследуемый пик равным “n-1” единиц. В качестве контроля используется ряд контрольных негетероплазмичных пиков из того же участка ДНК, до или после полиморфного фрагмента. Следует отметить, что, если среди контрольных пиков нет пика, одноименного исследуемому, выбираем для сравнения пуриновый или пиримидиновый контрольный пик, в зависимости от того, каким является пик исследуемый [89, 93, 96, 108].

Определяем, сколько единиц составляет исследуемый пик нуклеотидов в определенном образце ДНК и, на сколько единиц он отличается от пика, характерного для 100% нормальных молекул ДНК. Процент гетероплазии по данному типу мутаций вычисляется по формуле $p = \frac{u \times 100\%}{1}$ (формула №1), где «p» – процент гетероплазии по мутации; «u» – разница между количеством единиц нормального и исследуемого пика (или наоборот, между количеством единиц исследуемого и нормального пика) [89, 93, 96, 108].

В качестве примера приведем анализ гетероплазии по мутации m.652delG. Данную мутацию можно определить по пику нуклеотидов G. В анализируемой последовательности он находится под номером 2. По данным компьютерной программы, при 100% нормальных геномов (G/G) пик G составляет 2 единицы (рисунок 19а), а при 100% геномов с делецией (-/-) пик G составляет 1 единицу (рисунок 19б). В качестве контроля берем пик G №5, составляющий 2 единицы [89, 93, 96, 108].

Например, определим процент данной мутации в образце ДНК, взятом из стенки сосуда 50-летнего мужчины. Размер исследуемого пика G в данном образце составляет 15,73 (рисунок 19в). Размер контрольного пика G – 18,29. Полагая, что 18,29 составляет 2 единицы, вычисляем размер исследуемого пика G в единицах. Он равен 1,72 ед. Это на 0,28 ед. меньше пика, характерного для 100% нормальных молекул ДНК. Далее вычисляем процент гетероплазии по m.652delG (формула №1): $0,28 \times 100\% / 1 = 28\%$ [89, 93, 96, 108].

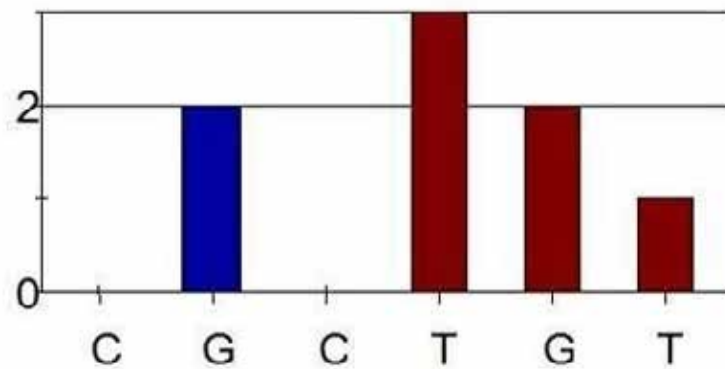
Таким образом, данный образец ДНК имеет 28% гетероплазии по m.652delG [89, 93, 96, 108].

II тип

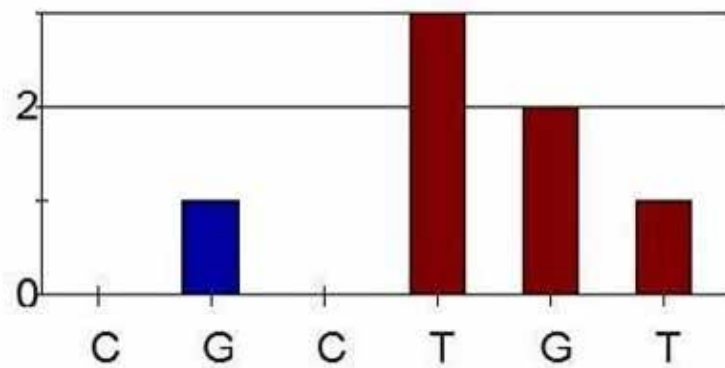
Делеция двух пар нуклеотидов

Детекция данных мутаций проводится аналогично методу анализа мутаций первого типа, за исключением того, что разница между пиками для 100% нормальных и мутантных аллелей составляет две единицы вместо одной [89].

а) Гомоплазмия по отсутствию делеции G



б) Гомоплазмия по наличию делеции G



в)

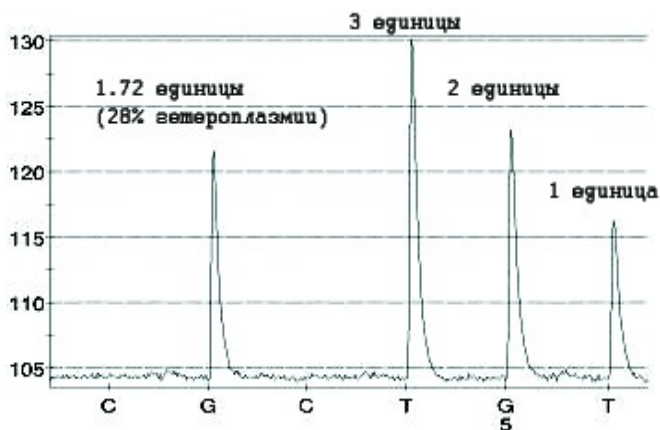


Рисунок 19. Детекция мутации m.652delG. Анализируемый при пиросиквенсе фрагмент - [G]GTTTGGT [89, 93, 96, 108]:

- а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по отсутствию делеции G в позиции 652 митохондриального генома;*
- б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по наличию делеции G в позиции 652 митохондриального генома;*
- в) практическая пиелограмма исследуемого образца ДНК (гетероплазия по m.652delG в исследуемом образце составляет 28%).*

III тип

Инсерция одной пары нуклеотидов

Процент гетероплазии по данному типу мутаций подсчитывается аналогично методу для мутаций I типа, за исключением того, что при 100% аллелей с инсерцией размер исследуемого пика на 1 единицу больше [89, 93, 95, 97, 108].

Для примера продемонстрируем, как подсчитывается процент гетероплазии при мутации m.9537insC. Так как используется реверс-праймер, то анализируем insG. В случае 100% нормальных аллелей величина пика G составляет 6 единиц, а в случае 100% аллелей со вставкой – 7 единиц. В качестве контроля берем пик G, равный 4 ед. Затем процент гетероплазии по данному типу мутаций также вычисляется согласно формуле №1:

$p = \frac{u \times 100\%}{1}$, где «p» – процент гетероплазии по мутации; однако, в этом случае, «u» – разница между количеством единиц исследуемого и нормального пика [89].

При исследовании ДНК участка нормальной сосудистой ткани 43-летнего мужчины размер исследуемого пика G составил 26,53. В то же время величина контрольного пика равнялась 16,28. Принимая во внимание, что 16,28 – это 4 единицы, размер исследуемого пика составил 6,52 единицы. Это на 0,52 ед. больше, чем высота пика при 100% нормальных аллелей [89].

Подсчитаем процент гетероплазии по m.9537insC: $0,52 \times 100\% / 1 = 52\%$
Процент гетероплазии по m.9537insC равен 52 [89].

IV тип

Точечные замены одной пары нуклеотидов

Существует два варианта гистограмм при данных мутациях. В зависимости от варианта существуют разные способы подсчета процента гетероплазии [89].

1 вариант

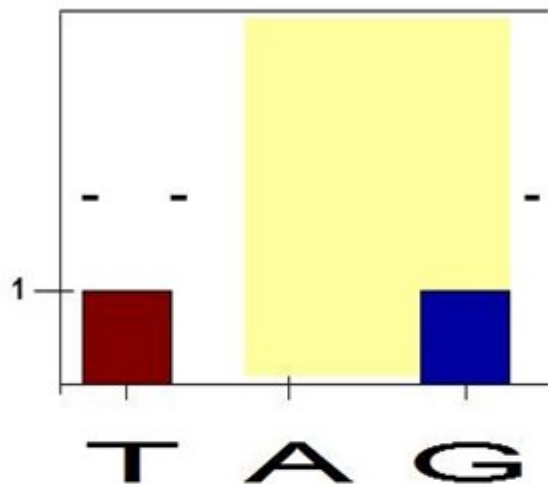
При этом варианте мы изучаем два пика нуклеотидов – нормальный и мутантный. В этом случае мы не берем пиков для контроля, а определяем, сколько единиц составляет сумма двух пиков. Затем суммируем данные по обоим пикам; вычисляем, сколько единиц от суммы составляет мутантный пик и на сколько единиц он больше (или меньше) нормы. После этого подсчитываем процент гетероплазии по формуле №1 [83, 87, 89, 94, 108, 111, 112, 114, 123, 493, 495, 496, 532].

Рассмотрим его на примере мутации m.3256C>T (т.к. используется реверс-праймер, то исследуется замена G→A). При 100% митохондриальных геномов с нуклеотидом G в позиции 3256 – 0 ед. A и 1 ед. G (рисунок 20а); при 100% геномов с нуклеотидом A в позиции 3256 – 0 ед. G и 1 ед. A (рисунок 20б). Мы принимаем сумму за 1 единицу, а затем подсчитываем процент гетероплазии [83, 87, 89, 94, 108, 111, 112, 114, 123, 493, 495, 496, 532].

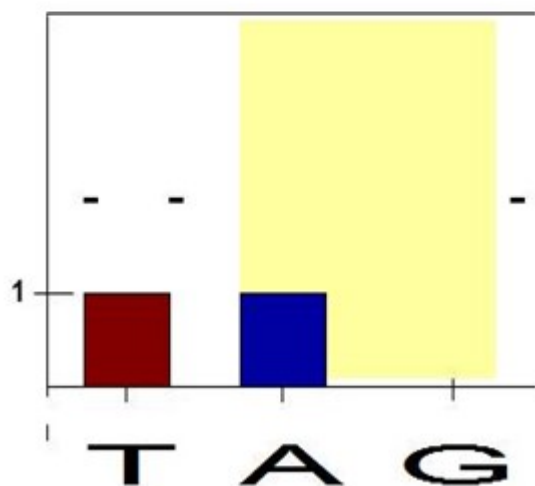
Например, при анализе образца ДНК из сосудистой ткани 29-летнего мужчины размер пика A был равен 0,84; а размер пика G – 3,05 (рисунок 20в). Сумма пиков – 3,89. Принимая во внимание, что 3,89 – это 1 ед., то мутантный пик A

составляет 0,22 ед. Рассчитываем процент гетероплазии по m.3256C>T:
 $0,22 \times 100\% / 1 = 22\%$ [83, 87, 89, 94, 108, 111, 112, 114, 123, 493, 495, 496, 532].

а) Гомоплазмия по G



б) Гомоплазмия по A



в)

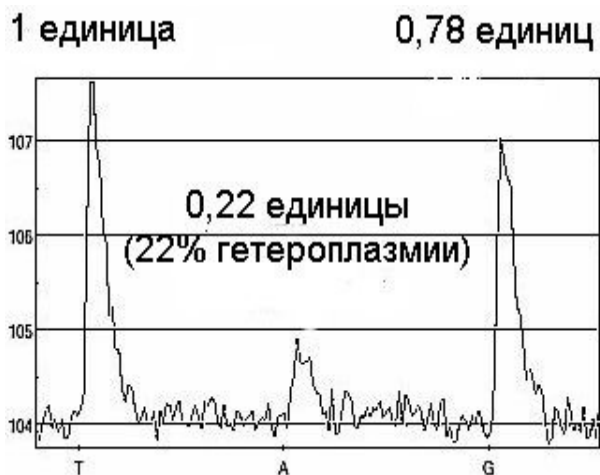


Рисунок 20. Детекция мутации $m.3256C>T$ (при использовании обратного праймера для сиквенса – $GT\rightarrow AT$). Анализируемый при пиросиквенсе фрагмент – TA/G [83, 87, 89, 94, 108, 111, 112, 114, 123, 493, 495, 496, 532]:

а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по отсутствию замены 3256 $G\rightarrow A$ в митохондриальном геноме;

б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по наличию замены 3256 $G\rightarrow A$ в митохондриальном геноме;

в) практическая пираграмма исследуемого образца ДНК (уровень гетероплазмии по мутации $m.3256C>T$ составляет 22%).

2 вариант

При данной однонуклеотидной замене анализируемая последовательность состоит не из двух, а из нескольких пиков нуклеотидов [89, 105, 107, 497]. В таком случае подсчитываем общее количество единиц данных пиков, суммируем данные по пикам для исследуемого образца ДНК, находим, какое количество единиц составляет пик мутантного нуклеотида от суммы и на сколько единиц он отличается от нормы (т.е. от пика данного нуклеотида при 100% нормальных молекул ДНК), а затем подсчитываем процент гетероплазмии по данной мутации [89, 105, 107, 497].

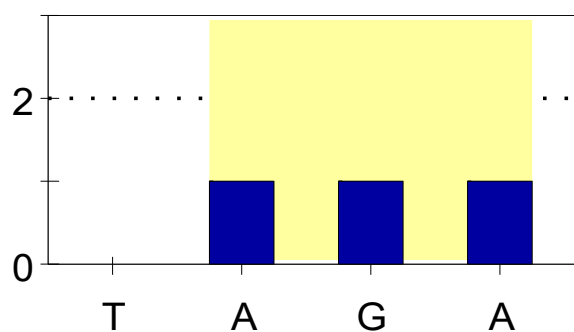
В качестве примера рассмотрим мутацию $m.13513G>A$. При 100% нормальных геномов с нуклеотидом G в позиции 13513 – 1 ед. A (пик №2), 1 ед. G (пик №3), 1 ед. A (пик №4) (рисунок 21а); при 100% мутантных геномов с нуклеотидом A в позиции 13513 – 3 ед. A, 0 ед. G, 0 ед. A (рисунок 21б). Как видно из гистограммы, процент гетероплазмии необходимо анализировать по пику A (№2), т.к. именно в этой позиции происходит замена [89, 105, 107, 497].

Суммируем данные по трем пикам, принимаем сумму за 3 единицы, после чего рассчитываем, сколько единиц составляет мутантный пик A (№2). Зная, на сколько единиц этот пик больше пика, характерного для 100% нормальных аллелей, мы можем рассчитать процент гетероплазмии для данной

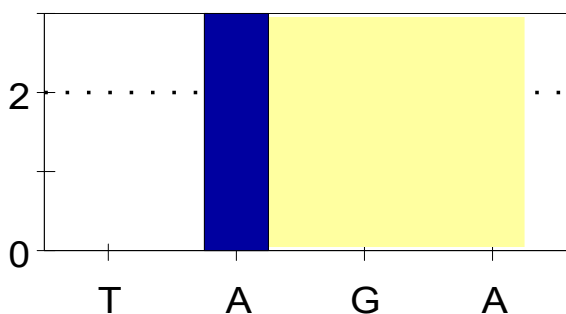
мутации по формуле №2: $p = ux100\%/2$, где «р» – процент гетероплазии по мутации; «у» – разница между количеством единиц исследуемого и нормального пика [89, 105, 107, 497].

Например, при исследовании образца ДНК из сосудистой ткани 43 – летнего мужчины, пик А (пик №2) составил 10,76; пик G (пик №3) – 4,64; пик А (пик №4) – 5,18 (рисунок 21в) [89, 105, 107, 497].

а) гомоплазия по G (100% нормальных геномов)



б) гомоплазия по A (100% мутантных геномов)



в) гетероплазия по A

1,6 единицы (30% гетероплазии)

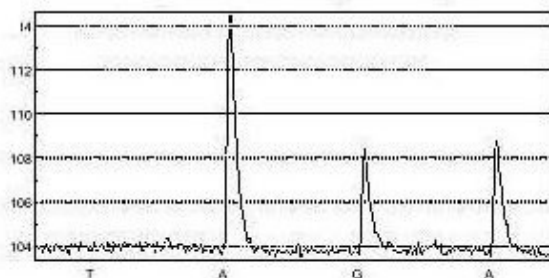


Рисунок 21. Детекция мутации *m.13513G>A*. Анализируемый при пиросиквенсе фрагмент – *AG/AA* [89, 105, 107, 497]:

- а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю 13513G в митохондриальном геноме;*
- б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по мутантному аллелю 13513A в митохондриальном геноме;*
- в) практическая пирограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации *m.13513G>A* составляет 30%).*

Сумма пиков – 20,58. Принимая во внимание, что сумма равна 3 ед., размер мутантного пика С составляет 1,6 ед., т.е. на 0,6 ед. больше нормы.

Подсчитываем процент гетероплазмии: $0,6 \times 100\% / 2 = 30\%$

Таким образом, гетероплазмия по мутации *m.13513G>A* составляет 30% [89, 105, 107, 497].

V тип

Два варианта точечной замены одной пары нуклеотидов в одной и той же позиции митохондриальной хромосомы человека

Анализ мутаций данного типа немного похож на анализ мутаций 2 варианта IV типа. Имеется три пика, размер которых меняется, в зависимости от количества нормальных и мутантных хромосом. Для каждого варианта замены характерна своя комбинация размеров пиков. Следует выяснить, на какое количество единиц изменяется размер мутантного пика при каждой мутации, и учитывать это значение при подсчете процента гетероплазмии отдельно для каждой из замен. Затем подсчитывается общее количество единиц данных пиков, суммируются данные по пикам для анализируемого образца ДНК, определяется, какое количество единиц составляет пик мутантного нуклеотида от общей суммы, а затем считается процент гетероплазмии по данной мутации по формуле №1. Если мы находим определенный процент

гетероплазмии по каждому варианту замены, мы говорим, что в данной позиции митохондриальной хромосомы человека есть гетероплазмия по обеим мутациям [89].

Рассмотрим пример определения процента гетероплазмии для мутации m.14482C>G/A. В одной и той же анализируемой области пирограммы можно определить гетероплазмию по мутациям m.14482C>G и m.14482C>A. При 100% нормальных аллелей (C/C) пик C будет составлять 2 ед., пик G – 0 ед., пик A – 1 ед. При 100% замене C→G пик C будет равен 1 ед., G – 1 ед., A – 1 ед. При 100% аллелей с нуклеотидом A в позиции 14482 пик C будет равен 1 ед., пик G – 0 ед., пик A – 2 ед. Таким образом, при каждой из замен пик исследуемого нуклеотида увеличивается на 1 единицу. Мы суммируем данные по всем трем пикам, принимаем их равными 3 единицам и определяем, какое количество единиц составляет пик нуклеотида исследуемого варианта замены и на сколько единиц он больше нормы. Затем считаем процент гетероплазмии [89].

Например, при анализе образца ДНК из сосудистой ткани 25-летнего мужчины размер пика C составил 12,52; пика G – 0,45; пика A – 12,41. Сумма пиков оказалась равной 25,38. Поэтому, в единицах размер пика A равен 1,47; это на 0,47 единиц больше нормы. В то же время, размер пика G равен 0,05 единиц, что, соответственно, на такое же количество единиц больше нормы. Теперь можно посчитать процент гетероплазмии для каждой из замен:

- а) для исследуемого пика A: $0,47 \times 100\% / 1 = 47\%$;
- б) для исследуемого пика G: $0,05 \times 100\% / 1 = 5\%$ [89].

Таким образом, гетероплазмия по мутации m.14482C>A в исследуемом образце ДНК оказалась равной 47%, а по мутации m.14482C>G – 5% [89].

VI тип

Две точечные замены, расположенные на соседних позициях в митохондриальной ДНК человека

Анализ таких мутаций похож на анализ двух вариантов замен в одной и той же позиции хромосомы (мутаций V типа). В качестве примера приведем анализ мутаций m.8362T>G и m.8363G>A [89]. Так как используется обратный праймер, то на самом деле будет проводиться анализ процента гетероплазии мутаций m.8362A>C и m.8363C>T, причем в обратном порядке.

В случае 100% нормальных аллелей (C/C, A/A) пики нуклеотидов будут следующих размеров: 0 ед. T (пик №2), 1 ед. C (№3), 1 ед. A (№4), 1 ед. C (№5). При 100% аллелей с заменой m.8363C>T (T/T, A/A) размеры пиков будут составлять: 1 ед. T, 0 ед. C, 1 ед. A, 1 ед. C. При 100% аллелей с мутацией A8362C (C/C, C/C) размеры пиков будут составлять: 0 ед. T, 3 ед. C, 0 ед. A, 0 ед. C. Следует подчеркнуть, что при 100% замене C→T, по сравнению с нормой, на 1 ед. увеличивается пик T; а при 100% замене A→C – на 2 ед. увеличивается пик C. Сумма пиков составляет 3 ед. Мы подсчитываем размер исследуемых пиков в единицах, выясняем, на сколько единиц они отличаются от размера этих пиков при 100% нормальных аллелей (обозначим это значение через “у”), а затем подсчитываем процент гетероплазии по каждой из мутаций [89]:

- а) для m.8363C>T (расчет производится по формуле №1);
- б) для m.8362A>C.

Следует отметить, что при данной мутации затруднена оценка процента гетероплазии по пику нуклеотидов C, т.к. имеется, кроме исследуемого (пика №3), дополнительный пик C (№5). Данный пик (№5) при замене A→C сливается с исследуемым пиком (№3), т.е. компьютерная программа показывает размер пика, соответствующий сумме их значений. Значения остальных пиков при этом равны нулю. Все это очень осложняет расчеты. Поэтому, значительно проще провести оценку гетероплазии по пику A (по

формуле №1), после чего вычтешь данное значение из 100%. Полученная цифра (z%) и будет процентом гетероплазмы по m.8362A>C. Расчет производится по формуле №3: $z = 100\% - ux100\%/1$, где «z» – процент гетероплазмы по мутации A→C; «у» – разница между количеством единиц исследуемого и нормального пика А [89].

3.2.2 Общая формула для подсчета процента гетероплазмиимутаций митохондриального генома

3.2.2.1 Общая формула

После анализа всех разработанных формул была создана общая формула для подсчета процента гетероплазмы любых мутаций митохондриального генома (формула № 4) [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532]:

$$P = \frac{h - N}{M - N} \cdot 100$$

где М – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100% мутантных аллелей;

h – высота пика исследуемого нуклеотида;

P – процент гетероплазмы;

N – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100% нормальных аллелей [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

3.2.2.2 Пример расчета процента гетероплазии мутации *m.1555A>G* митохондриального генома по общей формуле (рисунок 22)

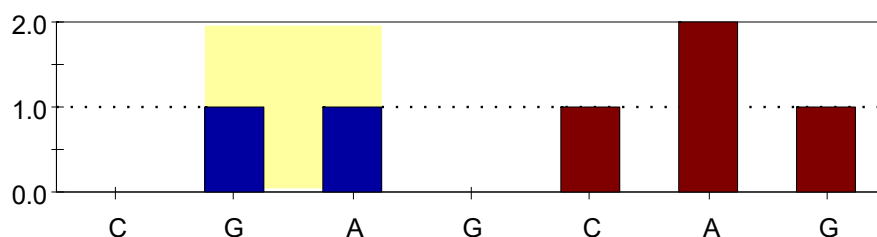
Мутацию *m.1555A>G* можно определить по пикам нуклеотидов G и A, располагающимся в анализируемой последовательности под номерами 2 и 3, соответственно. По данным компьютерной программы, при 100% нормальных геномов (G/G) пики G2 и A3 составляют по 1 единице (рисунок 22а), а при 100% геномов с мутацией (A/A) пик A3 составляет 2 единицы, а пик G2 – 0 единиц (рисунок 22б) [89, 91-93, 108, 119].

Таким образом, сумма величин пиков G2 и A3 составляет 2 единицы. Величина исследуемого пика A3 в образце ДНК оказалась равной 1,27; а пика G2 – 3,43. Рассчитываем величину пика, соответствующую одной единице. Она равна 2,35 [89, 91-93, 108, 119].

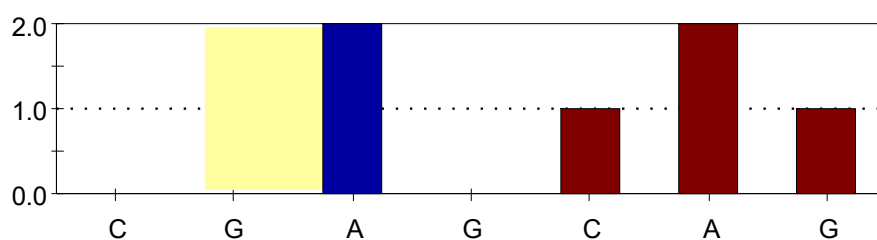
Подставляем значения в формулу №4: $P = \frac{1,27 - 2,35}{3,43 - 2,35} \cdot 100\% = 27\%$

Таким образом, процент гетероплазии по мутации *m.1555A>G* в образце ДНК, взятом из интимы аорты 70-летней женщины, оказался равен 27% (рисунок 22в) [89, 91-93, 108, 119].

а) Гомоплазмия по G (100% нормальных геномов)



б) Гомоплазмия по A (100% мутантных геномов)



в) Гетероплазмия по А

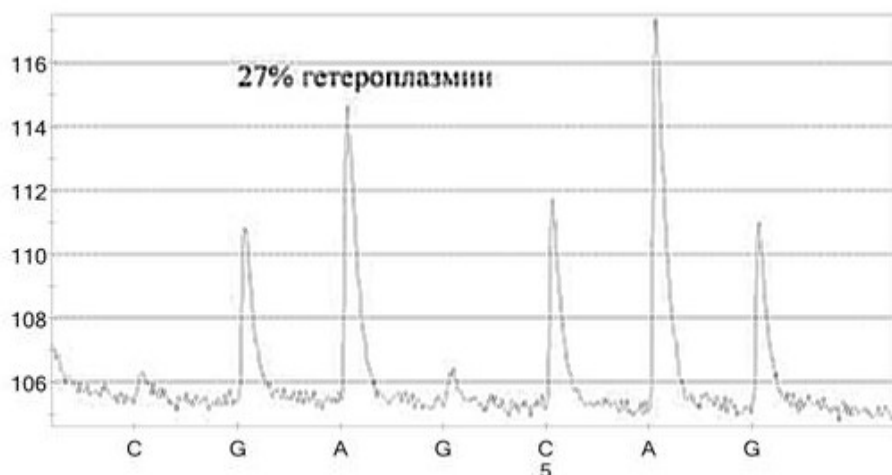


Рисунок 22. Детекция мутации *m.1555A>G*. Анализируемый при пиросиквенсе фрагмент – G/AACAAG [89, 91-93, 108, 119]:

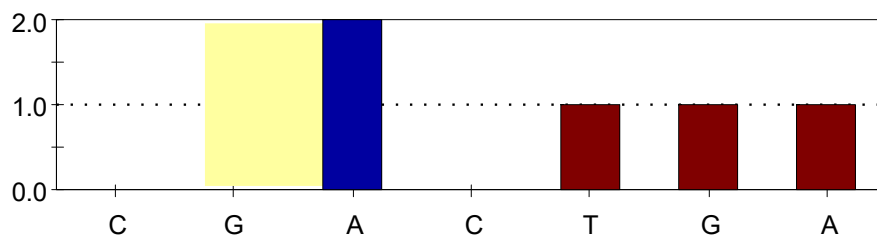
- а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю 1555G в митохондриальном геноме;*
- б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по мутантному аллелю 1555A в митохондриальном геноме;*
- в) практическая пиелограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации *m.1555A>G* составляет 27%).*

3.2.3 Примеры гистограмм исследованных мутаций и уровня гетероплазмии, определенного по пиелограммам ПЦР-фрагментов образцов ДНК

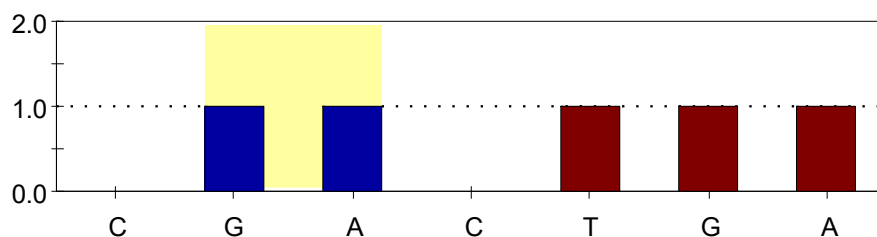
3.2.3.1 Для мутации *m.3336T>C*

Для данной однонуклеотидной замены используется обратный праймер для сиквенса, поэтому анализируется замена А на G (рисунок 23) [27, 89, 105, 107, 160, 497].

а) Гомоплазмия по А (100% нормальных геномов)



б) Гомоплазмия по G (100% мутантных геномов)



в) Гетероплазмия по G

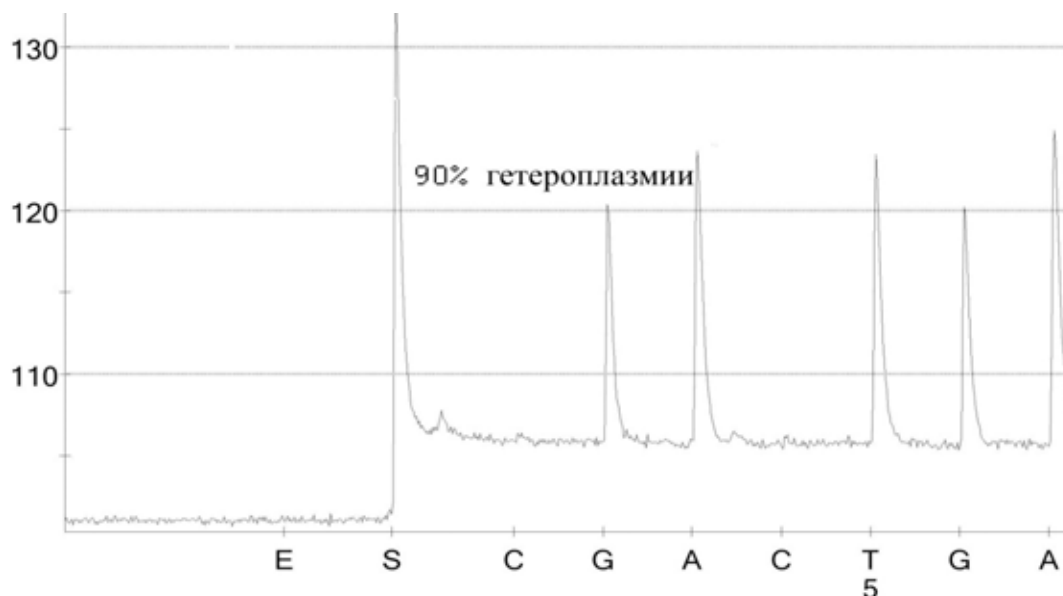


Рисунок 23. Детекция мутации $m.3336T>C$ (при использовании обратного праймера для сиквенса – $A\rightarrow G$). Анализируемый при пиросиквенсе фрагмент – $A/GATGA$ [27, 89, 105, 107, 160, 497]:

- а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю 3336A в митохондриальном геноме;*
- б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по мутантному аллелю 3336G в митохондриальном геноме;*
- в) практическая пирограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации $m.3336A>G$ составила 90%).*

3.2.3.2 Для мутации *m.5178C>A*

Для *m.5178C>A* также используется обратный праймер для сиквенса, поэтому анализируется замена G на T (рисунок 24) [45, 89, 90, 105, 107, 482, 497].

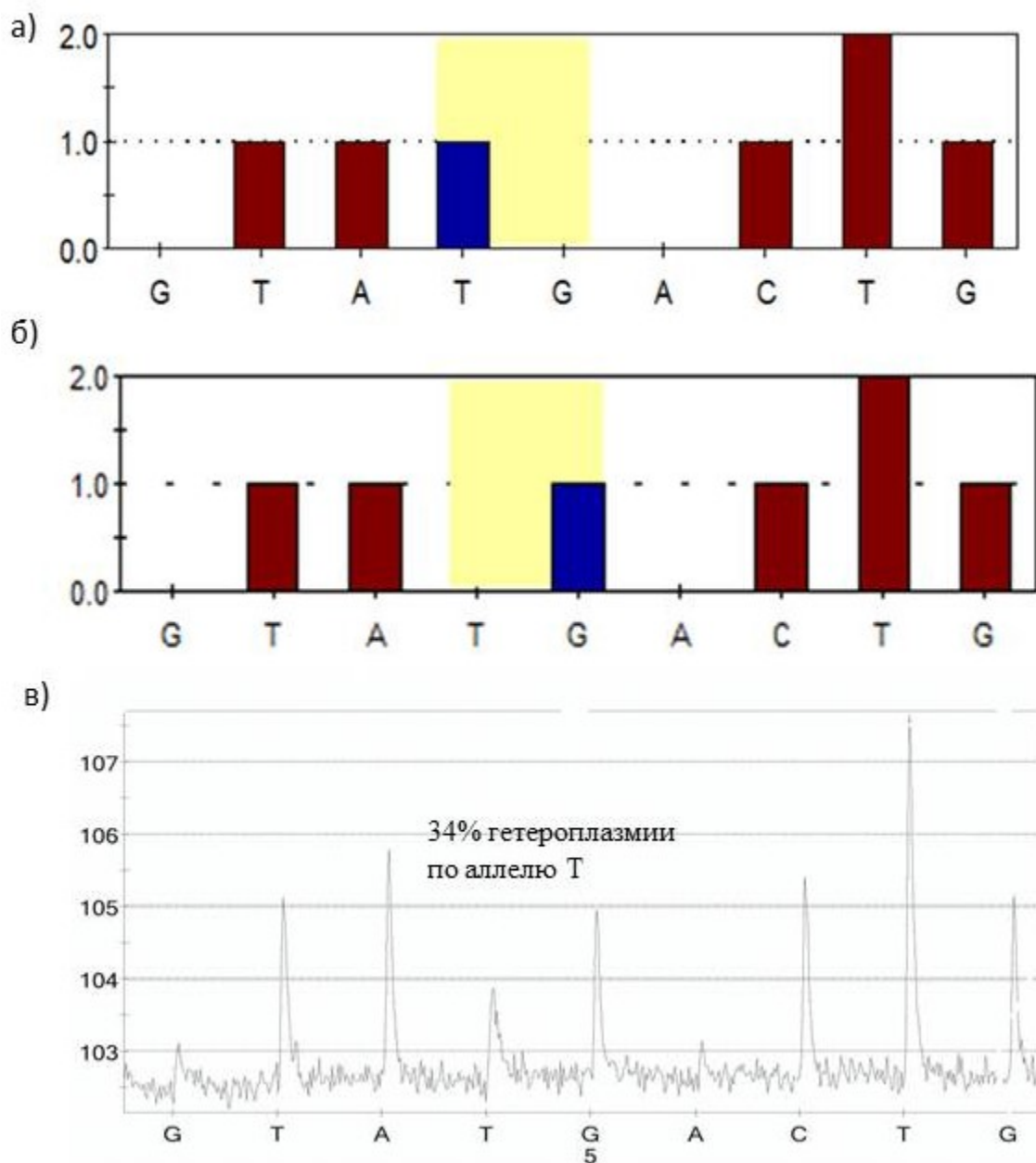


Рисунок 24. Анализ уровня гетероплазии мутации *m.5178C>A* (G→T при использовании обратного праймера для сиквенса). Анализируемый при пиросиквенсе фрагмент – TAT/GCTTG [45, 89, 90, 105, 107, 482, 497]:

a) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по мутантному аллелю T;

- б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю G;
- в) практическая пирограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации т.5178C>A составила 32%).

3.2.3.3 Для т.15059G>A

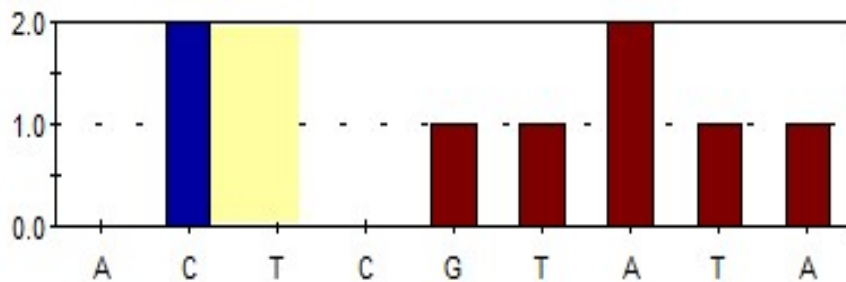
При исследовании данной мутации используется обратный праймер для сиквенса, поэтому анализируется замена С на Т (рисунок 25) [13, 89, 106, 116, 498, 527].

3.2.4 Оценка воспроизводимости метода измерения уровня гетероплазмии

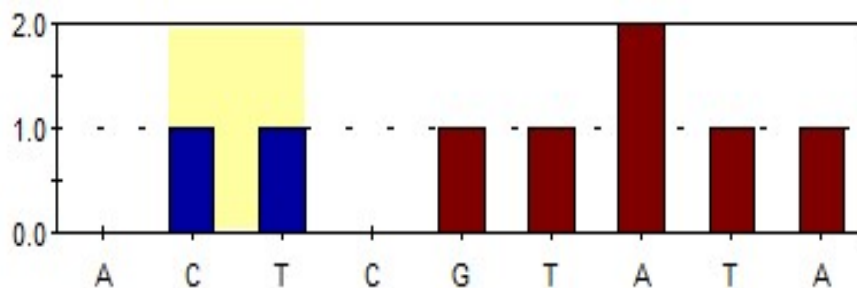
Для определения воспроизводимости метода был применен подход, использующий три последовательных независимых измерения уровня гетероплазмии в одном и том же образце [89]. Воспроизводимость оценивали по коэффициенту вариации (отношению стандартного отклонения к средней величине, выраженному в процентах). Результаты измерений представлены в таблице 21. Коэффициент вариации по результатам трехкратного измерения уровня гетероплазмии по произвольно выбранной мутации на 46 образцах интимы аорты человека составил 11,4 (SD=6,5); при этом отклонение индивидуальных измерений от средней результирующей величины составило 1,4 (SD=1,2) [89].

Таким образом, показатели чувствительности и специфичности метода, составили 88,2% и 77,1%, соответственно ($p \leq 0,05$). Воспроизводимость метода измерения уровня гетероплазмии составила 88,6% [89].

а) Гомоплазмия по С (100% нормальных геномов)



б) Гомоплазмия по Т (100% мутантных геномов)



в) Гетероплазмия по Т

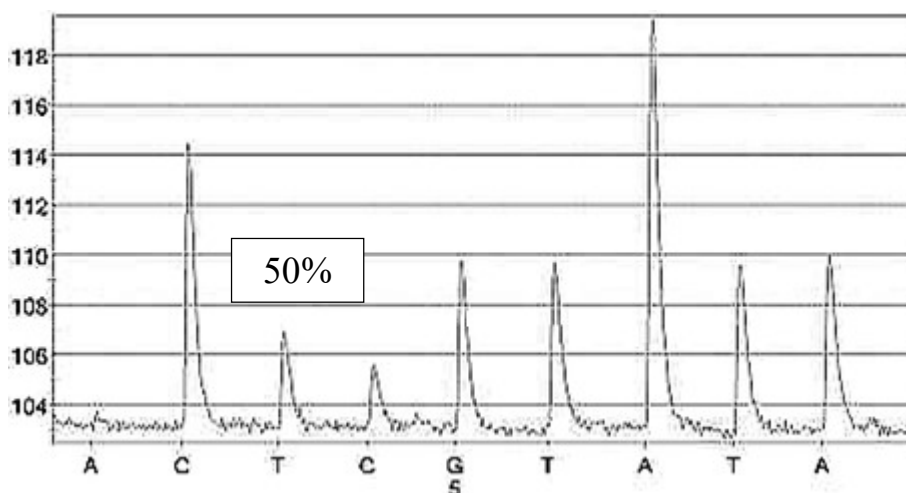


Рисунок 25. Анализ уровня гетероплазмии мутации $m.15059G>A$ (C→T при использовании обратного праймера для сиквенса). Анализируемый при пиросиквенсе фрагмент – CC/TGTAATA [89]:

а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю С;

б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по мутантному аллелю Т;

в) практическая пирограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации $m.15059G>A$ составила 50%).

Таблица 21. Результаты экспериментов по оценке воспроизводимости измерений уровня гетероплазии митохондриального генома [89]

№ п/п	Измерение 1	Измерение 2	Измерение 3	Среднее	SD	CV
1	18	18	16	17.3	1.2	6.7
2	20	17	20	19.0	1.7	9.1
3	14	14	12	13.3	1.2	8.7
4	14	16	18	16.0	2.0	12.5
5	24	16	22	20.7	4.2	20.1
6	16	15	14	15.0	1.0	6.7
7	14	17	16	15.7	1.5	9.8
8	22	25	24	23.7	1.5	6.5
9	24	21	29	24.7	4.0	16.4
10	24	20	23	22.3	2.1	9.3
11	16	20	24	20.0	4.0	20.0
12	23	24	23	23.3	0.6	2.5
13	11	12	15	12.7	2.1	16.4
14	18	18	20	18.7	1.2	6.2
15	16	18	22	18.7	3.1	16.4
16	22	26	23	23.7	2.1	8.8
17	23	15	17	18.3	4.2	22.7
18	29	27	34	30.0	3.6	12.0
19	17	20	22	19.7	2.5	12.8
20	20	24	22	22.0	2.0	9.1
21	22	18	19	19.7	2.1	10.6
22	64	64	64	64.0	0.0	0.0
23	52	63	57	57.3	5.5	9.6
24	16	16	16	16.0	0.0	0.0
25	15	17	19	17.0	2.0	11.8
26	14	13	17	14.7	2.1	14.2

27	11	12	14	12.3	1.5	12.4
28	12	9	14	11.7	2.5	21.6
29	12	15	18	15.0	3.0	20.0
30	12	12	12	12.0	0.0	0.0
31	10	17	16	14.3	3.8	26.4
32	18	19	24	20.3	3.2	15.8
33	11	11	13	11.7	1.2	9.9
34	14	11	12	12.3	1.5	12.4
35	7	6	7	6.7	0.6	8.7
36	7	9	7	7.7	1.2	15.1
37	8	5	7	6.7	1.5	22.9
38	9	12	10	10.3	1.5	14.8
39	9	8	8	8.3	0.6	6.9
40	8	8	8	8.0	0.0	0.0
41	8	12	11	10.3	2.1	20.1
42	23	21	21	21.7	1.2	5.3
43	13	14	13	13.3	0.6	4.3
44	22	17	21	20.0	2.6	13.2
45	25	23	23	23.7	1.2	4.9
46	19	16	17	17.3	1.5	8.8

Примечание: SD – стандартное отклонение; CV – коэффициент вариации.

3.3 Исследование интимы аорты человека с помощью метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома

3.3.1 Цель исследования интимы аорт индивидов

Полагают, что одним из объяснений мозаичного расположения атеросклеротических поражений в интимае сосудов может быть повреждающее

действие гемодинамического стресса [89, 114]. 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 мозаичности атеросклеротических поражений. В последнее время все чаще высказывается предположение, что мозаичность атеросклероза может быть объяснена генетическими факторами [89, 114].

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 интимо-медиального слоя, возникновению и росту атеросклеротической бляшки [89, 114]. 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, которые могут неограниченно пролиферировать [89, 114]. Спонтанное появление подобных мутантных гладкомышечных клеток в различных участках интимы сосудов может служить объяснением мозаичности атеросклеротических поражений. Кроме того, есть вероятность избирательного накопления мутантных копий митохондриального генома, переданных от матери потомкам, при попадании клетки в неблагоприятные условия. Это может произойти во время митоза, когда, при случайном неравномерном распределении митохондриальной ДНК, мутантные копии попадают, в основном, только в одну дочернюю клетку [89, 114].

В результате накопления мутантных копий мтДНК могут появиться отличия по уровню гетероплазии мутаций мтДНК между клетками

пораженных и нормальных участков интимы аорты. С целью проверки данного предположения был проведен пилотный анализ интимы аорт [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

3.3.2 Детекция уровня гетероплазии 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 их уровня гетероплазии с атеросклерозом [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

С помощью разработанного метода прямой количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома проведен анализ данных мутаций в образцах ДНК из липофиброзных бляшек и участков нормальной интимы 7 аорт [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

Следует отметить, что при анализе пирогрaмм выбранных для исследования мутаций, с помощью разработанного автором с коллегами метода, в образцах интимы аорты удалось выявить три новые, ранее не описанные мутации – m.652delG, m.961delC и m.5132insAA [89].

Сорок исследованных мутаций оказались гетероплазмичными (m.652delG, m.716T>G, m.750A>G, m.961delC, m.1555A>G, m.3256C>T, m.3258T>C, m.3271T>C, m.3280A>G, m.3285C>T, m.3316G>A, m.3336T>C, m.5132insAA, m.5178C>A, m.5540G>A, m.5692T>C, m.5814T>C, m.6489C>A, m.8993T>G, m.8993T>C, m.9379G>A, m.9480del15, m.9537delC, m.12315G>A, m.13513G>A, m.14459G>A, m.14482C>A, m.14482C>G, m.14484T>C, m.14487T>C, m.14709T>C, m.14846G>A, m.15059G>A, m.652insG, m.961insC, m.15084G>A, m.5132delAA, m.15498del24, m.15452C>A и m.15762G>A), а две

(m.8362T>G и m.8363G>A) – гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе [89].

Статистический анализ проводился с помощью непараметрического теста Монте-Карло, рангового теста Уилкоксона и бутстрэп-анализа [89].

Результаты представлены в таблицах 22-24 [44, 82–97, 100, 101, 103, 296, 436, 464–471, 492–496]. Присвоение индекса «_а», означает, что уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома представлен для участков интимы с липофиброзной бляшкой; если данный индекс в названии мутации отсутствует, то уровень гетероплазмии исследуемой мутации указан для нормальных участков интимы аорты [89].

Данные в таблице 22 представлены в виде среднего, стандартного отклонения и межквартильных значений [89].

Таблица 22. Показатели уровня гетероплазмии исследуемых мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и нормальных участках интимы аорт [89].

Мутация	Среднее	Стандартное отклонение	Процентили (квартили)		
			25%	50% (медиана)	75%
m.652delG	5,9	10,3	0,0	0,0	9,0
m.652delG_a	7,6	8,9	0,0	2,0	17,0
m.652insG	2,4	4,6	0,0	0,0	5,0
m.652insG_a	2,4	4,2	0,0	0,0	8,0
m.716T>G	1,7	2,4	0,0	0,0	3,0
m.716T>G_a	1,3	1,7	0,0	0,0	3,0
m.750A>G	4,6	1,8	3,0	4,0	7,0
m.750A>G_a	6,0	4,5	3,0	5,0	6,0
m.961delC	0,9	2,3	0,0	0,0	0,0
m.961delC_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.961insC	16,9	12,7	4,0	23,0	27,0

m.961insC_a	22,7	16,6	11,0	23,0	29,0
m.1555A>G	14,6	19,2	0,0	14,0	19,0
m.1555A>G_a	4,7	4,6	0,0	7,0	8,0
m.3256C>T	11,0	8,2	8,0	10,0	13,0
m.3256C>T_a	14,6	11,2	8,0	12,0	22,0
m.3258T>C	6,7	5,6	3,0	5,0	10,0
m.3258T>C_a	7,9	2,7	5,0	8,0	11,0
m.3271T>C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.3271T>C_a	2,4	6,4	0,0	0,0	0,0
m.3280A>G	1,3	2,4	0,0	0,0	3,0
m.3280A>G_a	1,9	3,5	0,0	0,0	4,0
m.3285C>T	2,7	2,1	0,0	3,0	5,0
m.3285C>T_a	3,4	2,0	2,0	4,0	5,0
m.3316G>A	3,1	3,5	0,0	2,0	7,0
m.3316G>A_a	4,6	2,9	2,0	5,0	6,0
m.3336T>C	9,9	24,8	0,0	0,0	3,0
m.3336T>C_a	4,3	6,4	0,0	0,0	7,0
m.5132delAA	0,9	1,6	0,0	0,0	2,0
m.5132delAA_a	3,3	6,0	0,0	0,0	8,0
m.5132insAA	5,6	6,5	0,0	3,0	13,0
m.5132insAA_a	3,9	5,3	0,0	0,0	9,0
m.5178C>A	12,3	9,5	7,0	10,0	14,0
m.5178C>A_a	9,0	6,7	5,0	7,0	18,0
m.5540G>A	6,7	4,6	3,0	8,0	11,0
m.5540G>A_a	6,3	3,8	4,0	6,0	7,0
m.5692T>C	5,9	4,3	4,0	5,0	8,0
m.5692T>C_a	5,0	2,4	3,0	5,0	5,0
m.5814T>C	2,3	2,5	0,0	2,0	5,0
m.5814T>C_a	3,4	5,0	0,0	0,0	6,0

m.6489C>A	6,4	6,7	3,0	4,0	8,0
m.6489C>A_a	3,1	2,5	2,0	3,0	4,0
m.8362T>G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.8362T>G_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.8363G>A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.8363G>A_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.8993T>C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.8993T>C_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
m.8993T>G	44,7	3,6	42,0	46,0	47,0
m.8993T>_a	43,7	1,6	43,0	44,0	45,0
m.9379G>A	2,3	2,7	0,0	2,0	2,0
m.9379G>A_a	4,7	2,8	3,0	6,0	7,0
m.9480del15	3,3	4,5	0,0	0,0	7,0
m.9480del15_a	6,3	5,9	3,0	4,0	9,0
m.9537delC	15,9	24,4	0,0	9,0	22,0
m.9537delC_a	15,3	13,0	2,0	12,0	27,0
m.12315G>A	3,7	5,0	0,0	0,0	8,0
m.12315G>A_a	14,4	14,7	5,0	6,0	35,0
m.13513G>A	30,7	12,7	20,0	30,0	45,0
m.13513G>A_a	40,0	16,1	25,0	40,0	60,0
m.14459G>A	3,6	3,5	2,0	3,0	4,0
m.14459G>A_a	11,7	18,4	3,0	4,0	10,0
m.14482C>A	47,4	5,1	42,0	49,0	51,0
m.14482C>A_a	46,0	4,8	42,0	48,0	49,0
m.14482C>G	2,3	2,5	0,0	2,0	5,0
m.14482C>G_a	8,4	14,6	0,0	4,0	7,0
m.14484T>C	1,1	2,0	0,0	0,0	4,0
m.14484T>C_a	2,3	3,7	0,0	0,0	4,0
m.14487T>C	4,4	2,2	3,0	4,0	7,0

m.14487T>C_a	5,3	2,4	3,0	5,0	8,0
m.14709T>C	2,4	3,8	0,0	0,0	5,0
m.14709T>C_a	4,1	3,5	2,0	3,0	6,0
m.14846G>A	4,7	3,1	2,0	5,0	8,0
m.14846G>A_a	6,7	4,1	6,0	6,0	8,0
m.15059G>A	14,6	18,7	0,0	0,0	31,0
m.15059G>A_a	38,6	29,1	0,0	41,0	66,0
m.15084G>A	0,4	1,1	0,0	0,0	0,0
m.15084G>A_a	0,3	0,8	0,0	0,0	0,0
m.15452C>A	74,0	33,2	80,0	82,0	90,0
m.15452C>A_a	73,4	34,3	72,0	86,0	98,0
m.15498del24	2,4	4,6	0,0	0,0	5,0
m.15498del24_a	2,6	5,0	0,0	0,0	5,0
m.15762G>A	5,0	4,3	0,0	6,0	7,0
m.15762G>A_a	5,3	4,1	3,0	4,0	9,0

Сравнение величины гетероплазии в нормальных и атеросклеротических участках сосудистой стенки аорт проводили методами непараметрической статистики с использованием рангового теста Уилкоксона (таблица 23) [89].

Таблица 23. Сравнение уровня гетероплазии 42 мутаций мтДНК в нормальных участках интимы аорт и липофиброзных бляшках с помощью рангового теста Уилкоксона [89]

Мутации	Вид ранга	Количество рангов	Средний ранг	Суммарный ранг
m.652delG	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		

m.652insG	Отрицательный	2	2,50	5,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	3		
m.716T>G	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	5		
m.750A>G	Отрицательный	2	4,50	9,00
	Положительный	4	3,00	12,00
	Нейтральный	1		
m.961insC	Отрицательный	3	2,67	8,00
	Положительный	3	4,33	13,00
	Нейтральный	1		
m.961delC	Отрицательный	1	1,00	1,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	6		
m.1555A>G	Отрицательный	4	2,50*	10,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	3		
m.3256C>T	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	5	6,00*	42,00*
	Нейтральный	0		
m.3258T>C	Отрицательный	1	6,00	6,00
	Положительный	5	3,00	15,00
	Нейтральный	1		
m.3271T>C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	6		
m.3280A>G	Отрицательный	1	1,50	1,50
	Положительный	2	2,25	4,50

	Нейтральный	4		
m.3285C>T	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		
m.3316G>A	Отрицательный	1	1,50*	1,50*
	Положительный	4	3,38*	13,50*
	Нейтральный	2		
m.3336T>C	Отрицательный	1	2,00*	4,00*
	Положительный	3	4,00*	6,00*
	Нейтральный	3		
m.5132insAA	Отрицательный	3	3,00	9,00
	Положительный	2	3,00	6,00
	Нейтральный	2		
m.5132delAA	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	2	3,50*	7,00*
	Нейтральный	3		
m.5178C>A	Отрицательный	4	4,00*	11,00*
	Положительный	1	2,75*	4,00*
	Нейтральный	2		
m.5540G>A	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	3	4,00	12,00
	Нейтральный	0		
m.5692T>C	Отрицательный	4	3,00	12,00
	Положительный	2	4,50	9,00
	Нейтральный	1		
m.5814T>C	Отрицательный	2	1,50	3,00
	Положительный	1	3,00	3,00
	Нейтральный	4		
m.6489C>A	Отрицательный	4	3,38*	13,50*

	Положительный	1	1,50*	1,50*
	Нейтральный	2		
m.8362T>G	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
m.8363G>A	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
m.8993T>G	Отрицательный	5	3,40	17,00
	Положительный	2	5,50	11,00
	Нейтральный	0		
m.8993T>C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
m.9379G>A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	5	4,70*	23,50*
	Нейтральный	0		
m.9480del15	Отрицательный	3	2,33*	7,00*
	Положительный	3	4,67*	14,00*
	Нейтральный	1		
m.9537delC	Отрицательный	2	4,00	8,00
	Положительный	4	3,25	13,00
	Нейтральный	1		
m.12315G>A	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	5	4,00*	20,00*
	Нейтральный	1		
m.13513G>A	Отрицательный	1	3,58*	6,50*
	Положительный	6	6,50*	21,50*
	Нейтральный	0		

m.14459G>A	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	3	3,67*	11,00*
	Нейтральный	2		
m.14482C>A	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	1		
m.14482C>G	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	3	3,00*	9,00*
	Нейтральный	3		
m.14484T>C	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	2	2,00	4,00
	Нейтральный	4		
M.14487T>C	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	4	4,25*	17,00*
	Нейтральный	1		
m.14709T>C	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		
m.14846G>A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	4	4,13*	16,50*
	Нейтральный	1		
m.15059G>A	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		
m.15084G>A	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	5		
m.14598del24	Отрицательный	2	2,25	4,50
	Положительный	2	2,75	5,50

	Нейтральный	3		
m.15452C>A	Отрицательный	2	4,75	9,50
	Положительный	4	2,88	11,50
	Нейтральный	1		
m.15762G>A	Отрицательный	3	2,33	7,00
	Положительный	2	4,00	8,00
	Нейтральный	2		

Примечание: * – более, чем двухкратное отличие между положительными и отрицательными значениями рангов.

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 (или среднего или суммарного) была не менее двухкратной. Такими мутациями оказались m.652delG, m.716T>G, m.1555A>G, m.3256C>T, m.3316G>A, m.3336C>T, m.5132delAA, m.5178C>A, m.6489C>A, m.9379G>A, m.9480del15, m.12315G>A, m.13513G>A, m.14459G>A, m.14482C>G, m.14487T>C, m.14846G>A и m.15059G>A [89, 114].

В то же время, корреляционный анализ, проведенный методом бутстрэп, показал, что мутации m.652delG, m.3256C>T, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A высокодостоверно ассоциированы с липофиброзными бляшками аорты ($p \leq 0,05$), а m.13513G>A и m.14846G>A – значимо на уровне $p \leq 0,1$. Мутации m.1555A>G и m.5178C>A оказались связаны с отсутствием липофиброзных бляшек на уровне значимости $p \leq 0,05$ (таблица 24). Для ряда значимых мутаций достоверность отличий отображена на блочных диаграммах (рисунки 26–33) [89, 114].

Помимо формального статистического подхода, был использован подход, использующий в качестве критерия частоту выявления различий между

показателями гетероплазмии в нормальных и атеросклеротических поражениях в образцах, полученных от одного и того же донора аутопсийного материала [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

Обнаружено 11 митохондриальных мутаций, принадлежащих митохондриальным генам MT-ND6, MT-RNR1, MT-CYTB, MT-TL2, MT-ND1, MT-ND2, MT-TL1 и MT-ND5, которые ассоциированы с атеросклеротическими поражениями [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532]. Данные по образцам аорт, имеющих значительные отличия в проценте гетероплазмии по данным мутациям в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью, представлены в таблице 25. Как видно из таблицы, по мутациям m.652insG и m.3336T>C такие отличия имеются в 29% аорт; по мутациям m.3256C>T, m.14459G>A, m.14846G>A и m.15059G>A – в 43%. Более половины образцов имеют значительные отличия в проценте гетероплазмии по мутациям m.652delG, m.1555A>G и m.5178C>A – в 57%. И, наконец, в наибольшем количестве липофиброзных бляшек преобладают, по сравнению с нормальной интимой, мутации m.12315G>A и m.13513G>A – в 71% и 86% (соответственно) [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

Таким образом, при количественной оценке мутантного аллеля митохондриального генома отмечаются значительные отличия процента гетероплазмии по 11 мутациям между образцами из липофиброзной бляшки и нормальной интимы аорты [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532].

После анализа результатов как формального, так и неформального статистических подходов было принято решение продолжить исследование 11 мутаций митохондриального генома на образцах интимы аорты и клеток крови пораженных атеросклерозом индивидов.

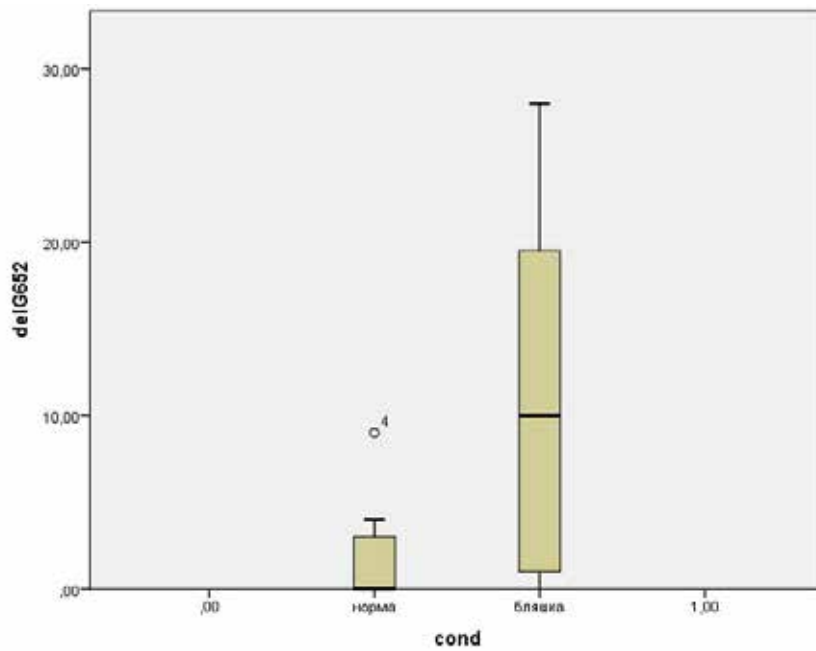


Рисунок 26. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации m.652delG в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89].

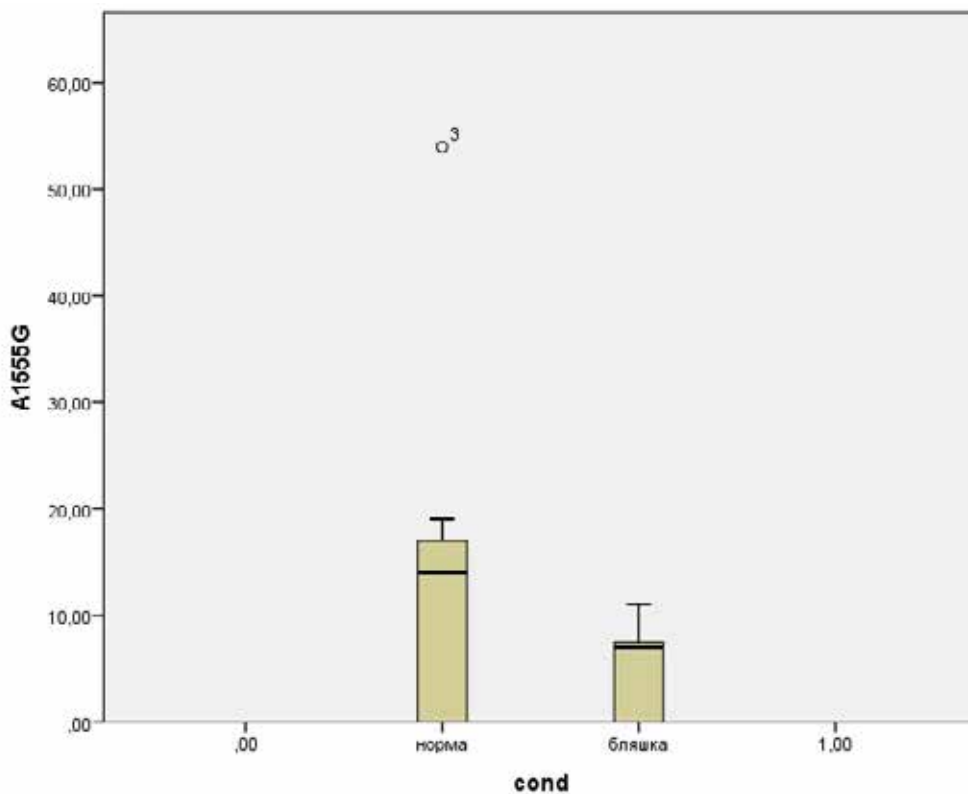


Рисунок 27. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации m.1555A>G в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89].

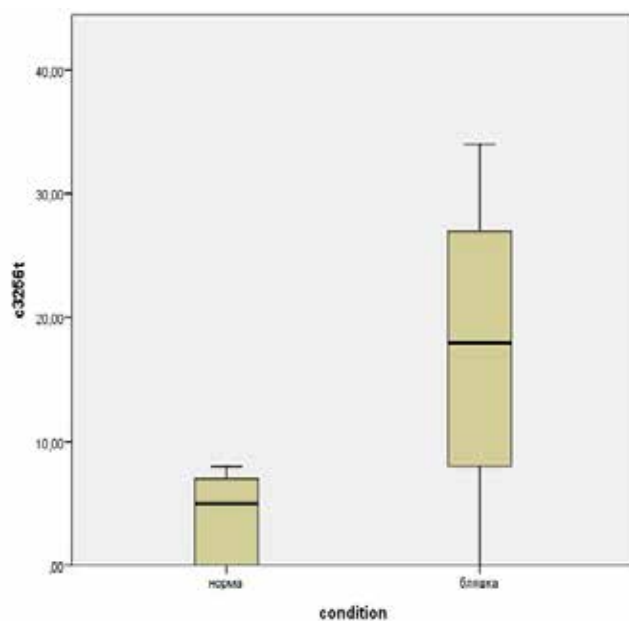


Рисунок 28. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации *m.3256C>T* в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89, 114].

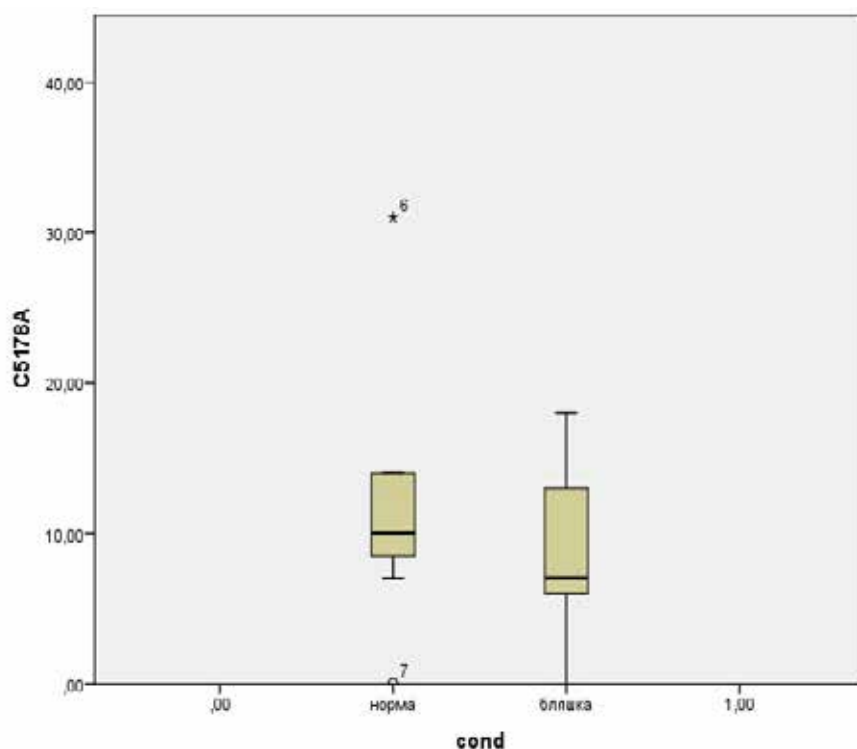


Рисунок 29. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации *m.5178C>A* в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89].

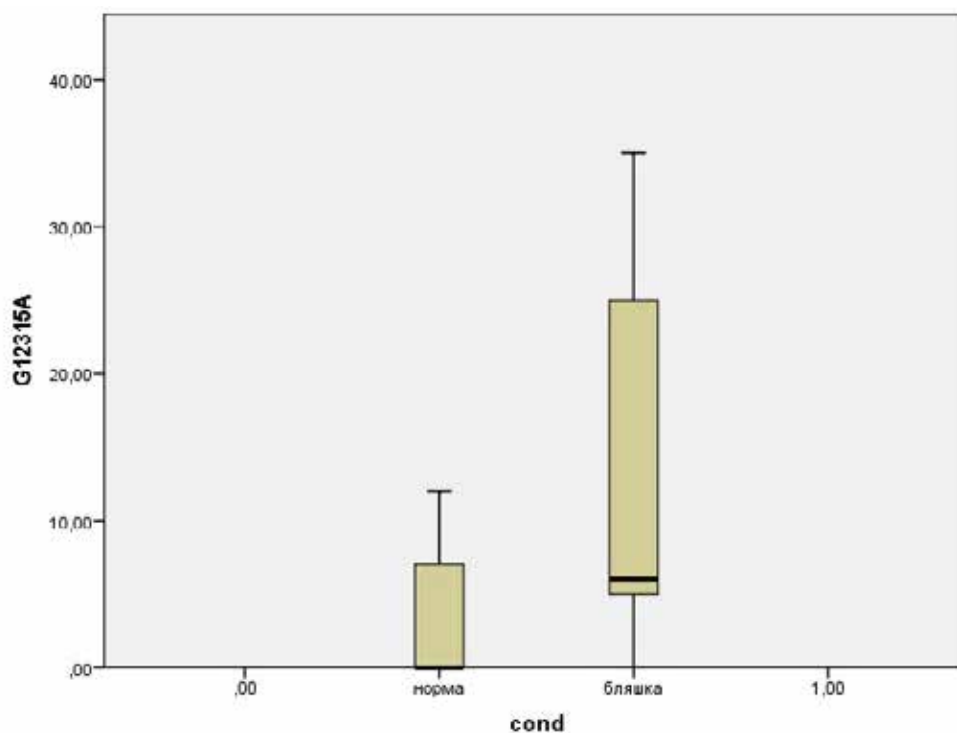


Рисунок 30. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации *m.12315G>A* в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89, 114].

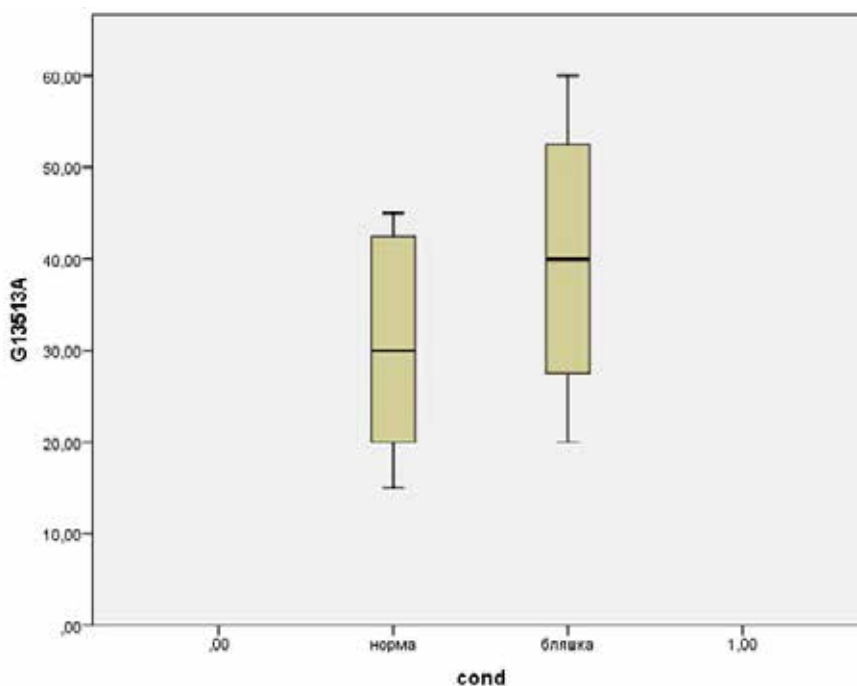


Рисунок 31. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации *m.13513G>A* в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89].

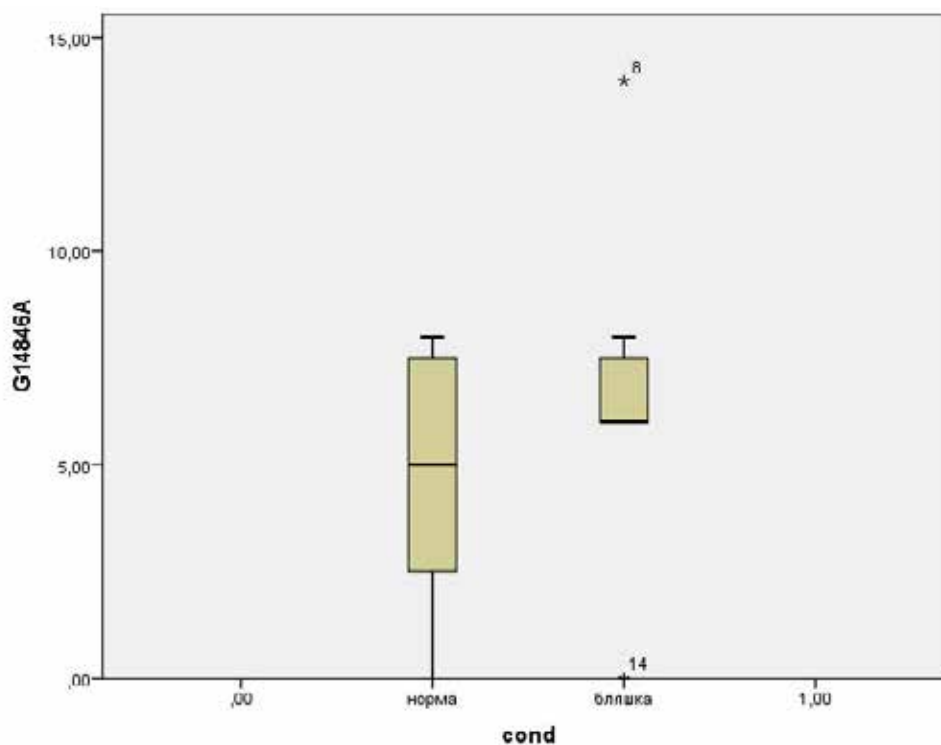


Рисунок 32. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации $m.14846G>A$ в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89].

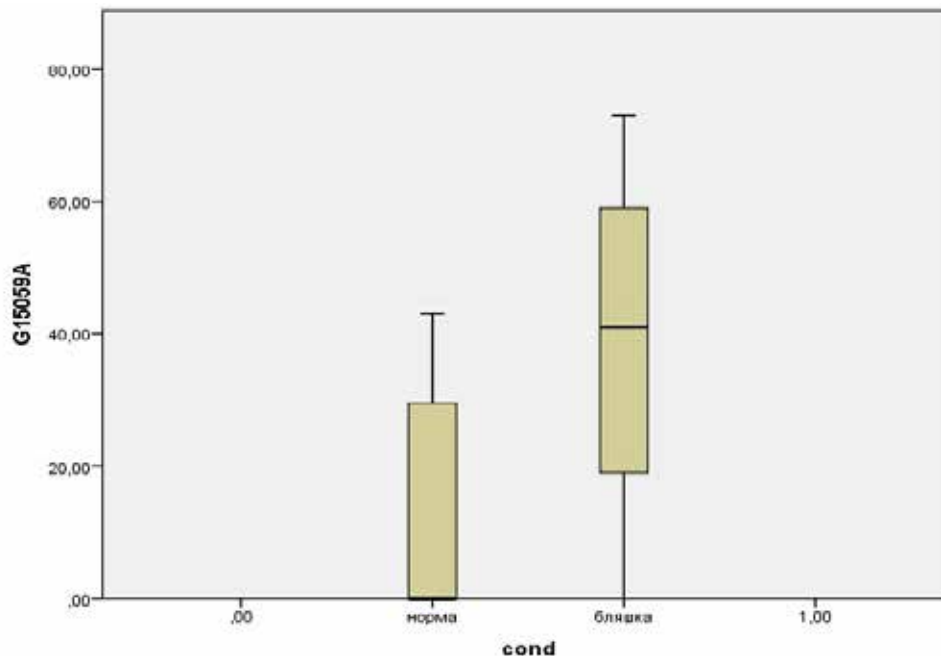


Рисунок 33. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации $m.15059G>A$ в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме [89, 114].

Таблица 24. Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции между уровнем гетероплазмии и наличием липофиброзной бляшки [89, 114]

Мутация	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость (двусторонняя)
m.652delG	0,485	0,012**
m.652insG	0,075	0,186
m.1555A>G	-0,401	0,001**
m.3256C>T	0,608	0,001**
m.3336T>C	0,086	0,175
m.5178C>A	-0,302	0,024**
m.12315G>A	0,401	0,042**
m.13513G>A	0,335	0,097*
m.14459G>A	0,470	0,015**
m.14846G>A	0,315	0,101*
m.15059G>A	0,436	0,026**

Примечание:

** – высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками ($p \leq 0,05$);

* – корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками значима на уровне $p \leq 0,1$.

Таблица 25. Сравнение процента 11 митохондриальных мутаций в атеросклеротических бляшках и нормальной интиме аорт [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532]

Ген	Мутация	№ аорты	Норма	Бляшка
MT-TL1	m.3256C>T	A1	8	18
		A3	11	22
		A5	12	27

		A6	13	34	
MT-ND5	m.13513G>A	A1	45	60	
		A2	20	30	
		A3	20	40	
		A4	15	25	
		A6	45	60	
		A7	30	45	
MT-RNR1	m.652delG	A1	0	2	
		A2	0	17	
		A3	4	22	
		A5	2	28	
	m.652insG	A6	0	9	
		A7	0	8	
	m.1555A>G	A1	14	11	
		A2	15	7	
		A3	54	8	
		A5	19	7	
MT-TL2	m.12315G>A	A1	8	35	
		A2	0	5	
		A3	0	6	
		A4	0	15	
		A5	12	35	
MT-ND2	m.5178C>A	A2	14	7	

		A3	14	8
		A5	10	5
		A6	31	18
MT-ND6	m.14459G>A	A3	2	4
		A5	2	10
		A6	0	53
MT-ND1	m.3336T>C	A1	3	6
		A3	0	17
MT-CYTB	m.14846G>A	A1	8	14
		A2	2	7
		A6	3	8
	m.15059G>A	A1	31	41
		A3	28	52
A5		43	66	

3.4 Теоретическое обоснование дальнейших исследований интимы артерий

Теоретическим обоснованием для проведения дальнейших исследований интимы аорт послужили выявленные отличия в уровне гетероплазии мутаций митохондриального генома при сравнении участков атеросклеротического поражения и нормальной интимы аорт [89]. Возможными механистическими объяснениями подобных различий могут быть следующие:

1. Согласно моноклональной гипотезе, мозаичное расположение атеросклеротических поражений в интимае сосудистой стенки может возникнуть из-за клеток, имеющих высокий уровень мутантных копий

митохондриального генома. Возможно, в мутантных клетках начинается ошибочная интерпретация внешних сигналов и выделение провоспалительных хемокинов, что привлекает к потенциальному очагу атеросклеротического поражения клетки из сосудистого русла. Усугублению процесса может способствовать наличие в клетках крови высокого уровня гетероплазмии мутаций, связанных с атеросклерозом [89, 114].

2. Избирательное выживание в возникающем атеросклеротическом поражении мутантных клеток. Данные клетки начинают неограниченно пролиферировать из-за угнетения их собственного дыхания, в связи с возникшими дефектами ферментов дыхательной цепи митохондрий. Таким образом, у них появляется преимущество перед нормальными клетками [89, 114].

3. Избирательное попадание мутантных клеток в очаг атеросклеротического поражения, а клеток, имеющих нормальный митохондриальный геном – в область непораженной интимы артерий [89, 114].

В целях понимания, имеет ли гетероплазмия митохондриального генома патогенетическое значение, необходимо было провести анализ уровня гетероплазмии мутаций:

1) В суммарном (общем) атеросклеротическом поражении, сравнив его с уровнем гетероплазмии данных мутаций в суммарной нормальной интиме [89].

2) В морфологически картированной интиме нескольких аорт, разделив ее на участки с различной степенью поражения и нормальной интимой. В подобном исследовании можно было получить подтверждение мозаичного расположения атеросклеротических поражений в сосудистой стенке, в том случае, если уровень гетероплазмии мутаций в различных как пораженных, так и нормальных участках окажется разным [89].

3) В образцах, выделенных из клеток крови [89].

Существует предположение, что не только клетки интимы, но и клетки крови участвуют в атерогенезе. Из сосудистого русла моноциты могут мигрировать сквозь эндотелий в протеогликановый слой интимы. Там

моноциты становятся макрофагами и начинают удалять лишнее количество модифицированных липопротеидов. Попадающие в стенку сосуда лимфоциты, вероятно, предназначены для выполнения сигнальной роли в то время, когда формируется иммунный ответ и локальная воспалительная реакция [89].

Вследствие того, что атеросклероз – это мультифакториальное заболевание, вполне вероятно, что различный уровень гетероплазии в клетках интимы может возникать под влиянием целого ряда факторов [89].

3.5 Анализ уровня гетероплазии мутаций мтДНК в гомогенатах нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт

Дальнейшие исследования были посвящены сравнению среднего процента выбранных 11 мутаций в образцах ДНК, выделенных из суммарных гомогенатов пораженной и нормальной интимы 10 аорт [45, 88-90, 92, 100, 101, 107. 108, 110, 119, 482].

При неформальном статистическом подходе выявлено 6 мутаций, процент которых в гомогенатах ткани пораженной интимы был значительно выше по сравнению с гомогенатами ткани нормальной интимы. Это нуклеотидные замены m.12315G>A (6 из 10 аорт), m.14459G>A (5/10), m.5178C>A (4/10), m.15059G>A(3/10), m.1555A>G и m.3336T>C (2/10). Данные по гомогенатам интимы аорт, в которых имеются такие отличия, представлены в таблице 26 [45, 88-90, 92, 100, 101, 107. 108, 110, 119, 482].

Обращают на себя внимание множественные митохондриальные мутации в 7 из 10 исследованных аорт, процент которых в несколько раз выше в гомогенатах из пораженной атеросклерозом интимы, чем из нормальной. Например, в аорте В1 процент гетероплазии пяти мутаций значительно выше в гомогенате атеросклеротического поражения, чем в гомогенате нормальной интимы. В гомогенатах из пораженных участков аорт В2 и В7 преобладают по три мутации, а в В4, В8, В9 и В10 – по две митохондриальные мутации [45, 88-90, 92, 100, 101, 107. 108, 110, 119, 482].

Таблица 26. Сравнение уровня гетероплазмии шести митохондриальных мутаций в гомогенатах из нормальной интимы и атеросклеротических поражений аорт [45, 88-90, 92, 100, 101, 107. 108, 110, 119, 482].

Ген	Мутация	№ аорты	Норма	Поражение
MT-RNR1	m.1555A>G	B1	6	51
		B10	0	16
MT-ND2	m.5178C>A	B1	5	25
		B7	25	77
		B8	20	30
		B9	18	23
MT-ND1	m.3336T>C	B2	6	13
		B7	6	30
MT-ND6	m.14459G>A	B1	3	16
		B4	4	9
		B5	2	5
		B6	5	10
		B10	6	10
MT-TL2	m.12315G>A	B1	5	14
		B2	6	10
		B3	9	16
		B4	3	6
		B7	16	24
		B8	17	62
MT-CYTB	m.15059G>A	B1	31	43

		B2	30	45
		B9	41	56

Формальный статистический анализ был проведен с помощью бутстрэп-оценки сравнения средних значений зависимых выборок (таблица 27). Анализ заключался в оценке среднего различия в уровне гетероплазмии в нормальных участках интимы и участках атеросклеротического поражения, и оценке достоверности данных различий. Бутстрэп-анализ проводился с помощью тиражирования выборки, моделирования процесса воспроизводства случайного отбора с возвращением. Знак представленной оценки отражал направление связи [45, 88-90, 92, 100, 101, 107. 108, 110, 119, 482].

Таблица 27. Сравнение суммарных гомогенатов нормальной интимы и атеросклеротического поражения методом бутстрэп-анализа [45, 88-90, 92, 100, 101, 107. 108, 110, 119, 482]

Мутация	Количество аорт	Парные различия	Достоверность отличий
m.652delG	10	9,14	0,068*
m.652insG	10	0,73	0,725
m.1555A>G	10	9,86	0,001**
m.3256C>T	10	3,57	0,048**
m.3336T>C	10	0,69	0,003**
m.5178C>A	10	3,29	0,045**
m.12315G>A	10	10,71	0,004**
m.13513G>A	10	2,074	0,839
m.14459G>A	10	8,14	0,050**
m.14846G>A	10	-2,00	0,075*
m.15059G>A	10	0,45	0,103*

Примечание: ** – высокодостоверная корреляция мутаций с гомогенатами атеросклеротического поражения ($p \leq 0,05$);

* – корреляция мутаций с гомогенатами атеросклеротического поражения значима на уровне $p \leq 0,1$.

Согласно статистическим данным по суммарным гомогенатам пораженной и нормальной интимы, мутации митохондриального генома m.3256C>T, m.14459G>A, m.1555A>G, m.12315G>A, m.3336T>C и m.5178C>A высокодостоверно ассоциированы с суммарным атеросклеротическим поражением аорты ($p \leq 0,05$), а мутации m.15059G>A и m.652delG – на уровне значимости $p \leq 0,1$. В то же время мутация m.14846G>A связана с отсутствием атеросклероза ($p \leq 0,1$). [45, 88-90, 92, 100, 101, 107, 108, 110, 119, 482]. Для ряда значимых мутаций достоверность отличий отображена на блочных диаграммах (рисунки 34-38) [89].

3.6 Анализ уровня гетероплазмии мутаций мтДНК в участках морфологически картированной стенки аорт

3.6.1 Морфологическое и мутационное картирование аорт

С целью выявления связи одиннадцати мутаций мтДНК с атеросклеротическими поражениями различной степени тяжести, проведено морфологическое и мутационное картирование аутопсийного материала, представлявшего собой 5 образцов аорты, взятых у индивидов, которые погибли из-за внезапной сердечно-сосудистой смерти или несчастного случая [89, 113, 116, 500, 502].

Интима каждой из аорт имела приблизительный размер 7x9 см. В каждой аорте были выявлены зоны как с нормальной интимой, так и с атеросклеротическим поражением различной степени тяжести. Им присвоены ранги. Первый ранг соответствовал нормальной интимае, второй ранг – жировой

инфильтрации, третий ранг – жировой полосе, четвертый ранг – липофиброзной бляшке, 5 – фиброзной бляшке). В каждой исследованной аорте было выявлено 38-70 подобных зон (рисунки 39–43) [89, 113, 116, 500, 502]. Общее количество проанализированных зон (участков сосудистой стенки) было равно 265 (таблица 28) [89, 113, 116, 500, 502].

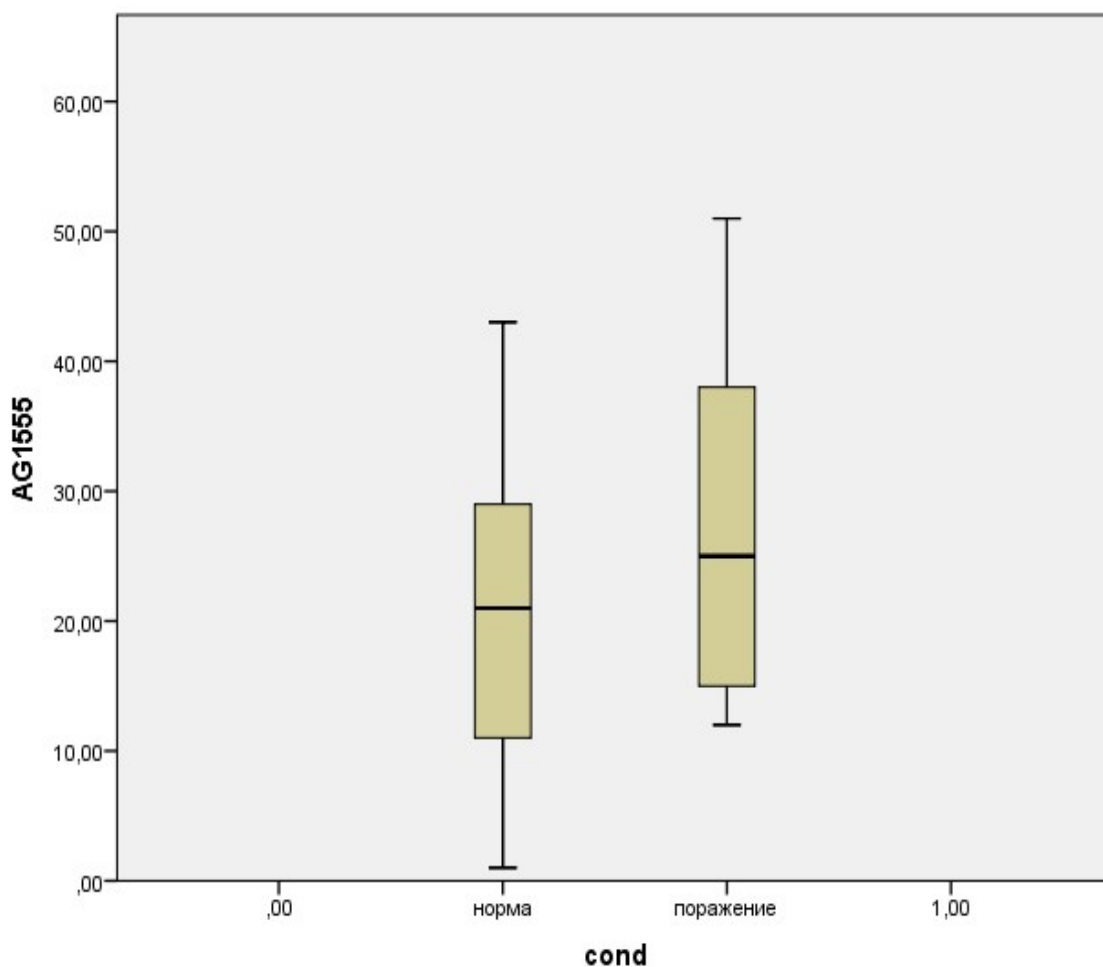


Рисунок 34. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации *m.1555A>G* в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме [89].

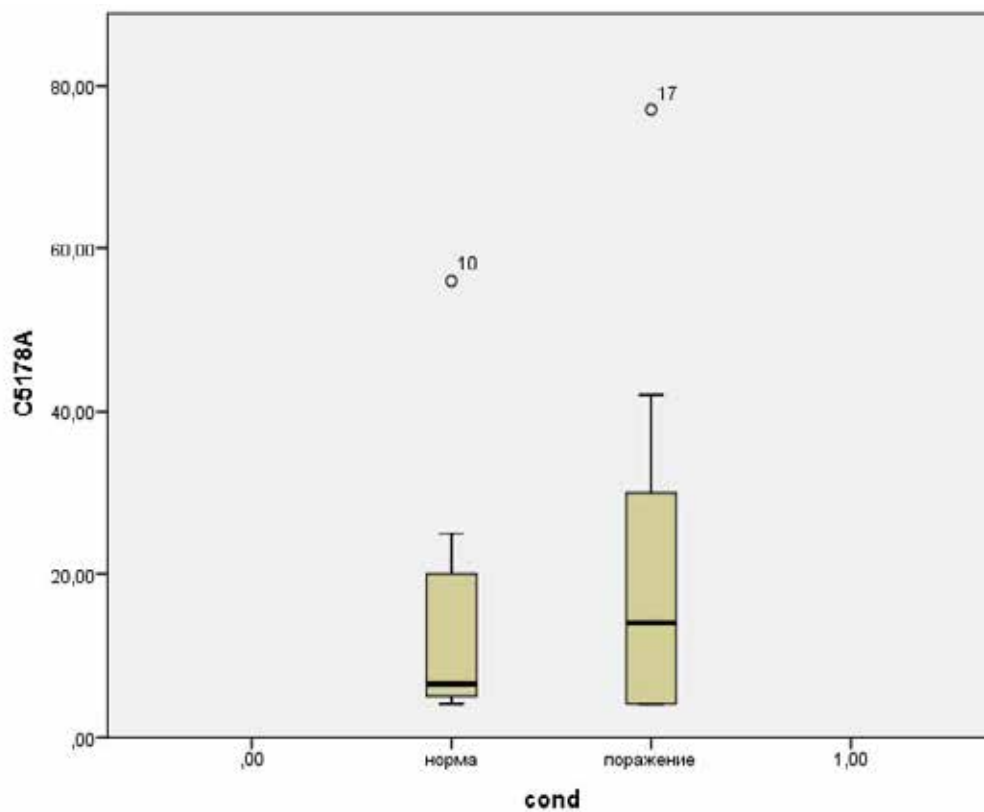


Рисунок 35. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации т.5178С>А в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме [89].

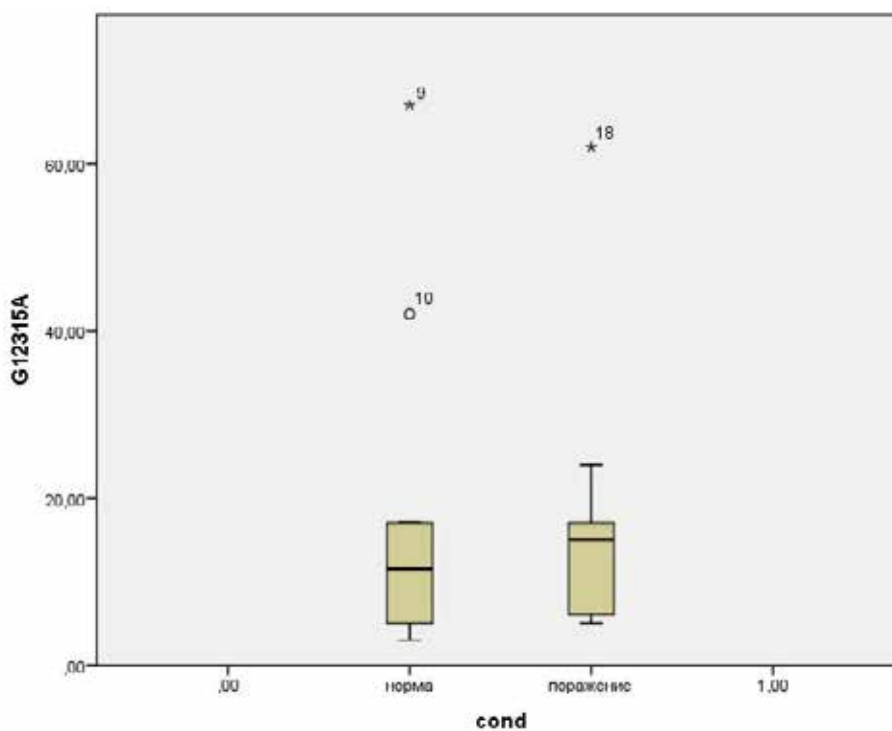


Рисунок 36. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации $m.12315G>A$ в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме [89].

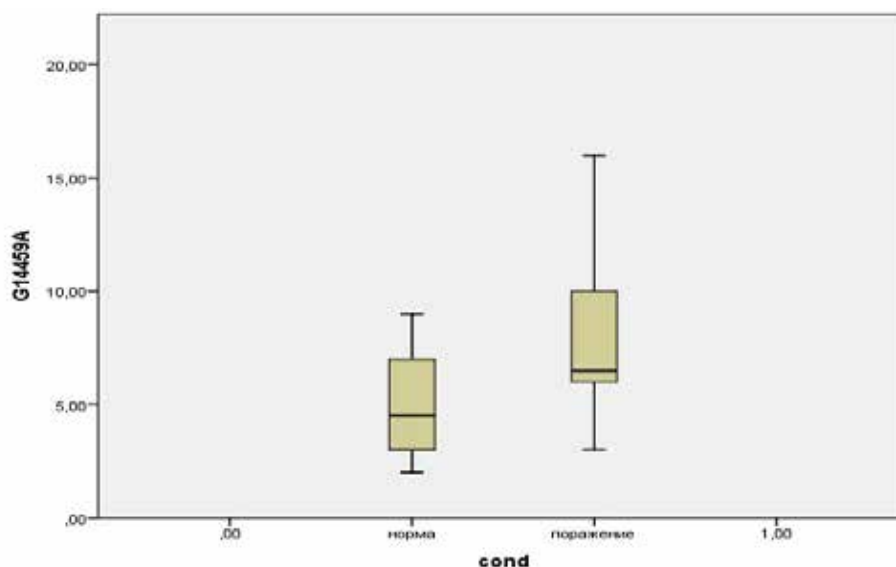


Рисунок 37. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации $m.14459G>A$ в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме [89].

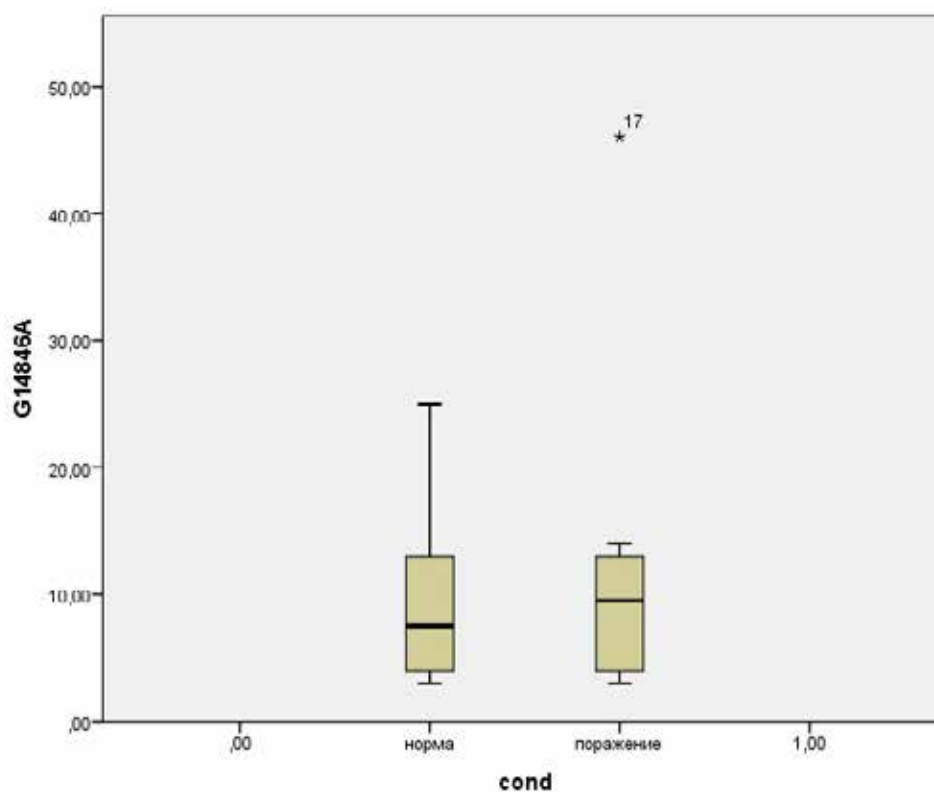


Рисунок 38. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации *m.14846G>A* в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме [89].

На основании проведенного морфологического анализа интимы аорт были созданы морфологические карты. На данных картах были отмечены идентифицированные зоны (рисунки 39–43) [89, 113, 116, 500, 502].

Кроме того, использована возможность более грубой классификации зон: норма, ранние поражения (сочетание 2+3), поздние поражения (сочетания 4+5).

Таблица 28. Степень атеросклеротического поражения морфологически картированных аорт [89, 113, 116, 500, 502]

Номер аорты	Степень атеросклеротического поражения	Количество участков интимы аорты
1	Норма	9
	Жировая инфильтрация	17
	Жировая полоса	6
	Липофиброзная бляшка	5
	Фиброзная бляшка	1
2	Норма	13
	Жировая инфильтрация	10
	Жировая полоса	7
	Липофиброзная бляшка	12
	Фиброзная бляшка	3
3	Норма	12
	Жировая инфильтрация	6

	Жировая полоса	6
	Липофиброзная бляшка	12
	Фиброзная бляшка	7
4	Норма	15
	Жировая инфильтрация	14
	Жировая полоса	18
	Липофиброзная бляшка	12
	Фиброзная бляшка	9
5	Норма	25
	Жировая инфильтрация	17
	Жировая полоса	13
	Липофиброзная бляшка	10
	Фиброзная бляшка	5

3.6.2 Анализ 11 мутаций митохондриального генома в морфологически картированных аортах

При анализе всех участков пораженной атеросклерозом и нормальной интимы пяти аорт с помощью бутстрэп-анализа обнаружено, что с суммарным атеросклеротическим поражением картированных аорт (суммой всех участков аорт, имеющих атеросклеротические поражения различной степени тяжести) связаны мутации митохондриального генома m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A – высокодостоверно, а мутация m.652delG – на уровне значимости 0,1 [89, 113, 116, 500, 502]. В то же время мутация m.13513G>A высокодостоверно связана с отсутствием суммарного атеросклеротического поражения картированных аорт (таблица 29) [89, 113, 116, 500, 502].

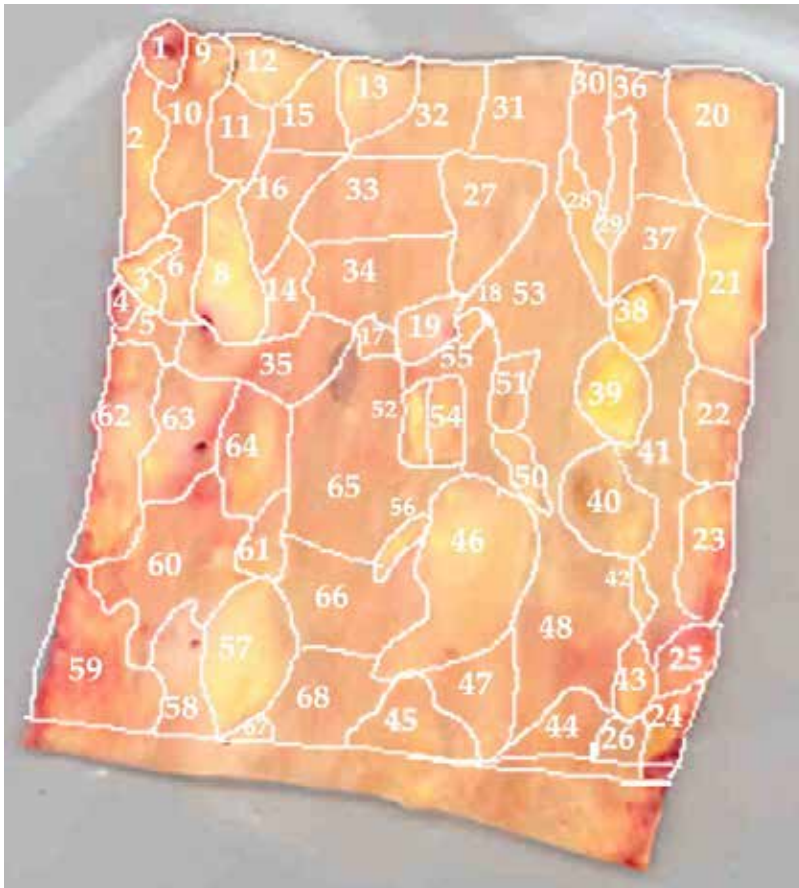


Рисунок 39. Морфологическая карта первой аорты [89, 113, 116, 500, 502].



Рисунок 40. Морфологическая карта второй аорты [89].

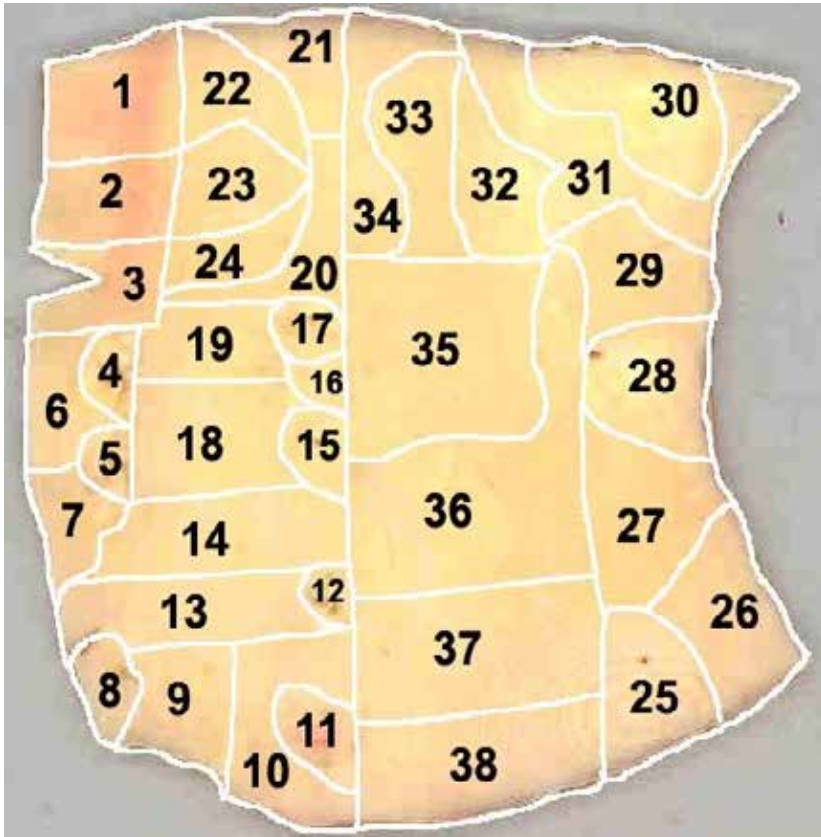


Рисунок 41. Морфологическая карта третьей аорты [89].

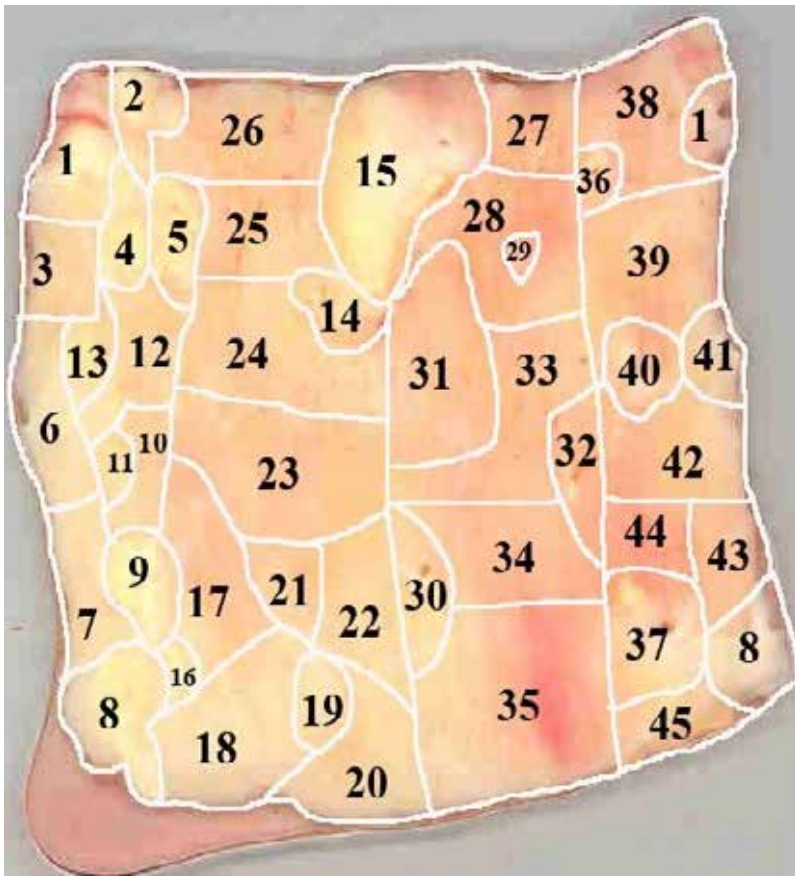


Рисунок 42. Морфологическая карта четвертой аорты [89].

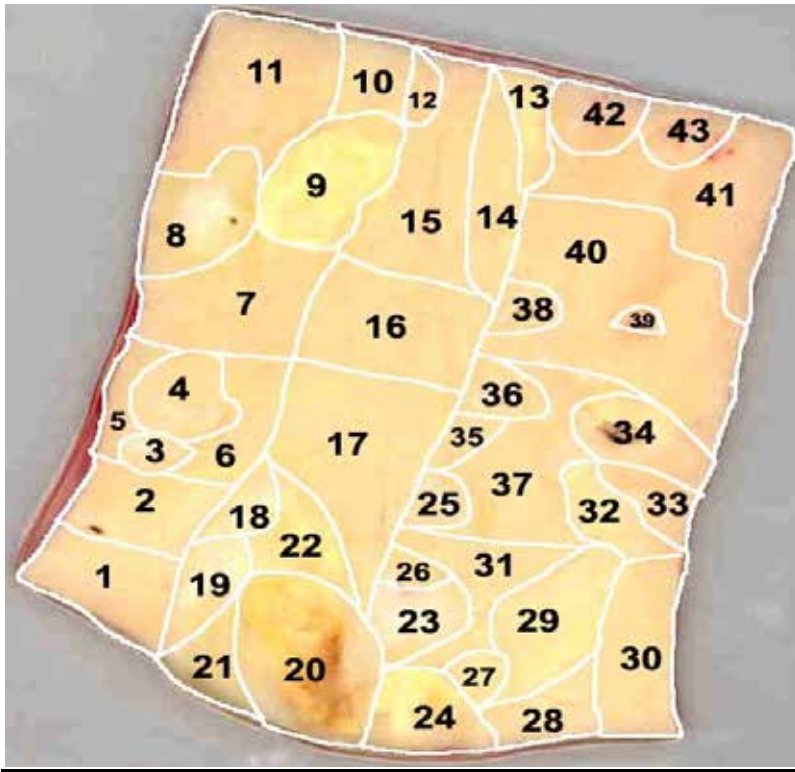


Рисунок 43. Морфологическая карта пятой аорты [89].

Эти данные хорошо совпадают с результатами, полученными при анализе суммарных атеросклеротических гомогенатов [89, 113, 116, 500, 502].

Согласно критерию сдвига Уилкоксона для зависимых выборок (на усредненных данных – для всех аорт одновременно) выявлено (таблица 30), что с суммарным начальным атеросклеротическим поражением (суммой всех участков аорт, имеющих жировые точки и жировые полосы) и суммой всех участков липофиброзных бляшек ассоциированы, на том же уровне значимости, мутации митохондриального генома, характерные для суммарного атеросклеротического поражения [89, 113, 116, 500, 502]. Мутация m.13513G>A высокодостоверно связана с отсутствием данных типов суммарного поражения [89, 113, 116, 500, 502]. Кроме того, с отсутствием суммарного начального атеросклеротического поражения и отсутствием суммы липофиброзных бляшек высокодостоверно связана, на уровне значимости $p \leq 0,05$, мутация m.1555A>G [89, 113, 116, 500, 502]. Также выявлено, что с отсутствием суммы липофиброзных бляшек высокодостоверно ассоциирована мутация m.14846G>A [89, 113, 116, 500, 502].

В то же время для суммы участков как липофиброзных, так и фиброзных бляшек выявлена положительная связь с мутацией митохондриального генома m.652delG на уровне значимости $p \leq 0,1$ [89, 113, 116, 500, 502]. При этом данная мутация отсутствует в суммарном начальном атеросклеротическом поражении [89, 113, 116, 500, 502].

Кроме того, мутации m.3256C>T и m.5178C>A оказались высокодостоверно ассоциированы с суммой участков с фиброзными бляшками [89, 113, 116, 500, 502]. Однонуклеотидная замена гуанина на аденин в позиции мтДНК 12315 связана с отсутствием суммы фиброзных бляшек в аортах [89, 113, 116, 500, 502].

Таблица 29. Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции между уровнем гетероплазмии и наличием суммарного атеросклеротического поражения картированных аорт [89, 113, 116, 500, 502]

Мутация	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость (двусторонняя)
m.652delG	0,341	0,088*
m.652insG	-0,289	0,121
m.1555A>G	-0,301	0,113
m.3256C>T	0,462	0,050**
m.3336T>C	0,639	0,023**
m.5178C>A	0,476	0,047**
m.12315G>A	0,603	0,032**
m.13513G>A	-0,499	0,039**

m.14459G>A	0,586	0,036**
m.14846G>A	-0,267	0,129
m.15059G>A	0,531	0,037**

Примечание: ** – высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическим поражением ($p \leq 0,05$);
* – корреляция мутаций с атеросклеротическим поражением значима на уровне $p \leq 0,1$.

Таблица 30. Преобладающие мутации мтДНК в различных типах суммарного атеросклеротического поражения (АТП) морфологически картированных аорт [89, 113, 116, 500, 502]

Мутация	Начальное атеросклеротическое поражение		Липофиброзная бляшка		Фиброзная бляшка	
	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость
m.652delG	0,203	0,146	0,344	0,091*	0,366	0,071*
m.652insG	- 0,175	0,186	- 0,282	0,125	- 0,158	0,232
m.1555A>G	-0,468	0,048**	-0,483	0,039**	- 0,184	0,195
m.3256C>T	0,462	0,045**	0,469	0,045**	0,481	0,050**
m.3336T>C	0,501	0,034**	0,542	0,025**	0,256	0,119
m.5178C>A	0,481	0,046**	0,556	0,023**	0,494	0,048**
m.12315G>A	0,455	0,050**	0,501	0,041**	-0,411	0,046**
m.13513G>A	-0,519	0,035**	-0,588	0,021**	0,215	0,143

m.14459G>A	0,478	0,042**	0,579	0,026**	0,196	0,191
m.14846G>A	-0,268	0,117	-0,467	0,050**	0,172	0,214
m.15059G>A	0,497	0,043**	0,601	0,015**	0,168	0,203

Примечание: ** – высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическим поражением ($p \leq 0,05$);

* – корреляция мутаций с атеросклеротическим поражением значима на уровне $p \leq 0,1$.

3.6.3 Совокупная мутационная нагрузка 11 мутаций в морфологически картированных аортах

Для того, чтобы определить наличие взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклеротического поражения, проведен линейный регрессионный анализ [89, 113, 116, 500, 502]. В силу большой индивидуальной вариабельности признака данные показатели использованы как нормированные значения, в виде квартилей. Для каждой мутации в каждой аорте проведено изучение распределения показателя гетероплазии, определены межквартильные границы. Индивидуальные скалярные показатели гетероплазии были трансформированы в ординарные величины 1, 2, 3 или 4, характеризующие принадлежность показателя к определенной квартили в пределах данного аутопсийного образца [89, 113, 116, 500, 502]. Результаты представлены в таблицах 31 и 32.

Таблица 31. Сводка модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклероза в аортах [89, 113, 116, 500, 502]

Модель	R	R ²	Скорректированный R ²	Стандартная ошибка оценки
1	0,945	0,894	0,886	0,278

Примечание: предикторами модели являлись константа, квартили *m.14846G>A*, квартили *m.625delG*, квартили *m.3336T>C*, квартили *m.5178C>A*, квартили *m.1555A>G*, квартили *m.14459G>A*, квартили *m.15059G>A*, квартили *m.625insG*, квартили *m.12315G>A*, квартили *m.13513G>A*, квартили *m.3256C>T*.

Таким образом, при оценке совокупной нагрузки по 11 мутациям модель линейной регрессии достигла статистической значимости при $p < 0,001$. Учитывая достаточное количество степеней свободы (11), можно утверждать, что степень атеросклеротического поражения ассоциирована с совокупной нагрузкой по данным мутациям с вероятностью безошибочного прогноза 99,9% [89, 113, 116, 500, 502].

Таблица 32. Дисперсионный анализ модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклероза [89, 113, 116, 500, 502]

Модель		Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F	Значимость
1	Регрессия	93,8	11	8,53	110,0	<0,001
	Остаток	11,2	144	0,08		
	Итого	104,9	155			

Примечание: предикторами модели являлись константа, квартили *m.14846G>A*, квартили *m.625delG*, квартили *m.3336T>C*, квартили *m.5178C>A*, квартили *m.1555A>G*, квартили *m.14459G>A*, квартили *m.15059G>A*, квартили *m.625insG*, квартили *m.12315G>A*, квартили *m.13513G>A*, квартили *m.3256C>T*. Зависимой переменной была «степень поражения».

Изучены показатели чувствительности и специфичности для каждой из мутаций, ассоциированной с атеросклерозом. Анализ проводили методом построения ROC-кривых с последующей оценкой площади под кривой, что позволило описать экспланаторные свойства генотипических маркеров (рис.44) [89, 113, 116, 500, 502].

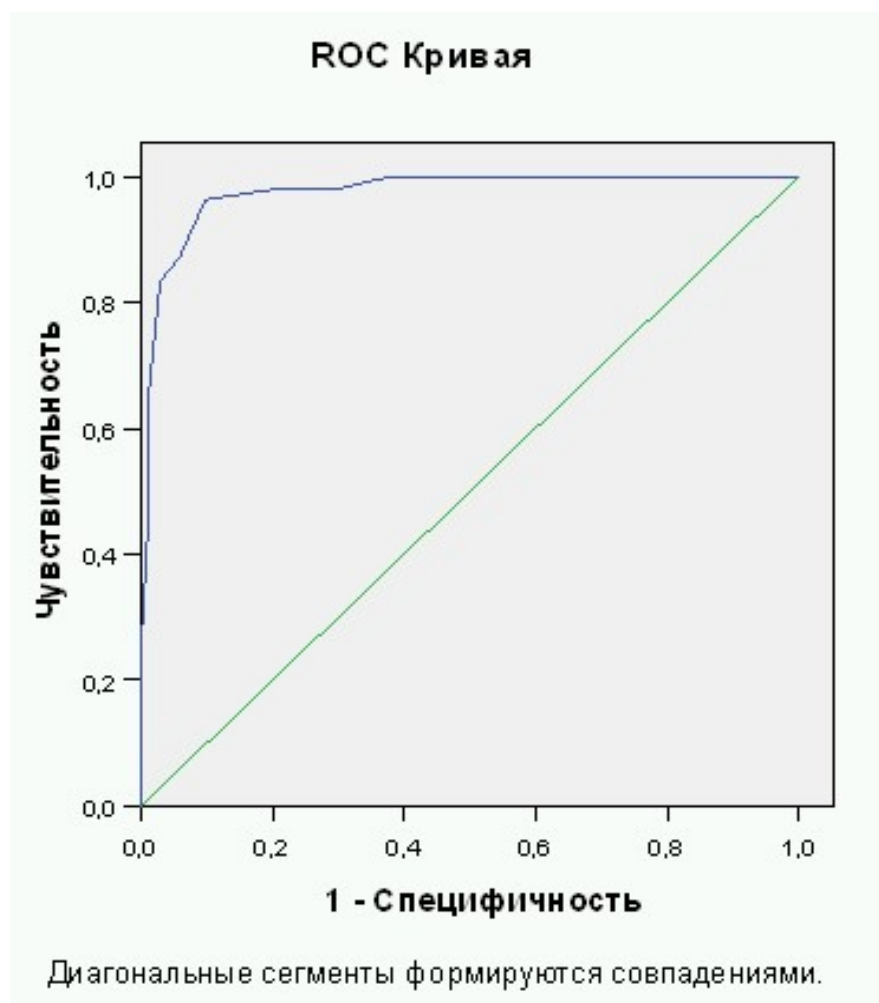


Рисунок 44. ROC-кривая для оценки чувствительности и специфичности показателя «мутационная нагрузка» в отношении атеросклероза [89, 113, 116, 500, 502]. Положительным реальным состоянием является атеросклеротическая бляшка.

Площадь под кривой составляет 0,975 ($p < 0.001$) [89, 113, 116, 500, 502]

Для данного анализа ранговые значения (номера квартилей) гетероплазии были просуммированы в зависимости от знака бета-

коэффициента, полученного в регрессионном анализе (при положительном значении коэффициента – сложение, при отрицательном – вычитание). Полученный параметр получил название «мутационная нагрузка» [89, 113, 116, 500, 502].

При использовании данной модели показатель чувствительности составил 88,2 ($p \leq 0,05$; т.к. 95% доверительный интервал лежит в пределах от 74,6 до 95,3). Показатель специфичности составил 77,1 ($p \leq 0,05$; т.к. 95% доверительный интервал лежит в пределах от 70,8 до 87,3) [89, 113, 116, 500, 502].

Таким образом, совокупная мутационная нагрузка по 11 исследованным мутациям митохондриального генома ассоциирована с 88,2% случаев атеросклеротических поражений морфологически картированных аорт [89, 113, 116, 500, 502].

3.7 Преобладающие мутации в атеросклеротических поражениях аорт

Обобщив данные анализа уровня гетероплазмы в интима отдельных участков, суммарных гомогенатов и участков морфологически картированных аорт, как нормальных, так и пораженных атеросклерозом, можно сделать следующие выводы [89]:

1. В настоящей работе выявлена мозаичность распределения митохондриальных мутаций в интима аорты человека: обнаружены отличия в уровне гетероплазмы 11 мутаций для различных участков как нормальной, так и пораженной атеросклерозом морфологически картированной интимы аорт человека [89].
2. Суммарное атеросклеротическое поражение интимы аорт ассоциировано с мутациями митохондриального генома m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A, а мутация m.13513G>A достоверно чаще встречалась у условно здоровых участников исследования [89].

3. Для разных типов атеросклеротических поражений интимы аорт, таких как начальное поражение, липофиброзная и фиброзная бляшка, характерен различный набор мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом или связанных с отсутствием подобных поражений. Липофиброзные бляшки и начальное атеросклеротическое поражение интимы аорт связаны с мутациями m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A. В то же время мутация m.1555A>G связана с отсутствием начального и суммарного атеросклеротических поражений, а мутация m.14846G>A – с отсутствием липофиброзных бляшек. С фиброзными бляшками ассоциированы m.5178C>A и m.3256C>T. Мутация m.12315G>A связана с отсутствием фиброзных бляшек в интимае аорты [89].

3.8 Анализ уровня гетероплазмии в клетках крови

Выявленные при анализе пораженных атеросклерозом участков аорт 11 мутаций митохондриального генома было решено проанализировать в клетках крови 700 участников исследования из Московского региона, у которых были выявлены атеросклеротические поражения сонных артерий при клиническом и ультрасонографическом обследовании. Средний возраст участников составлял 64,73 года [89, 99, 115, 501, 503, 504].

3.8.1 Принцип исследования атеросклеротических поражений интимы сонных артерий

3.8.1.1 Оценка размера атеросклеротических бляшек

При ультразвукографическом обследовании атеросклеротические бляшки (АСБ) оценивались, в зависимости от размера бляшки, согласно 4-бальной шкале [53, 54, 89, 137, 342, 427, 504, 537, 561]:

- 1) 0 баллов присваивалось в случае, если возвышенные атеросклеротические поражения в сонной артерии не были обнаружены;
- 2) 1 балл присваивался в случае наличия стабильных атеросклеротических бляшек и стеноза просвета сонной артерии до 20%;
- 3) 2 балла присваивалось в случае наличия стабильных атеросклеротических бляшек и стеноза просвета сонной артерии от 20 до 50%;
- 4) 3 балла присваивалось в случае гемодинамически значимых атеросклеротических бляшек и стеноза просвета сонной артерии более 50% (таблица 33).

Таблица 33. Размер атеросклеротических бляшек в сонных артериях у 700 участников исследования [89, 99, 115, 501, 503, 504]

Выборка	Размер атеросклеротических бляшек в сонных артериях			
	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла
Мужчины	159 (44%)	123 (34%)	76 (21%)	4 (1%)
Женщины	108 (32%)	118 (35%)	101 (30%)	11 (3%)
Общая	267 (38%)	241 (35%)	177 (25%)	15 (2%)

3.8.1.2 Оценка толщины интимо-медиального слоя сонных артерий

В связи с тем, что абсолютная норма для значения толщины интимо-медиального слоя сонных артерий у людей отсутствует. Поэтому в отдельных

популяциях, с помощью эпидемиологических исследований, оно выявляется при анализе распределения ТИМС СА [53, 54, 137, 342, 427, 537, 561]. В Московском регионе, в выборке условно здоровых участников исследования (женщин и мужчин), у которых не наблюдалось клинических проявлений атеросклероза, была проведена детекция распределения средней и максимальной ТИМС СА для разных возрастных групп [89, 504]. Выявлены пограничные (межквартильные) значения ТИМС СА для участников исследования из Москвы и Московской области (таблица 34).

Таблица 34. Среднее значение ТИМС СА для участников исследования из Москвы и Московской области [89, 504]

	Толщина интимо-медиального слоя сонных артерий, мкм			
	<50 лет	51-60 лет	61-70 лет	>70 лет
Женщины, медиана	680	740	835	910
<i>Не предрасположенные к атеросклерозу</i>	<610	<670	<775	<845
<i>Предрасположенные к атеросклерозу</i>	>740	>820	>930	>1015
Мужчины, медиана	750	810	900	930
<i>Не предрасположенные к атеросклерозу</i>	<660	<740	<830	<850
<i>Предрасположенные к атеросклерозу</i>	>800	>910	>995	>1070

Абсолютные значения данных параметров были перекодированы в квартильные показатели ординарной шкалы (1, 2 или 3) в соответствии с величинами межквартильных границ для квартилей 1/2 и 3/4. При этом принадлежность к 1-й квартили рассматривали как признак низкого уровня

атеросклеротической нагрузки (1), принадлежность к 4-й квартили – высокой (3) [89, 99, 115, 501, 503, 504]. Принадлежность ко 2-й и 3-й квартилям рассматривали как среднюю степень атеросклеротической нагрузки (2) [89, 99, 115, 501, 503, 504]

Можно было считать медиану границей между нормой и утолщением, но это очень условно. Поэтому специально были отобраны именно крайние характеристики (границы между 1-2 и 3-4 квартилями), чтобы участники исследования явно различались по степени атеросклеротической нагрузки [89, 99, 115, 501, 503, 504]. Соответственно, если человек попадал в первую квартиль, то это расценивалось как абсолютная норма, со значением уровня атеросклеротической нагрузки равным 1. Если человек попадал в четвертую квартиль, это расценивалось как явная предрасположенность к атеросклерозу. Таким участникам исследования было присвоено значение уровня атеросклеротической нагрузки равное 3. Прочим участникам исследования присваивали значение уровня атеросклеротической нагрузки равное 2 [89, 99, 115, 501, 503, 504]

Для исследуемой выборки средние значения ТИМС СА по выделенным группам представлены в таблице 35 [89, 99, 115, 501, 503, 504].

Таблица 35. Величина ТИМС СА у участников исследования с различной степенью атеросклеротической нагрузки [89, 99, 115, 501, 503, 504]

Величина ТИМС СА, мм	Уровень атеросклеротической нагрузки		
	1	2	3
Среднее значение ТИМС СА, мм	0,7	0,85	1,01
Максимальное значение ТИМС СА, мм	0,84	1,00	1,26
Минимальное значение ТИМС СА, мм	0,18	0,66	0,77

3.8.1.3 Демографические характеристики участников исследования

На основании полученных данных было проведено сравнение демографических (клинико-антропометрических) характеристик пациентов с атеросклерозом и условно здоровых участников исследования [53, 54, 137, 342, 427, 530, 537, 561].

Таблица 36. Демографические характеристики участников исследования [530]

Параметр	Условно здоровые участники исследования	Пациенты с атеросклерозом	Достоверность отличий
Систолическое артериальное давление (мм.рт.ст.)	129 (15,7)	141 (14,1)	0,26
Индекс массы тела (кг/м ²)	25,6(7,3)	29,3 (6,4)	0,45
Пол, мужчины:женщины (количество человек)	159:180	203:158	0,002**
Курение (% курящих к общему количеству человек)	20 (10,6)	42 (9,5)	0,10*
Холестерин ЛНП (ммоль/л)	4,03 (1,07)	4,38 (1,09)	0,001**
Диастолическое артериальное давление (мм.рт.ст.)	78 (16,7)	89 (17,3)	0,38
Age, years	53 (8,5)	64 (8,9)	0,003**
Общий холестерин (ммоль/л)	6,39 (1,21)	6,76 (1,09)	0,001**
Триглицериды	1,48 (0,61)	1,51 (0,64)	0,290

(ммоль/л)			
Холестерин ЛВП (ммоль/л)	1,70 (0,48)	1,53 (0,52)	0,002**

*Примечание: ** - высокодостоверные отличия между пациентами с атеросклерозом и условно здоровыми участниками исследования;*

** отличия между пациентами с атеросклерозом и условно здоровыми участниками исследования значимы на уровне $p \leq 0,1$.*

Данные в таблице 36 представлены в виде среднего значения со стандартным отклонением (в скобках). Как видно из таблицы 36, в группе условно здоровых участников исследования преобладали женщины, тогда как в группе пациентов с доклиническим атеросклерозом преобладали мужчины. Обнаружены высокодостоверные отличия между пациентами с атеросклерозом и условно здоровыми участниками исследования по таким параметрам, как возраст, уровень общего холестерина и холестерина ЛНП у мужчин ($p \leq 0,01$). Кроме того, у пациентов с доклиническим атеросклерозом была выявлена тенденция к увеличению частоты курения ($p \leq 0,1$). Что же касается таких параметров, как индекс массы тела, уровень артериального давления, уровень триглицеридов, то между исследованными группами значимых отличий не обнаружено [530].

Согласно установленному клиническому диагнозу атеросклероза исследованная выборка был разделена на 2 группы:

1) условно здоровые участники исследования без ультразвукографических признаков атеросклероза (339 человек, или 48,4% выборки) [89, 99, 115, 501, 503, 504, 530];

2) пациенты без клинических проявлений атеросклероза, которые имели ультразвукографические признаки доклинического атеросклероза, а именно наличие повреждений в просвете сонной артерии (более 10% просвета артерии) (361 человек, или 51,6% выборки) [89, 99, 115, 501, 503, 504, 530].

В результате были получены рабочие данные в формате таблицы 10×700, где был приведен процент гетероплазии каждой мутации для каждого пациента с установленным клиническим диагнозом атеросклероза и каждого условно здорового участника исследования [89, 99, 115, 501, 503, 504, 530].

Полученные, в ходе настоящего исследования, данные были подвергнуты статистической обработке. Для этого были использованы программы пакета SPSS версии 21.0 (SPSS Inc., США) [89, 99, 115, 501, 503, 504, 530]. Были применены U-тест для независимых выборок по Манну-Уитни и тест для зависимых выборок по Уилкоксоу. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. Коэффициент корреляции был определен на основе анализа таблиц сопряженности по Спирмену и бутстрэп-анализа. Направление связи между уровнем гетероплазии мутаций мтДНК и стадиями атеросклеротических поражений было определено с помощью линейного регрессионного анализа. С помощью факториальной регрессии анализировали степень ассоциации уровня гетероплазии мутаций мтДНК с атеросклеротическими поражениями. Мутационный эксцесс был определен с целью количественной оценки мутационной нагрузки. Анализ частот был использован для определения межквартильных границ в распределениях процента гетероплазии по отдельным мутациям. Итогом статистической обработки было определение статистической мощности исследования [89, 99, 115, 501, 503, 504, 530]

3.8.2 Ассоциация уровня гетероплазии мутаций мтДНК с возрастом

Согласно бутстрэп-анализу (таблица 37), обнаружена высокодостоверно положительная корреляция возраста участников исследования с уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A ($p \leq 0,05$) [89, 501, 503]. Отрицательная корреляция с возрастом для мутаций m.1555A>G и m.14846G>A была высокодостоверной ($p \leq 0,05$), а для m.652insG и m.13513G>A – значимой на уровне $p \leq 0,1$ [89, 501, 503].

Таблица 37. Корреляция возраста индивидов с уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций в лейкоцитах крови [89, 501, 503].

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптотическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	0,102	0,201
m.652insG	-0,129	0,104*
m.1555A>G	-0,274	0,046**
m.3256C>T	0,062	0,439
m.3336T>C	0,104	0,192
m.5178C>A	0,015	0,863
m.12315G>A	0,277	0,050**
m.13513G>A	-0,128	0,103*
m.14459G>A	0,261	0,048**
m.14846G>A	-0,271	0,045**
m.15059G>A	0,285	0,047**

Примечание: ** – высокодостоверная корреляция мутаций с возрастом ($p \leq 0,05$);

* – корреляция мутаций с возрастом значима на уровне $p \leq 0,1$.

3.8.3 Ассоциация мутаций митохондриального генома с атеросклеротическими бляшками сонных артерий

3.8.3.1 Анализ 11 мутаций

Согласно статистическим данным (таблица 38), пороговый уровень гетероплазмии в клетках крови ассоциирован с наличием атеросклеротических бляшек в сонных артериях высокодостоверно – по мутациям m.652delG,

m.3336T>C, m.12315G>A, m.14459G>A ($p \leq 0,01$), и значимо на уровне $p \leq 0,1$ – по m.3256C>T, m.5178C>A [89, 99, 115, 494, 504].

В то же время с отсутствием АСБ СА связаны мутации m.14846G>A ($p \leq 0,001$) и m.652insG ($p \leq 0,1$) [89, 99, 115, 494, 504].

Таблица 38. Корреляция атеросклеротических бляшек индивидов с уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций [89, 99, 115, 494, 504]

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	0,464	0,010**
m.652insG	-0,319	0,060*
m.1555A>G	-0,163	0,247
m.3256C>T	0,274	0,101*
m.3336T>C	0,593	0,002**
m.5178C>A	0,305	0,064*
m.12315G>A	0,612	0,001**
m.13513G>A	-0,201	0,187
m.14459G>A	0,605	0,001**
m.14846G>A	-0,452	0,010**
m.15059G>A	0,116	0,212

Примечание:

** – высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками ($p \leq 0,05$);

* – корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками значима на уровне $p \leq 0,1$.

3.8.3.2 Уровень гетероплазии мутации *m.13513G>A*, связанный с отсутствием АСБ СА

Особое положение занимает мутация митохондриального генома *m.13513G>A*. Уровень гетероплазии данной однонуклеотидной замены, равный 65%, высокодостоверно ассоциирован с отсутствием атеросклеротических бляшек в интима сонных артерий ($p \leq 0,05$) (таблица 39) [89, 99, 115, 494, 504].

Таблица 39. Ассоциация 65% уровня гетероплазии аллеля 13513А с отсутствием АСБ СА [89, 99, 115, 494, 504]

Корреляция Спирмена		65% уровень гетероплазии <i>m.13513G>A</i>	АСБ СА
65% уровень гетероплазии <i>m.13513G>A</i>	Коэффициент корреляции	1,000	-0,204
	Значимость (двухсторонняя)	-	0,054
	Количество валидных случаев	90	90
АСБ СА	Коэффициент корреляции	-0,204	1,000
	Значимость (двухсторонняя)	0,054	-
	Количество валидных случаев	90	502

3.8.3.3 Совокупная мутационная нагрузка при атеросклеротических бляшках в сонных артериях

Так как влияние различных мутаций разнонаправленное, необходимо рассматривать совокупное влияние 11 исследованных мутаций, или суммарную мутационную нагрузку [89, 99, 115, 494, 504]. Для этого на предварительном этапе была построена модель логистической регрессии (таблицы 40–42) [89, 99, 115, 494, 504]. Затем вероятность принадлежности к той или иной категории (0 (нет атеросклеротических бляшек) или 1 (наличие атеросклеротических бляшек любого размера)) выступила в качестве предиктора при анализе ROC-кривых (таблица 43) [89, 99, 115, 494, 504].

3.8.3.3.1 Логистическая регрессия

Таблица 40. Сводка модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки с атеросклеротической бляшкой в сонных артериях [89, 99, 115, 494, 504]

Модель	Удвоенный логарифм функции правдоподобия со знаком минус	R² Кокса и Снелла	R² Нагелькерка
1	147,273	0,358	0,481*

Примечание:* – Совокупность признаков объясняет дисперсию зависимой переменной на 48,1%.

Таблица 41. Классификация случаев ассоциации атеросклеротических бляшек с совокупной нагрузкой 11 мутаций [89, 99, 115, 494, 504]

Модель	Обнаруженные случаи		Предсказанные случаи		
			Ассоциация АТ бляшек с суммарной нагрузкой 11 мутаций		Процентный показатель верных прогнозов
			0,00	1,00	
1	Ассоциация АТ бляшек с суммарной нагрузкой 11 мутаций	0,00	44	24	64,7
		1,00	24	68	73,9
	Суммарный процентный показатель				70,0*

*Примечание:**- Процент верно классифицированных случаев составил 70%.

Таблица 42. Анализ включенных переменных и коэффициента силы и направления связи [89, 99, 115, 494, 504]

Анализируемые переменные							
	Мутации	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Модель 1	m.1555A>G	-0,163	0,042	14,952	1	0,000**	0,850
	m.3256C>T	0,033	0,051	0,417	1	0,519	1,033
	m.14846G>A	-0,026	0,029	0,845	1	0,358	0,974
	m.5178C>A	0,034	0,045	0,560	1	0,454	1,034
	m.652delG	0,052	0,022	5,761	1	0,016**	1,054
	m.12315G>A	0,122	0,027	20,958	1	0,000**	1,130

	m.13513G>A	-0,046	0,017	6,951	1	0,008**	1,047
	m.14459G>A	0,030	0,015	3,971	1	0,046**	0,970
	m.15059G>A	0,052	0,020	6,836	1	0,009**	1,054
	m.652insG	0,077	0,081	0,901	1	0,343	1,080
	m.3336T>C	0,052	0,028	3,420	1	0,064*	1,054
	Constant	-2,384	1,308	3,321	1	0,068*	0,092

Примечание: 1) коэффициент *B* указывает направленность связи;

2) ** – высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях ($p \leq 0,05$);

3) * – корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками значима на уровне $p \leq 0,1$.

3.8.3.3.2 ROC-анализ

На основании значений включенных переменных модель оценила для каждого участника исследования вероятность принадлежности к категориям 0 или 1. Полученные данные по вероятности, которые можно рассматривать как меру относительного риска, были использованы для ROC-анализа (рисунок 45, таблица 43) [89, 99, 115, 494, 504].

Таблица 43. ROC-анализ взаимосвязи мутационной нагрузки с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях [89, 99, 115, 494, 504]

Вероятность безошибочного прогноза				
Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптоматический доверительный интервал 95%	
			Ниже 95%	Выше 95%
0,842	0,030	0,001	0,784	0,900

Площадь под кривой составила 0,842, следовательно, модель оказалась значимой. Пороговое значение было выбрано 0,54; ему соответствовало значение чувствительности - 0,739 и значение специфичности - 0,735 ($p \leq 0,05$) [89, 99, 115, 494, 504].

Таким образом, предсказательная и объяснительная способность модели для совокупной мутационной нагрузки при атеросклеротических бляшках любого размера оказалась значительно выше, чем для моделей, построенных отдельно для каждой мутации [89, 99, 115, 494, 504]. Совокупная мутационная нагрузка 11 исследованных мутаций митохондриального генома ассоциирована с 84,2% атеросклеротических бляшек в сонных артериях человека [89, 99, 115, 494, 504].

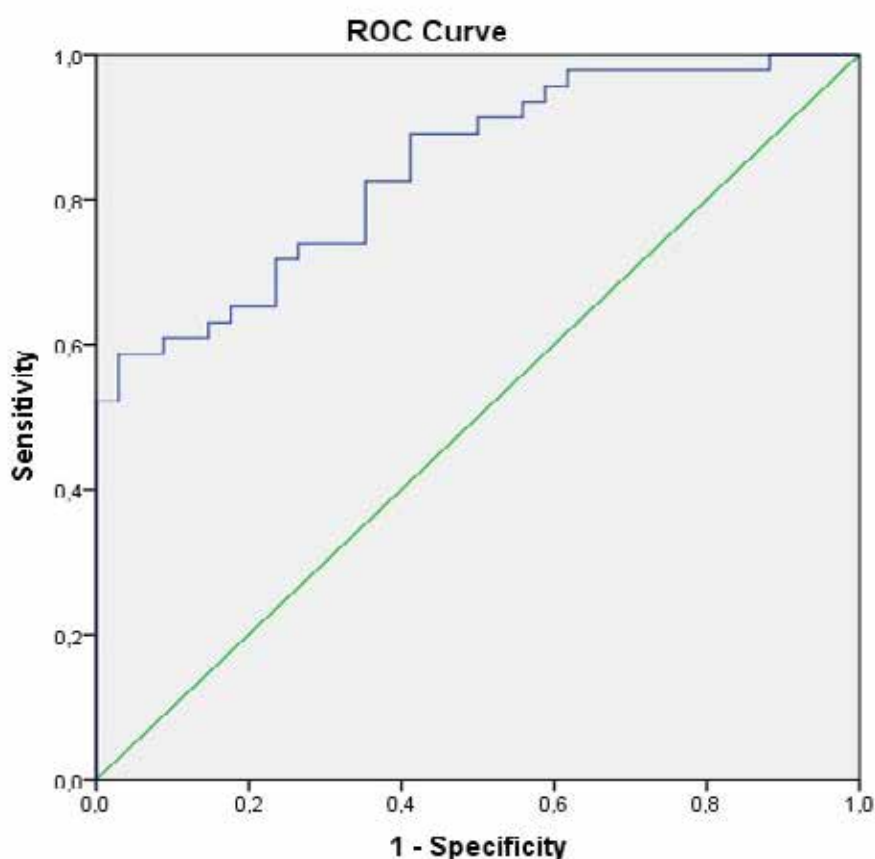


Рисунок 45. ROC-кривая, с помощью которой была оценена ассоциация суммарной мутационной нагрузки одиннадцати мутаций мтДНК с атеросклеротическими бляшками сонных артерий [89, 99, 115, 494, 504].

3.8.4 Ассоциация мутаций мтДНК с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий

3.8.4.1 Анализ 11 мутаций митохондриального генома

Согласно данным статистики (таблица 44), пороговый уровень гетероплазмии в клетках крови ассоциирован с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий (ИМС СА) по мутациям m.12315G>A и m.15059G>A – высокодостоверно ($p \leq 0,05$), а по однонуклеотидным заменам m.3256C>T и m.5178C>A – значимо на уровне $p \leq 0,1$ [89, 99, 115, 494, 504].

Однонуклеотидные замены m.13513G>A и m.14846G>A высокодостоверно ассоциированы с отсутствием утолщения ИМС СА ($p \leq 0,05$).

Таблица 44. Корреляция мутаций митохондриального генома с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий [89, 99, 115, 494, 504]

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	0,161	0,206
m.652insG	0,017	0,722
m.1555A>G	0,009	0,865
m.3256C>T	0,329	0,091*
m.3336T>C	0,081	0,383
m.5178C>A	0,318	0,103*
m.12315G>A	0,619	0,001**
m.13513G>A	-0,478	0,050**
m.14459G>A	0,157	0,236
m.14846G>A	-0,493	0,045**

m.15059G>A	0,529	0,028**
------------	-------	---------

Примечание: ** – высокодостоверная корреляция мутаций с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий ($p \leq 0,05$);

* – корреляция мутаций с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий значима на уровне $p \leq 0,1$.

3.8.4.2 Совокупная мутационная нагрузка при утолщении интимо-медиального слоя сонных артерий

Аналогично п.3.8.3.3 из-за того, что влияние разных мутаций на изменение ТИМС СА разнонаправленное, необходимо рассматривать совокупное влияние 11 исследованных мутаций, или совокупную мутационную нагрузку [89, 99, 115, 494, 504]. На предварительном этапе была построена бинарная модель логистической регрессии (таблицы 45–47) [89, 99, 115, 494, 504]. Вероятность принадлежности к той или иной категории (0 (нет утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий) или 1 (наличие утолщения ИМС СА)) выступила в качестве предиктора при анализе ROC-кривых (таблица 48, рисунок 46) [89, 99, 115, 494, 504].

3.8.4.2.1 Логистическая регрессия

Таблица 45. Сводка модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки с ТИМС СА [89, 99, 115, 494, 504]

Модель	Удвоенный логарифм функции правдоподобия со знаком минус	R ² Кокса и Снелла	R ² Нагелькерка
1	65,002	0,260	0,382*

Примечание: * – Совокупность признаков объясняет дисперсию зависимой переменной на 38,2%.

Таблица 46. Классификация случаев ассоциации ТИМС СА с совокупной нагрузкой 11 мутаций мтДНК [89, 99, 115, 494, 504]

Модель	Обнаруженные случаи		Предсказанные случаи		
			Ассоциация ТИМС СА с суммарной нагрузкой 11 мутаций		Процентный показатель верных прогнозов
			0,00	1,00	
1	Ассоциация ТИМС СА с суммарной нагрузкой 11 мутаций	0,00	55	2	96,5
		1,00	11	9	45,0
	Суммарный процентный показатель				83,1*

Примечание:* – Процент верно классифицированных случаев составил 83,1%.

Таблица 47. Анализ включенных переменных, коэффициента силы и направления связи [89, 99, 115, 494, 504]

Анализируемые переменные							
	Мутации	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Модель 1	m.1555A>G	-0,177	0,079	5,017	1	0,025*	0,838
	m.3256C>T	0,098	0,071	1,916	1	0,166	1,103
	m.14846G>A	-0,108	0,051	4,483	1	0,034*	0,898

	m.5178C>A	0,079	0,078	1,024	1	0,312	0,924
	m.652delG	0,006	0,036	0,032	1	0,857	0,994
	m.12315G>A	0,027	0,030	0,806	1	0,369	1,028
	m.13513G>A	-0,023	0,023	1,001	1	0,317	1,023
	m.14459G>A	0,018	0,026	0,463	1	0,496	0,982
	m.15059G>A	0,026	0,023	1,273	1	0,259	1,027
	m.652insG	-0,187	0,156	1,439	1	0,230	1,205
	m.3336T>C	0,028	0,028	1,036	1	0,309	1,028
	Constant	1,350	1,913	0,498	1	0,480	3,858

Примечание: 1) коэффициент В указывает направленность связи;

*2) * – высокодостоверная корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях ($p \leq 0,05$).*

3.8.4.2.2 ROC-анализ

На основании значений включенных переменных модель оценила для каждого участника исследования вероятность принадлежности к категориям 0 или 1. Полученные данные по вероятности, которые можно рассматривать как меру относительного риска, были использованы для ROC-анализа (рисунок 46, таблица 47) [89, 99, 115, 494, 504].

Таблица 48. ROC-анализ взаимосвязи мутационной нагрузки с ТИМС СА [89, 99, 115, 494, 504]

Вероятность безошибочного прогноза				
Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптоматический доверительный интервал 95%	
			Ниже 95%	Выше 95%
0,849	0,055	0,001	0,742	0,956

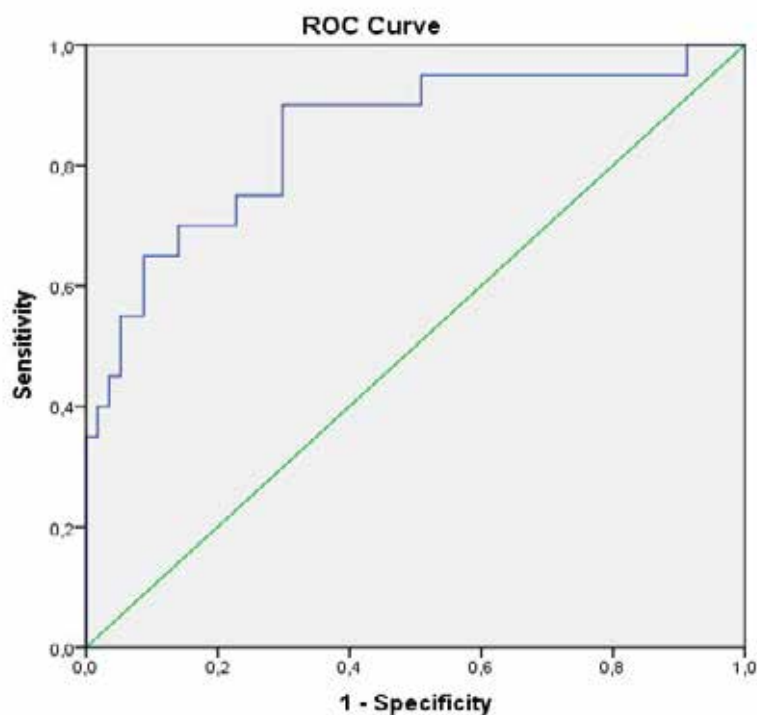


Рисунок 46. ROC-кривая, с помощью которой была оценена ассоциация суммарной мутационной нагрузки одиннадцати мутаций мтДНК с ТИМС СА [89, 99, 115, 494, 504]

Площадь под кривой составила 0,849, следовательно, модель оказалась значимой. Чувствительность – 0,700; специфичность – 0,900 ($p \leq 0,05$) [89, 99, 115, 494, 504].

Таким образом, предсказательная и объяснительная способность модели для совокупной мутационной нагрузки при утолщении интимо-медиального слоя сонных артерий оказалась значительно выше, чем для моделей, построенных отдельно для каждой мутации. Совокупная мутационная нагрузка по 11 исследованным мутациям митохондриального генома ассоциирована с 84,9% случаев утолщения ИМС СА человека [89, 99, 115, 494, 504].

3.8.5 Генодиагностика атеросклероза

3.8.5.1 Пороговое значение процента гетероплазмы отдельных мутаций, ассоциированное с образованием атеросклеротических бляшек в сонных артериях

На основании полученных данных по анализу уровня гетероплазмы мутаций митохондриального генома в клетках крови участников исследования было определено пороговое значение процента гетероплазмы каждой мутации, после которого у индивида начиналось образование атеросклеротических бляшек [89, 483, 530]. Для мутаций, ассоциированных с отсутствием АСБ СА, при достижении порогового уровня гетероплазмы в сонных артериях человека переставали выявляться атеросклеротические бляшки (таблица 49). Выбор оптимального порогового значения базировался на одновременной максимизации значений чувствительности и специфичности. Значения данных параметров не должны были быть меньше 0,5 [89, 483, 530].

Таблица 49. Пороговое значение процента гетероплазмы мутаций митохондриального генома, ассоциированное с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях [89, 483, 530]

Мутация	Пороговое значение гетероплазмы (%)
m.652delG	20,5
m.652insG*	20,0
m.1555A>G	17,5
m.3256C>T	15,5
m.3336T>C	6,5
m.5178C>A	6,5
m.12315G>A	7,5
m.13513G>A*	32,5

m.14459G>A	4,5
m.14846G>A*	17,5
m.15059G>A	24,5

Примечание:* – мутации, связанные с отсутствием АСБ СА.

3.8.5.2 Пороговое значение процента гетероплазии отдельных мутаций, ассоциированное с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий

Аналогично пункту 3.8.5.1 было определено пороговое значение процента гетероплазии каждой мутации мтДНК, после которого у индивида начиналось утолщение интимо-медиального слоя сонных артерий. Для мутаций митохондриального генома, ассоциированных с отсутствием утолщения интимо-медиального слоя, при достижении порогового уровня гетероплазии переставало детектироваться такое утолщение в сонных артериях участников исследования (таблица 50) [89, 483, 530].

Как видно из полученных данных (пункты 3.8.5.1 и 3.8.5.2), обнаружено хорошее совпадение порогового значения процента гетероплазии исследованных 11 мутаций митохондриального генома для атеросклеротических бляшек и утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий [89, 483, 530].

Таблица 50. Пороговое значение процента гетероплазии мутаций митохондриального генома, ассоциированное с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий [89, 483, 530]

Мутация	Пороговое значение гетероплазии (%)
m.652delG	21,5
m.652insG*	20,0
m.1555A>G	19,5
m.3256C>T	16,5

m.3336T>C	7,5
m.5178C>A	6,5
m.12315G>A	10,5
m.13513G>A*	33,5
m.14459G>A	4,5
m.14846G>A*	17,5
m.15059G>A	26,5

Примечание: * – мутации, связанные с отсутствием утолщения ИМС СА.

3.8.6 Ассоциация мутаций мтДНК с факторами риска атеросклероза

Для оценки корреляции уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома с факторами риска развития атеросклероза был проведен анализ по Спирмену (таблица 51) [89].

Таблица 51. Корреляция мутаций митохондриального генома с факторами риска атеросклероза [89]

Мутация	Фактор риска атеросклероза	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.1555A>G	Гипертрофия левого желудочка	0,097	0,066*
m.3336T>C	Гипертрофия левого желудочка	-0,127	0,013**
m.5178C>A	Инфаркт миокарда	0,107	0,046**
	Боль за грудиной	0,089	0,073*
	Гипертрофия левого желудочка	0,115	0,039**

m.12315G>A	Инфаркт миокарда	-0,090	0,070*
	Гипертрофия левого желудочка	-0,123	0,019**
m.14459G>A	Боль за грудиной	0,112	0,041**
	Гипертрофия левого желудочка	-0,083	0,081*
m.14846G>A	Инфаркт миокарда	-0,121	0,002**
m.15059G>A	Боль за грудиной	-0,116	0,039**

Примечание: ** – высокодостоверная корреляция мутаций с фактором риска атеросклероза ($p \leq 0,05$);

* – корреляция мутаций с фактором риска атеросклероза значима на уровне $p \leq 0,1$.

Согласно таблице 51, с инфарктом миокарда (ИМ) высокодостоверно ассоциирована мутация m.5178C>A. С отсутствием ИМ связаны однонуклеотидные замены m.14846G>A – высокодостоверно ($p \leq 0,05$) и m.12315G>A – на уровне значимости $p \leq 0,1$ [89].

С болью за грудиной (БЗГ) высокодостоверно ассоциирована замена гуанина на аденин в позиции митохондриального генома 14459 ($p \leq 0,05$) и замена цитозина на аденин в позиции мтДНК 5178 ($p \leq 0,1$). Мутация m.15059G>A высокодостоверно связана с отсутствием БЗГ ($p \leq 0,05$) [89].

В то же время, с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ) ассоциированы мутации митохондриального генома m.5178C>A – высокодостоверно, и m.1555A>G – на уровне значимости $p \leq 0,1$. При этом однонуклеотидные замены m.12315G>A и m.3336T>C высокодостоверно связаны с отсутствием ГЛЖ. Мутация m.14459G>A ассоциирована с отсутствием данной патологии в исследованной выборке на уровне значимости $p \leq 0,1$ [89].

Следует отметить связь мутации m.5178C>A со всеми тремя представленными факторами риска атеросклероза и ассоциацию m.12315G>A – с отсутствием двух из них [89].

При этом с болью за грудиной оказалась связана однонуклеотидная замена гена субъединицы NADH-дегидрогеназы, а с ее отсутствием – мутация гена цитохрома В [89].

3.9 Гаплотипы мутаций митохондриального генома и атеросклероз

Для выявления преобладающих при атеросклерозе гаплотипов митохондриального генома была проведена факториальная регрессия полученных данных по 11 мутациям. Этот метод позволяет оценить эффект взаимодействия двух или более предикторов [89].

В данном случае оценивался эффект взаимодействия уровня гетероплазии мутаций одного гаплотипа с одним направлением связи. Распределение исходных значений было лог-преобразовано для того, чтобы исключить возможность смещений. Полученная шкала является относительной. На графиках представлено относительное изменение совместного распределения мутаций по категориям атеросклеротического поражения (рисунки 47–50) [89].

В результате проведенного анализа выявлены два преобладающих при атеросклерозе трехмаркерных гаплотипа m.1555A>G-m.5178C>A-m.13513G>A и m.652delG-m.12315G>A-m.3256C>T, обусловленные сочетанием пороговых значений уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома [89].

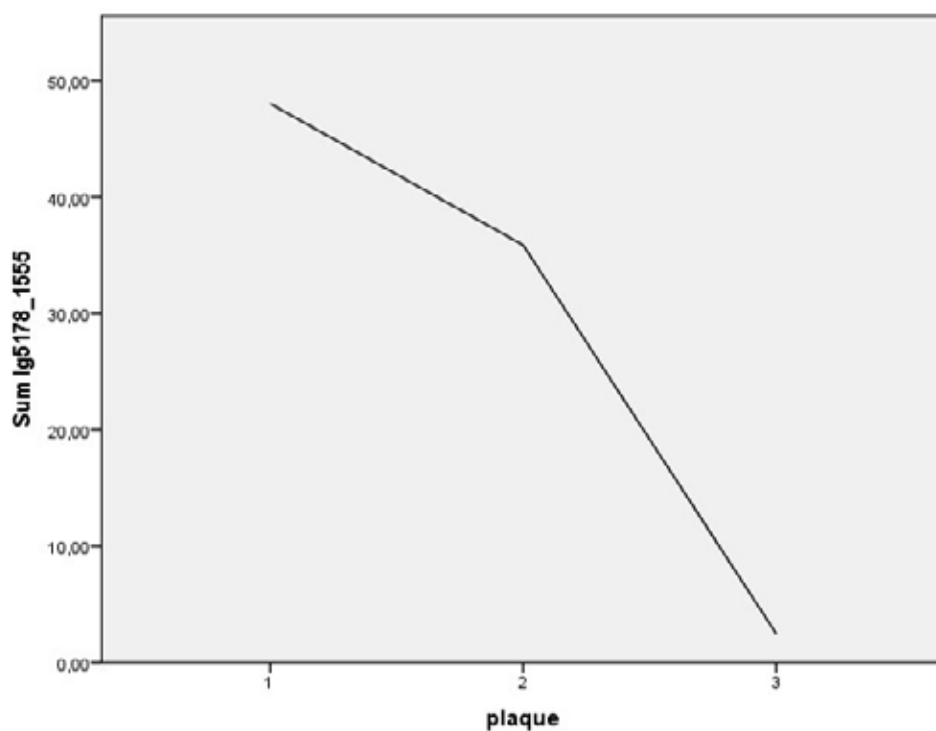


Рисунок 47. Относительное изменение совместного распределения мутаций $m.1555A>G$ и $m.5178C>A$ по категориям атеросклеротического поражения [89].

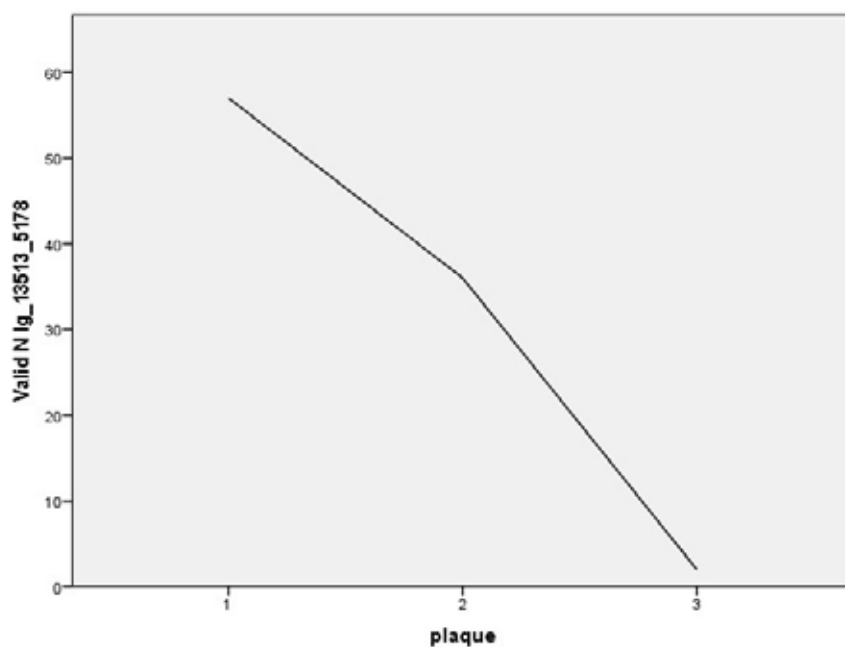


Рисунок 48. Относительное изменение совместного распределения мутаций $m.5178C>A$ и $m.13513G>A$ по категориям атеросклеротического поражения [89].

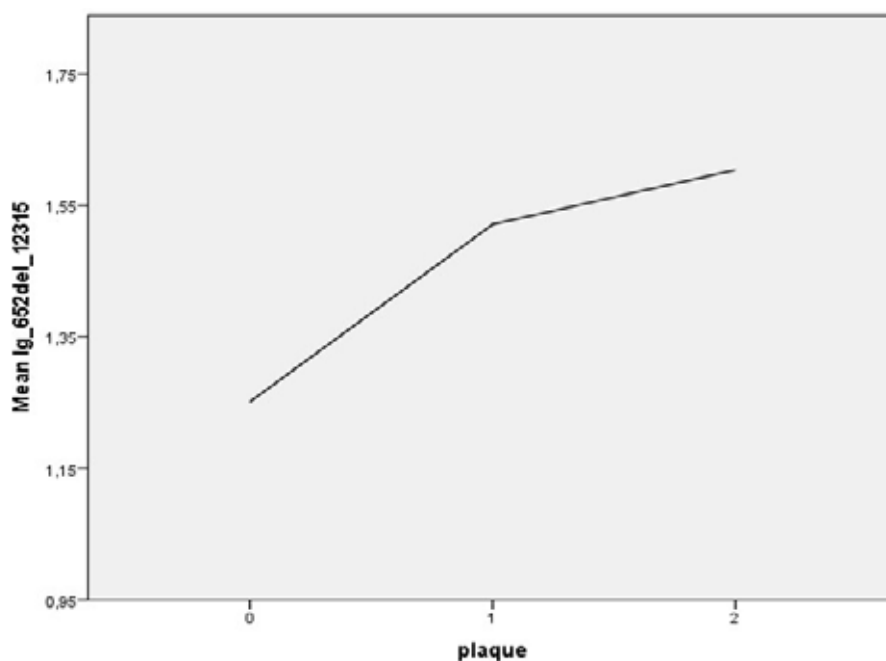


Рисунок 49. Относительное изменение совместного распределения мутаций *m.652delG* и *m.12315G>A* по категориям атеросклеротического поражения [89].

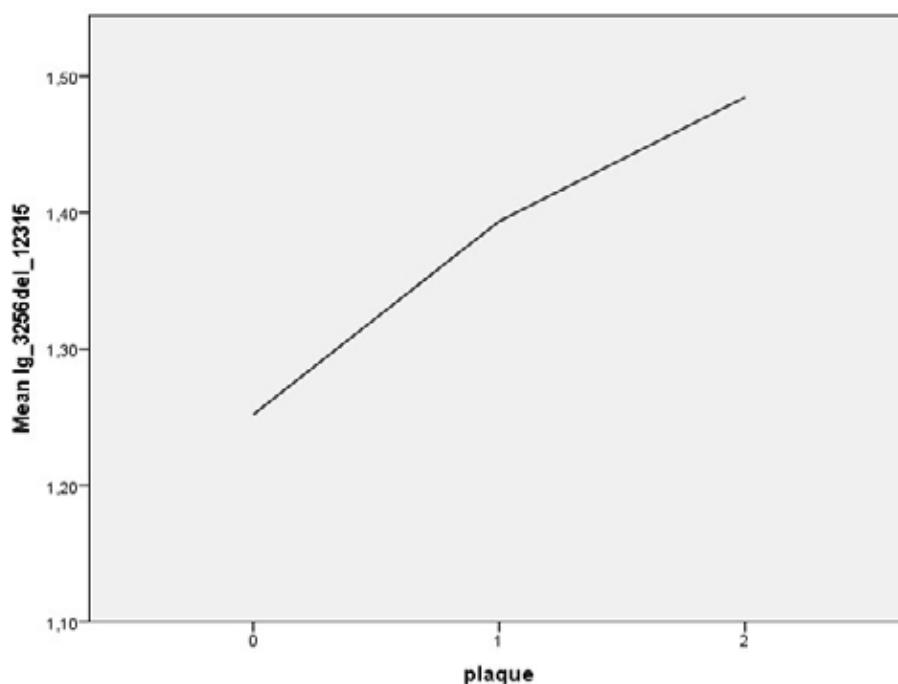


Рисунок 50. Относительное изменение совместного распределения мутаций *m.3256C>T* и *m.12315G>A* по категориям атеросклеротического поражения [89].

Совместные исследования

3.10 Ассоциация гаплогрупп митохондриального генома с атеросклеротическими поражениями

Анализ ассоциации гаплогрупп с атеросклерозом и его факторами риска был основан на статистике Хи-квадрат, а именно отношении шансов. Для оценки отношения шансов переменная «бляшка» была перекодирована в дихотомическую (0 – отсутствие, 1 – наличие бляшки любого размера) [89, 499].

В нашей выборке количество участников исследования, имеющих атеросклеротическую бляшку любого размера, равнялось 413. У остальных 287 индивидов бляшки отсутствовали. При этом количество валидных случаев оказалось равным 384 [89, 499].

3.10.1 Анализ ассоциации гаплогрупп с атеросклеротическими бляшками

3.10.1.1 Гаплогруппа М у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы М с атеросклеротическими бляшками сонных артерий приведен в таблицах 52-56 [89, 499].

Таблица 52. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих АСБ СА, с гаплогруппой М [89, 499]

	Количество участников исследования, имеющих АСБ СА					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		Σ	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация АСБ СА с гаплогруппой М	384	92,9%	29	7,1%	413	100,0%

Таблица 53. Сопряженность гаплогруппы М с АСБ СА [89, 499]

Сопряженность				
		АСБ СА		Количество валидных случаев
		0,00	1,00	
М	0,00	183	185	368
	1,00	13	3	16
Количество валидных случаев		196	188	384

Таблица 54. Отношение шансов гаплогруппы М быть ассоциированной с АТ или его отсутствием у индивидов [89, 499]

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы М быть ассоциированной с АТ/отсутствием АТ (0,00/1,00)	0,197	0,042	0,916
Для валидных случаев с АСБ СА, не ассоциированных с гаплогруппой М (0,00)	3,021*	0,848	10,760
Для валидных случаев с АСБ СА, ассоциированных с гаплогруппой М (1,00)	0,596	0,451	0,787
Количество валидных случаев	384		

Согласно таблице 54, вероятность появления атеросклеротической бляшки у представителей гаплогруппы М в 5,07 раза ниже по сравнению с теми участниками исследования, у которых гаплогруппа М отсутствует [89, 499]. Поскольку значение статистики Хи-квадрат (таблица 55) указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым [89, 499].

Таблица 55. Оценка ассоциации гаплогруппы М с отсутствием АСБ СА у участников исследования методом Хи-квадрат [89, 499]

	Значение	Асимтоматическая значимость (двухсторонняя)
Хи-квадрат по Пирсону	5,229	0,022*
Количество валидных случаев	384	

*Примечание:**- высокодостоверная ассоциация ($p \leq 0,05$).

Это подтверждается таблицей 56 по корреляции Спирмена [89, 499].

Таблица 56. Корреляция Спирмена для АСБ СА и гаплогруппы М [89, 499]

Корреляция				
			АСБ СА	Гаплогруппа М
Коэффициент ранговой корреляции Спирмена	АСБ СА	Коэффициент корреляции	1,000	-0,137*
		Значимость (двух-сторонняя)	0,000	0,018*
		Количество валидных случаев	384	384
	Гаплогруппа М	Коэффициент корреляции	-0,137*	1,000

		Значимость (двух- сторонняя)	0,018*	0.000
		Количество валидных случаев	384	413

Примечание:* - корреляция значима на уровне $p \leq 0,05$ (двухсторонняя).

3.10.1.2 Гаплогруппа T у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы T с атеросклеротическими бляшками сонных артерий приведен в таблицах 57-61 [89, 499].

Таблица 57. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих АСБ СА, с гаплогруппой T [89, 499]

	Количество участников исследования, имеющих АСБ СА					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		Σ	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация АСБ СА с гаплогруппой T	384	92,9%	29	7,1%	413	100,0%

**Таблица 58. Сопряженность гаплогруппы Т с АСБ СА
[89, 499]**

Сопряженность				
		Атеросклеротическая бляшка		Количество валидных случаев
		0,00	1,00	
Т	0,00	160	178	338
	1,00	36	10	46
Количество валидных случаев		196	188	384

**Таблица 59. Отношение шансов гаплогруппы Т быть
ассоциированной с атеросклерозом или его отсутствием
у индивидов [89, 499]**

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы Т быть ассоциированной с АТ/ отсутствием АТ (0,00/1,00)	0,257	0,113	0,585
Для валидных случаев с АСБ СА, не ассоциированных с гаплогруппой Т (0,00)	2,369*	1,272	4,412

Для валидных случаев с АСБ СА, ассоциированных с гаплогруппой Т (1,00)	0,609	0,490	0,756
Количество валидных случаев	384		

Согласно таблице 59, вероятность появления бляшки у носителей гаплогруппы Т в 3,89 раза ниже по сравнению с участниками исследования, у которых гаплогруппа Т отсутствует [89, 499]. Поскольку значение статистики Хи-квадрат (таблица 60) указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым [89, 499].

Таблица 60. Оценка ассоциации гаплогруппы Т с отсутствием АСБ СА у участников исследования методом Хи-квадрат [89, 499]

	Значение	Асимтотическая значимость (двухсторонняя)
Хи-квадрат по Пирсону	11,738	0, 001*
Количество валидных случаев	384	

*Примечание:**- высокодостоверная ассоциация ($p \leq 0,001$).

Это подтверждается таблицей 61 по корреляции Спирмена [89, 499].

Таблица 61. Корреляция Спирмена для АСБ СА и гаплогруппы Т [89, 499]

Корреляция				
			АСБ СА	Гаплогруппа Т
Коэффициент ранговой корреляции Спирмена	АСБ СА	Коэффициент корреляции	1,000	-0,198*
		Значимость (двух-сторонняя)	0,000	0,001*
		Количество валидных случаев	384	384
	Гаплогруппа Т	Коэффициент корреляции	-0,198*	1,000
		Значимость (двух-сторонняя)	0,001*	0,000
		Количество валидных случаев	384	413

*Примечание:** - корреляция значима на уровне $p \leq 0,001$ (двухсторонняя).

3.10.1.3 Гаплогруппа U у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы U с атеросклеротическими бляшками сонных артерий приведен в таблицах 62-66 [89, 499].

Таблица 62. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих АСБ СА, с гаплогруппой U [89, 499]

	Количество участников исследования, имеющих АСБ СА					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		Σ	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация АСБ СА с гаплогруппой U	384	92,9%	29	7,1%	413	100,0%

Таблица 63. Сопряженность гаплогруппы U с АСБ СА [89, 499]

Сопряженность				
		Атеросклеротическая бляшка		Количество валидных случаев
		0,00	1,00	
U	0,00	65	92	157
	1,00	131	96	227
Количество валидных случаев		196	188	384

Таблица 64. Отношение шансов гаплогруппы U быть ассоциированной с атеросклерозом или его отсутствием у индивидов [89, 499]

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы U быть ассоциированной с АТ/ отсутствием АТ (1,00/0,00) для всех участников исследования	0,521	0,327	0,830
Для валидных случаев с АСБ СА, не ассоциированных с гаплогруппой U (0,00)	0,720	0,563	0,919
Для валидных случаев с АСБ СА, ассоциированных с гаплогруппой U (1,00)	1,381	1,101	1,734
Количество валидных случаев	384		

Согласно таблице 64, вероятность появления атеросклеротической бляшки у носителей гаплогруппы U в 1,9 раза выше, чем у тех участников исследования, у которых гаплогруппа U отсутствует [89, 499]. Поскольку значение статистики Хи-квадрат (таблица 65) указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым [89, 499].

Таблица 65. Оценка ассоциации гаплогруппы U с АСБ СА методом Хи-квадрат [89, 499]

	Значение	Асимтоматическая значимость (двухсторонняя)
Хи-квадрат по Пирсону	7,587	0, 006*
Количество валидных случаев	384	

*Примечание:**- высокодостоверная ассоциация ($p \leq 0,01$).

Это подтверждается таблицей по корреляции Спирмена (таблица 66) [89, 499].

Таблица 66. Корреляция Спирмена для АСБ СА и гаплогруппы U [89, 499]

Корреляция				
			АСБ СА	Гаплогруппа U
Коэффициент ранговой корреляции Спирмена	АСБ СА	Коэффициент корреляции	1,000	0,211*
		Значимость (двух-сторонняя)	0,000	0,000*
		Количество валидных случаев	384	384
	Гаплогруппа U	Коэффициент корреляции	0,211*	1,000

		Значимость (двух- сторонняя)	0,000*	0,000
		Количество валидных случаев	384	413

Примечание:* - корреляция значима на уровне $p \leq 0,001$ (двухсторонняя).

3.10.2 Анализ ассоциации гаплогрупп с факторами риска атеросклероза

3.10.2.1 Гаплогруппа U у индивидов с артериальной гипертензией (АГ)

Анализ ассоциации гаплогруппы U с артериальной гипертензией приведен в таблицах 67-70 [89, 499].

Таблица 67. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих АГ, с гаплогруппой U [89, 499]

	Суммарное количество случаев					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		Σ	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация гипертензии с гаплогруппой U	413	100,0%	0	0,0%	413	100,0%

Таблица 68. Сопряженность гаплогруппы U с АГ [89, 499]

Сопряженность				
		АГ		Количество валидных случаев
		0,00	1,00	
U	0,00	50	121	171
	1,00	161	81	242
Количество валидных случаев		211	202	413

Таблица 69. Отношение шансов гаплогруппы U быть ассоциированной с АГ или ее отсутствием у индивидов [89, 499]

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы U быть ассоциированной с АГ/отсутствием АГ (0,00/1,00)	0,547	0,342	0,877
Для валидных случаев с АГ, не ассоциированными с гаплогруппой U (0,00)	0,679	0,497	0,927
Для валидных случаев с АГ, ассоциированными с гаплогруппой U (1,00)	1,241	1,053	1,462

Количество валидных случаев	413		
-----------------------------	-----	--	--

Согласно данным, приведенным в таблице 69, вероятность возникновения артериальной гипертензии у представителей гаплогруппы U в 1,83 раза выше, чем у тех участников исследования, у которых гаплогруппа U отсутствует [89, 499]. Поскольку значение статистики Хи-квадрат (таблица 70) указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым [89, 499].

Таблица 70. Оценка ассоциации гаплогруппы U с АГ методом Хи-квадрат [89, 499]

	Значение	Асимтоматическая значимость (двухсторонняя)
Хи-квадрат по Пирсону	7,587	0, 012*
Количество валидных случаев	413	

*Примечание:**- высокодостоверная ассоциация ($p \leq 0,05$).

3.10.2.2 Гаплогруппа U у индивидов с наличием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ)

Анализ ассоциации гаплогруппы U с гипертрофией левого желудочка приведен в таблицах 71-74 [89, 499].

Таблица 71. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих ГЛЖ, с гаплогруппой U [89, 499]

	Суммарное количество случаев					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		Σ	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация ГЛЖ с гаплогруппой U	413	100,0%	0	0,0%	413	100,0%

Таблица 72. Сопряженность гаплогруппы U с ГЛЖ [89, 499]

Сопряженность				
		ГЛЖ		Количество валидных случаев
		0,00	1,00	
U	0,00	104	67	171
	1,00	178	64	242
Количество валидных случаев		282	131	413

Таблица 73. Отношение шансов гаплогруппы U быть ассоциированной с ГЛЖ [89, 499]

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы U быть ассоциированной с ГЛЖ/не ассоциированной с ГЛЖ (0,00/1,00)	0,567	0,353	0,912
Для валидных случаев с АТ бляшками, не ассоциированными с гаплогруппой U (0,00)	0,832	0,709	0,976
Для валидных случаев с АТ бляшками, ассоциированными с гаплогруппой U (1,00)	1,467	1,066	2,018
Количество валидных случаев	413		

Согласно таблице 73, вероятность возникновения гипертрофии левого желудочка у представителей гаплогруппы U в 1,76 раз выше, чем у тех участников исследования, у которых гаплогруппа U отсутствует [89, 499]. Поскольку значение статистики Хи-квадрат (таблица 74) указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым [89, 499].

Таблица 74. Оценка ассоциации гаплогруппы U с ГЛЖ методом Хи-квадрат [89, 499]

	Значение	Асимтоматическая значимость (двухсторонняя)
Хи-квадрат по Пирсону	7,587	0, 019*
Количество валидных случаев	413	

*Примечание:**- высокодостоверная ассоциация ($p \leq 0,05$).

3.11 Ассоциация популяционных гаплогрупп с мутациями митохондриального генома

Дальнейшие наши исследования были посвящены анализу связи популяционных гаплогрупп митохондриального генома с выявленными мутациями [89, 499].

3.11.1 Гаплогруппа U и митохондриальные мутации

Таблица 75. Корреляция гаплогруппы U с уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций [89, 499]

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	2,730	0,006**
m.652insG	0,000	1,000
m.1555A>G	1,555	0,101*
m.3256C>T	1,323	0,186

m.3336T>C	0,419	0,675
m.5178C>A	1,379	0,168
m.12315G>A	1,681	0,093*
m.13513G>A	0,062	0,950
m.14459G>A	0,585	0,559
m.14846G>A	0,709	0,478
m.15059G>A	2,630	0,009**

Примечание:

** - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ($p \leq 0,05$);

* - корреляция гаплогрупп с мутациями значима на уровне $p \leq 0,1$.

Согласно данным таблицы 75, с гаплогруппой U высокодостоверно ассоциированы мутации митохондриального генома m.652delG и m.15059G>A, и значимо на уровне $p \leq 0,1$ – однонуклеотидные замены m.12315G>A и m.1555A>G [89, 499].

3.11.2 Гаплогруппа H и митохондриальные мутации

Таблица 76. Корреляция гаплогруппы H с уровнем гетероплазии митохондриальных мутаций [89, 499]

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	0,377	0,706
m.652insG	0,000	1,000
m.1555A>G	0,293	0,769
m.3256C>T	1,419	0,156
m.3336T>C	0,415	0,815
m.5178C>A	2,249	0,024*

m.12315G>A	0,523	0,601
m.13513G>A	0,232	0,816
m.14459G>A	0,213	0,861
m.14846G>A	0,257	0,797
m.15059G>A	0,378	0,706

Примечание:

* - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ($p \leq 0,05$).

Согласно данным таблицы 76, с гаплогруппой Н высокодостоверно ассоциирована мутация митохондриального генома m.5178C>A [89, 499].

3.11.3 Гаплогруппа Т и митохондриальные мутации

Таблица 77. Корреляция гаплогруппы Т с уровнем гетероплазии митохондриальных мутаций [89, 499]

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	0,649	0,103*
m.652insG	0,000	1,000
m.1555A>G	1,296	0,195
m.3256C>T	2,237	0,010**
m.3336T>C	2,395	0,001**
m.5178C>A	1,364	0,173
m.12315G>A	1,448	0,148
m.13513G>A	1,944	0,050**
m.14459G>A	0,984	0,325
m.14846G>A	1,653	0,098*
m.15059G>A	2,557	0,007**

Примечание:

** - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ($p \leq 0,05$);

* - корреляция гаплогрупп с мутациями значима на уровне $p \leq 0,1$.

Согласно данным таблицы 77, с гаплогруппой Т высокодостоверно ассоциированы мутации митохондриального генома m.3256C>T, m.3336T>C, m.13513G>A и m.15059G>A ($p \leq 0,05$), и значимо на уровне $p \leq 0,1$ – однонуклеотидные замены m.652delG и m.14846G>A [89, 499].

3.11.4 Гаплогруппа М и митохондриальные мутации

Таблица 78. Корреляция гаплогруппы М с уровнем гетероплазии митохондриальных мутаций [89, 499]

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	1,246	0,213
m.652insG	0,000	1,000
m.1555A>G	1,794	0,073*
m.3256C>T	0,057	0,954
m.3336T>C	1,651	0,103*
m.5178C>A	3,329	0,001**
m.12315G>A	0,223	0,824
m.13513G>A	1,000	0,317
m.14459G>A	0,402	0,687
m.14846G>A	0,066	0,947
m.15059G>A	0,773	0,440

Примечание:

** - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ($p \leq 0,05$);

** - корреляция гаплогрупп с мутациями значима на уровне $p \leq 0,1$.*

Согласно данным таблицы 78, с гаплогруппой М высокодостоверно ассоциирована мутация митохондриального генома m.5178C>A, и значимо на уровне $p \leq 0,1$ – однонуклеотидные замены m.1555A>G и m.3336T>C [89, 499].

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В атерогенезе большое значение имеют клетки крови. При возникновении атеросклероза происходит их миграция в интиму-медию через эндотелиальный слой. Сигнальную роль во время формирования воспалительного и иммунного ответа выполняют лимфоциты, а моноциты превращаются в макрофаги, удаляющие излишки холестерина, которые накапливаются в очагах атеросклеротических поражений [89].

Одной из возможных причин атеросклероза могут быть дефекты в митохондриях клеток, благодаря которым может возникнуть недостаток энергии (АТФ) в клетках и тканях организма, ведущий, согласно моноклональной гипотезе, к неограниченной пролиферации клеток и возникновению атеросклеротических поражений [89, 530]. Для того, чтобы выяснить, имеются ли отличия между митохондриями клеток нормальной и пораженной атеросклерозом интимы сосудов, был проведен ультраструктурный анализ митохондрий с помощью электронного микроскопа. Обнаружено, что, по сравнению с митохондриями клеток нормальной интимы, в митохондриях из участков атеросклеротических поражений имеются деструктивные изменения крист, отек матрикса, вакуолеподобные и миелиноподобные структуры [89].

На основании выявленных патологических изменений в данных митохондриях, было высказано предположение, что причиной подобных митохондриальных дефектов могут быть мутации мтДНК, ведущие к дисфункции ферментов дыхательной цепи митохондрий или транспортных РНК. Вероятно, уровень обмена веществ в мутантных митохондриях снижается, а моноциты с такими митохондриями становятся склонными к липоидозу, в конечном итоге превращаясь в пенистые клетки. Таким образом, пусковым механизмом атерогенеза могут быть мутации митохондриального генома [89, 530].

Для того, чтобы проверить данное предположение, было решено провести сравнительный анализ уровня гетероплазии в выборке индивидов с пораженной атеросклерозом и нормальной интимой артерий [89].

С целью определения уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома в исследуемой выборке автор с коллегами разработали новый оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, основанный на технологии пиросеквенирования [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 530, 535]. С помощью разработанного метода оказалось возможным определение уровня гетероплазии как соматических, так и наследственных мутаций мтДНК, а также соматических мутаций ядерного генома [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 530, 535].

Схема анализа процента гетероплазии представлена на рисунке 51 [89, 495].

Метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанный автором с сотрудниками на основе технологии пиросеквенирования [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 530, 535] обладает рядом существенных преимуществ по сравнению с другими количественными методами: инвазивного расщепления олигонуклеотидного зонда (Invader), РТ РАСА-кПЦР), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), анализа гетеродуплексов, анализа гетероплазии с использованием Surveyor nuclease, секвенирования по Сенгеру, SNaPshot, HRM, TGGE, секвенирования нового поколения на оборудовании 454/Roche, Applied Biosystems SOLiD, серии приборов Illumina [89, 154, 158, 179, 202, 215, 231, 239, 271, 293, 298, 303, 365, 380, 384, 387, 396, 397, 434, 436, 437, 445, 466, 521, 535, 541, 550, 563, 579], применяемыми для анализа мутаций (таблица 79). Как видно из таблицы 79, пиросеквенс обладает наименьшим количеством недостатков и наибольшим количеством достоинств, по сравнению с другими методами измерения процента гетероплазии митохондриального генома. Он предоставляет уникальнейшую возможность анализа очень короткого фрагмента ДНК, содержащего область анализируемой мутации. Размер такого фрагмента ДНК, в

среднем, составляет 5-10 п.н., что существенно уменьшает вероятность допущенных при анализе ошибок. Вследствие этого метод, разработанный диссертантом с коллегами на основе технологии пиросеквенирования [83, 87, 89, 94, 111, 112, 114, 493, 495, 530], мог бы служить «золотым стандартом» для всех остальных методов определения процента гетероплазии митохондриального генома и его рекомендуется применять для верификации уровня гетероплазии мутаций, выявленных с помощью других методов.

Схема анализа процента гетероплазии мутантного аллеля митохондриального генома

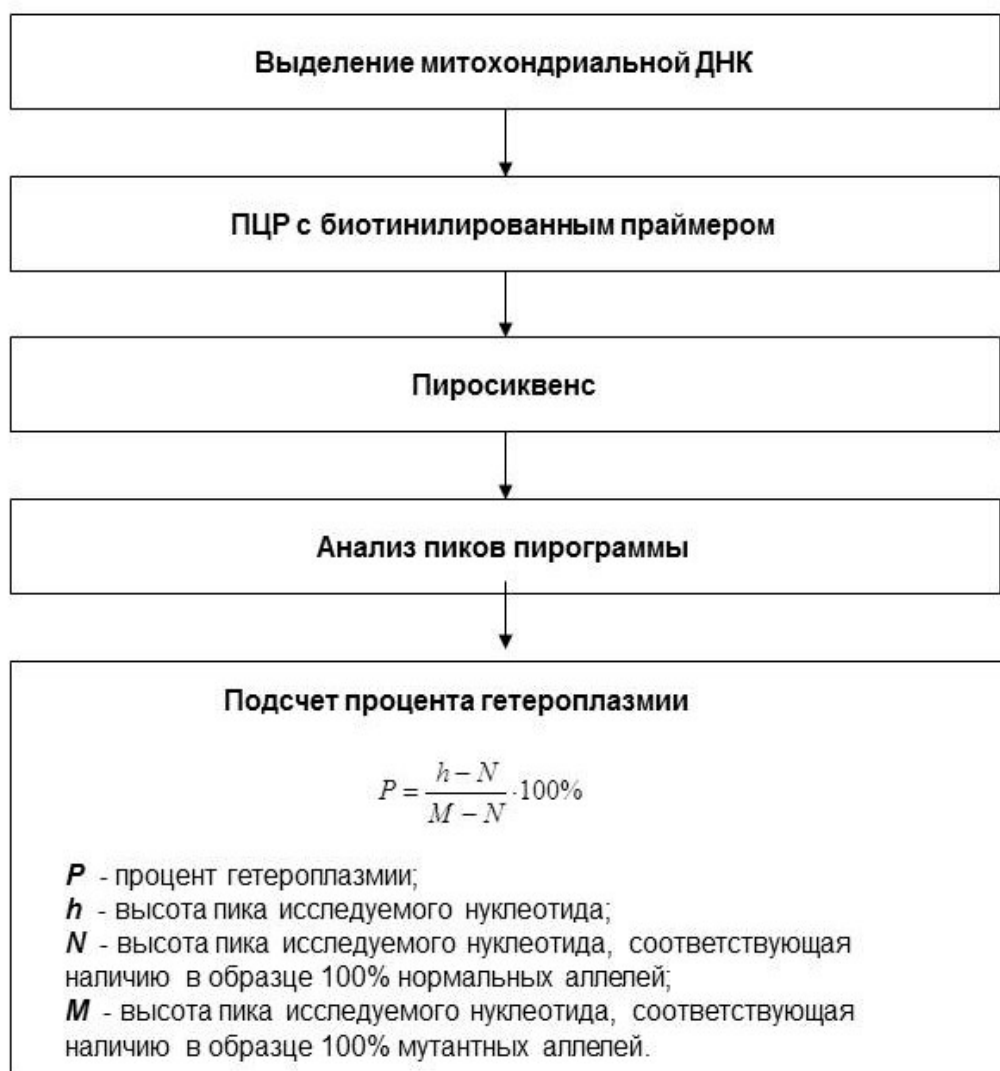


Рисунок 51. Анализ процента гетероплазии мутаций митохондриального генома с помощью разработанного метода [89, 495].

Таблица 79. Сравнение методов количественного анализа ДНК [89, 154, 158, 179, 202, 215, 231, 239, 271, 293, 298, 303, 365, 380, 384, 387, 396, 397, 434, 436, 437, 445, 466, 521, 535, 541, 550, 563, 579]

Метод	Преимущества	Недостатки
Метод пиросеквенирования	<ol style="list-style-type: none"> 1. Уникальная возможность анализа очень короткого фрагмента ДНК, в среднем – 5-10 п.н. 2. Известна точная природа изменения нуклеотидов 3. Можно автоматизировать 4. Быстрота 5. Можно использовать для SNP-анализа 6. Можно анализировать сложные вторичные структуры 7. Относительная дешевизна анализа мутаций в одном образце. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Необходимо специальное оборудование 2. Эффективность всех четырех ферментов является критическим моментом для точности процесса
Метод инвазивного расщепления олигонуклеотидного зонда (Invader)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Позволяет проводить SNP-анализ в одной реакционной пробирке 2. Позволяет использовать автоматическую настройку реакции 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Требуется длительного времени инкубации (3-4 ч) 2. Большое количество геномной ДНК (20-100 нг) на одну реакцию 3. Трудоемкий

		процесс подбора аллель-специфичных зондов
РТ РАСА-кПЦР (количественной рефракторной аллельспецифической амплификации в реальном времени)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Простой 2. Одноступенчатый 3. Быстрый 4. Нерадиоактивный 5. Чувствительный 6. Специфичный 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Сложно подобрать оптимальные аллель-специфические праймеры. 2. Сложно подобрать оптимальный режим для РТ ПЦР, так чтобы аллель-специфические праймеры садились именно на нужную последовательность.
454/Roche	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая длина прочтений 2. Для GSJunior – невысокая стоимость прибора и эксперимента 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая стоимость прибора для GSFLX+ 2. Высокая стоимость эксперимента для GSFLX+

		<p>3. Высокая стоимость за 1 Мб</p> <p>4. Большой расход растворов, пропускаемых через проточную ячейку</p>
<p><u>Illumina</u></p> <p>Illumina MiSeq</p>	<p>1. Невысокая стоимость инструмента и эксперимента</p> <p>2. Самая низкая стоимость за 1 Мб среди малых платформ</p> <p>3. Самое быстрое время запуска</p>	<p>1. Относительно короткие прочтения и количество прочтений меньше чем у других продуктов Illumina</p> <p>2. Завышенная стоимость за 1 Мб среди других продуктов Illumina</p>
<p>Illumina</p> <p>HiScanSQ</p>	<p>Разносторонние геномные исследования и прогноз на масштабирование характеристик</p>	<p>Для больших объемов данных – стоимость за 1 Гб больше, чем у HiSeq</p>
<p>Illumina</p> <p>GAIIx</p>	<p>1. Стоимость прибора ниже, чем у HiSeq</p> <p>2. Большое количество публикаций с использованием этого прибора</p>	<p>Стоимость за 1 Гб больше, чем у HiSeq</p>

Illumina HiSeq 1000 и 2000	<ol style="list-style-type: none"> 1. Наибольшее количество прочтений 2. Максимальный выход секвенирования в день и за 1 запуск 3. Самая низкая стоимость за 1 Гб среди всех платформ 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая стоимость прибора 2. Повышенные требования к платформам анализа полученного материала
Applied Biosystems SOLiD	<ol style="list-style-type: none"> 1. Каждый канал проточной пластины может быть проанализирован независимо 2. Высочайшая точность секвенирования 3. Возможность возобновления неудачных циклов секвенирования 4. 96 различных адаптеров для каждого канала 5. Пропускная способность 10–15 Гб/день для SOLiD-5500 и 20–30 Гб/день для SOLiD 5500XL 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокоэффективные приборы стали доступными лишь с середины 2011 года 2. Относительно короткие прочтения 3. Больше количество пробелов при сборке геномов 4. Высокая стоимость прибора для SOLiD-550XL
Метод HRM анализа	<ol style="list-style-type: none"> 1. Низкое потребление реагентов с незначительными потерями: требуется всего лишь 20 мкл ПЦР-смеси для анализа каждого образца, 	<p>Метод не адаптирован для количественного анализа процента</p>

	<p>исключая потребность в HPLC-растворителях или DGGE-гелях</p> <p>2. Этап высокочувствительного анализа кривых плавления может быть просто добавлен в конце ПЦР для немедленного анализа</p> <p>3. В отличие от DHPLC, не требуется термическая оптимизация</p> <p>4. Низкое потребление образцов: после проведения HRM-анализа продукты ПЦР могут быть использованы в реакции секвенирования по Сенгеру</p> <p>5. Высокое разрешение для точных и воспроизводимых результатов</p>	<p>гетероплазмии</p> <p>митохондриальных мутаций</p>
Метод TGGE	<p>1. Не требует денатурирующих агентов</p> <p>2. Большая воспроизводимость</p> <p>3. Анализировать фрагменты с размером до 1 000 п. н.</p>	<p>Точная природа нуклеотидного изменения неизвестна</p>
Метод HPLC	<p>1. Высокая точность</p> <p>2. Возможность определения малых количеств веществ</p> <p>3. Высокая эффективность разделения</p> <p>4. Гибкость изменения условий разделения</p> <p>5. Экспрессность анализа</p>	<p>1. Высокая стоимость колонок</p> <p>2. Точная природа нуклеотидного изменения не известна</p> <p>3. Необходимо секвенирование</p>

	<p>6. Сравнительная простота аппаратного оформления</p> <p>7. Возможность автоматизации</p>	<p>для определения природы мутации</p> <p>4. Трудно идентифицировать гетерозиготы</p>
<p>Метод определения гетероплазмы с использованием Surveyor nuclease</p>	<p>1. Прост в применении</p> <p>2. Наличие специализированных наборов для сканирования мутаций</p>	<p>Качественный метод.</p>
<p>Метод плюс-минус секвенирования по Сенгеру</p>	<p>1. Использование дидезоксинуклеотидов с флуоресцентными метками с разными длинами волн испускания позволяет проводить реакцию в одной пробирке.</p> <p>2. Секвенаторы такого типа могут проанализировать за один раз последовательности длиной 500—1000 нуклеотидов.</p>	<p>1. Использование радиоактивной метки</p> <p>2. Сложность разделения фрагментов в электрофорезе</p> <p>3. Усложнение за счет использования фага</p> <p>4. Потеря точности при прочтении больших фрагментов</p>

<p>Метод SNaPshot</p>	<p>1. Достоверный метод идентификации не охарактеризованных нуклеотидных нарушений, позволяющий впоследствии определить несвоевременные стоп-кодоны, миссенс- или молчащие мутации</p> <p>2. Можно использовать для SNP анализа</p> <p>3. Возможность автоматизации</p>	<p>1. Результаты относительны</p> <p>2. Малая точность данных</p> <p>3. Требуется нормирование результатов</p>
---------------------------	---	--

Следует подчеркнуть, что наибольший смысл имеет изучение тех мутаций митохондриального генома, которые могут приводить к фенотипическим изменениям у человека. К таким изменениям можно отнести проявления различных заболеваний, в том числе полигенных мультифакториальных патологий, к которым относится атеросклероз (таблица 80) [89].

С помощью разработанного автором с коллегами метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома были обнаружены три новые мутации - m.652delG, m.961delC и m.5132insAA, ранее не описанные в литературе [89, 495]. Две из них принадлежат гену 12 субъединицы рибосомальной РНК, а последняя – гену субъединицы 2 NADH дегидрогеназы [89, 495].

Автором впервые было установлено, что нормальные и пораженные атеросклерозом участки сосудистой стенки могут иметь отличия по уровню гетероплазмии ряда мутаций [89, 114]. Из 42 исследованных мутаций сорок оказались гетероплазмичными (m.652delG, m.716T>G, m.750A>G, m.961delC, m.1555A>G, m.3256C>T, m.3258T>C, m.3271T>C, m.3280A>G, m.3285C>T, m.3316G>A, m.3336T>C, m.5132insAA, m.5178C>A, m.5540G>A, m.5692T>C, m.5814T>C, m.6489C>A, m.8993T>G, m.8993T>C, m.9379G>A, m.9480del15,

m.9537delC, m.12315G>A, m.13513G>A, m.14459G>A, m.14482C>A, m.14482C>G, m.14484T>C, m.14487T>C, m.14709T>C, m.14846G>A, m.15059G>A, m.652insG, m.961insC, m.15084G>A, m.5132delAA, m.15498del24, m.15452C>A, m.15762G>A, а две (m.8362T>G и m.8363G>A) – гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе [89, 114].

В настоящем исследовании выявлено, что преобладающими мутациями в большинстве атеросклеротических поражений являются m.652delG, m.1555A>G, m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.13513G>A, m.14459G>A, m.652insG, m.14846G>A и m.15059G>A [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532]. Одни из них ассоциированы с атеросклерозом, другие – связаны с отсутствием атеросклеротических поражений у индивидов [13, 27, 45, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 119, 120, 160, 463, 482, 483, 493, 495-500, 502, 505, 528-532]. Согласно литературным источникам, данные мутации связаны с определенными заболеваниями (таблица 80). Следует подчеркнуть, что в нашем исследовании выявлена ассоциация ранее нигде не описанной мутации m.652delG с атеросклерозом [89, 114].

Таблица 80. Данные о патологиях, вызываемых исследованными мутациями [89, 141, 183, 198, 207, 252, 269, 287, 289, 290, 294, 330, 369, 402, 424, 481]

Ген	Мутация	Патология
MT-RNR1	m.652insG	Митохондриальные миопатии
	m.1555A>G	Тугоухость, индуцированная аминогликозидами и беспричинная потеря слуха, чувствительность к аминогликозидным

		антибиотикам; глухота
MT-TL1	m.3256C>T	MELAS, энцефалопатия, лактоцидоз, миопатия, кардиомиопатия, инсультоподобный удар в правом париетоокципитальном районе головного мозга, окислительный дефект мышечного метаболизма
MT-ND1	m.3336T>C, молчащая мутация, при которой аминокислота в первой белковой субъединице фермента NADH-дегидрогеназы остается прежней	Сахарный диабет типа 2
MT-ND2	m.5178C>A (вызывает замену лейцина на метионин)	Острый инфаркт миокарда, сахарный диабет типа 2
MT-TL2	m.12315G>A	Пигментная ретинопатия, блефароптоз, офтальмоплегия и глухота

MT-ND5	m.13513G>A	Синдром Ли (наследственная энцефаломиопатия); синдром Вольфа - Паркинсона –Уайта (синдром преждевременного возбуждения желудочков) и кардиомиопатия
MT-ND6	m.14459G>A (изменение аланина на валин в 72-ой аминокислотной позиции, которая находится в наиболее консервативном районе белка ND6)	Наследственная невропатия глаза, синдром Лебера. Ассоциирована с дисфункцией базальных ганглиев, мышечной спастичностью и энцефалопатией
MT-CYTB	m.14846G>A (аминокислотная замена Gly>Ser в позиции белковой цепи 34. Может привести к дисфункции фермента).	Митохондриальная миопатия
	m.15059G>A (происходит замена глицина на стоп-кодон в позиции пептида 190. Трансляция белка на рибосоме останавливается. В результате белок оказывается короче на	Митохондриальная миопатия

	244 аминокислоты. Может привести к дисфункции фермента).	
--	--	--

Отметим, что делеция гуанина в позиции 652 митохондриального генома приводит к дефекту малой субъединицы (12S) рибосомальной РНК. С большой вероятностью, функция мутантных рибосом становится угнетенной либо происходит их полная дисфункция [83, 87, 89, 93, 94, 96, 98, 99, 102-104, 108, 109, 111-115, 124, 125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530]. В митохондриях уменьшается экспрессия белковых субъединиц ферментов дыхательной цепи, следствием которой является уменьшение количества данных ферментов. Конечным итогом данного патогенетического процесса может быть возникновение и развитие атеросклеротических поражений [83, 87, 89, 93, 94, 96, 98, 99, 102-104, 108, 109, 111-115, 124, 125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530].

В то же время инсерция гуанина в позиции 652 митохондриального генома, по всей видимости, стабилизирует субъединицу 12S рибосомальной РНК и, следовательно, рибосому [83, 87, 89, 93-95, 97-99, 102-104, 108, 109, 114, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530]. Это может привести к увеличению экспрессии белковых цепей ферментов дыхательной цепи митохондрий, увеличению количества данных ферментов и запуску физиологических процессов в клетках, которые, вероятно, защищают организм от атеросклероза [83, 87, 89, 93-95, 97-99, 102-104, 108, 109, 114, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530].

Однонуклеотидная замена m.1555A>G также локализована в гене рибосомальной РНК 12S. Данная мутация, вероятно, стабилизирует рибосому, аналогично m.652insG, вследствие чего может иметь защитный эффект для клеток интимы артерий [83, 87, 89, 91-93, 98, 99, 102-104, 108, 109, 119, 114, 124, 125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530].

Мутация m.3256C>T локализована в 25 нуклеотиде гена тРНК-Leu (кодон узнавания UUR), который является последним нуклеотидом в области терминации транскрипции [83, 87, 89, 94, 98, 99, 102-104, 108, 109, 111, 112, 114, 123-125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530, 532]. Терминация происходит в том случае, если на А-сайте рибосомы появляется стоп-кодон (UAG, UGA или UAA). Если тРНК, соответствующие данным кодам, отсутствуют, пептидил-тРНК продолжает оставаться связанной с Р-сайтом рибосомы. На этом этапе протеины RF1 или RF2 выполняют функции узнавания различных кодонов и катализа отсоединения полипептидной цепи от мРНК. Протеин RF3 вызывает диссоциацию мРНК из митохондриальной рибосомы. Когда лейцин оказывается последней аминокислотой полипептида, терминации транскрипции не происходит, полипептид не может отделиться от митохондриальной рибосомы. Это влечет за собой такие негативные последствия, как невозможность использования для дальнейшего синтеза субъединиц рибосом, оставшихся связанными с полипептидами. Данные полипептиды также невозможно использовать в обменных процессах. Поэтому количество нормальных белков дыхательной цепи в митохондриях уменьшается, а интенсивность синтеза АТФ падает [83, 87, 89, 94, 98, 99, 102-104, 108, 109, 111, 112, 114, 123-125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530, 532].

Однонуклеотидная замена m.3336T>C (ген MT-ND1) является молчащей мутацией, не приводящей к замене аминокислоты в первой белковой субъединице фермента NADH дегидрогеназы [27, 83, 87, 89, 94, 98, 99, 105, 102-104, 107-109, 114, 160, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. Вероятно, связь данной мутации с атеросклеротическими поражениями артерий объясняется тем, что она входит в состав гаплотипа, ассоциированного с митохондриальной дисфункцией [27, 83, 87, 89, 94, 98, 99, 105, 102-104, 107-109, 114, 160, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530].

При однонуклеотидной замене m.5178C>A, локализованной в гене второй субъединицы NADH-дегидрогеназы, происходит замена лейцина на метионин

[45, 83, 87, 89, 90, 94, 98, 99, 102-105, 107-109, 114, 124, 125, 446, 463, 482, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. Данная мутация, вероятно, приводит к дисфункции фермента, способствующей возникновению атеросклеротических поражений. Некоторые исследователи предполагают, что мутация m.5178C>A защищает интиму от атеросклероза [402]. Однако полученные нами данные не подтверждают это предположение, т.к. процент мутации m.5178C>A в атеросклеротических поражениях различной степени тяжести оказался значительно выше, чем в нормальной интиме [45, 83, 87, 89, 90, 94, 98, 99, 102-105, 107-109, 114, 124, 125, 446, 463, 482, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. В частности, он оказался выше в пораженных атеросклерозом участках начального поражения интимы (жировых точках и жировых полосах), липофиброзных и фиброзных бляшках, суммарном атеросклеротическом поражении морфологически картированных аорт и гомогенатов [45, 83, 87, 89, 90, 94, 98, 99, 102-105, 107-109, 114, 124, 125, 446, 463, 482, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. Это подтверждается данными литературы [424]. Что касается данных пилотного исследования на 7 аортах, где была обнаружена ассоциация данной мутации с отсутствием липофиброзных бляшек, то там могла сыграть роль недостаточность выборки, что подтвердилось нашими дальнейшими исследованиями [45, 83, 87, 89, 90, 94, 98, 99, 102-105, 107-109, 114, 124, 125, 482, 493-497, 500, 502, 504-506, 530].

Однонуклеотидная замена m.12315G>A затрагивает нуклеотид 52 транспортной РНК-Leu (кодон узнавания CUN), локализующийся в регионе стебелька петли Т [83, 87, 89, 94, 98, 99, 100-104, 108-115, 124, 125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530]. Общеизвестна универсальность образования третичной структуры тРНК. Во время этого процесса петли Т и D сближаются и оказываются скрепленными друг с другом посредством образования дополнительных связей между основаниями. Непосредственное участие в таких связях играют полуконсервативные и консервативные остатки. Одним из таких остатков в транспортной РНК-Leu является гуанин в позиции 52 (функциональная группа, которая присоединяется к пуриновому кольцу, в

данном случае, =O). При замене гуанина на аденин (функциональная группа, которая присоединяется к пуриновому кольцу, в этом случае, - NH₂) происходит нарушение третичной структуры транспортной РНК, что ведет к ее нефункциональности. В результате менее интенсивно начинают формироваться комплексы транспортной РНК-Leu и, как следствие, снижается вероятность правильного включения лейцина в полипептидные цепи [83, 87, 89, 94, 98, 99, 100-104, 108-115, 124, 125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530]. Следствием наличия порогового уровня гетероплазмии мутации m.12315G>A, по всей видимости, является дисфункция определенного количества транспортных РНК-Leu, ведущая к снижению количества синтезированных на рибосомах белковых цепей ферментов дыхательной цепи, результатом чего может быть снижение уровня энергии в клетках [83, 87, 89, 94, 98, 99, 100-104, 108-115, 124, 125, 446, 463, 493-496, 500, 502, 504-506, 530].

Мутация m.13513G>A ведет к замене аспарагиновой кислоты на аспарагин в позиции 393 пятой белковой субъединицы NADH-дегидрогеназы [83, 87, 89, 94, 98, 99, 102-105, 107, 109, 111-115, 124,125, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. Функция данной области белковой цепи заключается в переносе в дыхательном комплексе 1 электрона с NADH на убихинон. При замене аспарагиновой кислоты, имеющей дополнительную кислотную группу, несущую отрицательный заряд, на аспарагин - аминокислоту, в которой отсутствует дополнительный заряд, из-за двух радикалов, компенсирующих заряды друг друга, в области "Oxidored_q1" происходит изменение уровня заряда. По всей вероятности, данное явление приводит к увеличению эффективности переноса электронов с NADH на убихинон [83, 87, 89, 94, 98, 99, 102-105, 107, 109, 111-115, 124,125, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. Возможно, более продуктивно начинает функционировать комплекс 1 дыхательной цепи и растет продукция энергии. Обращает на себя внимание то, что при достижении порогового уровня гетероплазмии m.13513G>A, равного 65%, данная мутация начинает проявлять защитный эффект, т.к. у индивидов с таким уровнем гетероплазмии этой однонуклеотидной замены отсутствуют

атеросклеротические поражения сонных артерий [83, 87, 89, 94, 98, 99, 102-105, 107, 109, 111-115, 124, 125, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. В то же время по отношению к утолщению интимо-медиального слоя сонных артерий защитный эффект m.13513G>A начинает проявляться уже на уровне 34% [83, 87, 89, 94, 98, 99, 102-105, 107, 109, 111-115, 124, 125, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. Это позволяет предположить, что аллель 13513A включается в физиологические механизмы, препятствующие утолщению ИМС, когда мутантных копий митохондриального генома будет более трети. В то же время образованию модифицированных липопротеидов, играющих ключевую роль в формировании атеросклеротических бляшек в интиме артерий, мутация m.13513G>A, по всей видимости, может препятствовать, только когда процент гетероплазмии аллеля 13513A составит более 65. Т.е. мутантных копий митохондриального генома в клетках будет более двух третей. Вероятно, данная мутация способствует усовершенствованию и стабилизации NADH-дегидрогеназы, которая включается в механизмы защиты клеток от атеросклеротических поражений [83, 87, 89, 94, 98, 99, 102-105, 107, 109, 111-115, 124, 125, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530].

Однонуклеотидная замена m.14459G>A, принадлежащая гену шестой субъединицы NADH-дегидрогеназы, ведет к замене аланина на валин в 72-ой аминокислотной позиции наиболее консервативного региона шестой белковой цепи фермента [83, 87-89, 94, 98, 99, 102-105, 107, 109, 111-115, 124, 125, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506, 530]. Мутация приводит к дисфункции NADH-дегидрогеназы, что является, по-видимому, пусковым механизмом патогенетического процесса, приводящего к атеросклерозу [83, 87-89, 94, 98, 99, 102-105, 107, 109, 111-115, 124, 125, 446, 463, 493-497, 500, 502, 504-506].

При мутации m.14846G>A происходит замена глицин на серин в цитохроме В, являющемся частью третьего комплекса дыхательной цепи [83, 87-89, 94, 98, 99, 102-104, 106, 109, 111-116, 124, 125, 446, 463, 493-496, 498, 500, 502, 504-506, 530]. Благодаря данной замене в N-терминальном конце цитохрома В, отвечающем за заякоривание белка в мембране, создается дополнительный сайт

для фосфорилирования белковой цепи. По всей видимости, большое количество копий митохондриального генома, содержащих данную мутацию, препятствует образованию атеросклеротических поражений и увеличивает конкурентоспособность мутантных клеток [83, 87-89, 94, 98, 99, 102-104, 106, 109, 111-116, 124, 125, 446, 463, 493-496, 498, 500, 502, 504-506, 530].

m.15059G>A является нонсенс-мутацией. В результате данной мутации мтДНК происходит замена аминокислоты глицин в позиции 190 белковой цепи на стоп-кодон [13, 83, 87-89, 94, 98, 99, 102-104, 106, 109, 111-116, 124, 125, 446, 463, 493-496, 498, 500, 502, 504-506, 530]. Это вызывает прекращение синтеза белка, который, в результате этого, становится на 244 аминокислоты короче. Цитохром В входит в состав комплекса III дыхательной цепи. В функции данного комплекса входит перенос электронов на цитохром С. При этом четыре протона выходят в межмембранное пространство митохондрий. Результатом достижения порогового значения гетероплазмии по данной мутации является дисфункция цитохрома В, ведущая к дисфункции митохондрий [13, 83, 87-89, 94, 98, 99, 102-104, 106, 109, 111-116, 124, 125, 446, 463, 493-496, 498, 500, 502, 504-506, 530].

При исследовании типов атеросклеротических поражений аорт оказалось, что большинство их связано с мутациями m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A [13, 27, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 160, 446, 463, 482, 493-498, 500, 502, 505, 506, 530]. Это позволяет предположить, что одним из пусковых механизмов атерогенеза являются дефекты транспортных РНК-Leu (кодоны узнавания UUR и CUN), а также 1, 2 и 6 субъединиц NADH-дегидрогеназы и цитохрома В [13, 27, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 160, 446, 463, 482, 493-498, 500, 502, 505, 506, 530].

Следует подчеркнуть, что спектр мутаций при различных типах атеросклеротического поражения интимы аорты может несколько отличаться [89, 98, 104, 115, 116, 500, 502, 506]. Например, мутация m.1555A>G оказалась связана с отсутствием начального атеросклеротического поражения (жировых точек и жировых полос) и липофиброзных бляшек. В то же время мутация

m.14846G>A ассоциирована с отсутствием липофиброзных бляшек в интима артерий [89, 98, 104, 115, 116, 500, 502, 506]..

В фиброзных бляшках спектр мутаций значительно отличался от других типов атеросклеротических поражений. Однонуклеотидные замены m.5178C>A и m.3256C>T были связаны с фиброзными бляшками, а мутация m.12315G>A ассоциирована с отсутствием данного типа поражения [89, 98, 104, 115, 116, 500, 502, 506]. По-видимому, дефектные по мутации m.12315G>A транспортные РНК-Leu (кодон узнавания CUN) играют существенную роль в патогенетическом процессе возникновения и развития атеросклеротических поражений до тех пор, пока не начинается стадия фиброзной бляшки, где процент гетероплазии по данной мутации падает до такой степени, что в нормальной интима он оказывается выше, чем в данном типе атеросклеротического поражения. Уровень гетероплазии некоторых других мутаций митохондриального генома, по-видимому, в фиброзных бляшках снижается и перестает отличаться от данного параметра в нормальной интима аорт [89, 98, 104, 115, 116, 500, 502, 506].

Интересно, что шесть преобладающих в разных типах атеросклеротических поражений мутаций m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A оказались также ассоциированы с атеросклерозом как в суммарных гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорт, так и в суммарном атеросклеротическом поражении участков морфологически картированных аорт [13, 27, 83, 87-98, 100-102, 104-116, 160, 446, 463, 482, 493-498, 500, 502, 505, 506].

При исследовании клеток крови участников исследования, у которых наличие атеросклероза было определено с помощью ультрасонографии, оказалось, что преобладающей мутацией как в атеросклеротических бляшках, так и в утолщении интимо-медиального слоя сонных артерий является m.12315G>A [89, 99, 103, 115, 494, 504]. Однонуклеотидные замены m.13513G>A и m.14846G>A оказались связаны с отсутствием данных видов

поражений. Аналогичная ситуация характерна и для атеросклеротического поражения интимы аорт [89, 99, 103, 115, 494, 504]..

В то же время мутации m.652delG, m.3336T>C и m.14459G>A были ассоциированы с атеросклерозом в бляшках как аорт, так и сонных артерий. Это наводит на мысль, что мутации в генах субъединицы 12S рибосомальной РНК, 1 и 6 субъединиц NADH-дегидрогеназы могут иметь отношение к атерогенезу [89, 99, 103, 115, 494, 504]..

Обращает на себя внимание мутация m.15059G>A, преобладающая при утолщении интимо-медиального слоя сонных артерий. Возможно, данная замена гуанина на аденин в позиции 15059 гена цитохрома В играет существенную роль в патогенетическом механизме утолщения сосудистой стенки артерий [89, 99, 103, 115, 494, 504]..

Мутации m.13513G>A и m.14846G>A были связаны как с отсутствием суммарного атеросклеротического поражения интимы аорт, так и с отсутствием атеросклеротических бляшек и утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий [89, 99, 103, 115, 494, 504].. Можно предположить, что данные мутации генов пятой субъединицы NADH-дегидрогеназы и цитохрома В (соответственно) приводят к стабилизации ферментов дыхательной цепи митохондрий, что, в конечном итоге, приводит к нормализации физиологических процессов в митохондриях и клетках интимы сосудов. Вполне вероятно, что данные изменения могут препятствовать возникновению атеросклероза [89, 99, 103, 115, 494, 504]..

В целях последующей молекулярно-генетической диагностики атеросклероза в клетках крови участников исследования была проведена детекция порогового значения процента гетероплазии каждой мутации, после которого у индивида начинались образование атеросклеротических бляшек или утолщение интимо-медиального слоя в сонных артериях [89, 99, 103, 115, 483, 494, 504, 530]. Для мутаций, ассоциированных с отсутствием АСБ СА или утолщения ИМС СА, при достижении порогового уровня гетероплазии в сонных артериях человека переставали выявляться данные виды

атеросклеротических поражений [89, 99, 103, 115, 483, 494, 504, 530]. Следует подчеркнуть, что выбор оптимального порогового значения базировался на одновременной максимизации значений чувствительности и специфичности [89, 99, 103, 115, 483, 494, 504]. Выявленное хорошее совпадение порогового значения процента гетероплазии исследованных 11 мутаций митохондриального генома для атеросклеротических бляшек и утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий может свидетельствовать об общих патогенетических механизмах образования данных поражений интимы сонных артерий человека [89, 99, 103, 115, 483, 494, 504, 530].

Согласно результатам, полученным в настоящей работе, накопление митохондриальных дефектов происходит с возрастом, т.к. между старением индивида и увеличением уровня гетероплазии мутаций имеется высокодостоверная связь для мутаций m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A [89, 501, 503]. Эти данные свидетельствуют о накоплении мутантных копий митохондриального генома в течение жизни человека [89, 501, 503]. В то же время значимая отрицательная корреляция с возрастом порогового уровня гетероплазии однонуклеотидных замен m.13513G>A и m.14846G>A (ассоциированных с отсутствием атеросклеротических поражений в аортах) говорит о том, что генетическая защита против атеросклероза (а, возможно, и от других патологий) с увеличением возраста индивида ослабевает [89, 501, 503].

Полагаем, что накопление мутантных копий митохондриальной ДНК с возрастом может быть вызвано несколькими причинами:

- 1) Соматической природой данных мутаций, возникающих в наиболее мутабельных регионах мтДНК. При этом высокая мутабельность митохондриального генома может возникать из-за высокой концентрации АФК (активных форм кислорода) в митохондрии, отсутствия в митохондриальной ДНК белков-гистонов и недостаточно эффективной репаративной системы [89, 501, 503].

2) Повышенной пролиферацией мутантных митохондрий и клеток, имеющих наследственную мутацию мтДНК [89, 501, 503].

3) Совокупностью вышеуказанных причин [89, 501, 503].

Согласно данным ряда научных групп, для того, чтобы генетические изменения перешли в фенотипические, необходимо, чтобы уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома превысил определенный порог [89, 412, 483, 517]. При этом, пока такой порог еще не достигнут, дыхательная цепь митохондрий продолжает нормально функционировать [89, 444]. Высокий уровень гетероплазмии некоторых мутаций митохондриального генома может привести к частичной или полной дисфункции ферментов дыхательной цепи, из-за дефектов, возникающих в их белковых субъединицах. Это может быть причиной дисфункции митохондрий и клеток, из-за которой развиваются патологии в тканях и органах человека [89, 114].

Мутации митохондриального генома могут повлиять на формирование атеросклеротических поражений, в связи со снижением эффективности функционирования дыхательной цепи, если они произошли в макрофагах [89]. Если уровень АТФ, необходимой для метаболизма клетки, оказывается недостаточным, в макрофагах, находящихся в области формирования атеросклеротических бляшек, уменьшается синтез липаз, перерабатывающих модифицированные липопротеиды, которые узнаются скэвенджер-рецепторами, в лизосомах. При этом может произойти накопление клетками избытка эфиров холестерина и усугубление патологического процесса. Макрофаги превращаются в пенистые клетки. В мутантных макрофагах может произойти не только падение уровня выработки энергии, но и накопление дефектных продуктов синтеза, утилизация которых также требует расхода энергии [89].

Совокупная мутационная нагрузка по исследованным одиннадцати митохондриальным мутациям ассоциирована более чем с 84% случаев возникновения атеросклеротических бляшек и утолщения интимо-медиального

слоя сонных артерий, что говорит о высокой диагностической ценности комплексного анализа данных мутаций при атеросклерозе [89, 502, 504].

В настоящей работе была выявлена ассоциация мутаций митохондриального генома с инфарктом миокарда, болью за грудиной и гипертрофией левого желудочка [89]. Обращает на себя внимание связь мутации m.5178C>A (ген MT-ND2) со всеми тремя представленными факторами риска атеросклероза и ассоциация m.12315G>A (ген MT-TL2) с отсутствием двух из них (ИМ и ГЛЖ) [89]. Можно предположить, что однонуклеотидная замена m.5178C>A, приводящая к дефекту NADH-дегидрогеназы, усугубляет не только течение атеросклероза, но и развитие таких патологий, как ИМ, БЗГ и ГЛЖ. В то же время m.12315G>A, повреждающая тРНК-Leu и ассоциированная с большинством атеросклеротических поражений, имеет антипатологический эффект при инфаркте миокарда, боли за грудиной и гипертрофии левого желудочка [89]. Так как данная мутация отрицательно коррелирует с возникновением фиброзных бляшек в интиме аорты, можно предположить общность антипатологических механизмов при развитии ИМ, БЗГ, ГЛЖ и фиброзных бляшек [89].

Мутация m.14846G>A проявила антипатологический эффект не только при атеросклерозе, но и при инфаркте миокарда, что также может свидетельствовать о том, что данная мутация гена фермента дыхательной цепи цитохрома В включается в защитные физиологические механизмы при данных заболеваниях [89].

Как с болью за грудиной, так и с атеросклерозом связана однонуклеотидная замена m.14459G>A гена 6 субъединицы NADH-дегидрогеназы, что говорит об общности патогенетических механизмов этих болезней [89]. Однако отрицательная корреляция с БЗГ мутации m.15059G>A гена цитохрома В, ассоциированной с атеросклерозом, говорит о том, что данная мутация включена в патогенез атеросклероза, но не связана с БЗГ [89]. На различие патогенетических процессов возникновения БЗГ и ГЛЖ указывает

то, что мутация m.14459G>A связана болью за грудиной, но не ассоциирована с гипертрофией левого желудочка [89].

Молчащая мутация m.3336T>C, и, по всей видимости, сцепленный с ней гаплотип, связаны с отсутствием ГЛЖ, в то время, как данная мутация ассоциирована с атеросклерозом. Это может служить подтверждением различия патогенетических механизмов при гипертрофии левого желудочка и атеросклерозе [89].

Таким образом, выявленные общие для атеросклеротических поражений, ИМ, БЗГ и ГЛЖ мутации митохондриального генома могут служить доказательством общности патогенетических процессов при данных заболеваниях [89]. Например, общим пусковым механизмом для развития данных патологий может быть дефект фермента дыхательной цепи митохондрий [89]. В то же время мутации, выявленные при одних патологиях, и отсутствующие при других, показывают, дефекты каких ферментов или транспортных РНК могут направить патогенетический процесс в том или ином направлении [89].

Выявленные в нашем исследовании преобладающие при атеросклеротических поражениях сонных артерий гаплотипы, основанные значении порогового уровня гетероплазмии мутантных аллелей однонуклеотидных замен митохондриального генома m.1555A>G-m.5178C>A-m.13513G>A и m.652delG-m.12315G>A-m.3256C>T, вероятно, имеют наследственную природу [89]. Составляющие их мутации коррелируют как между собой, так и с атеросклерозом. В то же время подобное сочетание мутаций различных митохондриальных генов в одном гаплотипе может говорить о существовании определенных патогенетических механизмов их одновременного возникновения при соматическом мутировании, наличии в митохондриальном геноме «горячих точек», в которых мутации происходят с повышенной вероятностью [89].

Не только мутации и гаплотипы, но и популяционные гаплогруппы митохондриального генома оказались ассоциированными с атеросклерозом и

его факторами риска [89, 499]. Например, гаплогруппа U связана с атеросклеротическими поражениями, а гаплогруппы M и T ассоциированы с отсутствием атеросклероза [89, 499]. Кроме того, выявлена связь гаплогруппы U с факторами риска атеросклероза – гипертонией и гипертрофией левого желудочка [89, 499]. Это позволяет предположить, что совокупность полиморфных сайтов популяционной гаплогруппы U способствует возникновению атеросклероза и его факторов риска или «утяжеляет» течение данных патологий [89, 499]. В то же время, вполне возможно, что набор полиморфизмов, характерных для гаплогрупп M и T, препятствует возникновению атеросклеротических поражений или облегчает течение атеросклероза [89, 499].

Интересно, что популяционная гаплогруппа U оказалась ассоциирована как с атеросклерозом, так и с выявленными атерогенными мутациями m.652delG, m.12315G>A и m.15059G>A, что может свидетельствовать о том, что данные мутации могут иметь не только соматическую, но и наследственную природу, и сцеплены с данной гаплогруппой [89, 499]. В то же время можно предположить, что в копиях митохондриального генома, содержащих данную гаплогруппу, более легко происходит соматическое мутирование в позициях 652, 12315 и 15059 митохондриального генома человека [89, 499].

Обращает на себя внимание ассоциация антиатерогенной гаплогруппы T с мутациями m.13513G>A и m.14846G>A, отрицательно коррелировавшими с атеросклеротическими поражениями [89, 499]. Кроме того, антиатерогенная популяционная гаплогруппа M оказалась ассоциированной с однонуклеотидной заменой m.1555A>G, также отрицательно коррелировавшей с атеросклерозом [89, 499]. Это позволяет предположить, что данные мутации возникли соматически именно на гаплогруппах T и M, либо были наследственно на них закреплены [89, 499].

Исследования, посвященные установлению патогенетических механизмов, в которые вовлечены выявленные мутации, гаплотипы и гаплогруппы

митохондриального генома, их роли в атерогенезе на молекулярном уровне, будут, в дальнейшем, логическим продолжением настоящей работы и приоритетной задачей коллектива сотрудников лаборатории [89].

К сожалению, проведенное исследование имеет некоторые ограничения.

По данным литературы, существуют ядерные копии более 600 различных участков митохондриального генома, около сотни таких последовательностей включает копии генов [346, 583]. Была проведена проверка вероятности отжига праймеров на митохондриальных псевдогенах в составе ядерного генома, т.к. изначально последовательности праймеров для данной работы найдены в литературных источниках, где была описана ассоциация ряда патологий человека с митохондриальными мутациями. Согласно информации ресурса BLAST (NCBI) [306], каждый из исследованных ПЦР-фрагментов (за исключением двух: первого, включавшего мутации m.8362C>A и m.8363T>C, а также второго, содержащего мутации m.14459G>A, m.14482C>G/A, m.14484T>C и m.14487T>C) имеет от одной до пяти копий фрагментов в ядерном геноме. Отжиг использованных праймеров на ядерном геноме был теоретически возможен. В то же время параллельный митохондриальному синтез ПЦР-фрагментов с использованием матрицы ядерного генома мог всего лишь уменьшить значение процента гетероплазмии исследуемых мутаций, в связи с тем, что в копиях ядерного генома, как правило, содержится нормальный вариант нуклеиновой кислоты в исследованном локусе [22]. Вероятность того, что в ядро клетки была перенесена мутантная копия митохондриального генома, весьма незначительна. Скорее всего, мутация эволюционно произошла гораздо позднее, чем данная копия попала в ядерный геном [89].

В настоящее время в нашей лаборатории ведется исследование данной проблемы [89]. Для ПЦР-фрагментов митохондриального генома и гомологичных фрагментов ядерного генома были найдены рестрикционные сайты, которые имелись в ядерной последовательности, но отсутствовали во фрагменте митохондриальной хромосомы [89]. Контролем для данного

рестрикционного анализа параллельно для каждого амплификата служила рестрикция ферментами, имеющими сайты лишь для ПЦР-фрагмента митохондриального генома. Пилотный анализ показал отсутствие амплификатов ядерного генома [89]. Это говорит о том, что уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома измерялся корректно и без ошибок. Объяснить отсутствие комплементарности использованных в работе праймеров ядерным копиям митохондриального генома можно тем, что количество копий митохондриальных хромосом в клетках организма человека значительно больше, чем ядерных, в связи с тем, что каждая митохондрия имеет несколько копий митохондриального генома, а количество митохондрий в клетке варьирует от одной до нескольких сотен. Поэтому концентрации образца ДНК в ПЦР оказалось достаточно для прохождения реакции с целью наработки исследуемого митохондриального амплификата, но недостаточно – для ПЦР-фрагмента ядерного генома [89].

Исследования, посвященные установлению патогенетических механизмов, в которые вовлечены выявленные мутации, их роли в атерогенезе на молекулярном уровне, будут, в дальнейшем, логическим продолжением настоящей работы и приоритетной задачей коллектива сотрудников лаборатории [89].

Следует подчеркнуть, что при разработке подходов для генетической диагностики атеросклеротических поражений человека, при использовании небольшого количества маркеров, оказалось возможным объяснить 84% вариабельности атеросклеротических поражений [89, 502, 504]. Это значительно превышает диагностические возможности каждого традиционного фактора риска ССЗ.

Так как, согласно результатам настоящего исследования, митохондриальные мутации оказывают существенное влияние на возникновение и развитие атеросклеротических поражений, практическим выходом данной работы будет разработка молекулярно-генетического диагностического набора для ранней диагностики и оценки

предрасположенности к атеросклерозу [89]. В дальнейших исследованиях, с целью выявления дополнительных молекулярно-генетических маркеров, планируется поиск новых митохондриальных мутаций, которые ассоциированы с атеросклерозом [89]. Кроме того, планируется провести проспективные эпидемиологические исследования по оценке риска ССЗ, который обуславливают подобные мутации. Детализация патологических механизмов вовлечения мутаций митохондриального генома в процесс атерогенеза также будет являться одним из приоритетных направлений нашей работы [89].

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с появлением новых генетических технологий и диагностических методов возникла насущная потребность пересмотреть стратегию профилактики и лечения полигенных мультифакториальных заболеваний, что может дать для Российской Федерации значительный материальный эффект [89].

Настоящая работа имеет пионерский характер. Метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, который был разработан автором с коллегами на базе технологии пиросиквенса, может быть широко применен как для диагностики атеросклероза, так и для анализа уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома при различных патологиях, а также для исследования соматических мутаций в ядерном геноме [89].

Комплексный анализ широкого спектра мутаций митохондриального генома, проведенный в настоящей работе, позволил выбрать одиннадцать мутаций митохондриального генома, перспективных для применения в ранней диагностике и семейном анализе атеросклероза, а также оценке предрасположенности индивидов к атеросклерозу [89].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ТГ – триглицерид

ИМС СА – интимо-медиаальный слой сонных артерий

dTTP – тимидилтрифосфат

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

dGTP – гуанозилтрифосфат

ИМС – интимо-медиаальный слой

dATP – аденозилтрифосфат

pРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

dCTP – цитозилтрифосфат
Ala – аминокислота аланин
DHU – дигидроуридин
dNTP – дезоксирибонуклеотидилтрифосфат
Ile – аминокислота изолейцин
MQ – бидистиллированная вода высокой степени очистки
Gly – аминокислота глицин
TBE – трис-борат-ЭДТА буфер
Met – аминокислота метионин
Glu – аминокислота глутамин
КБС – коронарная болезнь сердца
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности
Leu – аминокислота лейцин
Ser – аминокислота серин
Val – аминокислота валин
ins – инсерция (нуклеотида при мутировании)
NADH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ИБС – ишемическая болезнь сердца
SNP – однонуклеотидная замена
ЛПОНП – липопротеиды очень низкой плотности
del – делеция (нуклеотида при мутировании)
АГ – артериальная гипертензия
SDS – додецилсульфат натрия
АТ – атеросклероз
БЗГ – боль за грудиной
АСБ – атеросклеротическая бляшка
ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка
ПЦР/ПДРФ – ПЦР с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов
АД – артериальное давление

ГК – гипертрофическая кардиомиопатия
ТИМС СА – толщина интимо-медиального слоя сонных артерий
АТФ – аденозинтрифосфат
АСБ СА – атеросклеротическая бляшка сонной артерии
СД2 – сахарный диабет второго типа
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ИМ – инфаркт миокарда
ЛПНП – липопротеиды низкой плотности
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
ЛЖ – левый желудочек (сердца)
ОХ – общий холестерин
СД1 – сахарный диабет первого типа
ЛФБ – липофиброзная бляшка
п.о. – пара оснований
п.н. – пара нуклеотидов
СА – сонные артерии
ФБ – фиброзная бляшка
ХС – холестерин
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
KSS – синдром Кернса-Сейра
MT-CYB – митохондриальный ген, кодирующий цитохром В
MT-ND1 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 1 NADH-дегидрогеназы
MT-ND2 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 2 NADH-дегидрогеназы
MT-ND3 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 3 NADH-дегидрогеназы
MT-ND4 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 4 NADH-дегидрогеназы

MT-ND4L – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 4L NADH-дегидрогеназы

MT-ND5 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 5 NADH-дегидрогеназы

MT-ND6 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 6 NADH-дегидрогеназы

MT-ATP5 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 5 АТФ-синтетазы

MT-ATP6 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 6 АТФ-синтетазы

MT-RNR1 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 12S рибосомальной РНК

MT-RNR2 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 16S рибосомальной РНК

MT-CO1 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 1 цитохром оксидазы

MT-CO2 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 2 цитохром оксидазы

MT-CO3 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 3 цитохром оксидазы

MT-TL1 – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Лейцин (кодон узнавания UUR)

MT-TL2 – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Лейцин (кодон узнавания CUN)

MT-TV – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Валин

MT-TI – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Изолейцин

MT-TW – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Триптофан

MT-TN – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Аспарагин

MT-TC – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Цистеин

MT-TK – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Лизин

MT-TH – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Гистидин

MT-TE – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Глутаминовая кислота

MT-TP – митохондриальный ген, кодирующий тРНК-Пролин

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Молекулярно-генетическая диагностика может помочь выявлению индивидов, предрасположенных к атеросклерозу. На основании результатов настоящей работы рекомендовано скринировать пациентов на 11 мутаций митохондриального генома, а именно 652delG, 652insG, A1555G, C3256T, T3336C, C5178A, G12315A, G13513A, G14459A, G14846A, G15059A [89].

В качестве дополнительного, уточняющего диагноз анализа рекомендуется проводить детекцию популяционных гаплогрупп U, M и T [89].

Рекомендованный алгоритм обследования может быть использован для определения предрасположенности людей к возникновению и развитию атеросклероза, его ранней диагностики и семейного анализа [89].

ВЫВОДЫ

1. Выявлена мозаичность распределения митохондриальных мутаций в интиме аорты человека: обнаружены отличия в уровне гетероплазии 11 мутаций для разных участков как нормальной, так и пораженной атеросклерозом морфологически картированной интимы аорт человека.
2. Суммарное атеросклеротическое поражение интимы аорт ассоциировано с мутациями митохондриального генома m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A, а мутация m.13513G>A достоверно чаще встречалась у условно здоровых участников исследования.

3. Для разных типов атеросклеротических поражений интимы аорт, таких как начальное поражение, липофиброзная и фиброзная бляшка, характерен различный набор мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом или связанных с отсутствием подобных поражений. Липофиброзные бляшки и начальное атеросклеротическое поражение интимы аорт связаны с мутациями m.3256C>T, m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.14459G>A и m.15059G>A. В то же время мутация m.1555A>G связана с отсутствием начального и суммарного атеросклеротических поражений, а мутация m.14846G>A – с отсутствием липофиброзных бляшек. С фиброзными бляшками ассоциированы m.5178C>A и m.3256C>T. Мутация m.12315G>A связана с отсутствием фиброзных бляшек в интимае аорты.

4. В атеросклеротических бляшках сонных артерий обнаружены четыре мутации, ассоциированные с атеросклерозом: m.652delG, m.3336T>C, m.12315G>A и m.14459G>A. Мутации m.13513G>A и m.14846G>A связаны с отсутствием атеросклеротических бляшек.

Мутации m.12315G>A и m.15059G>A ассоциированы с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий. Однонуклеотидные замены m.13513G>A и m.14846G>A связаны с отсутствием утолщения ИМС СА.

5. Генетическая предрасположенность к атеросклерозу определяется суммарной нагрузкой митохондриального генома, обусловленной сочетанием мутаций, ассоциированных с атеросклерозом и мутаций, связанных с отсутствием атеросклеротических поражений. Совокупная мутационная нагрузка по исследованным 11 митохондриальным мутациям связана как с атеросклеротическими бляшками, так и с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий.

6. Гаплотипы m.1555A>G-m.5178C>A-m.13513G>A и m.652delG-m.12315G>A-m.3256C>T ассоциированы с атеросклеротическими поражениями сонных артерий.

7.Гаплогруппа U связана с атеросклеротическими поражениями сонных артерий. Гаплогруппы M и T ассоциированы с отсутствием атеросклероза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Динамика атеросклеротического процесса у человека. // М.: Мед. , 1970.
2. Авцын А. П. Ведение в географическую патологию. // М. Мед. , 1972.
3. Анастеади В.Х., Нагорнев В.А. Морфогенез атеросклероза. // Кишинев: Штиинца, 1982.
4. Анастеади В.Х., Нагорнев В.А. Ультраструктурные основы атеросклероза артерий. // Кишинев: Штиинца, 1983.
5. Анастеади В.Х., Нагорнев В.А. О пато- и морфогенезе атеросклероза (клинико-экспериментальные аспекты). // Арх. пат. – 1984. – Т.46., – №3. – С.10-13.
6. Аничков Н.Н. О начальных стадиях развития атеросклероза артерий. // Современные проблемы кардиологии. М.: Мед. , 1960. – С.7-18.
7. Аничков Н.Н. Основные теоретические положения к дальнейшему изучению проблемы атеросклероза. // Атеросклероз. Л.: Мед. , 1965. – С.14-21.
8. Аничков Н.Н. Сосуды. В кн: Частная патологическая анатомия. // М.: Мед. , 1947. – С.262-557.
9. Аничков Н.Н. Цинзерлинг В.Д. Современное состояние проблемы атеросклероза. // Атеросклероз. М.: Мед. , 1953. – С.7-18.
10. Бабаев В.Р. Изменение фенотипа гладкомышечных клеток артерий человека при атеросклерозе: Автореферат дис. докт. мед. наук, Москва. – 1992.
11. Бабаев В.Р., Сухова Г.К., Бобрышев Ю.В. Сироткин В.Н., Тарарак Э.М. Моноцитарно-макрофагальная инфильтрация в участках ранних атеросклеротических поражений аорты человека. // Арх. пат. – 1991. – Т.10.– С.48-53.
12. Бабаев В.Р., Бобрышев Ю.В., Стенина О.И., Тарарак Э.М. Фенотипические варианты гладкомышечных клеток в атероматозных бляшках человеческой аорты. // Арх. пат. – 1990. – Т.52. – №5. – С.16-21.

13. Баринаева В.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Трубинов С.С., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Сазонова М.А. Анализ уровня гетероплазмии мутации митохондриального генома G15059A гена СУТВ в липофиброзных бляшках интимы аорты человека. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2015. – № 1 (18). – С.47-51.
14. Бобрышев Ю., Орехов А. Клеточные механизмы атеросклероза. Архитектоника поражений и роль дендритных клеток. // LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH, 2012. – 172 с. ISBN: 978-3-8465-0426-0
15. Бобрышев Ю.В., Карагодин В.П., Ковалевская Ж.И., Шапырина Е.В., Каргаполова Ю.М., Галактионова Д.Ю., Саламов В.И., Орехов А.Н. Пролиферация клеток при различных типах поражения сонных и коронарных артерий. // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – Т.3. – №1. – С.80-83.
16. Букринский М.И., Свиридов Д.Д., Карагодин В.П., Собенин И.А., Сазонова М.А., Коренная В.В., Орехова В.А., Иванова М.И., Мясоедова В.А., Мельниченко А.А., Савинкова И.Г., Орехов А.Н. Повреждение механизма обратного транспорта холестерина, вызванное вирусом иммунодефицита человека: роль ABCA1-зависимого пути. // Бюллетень московского общества испытателей природы, отдел биологический. – 2009. – Т.114. – Вып.3, Прил.1, Ч.3. – С.297-301.
17. Вихерт А.М., Жданов В.С. Атеросклероз при различных заболеваниях. // М.: Мед., 1976 – С.208-210.
18. Вихерт А.М., Жданов В.С. Роль возрастных и приспособительных изменений сосудистой стенки в атерогенезе в свете учения академика И.В. Давыдовского об атеросклерозе. // Арх. пат.– 1988. – Т.50. – №3. – С.8-16.
19. Вихерт А.М. Ритмические структуры аорты у детей и лиц молодого возраста. // Арх. пат. – 1987. – Т.5 – С.16-21.
20. Вихерт А.М., Розина В.Н. Морфогенез ранних долипидных стадий атеросклероза. // Арх. пат. – 1983. – Т.45. – №6. – С.3-12.

21. Вихерт А.М., Розина В.Н. Эндотелий артерий при атеросклерозе у человека. // Бюлл. ВКНЦ АМН СССР. – 1981. – Т.4. – №1. – С.9-14.
22. Газиев А.И., Шайхаев Г.О. Ядерно-митохондриальные псевдогены. // Молекулярная биология. – 2010. – Т.44. – №3. – С.405-417.
23. Денисенко А.Д., Виноградов А.Г., Нагорнев В.А. и др. Взаимодействие макрофагов с аутоиммунным комплексом липопротеид-антитело. // Иммунология. – 1989. – Т.2. – С.32-35.
24. Жданов В.С. Морфологические особенности развития и течения коронарного атеросклероза. // Кардиология. – 1989. – Т.11. – С.43-46.
25. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертонией и различными видами кардиомиопатии. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2012. – №3. – С.124-129.
26. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертонии и различных видов кардиомиопатии. // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – Т.3. – №1. – С.85-87.
27. Желанкин А.В., Сазонова М.А., Коробов Г.А., Хасанова З.Б., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Детекция замены тимина на цитозин в позиции 3336 митохондриального генома при атеросклеротических поражениях человека. // Современный мир, природа и человек. – 2011. – Т.2. – №1. – С.59-61.
28. Иванова М.М., Бородачев Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома. // Пат. физиол. и эксп. тер.. – 2012. – Т.3. – С.115-122.
29. Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Мутации митохондриального генома в патологии человека. // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – Т.1. – №4. – С.164-167.

30. Иванова М.М., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Генетические детерминанты атеросклероза, локализованные в первой хромосоме человека. //Актуальные проблемы современной науки. – 2012. – Т.1. – №2. – С.47-53.
31. Иванова М.М., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Некоторые мутации митохондриального генома человека, ассоциированные с цитопатиями. // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2012. – Т.13. – Ст.26. – С.309-330.
32. Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий. // Соросовский образовательный журнал – 2000. – Т.6, №1. – С.34.
33. Иоффе В.И., Зубжицкий Ю.Н., Нагорнев В.А., Климов А.Н. Иммунологическое исследование экспериментального атеросклероза. // Бюлл. exper. биол. – 1973. – Т.6. – С.72-76.
34. Климов А.Н. Причины и условия развития атеросклероза.// В кн.: Биохимические основы патогенеза атеросклероза. Л., 1980. – С.3-45.
35. Климов А.Н. Предпосылки аутоиммунной теории патогенеза атеросклероза. // Иммунореактивность и атеросклероз. Л.: Мед. , 1986.
36. Климов А.Н. Иммунореактивность и атеросклероз.// Л.: Мед. , 1986 - С.192.
37. Климов А.Н. Аутоиммунная теория атерогенеза и концепция модифицированных липопротеидов. // Вестн. АМН СССР. – 1990. – Т.11.– С.30-36.
38. Климов А.Н., Нагорнев В.А. Методические аспекты этиологии и патогенеза атеросклероза. // Кардиология. – 1993. – Т.3. – С.5-10.
39. Климов А.Н., Нагорнев В.А., Денисенко А.Д. Изучение иммунологических механизмов развития атеросклероза и новые методы его диагностики и лечения. // Мед. академ. ж. – Т.5. – №2. – С.18-32.
40. Климов А.Н., Нагорнев В.А., Денисенко А.Д., Константинов В.О. Аутоиммунная теория патогенеза атеросклероза и новые пути его лечения. // Вестник РАМН. – 2003. – Т.12. – С.29-34.

41. Климов А.В., Никуличева Н.Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. // Л.: Мед. , 1984.
42. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. // СПб.: Питер. Ком. , 1999.
43. Косицкий Г.И. (ред.) Превентивная кардиология. // Москва: Медицина, 1987. – С.239-316.
44. Коробов Г.А., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Регуляторное действие интерлейкинов при атеросклерозе. // Актуальные проблемы современной науки. – 2012. – Т.1. – №2. – С.29-31.
45. Косогорова С.А., Сазонова М.А., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Коробов Г.А., Собенин И.А. Анализ гетероплазмии митохондриальной мутации С5178А гена субъединицы 2 NADH дегидрогеназы в гомогенатах пораженной интимы аорты. // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2012. – Т.13. – Ст.75. – С.895-899.
46. Ланкин В.З., Закирова А.Н., Касаткина Л.В., Котелевцева Н.В., Титов В.Н. Перекиси липидов и атеросклероз. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови больных ишемической болезнью сердца. // Кардиология. – 1980. – №7. – С.69-72.
47. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю.. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека. // Кардиологический вестник. – 2012. – Т.7 (19). – №1. – С.57-61.
48. 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. – С.56-61.
49. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А.. Ассоциация точковых мутаций ядерного и митохондриального геномов человека с ишемической болезнью сердца. // Пат.физиол. и эксп. тер. – 2012 – №2. – С.51-56.

50. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца. // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – Т.3. – №1. – С.92-96.
51. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А., Собенин И.А., Орехов А.Н. Ядерные мутации, вызывающие развитие инфаркта миокарда у человека. // Актуальные проблемы современной науки. – 2012. – Т.1. – №2. – С.36-39.
52. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Ассоциация мутаций ядерного генома с развитием инфаркта миокарда. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2013. – №2. – С.56-61.
53. Мясоедова В.А. Гендерные различия в развитии субклинического атеросклероза при начальных проявлениях недостаточности мозгового кровообращения: Автореф. дис. канд. мед. наук. - Москва, 2011.– 24 с.
54. Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Орехова В.А., Собенин И.А., Мухамедова Н.М., Мартиросян Д.М., Карагодин В.П., Орехов А.Н. Изучение толщины интимо-медиального слоя сонных артерий (ТИМ) как показателя естественного течения атеросклероза в московской популяции.// Пат/физиол/ и эксп/ тер. – 2012. – № 3. – С.104-108.
55. Мясников А.Л. Гипертоническая болезнь и атеросклероз. // М.: Медицина. – 1965.
56. Нагорнев В.А. Атерогенез и иммунное воспаление. // Бюл. exper. биол. – 1996. – Т.7. – С.4-6.
57. Нагорнев В.А. Кинетика клеточных элементов сосудистой стенки при атеросклерозе. // Арх. пат.– 1988. – Т.10. – С.89-95.
58. Нагорнев В.А. Кинетика клеток сосудистой стенки и атерогенез. // Арх. пат.– 1998. – Т.1. – С.39-43.
59. Нагорнев В.А. Методология в изучении проблемы атеросклероза. // Мед. акад. ж.– 2005. – Т.5. – №3. – С.121-133.
60. Нагорнев В.А. Патогенез атеросклероза. // СПб.: ЗАО Хромис. – 2006.

61. Нагорнев В.А., Анестиади В.Х., Зота Е.Г. Атерогенез. // Кишинев – СПб, 2001. – 330 с.
62. Нагорнев В.А., Бобрышев Ю.В, Ивановский Ю.В., Богачев Ю.В. Роль моноцитов-макрофагов в атерогенезе. // Арх. пат. – 1991. – Т.53. – №3. – С.23-29.
63. Нагорнев В.А., Бобрышев Ю.В., Ивановский Ю.В., Кузнецов А.С. Роль моноцитов в развитии атеросклеротических поражений аорты у кроликов. // Арх. пат. – 1983. – Т.45. – №6. – С.19-26.
64. Нагорнев В.А., Бобрышев Ю.В., Попов А.В., Виноградов А.Г. Транспорт бета-липопротеидов через эндотелий при экспериментальной гиперхолестеринемии (электронно-радиоавтографическое исследование). // Арх. пат. – 1982. – Т.44. – №1. – С.10-17.
65. Нагорнев В.А., Восканьяни А.Н. Атерогенез как иммуновоспалительный процесс. // Вестник РАМН. – 2004. – Т.7. – С.3-11.
66. Нагорнев В.А., Восканьянц А.Н., Виноградов А.Г. и др. // Цитотоксический эффект липопротеидов низкой плотности. // Бюлл. exper. биол. – 2003. – Т.135. – №1. – С.107-109.
67. Нагорнев В.А., Журавлева Т.Б., Бобрышев Ю.В. Структурно-функциональная характеристика внутренней поверхности коронарных артерий сердца человека при атеросклерозе. // Арх. пат. – 1989. – Т.51.– С.15-23.
68. Нагорнев В.А., Ивановский Ю.В, Бобрышев Ю.В. и др. Современные представления о морфогенезе атеросклероза и развитие идей Н.Н. Аничкова. // Актуальные проблемы патогенеза атеросклероза. Л., 1985. – С.3-25.
69. Нагорнев В.А., Зота Е.Г. Цитокины, иммунное воспаление и атеросклероз. // Успехи соврем, биологии. – 1996. – Т. II 6. – №3. – С.320-331.
70. Нагорнев В.А., Кетлинский С.А. Клеточно-молекулярные механизмы становления и развития атерогенеза (СО40-СО40L-иммунорегуляторный сигнал). // Бюлл. exper. биол. – 1999. – Т.10. – С.364-371.

71. Нагорнев В.А., Мальцева С.В. Аутоиммунные и воспалительные механизмы развития атеросклероза. // Арх. пат. – 2005. – Т.5. – С.6-15.
72. Нагорнев В.А., Мальцева С.В. Роль инфекции в развитии иммунного воспаления и патогенезе атеросклероза. // Арх. пат. – 2000. – Т.6. – С.53-59.
73. Нагорнев В.А., Мальцева С.В., Восканьяни А.Н. Эволюция взглядов на роль макрофагов в атерогенезе от Н.Н. Аничкова до наших дней. // Арх. пат. – 2003. – Т.65. – №2. – С.8-12.
74. Нагорнев В.А., Мальцева С.В., Пигаревский П.В и др.//Роль *Chlamydia pneumoniae* в патогенезе атеросклероза. // Мед. акад. ж. – 2002. – Т.2. – №3. – С.18-28.
75. Нагорнев В.А., Мальцева С.В., Селиверстова В.Г. и др. *Chlamydia pneumoniae* как патогенетический фактор риска в развитии атеросклероза и его осложнений. // Арх. пат. – 2004. – Т.66. – №2. – С.52-59.
76. Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., Восканьянц А.Н., Яковлева О.А. Современные взгляды на проблему патогенеза атеросклероза с позиций инфекционной патологии. // Вестник РАМН. – 2002. – Т.12.– С.9-15.
77. Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., Огурцов Р.Г., Денисенко А.Д. Атеросклероз и система иммунитета. // Арх. пат. – 1985. – Т.47. – №4. – С.15-22.
78. Нагорнев В.А., Попов А.В, Плесков В.М, Бобрышев Ю.В. Ультраструктурные особенности трансформации макрофагов пенистые клетки в опытах *in vitro*. // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 1985. – Т.99. – №5. – С.617-619.
79. Нагорнев В.А., Яковлева О.А., Рабинович В С. Атерогенез и воспаление. // Мед. акад. ж. – 2001. – Т.1. – №1. – С.139-150.
80. Орехов А.Н. Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия. // Palmarium Academic Publishing GmbH, 2013. - 536 с. ISBN: 978-3-659-98213-2.

81. Орехов А.Н., Тертов В.В., Собенин И.А. Модифицированные липопротеиды и атеросклероз. Обнаружение, характеристика, механизмы модификации, атерогенность. // LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH, 2012. – 295 с. ISBN: 978-3-8433-8798-9.
82. Попов А.В. Превращения плазменных липопротеидов в артериальной стенке: Автореферат дис. докт. мед наук. – Л., 1983.
83. Постнов А.Ю., Сазонова М.А., Собенин И.А. Прямая количественная оценка аллеля митохондриального генома, первые результаты: ассоциация с атеросклерозом. // Молекулярная диагностика-2010: Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва. – 2010. – Т. III. – С.109-112.
84. Рыжкова А.И., Карагодин В.П., Сухоруков В.Н., Сазонова М.А., Орехов А.Н. Десалирированные липопротеины низкой плотности в крови человека.// Клиническая медицина. – 2017. – Т. 95. – № 3. – С.216-221.
85. Рыжкова А.И., Иванова Е.А., Сухоруков В.Н., Карагодин В.П., Сазонова М.А., Орехов А.Н. Электроотрицательные липопротеиды низкой плотности. // Патогенез. - 2016. –Т.14. – №3. – С.11-16.
86. Руденская Г.Е., Захарова Е.Ю., Адарчева Л.С., Михайлова Е.Н., Карлова И.З. Наследственная атрофия зрительных нервов Лебера: неврологические и другие внеглазные проявления. // Журнал неврологии и психиатрии. – 2004. – Т.2. – №40.
87. Сазонова М.А., Андрианова И.В., Будников Е.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома. // XV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докладов (Москва. 14-18 апреля 2008). – Москва, 2008. – С.414.
88. Сазонова М.А., Баринаева В.А., Синёв В.В., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Хасанова З.Б., Егорова Л.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Детекция уровня гетероплазии мутации митохондриального генома

- m.14459G>A в гомогенатах интимы аорты человека. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2013. – Т.1. – С.40-44.
89. 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
90. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М. Уровень гетероплазии митохондриальной мутации C5178A в тотальных гомогенатах пораженной атеросклерозом интимы аорты. // Вестн. урал. мед. акад. науки. – 2012. – Т.2. – №39. – С.73-74.
91. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М., Митрофанов К.Ю., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Анализ мутации митохондриального генома A1555G при атеросклерозе интимы аорты человека. // Современный мир, природа и человек. – 2011. – Т.2. – №1. – С.67-69.
92. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М., Орехов А.Н., Постнов А.Ю. Анализ митохондриальной мутации A1555G в тотальных гомогенатах атеросклеротических поражений. // Вестн. урал. мед. акад. науки. – 2012. – Т.2. – №39. – С.72-73.
93. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Коробов Г.А., Иванова М.М., Постнов А.Ю., Собенин И.А. Мутации митохондриального гена 12S рРНК при атеросклерозе. // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине. – 2011. – № 2. – С.283-284.
94. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома. // Фундаментальные науки и практика. – 2010. – Т.1. – №2. – С.19-21.

95. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Ассоциация мутации митохондриального генома 652insG с атеросклеротическими поражениями человека. // *Фундаментальные науки и практика.* – 2010. – Т.1. – №4. – С.168-171.
96. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Коробов Г.А., Мясоедова В.А., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Детекция митохондриальной делеции гуанина в позиции 652 при атеросклеротических поражениях человека. // *Проблемы и перспективы современной науки.* – 2011. – Т.3. – №1. – С.105-107.
97. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Детекция мутации митохондриального генома человека 652insG при атеросклеротических поражениях сосудов человека. // *Молекулярная диагностика-2010: Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием.* Москва. – 2010. – Том V. – С.109-112.
98. Сазонова М.А., Митрофанов К.Ю., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Постнов А.Ю., Бобрышев Ю.В., Орехов А.Н., Собенин И.А. Морфологические и генетические изменения митохондрий в атеросклеротических поражениях аорты человека. // *Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2017».* – 2017. – Т.2. – Раздел 14. – С.81-82.
99. Сазонова М.А., Митрофанов К.Ю., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Постнов А.Ю., Бобрышев Ю.В., Орехов А.Н., Собенин И.А. Электронно-микроскопические и молекулярно-генетические исследования митохондрий лейкоцитов пациентов с атеросклерозом. // *Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным*

- участием «Молекулярная диагностика-2017». – 2017. – Т.2. – Раздел 14. – С.102-103.
100. Сазонова М.А., Косогорова С.А., Синёв В.В., Баринова В.А., Хасанова З.Б., Бобрышев Ю.В., Собенин И.А.. Анализ гетероплазии митохондриальной мутации G12315A гена в гомогенатах пораженной интимы аорты. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2013. – Т.4 (13). – С.46-49.
101. Сазонова М.А. , Синёв В.В., Никитина Н.А., Бобрышев Ю.В. , Постнов А.Ю. , Орехов А.Н., Собенин И.А. Ассоциация мутации митохондриального генома G12315A с суммарными гомогенатами атеросклеротического поражения интимы аорты человека. // Международный научно-исследовательский журнал. - 2014.- №1 (20), Часть 1. - С.18-21.
102. Сазонова М.А. , Синёв В.В. , Собенин И.А. , Постнов А.Ю., Бобрышев Ю.В. , Орехов А.Н.. Митохондриальные мутации, ассоциированные с атеросклерозом магистральных сосудов человека. // Стратегические вопросы мировой науки. Т.28. Сборник статей Десятой Международной научно-практической конференции «Стратегические вопросы мировой науки», 7.02.-15.02. 2014, Перемышль, Польша. - Издательство Sp. z o.o. “Nauka I studia”, Перемышль, Польша, 2014, стр.68-69.
103. Сазонова М.А., Синёв В.В., Баринова В.А., Рыжкова А.И., Чичёва М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Трубинов С.С., Хасанова З.Б., Никитина Н.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Бобрышев Ю.В., Орехов А.Н. Ультраструктурный анализ характеристик лейкоцитов при атеросклерозе.//Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время.// Сборник научных трудов Всероссийской конференции, посвященной 155-летию кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова «Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время», 18.04.2014, Санкт-Петербург, Россия. Санкт-Петербург. – Издательство ВМедА. – 2014. – С.206-208.

104. Сазонова М.А., Синёв В.В., Баринова В.А., Рыжкова А.И., Чичёва М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Трубинов С.С., Хасанова З.Б., Никитина Н.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Бобрышев Ю.В., Орехов А.Н. Электронномикроскопический анализ митохондрий в атеросклеротических поражениях интимы аорты человека. // Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время. Сборник научных трудов Всероссийской конференции, посвященной 155-летию кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова «Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время», 18.04.2014, Санкт-Петербург, Россия. Санкт-Петербург. - Издательство ВМедА. – 2014. – С.208-211.
105. Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Желанкин А.В., Иванова М.М., Митрофанов К.Ю., Собенин И.А., Постнов А.Ю.. Ассоциация мутаций митохондриальных генов субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH-дегидрогеназы с липофиброзными бляшками аорты человека. // Кардиологический вестник. – 2013. – Т.8 (20). – №1. – С.32-35.
106. Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Постнов А.Ю., Собенин И.А.. Детекция митохондриальных мутаций генов цитохромов В и С в липофиброзных бляшках интимы аорты человека. // Пат. физиол. и эксп. тер.. – 2012. – №4. – С.62-66.
107. Сазонова М.А., Синёв В.В., Чичёва М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.. Анализ гетероплазмии некоторых генов субъединиц NADH дегидрогеназы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорты. // Пат. физиол. и эксп. тер.. – 2012. – № 4. – С.71-74.
108. Сазонова М.А., Синёв В.В., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Орехов А.Н., Собенин И.А.. Ассоциация гетероплазмии мутаций митохондриальных генов РНК с гомогенатами пораженной атеросклерозом интимы аорты. // Пат. физиол. и эксп. тер.. – 2012. – №4. – С.67-70.

109. Сазонова М.А., Синёв В.В. , Постнов А.Ю., Бобрышев Ю.В., Собенин И.А., Орехов А.Н. Детекция мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках человека.// Перспективные научные исследования-2014. Т.38. Биология. Сборник статей десятой научно-практической конференции "Перспективные научные исследования-2014", 17-25.02.2014, София, Болгария. София, Издательство "Бял ГРАД-БГ" ООД. – 2014. – С.84-91.
110. Сазонова М.А. , Синёв В.В., Никитина Н.А., Бобрышев Ю.В. , Постнов А.Ю. , Орехов А.Н., Собенин И.А. Ассоциация мутации митохондриального генома G12315A с суммарными гомогенатами атеросклеротического поражения интимы аорты человека // Международный научно-исследовательский журнал. – 2014. – №1 (20), Часть 1. – С.18-21.
111. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2011. – №4. – С.81-84.
112. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А. Новый оригинальный метод количественного определения уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома.// В книге: Вопросы неотложной кардиологии 2014: от науки к практике Сборник тезисов VII Всероссийского форума. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Российский Кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ; Общество специалистов по неотложной кардиологии; Российское медицинское общество по артериальной гипертензии. – 2014. – С. 49-50.
113. Сазонова М.А., Синёв В.В., Баринаева В.А., Рыжкова А.И., Трубинов С.С., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Собенин И.А. Анализ уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома в участках морфологически картированной стенки аорты.// В книге: Вопросы неотложной кардиологии 2014: от науки к практике Сборник тезисов VII Всероссийского форума. Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2014. – С. 49-50.

- Федерации. Российский Кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения РФ; Общество специалистов по неотложной кардиологии; Российское медицинское общество по артериальной гипертензии. – 2014. – С. 50.
114. Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома с липофиброзными бляшками интимы аорты человека. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2015 – №1. – С.17-32.
115. Сазонова М.А., Митрофанов К.Ю., Бобрышев Ю.В., Ревин В.В., Зелиный Р.И., Орехов А.Н. Электронномикроскопическое исследование митохондрий в атеросклеротических поражениях интимы аорты и в лейкоцитах человека при атеросклерозе.// Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке. Материалы всеросс. науч. конф. с междунар. участием. МГУ им. Н.П. Огарёва. 2015. Издательство: Типография ООО «Референт».
116. Сазонова М.А., Синёв В.В., Баринова В.А., Рыжкова А.И., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н. Мозаичность интимы аорты по митохондриальным мутациям G15059A и G14846A гена цитохрома В при атеросклеротических поражениях у человека.// Патогенез. – 2014. – Т.12. – № 2. – С.51-57.
117. Саркисов Д.С., Колокольчикова Е.Г, Варава Б.Н., Принцева О.Ю., Тюрин А.В. К вопросу о морфогенезе утолщения интимы, наблюдаемых при неспецифическом аортоартериите. // Бюлл. exper. биол. мед. – 1986. – Т.8. – С.233-235.
118. Саркисов Д.С., Пожариский К.М., Аничков Н.М.. Н.Н. Аничков. // М.: Мед. , 1989. – 81с.
119. Синёв В.В., Сазонова М.А., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Изучение гетероплазмии мутации митохондриального генома A1555G в гомогенатах пораженной атеросклерозом интимы аорты. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2013. – №3. – С.45-48.

120. Синёв В.В., Чичёва М.М., Баринова В.А., Рыжкова А.И., Зелиный Р.И., Карагодин В.П., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н., Сазонова М.А. Уровень гетероплазмии некоторых мутаций гена МТ-СУВ у женщин с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий. // Генетика. – 2016. – Т.52. – №8. – С.951-958.
121. Собенин И.А., Мясоедова В.А., Сазонова М.А., Кириченко Т.В., Чупракова О.В., Кожевникова Ю.А., Орехова В.А., Рудимов Е.Г., Орехова Е.А., Савинкова И.Г., Неробов П.Л., Орехов А.Н. Разработка метода комплексной оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений на основе анализа генотипа и фенотипа. // Сборник тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». (Москва, 25-27 ноября 2009 г.). – Москва, 2009. – С.134-135.
122. Собенин И., Орехов А. Принципы патогенетической терапии атеросклероза. Использование клеточных моделей. // LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH, 2012. – 254 с. ISBN: 978-3-8473-7691-0.
123. Собенин И.А., Сазонова М.А., Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Иванова М.М., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Полиморфизм 3256С/Т митохондриальной ДНК как маркер ишемической болезни сердца и атеросклероза. // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011 – Т.3. – №1. – С.108-110.
124. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Патентная заявка от 10.08.2010 «Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу», регистрационный № 2010133468.
125. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Бобрышев Ю.В., Романенко Е.Б., Орехов А.Н. Патентная заявка от 09.10.2012. «Способ генодиагностики сердечно-сосудистых заболеваний», регистрационный № 2012142947.

126. Струков А.И. Некоторые вопросы изучения об ишемической болезни сердца. // Кардиология. – 1973. – Т.10. – С.5-17.
127. Султаналиев А.Н., Жданов В.С. Липоидоз интимы коронарных артерий сердца у новорожденных и детей первого года жизни. // Арх. пат. – 1985. – Т.47. – №10. – С.36-42.
128. Сумароков А.Б., Панкратова В.Н., Лякишев А.А., Авдеева И.Ю. Изучение *Chlamydia pneumoniae* при атеросклерозе. // Клин. Мед. – 1999. – №10. – С.4-7.
129. Сухоруков В.С. Нарушения клеточной энергетики // Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РФ, 2002.
130. Чазов Е.И. Болезни сердца и сосудов. Руководство для врачей// М.: Медицина, 1992. 1 т. – 496 с., 2 т. – 512 с., 3 т. – 448 с., 4 т. – 448 с.
131. Abd El-Aziz T.A., Hussein Y.M., Mohamed R.H., Shalaby S.M. Renin-angiotensin system genes polymorphism in Egyptians with premature coronary artery disease. // Gene. – 2012. – V.498. – Issue 2. – P.270-275.
132. Agaton C., Unneberg P., Sievertzon M., Holmberg A., Ehn M., Larsson M., Odeberg J., Uhlén M., Lundeberg J. Gene expression analysis by signature pyrosequencing. // Gene. – 2002. – May 1; V.289. – Issue 1(2). – P.31-39.
133. Al-Fakhri N., Wilhelm J., Hahn M., Heidt M., Hehrlein F.W., Endisch A.M., Hupp T., Cherian S.M., Bobryshev Y.V., Lord R.S., Katz N. Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM-15 and ADAM-9 following upregulation of integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 in atherosclerosis. // J. Cell. Biochem. – 2003. – V.89. – Issue 4. – P.808-823.
134. Aleksova A, Di Nucci M, Gobbo M, Bevilacqua E, Pradella P, Salam K, Barbati G, De Luca A, Mascaretti L, Sinagra G. Factor-V HR2 haplotype and thromboembolic disease. // ActaCardiol. – 2015. – Dec.; V.70. – Issue 6. – P.707-711. doi:10.2143/AC.70.6.3120184.
135. Alizadeh Dehnavi R., de Roos A., Rabelink T.J., van Pelt J., Wensink M.J., Romijn J.A., Tamsma J.T. Elevated CRP levels are associated with increased

- carotid atherosclerosis independent of visceral obesity. // *Atherosclerosis*. – 2008. – V.200. – Issue 2. – P.417-423.
136. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Futcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – V.89. – P.10114-10118.
137. Amato M., Veglia F., de Faire U., Giral P., Rauramaa R., Smit A.J., Kurl S., Ravani A., Frigerio B., Sansaro D., Bonomi A., Tedesco C.C., Castelnuovo S., Mannarino E., Humphries S.E., Hamsten A., Tremoli E., Baldassarre D.; IMPROVE study group. Carotid plaque-thickness and common carotid IMT show additive value in cardiovascular risk prediction and reclassification. // *Atherosclerosis*. – 2017. – Aug.; 263. – P.412-419.
doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.023.
138. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. // *Nature*. – 1981. – V.290. – Issue 5806. – P.457-465.
139. Andreassi M.G. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. // *Mutat. Res*. – 2003. – Jan.; V.543. – Issue 1 – P.67-86. Review.
140. Andreassi M.G., Botto N., Colombo M.G., Biagini A., Clerico A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? // *Environ. Mol. Mutagen*. – 2000. – V.35. – Issue 4. – P.265-269. Review.
141. 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. – V.51. – Issue 5. – P.1444-1447.

142. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. // *Nat. Genet.* – 1999. – Oct.; V.23. – Issue 2. – P.147.
143. Arai H., Hiro T., Kimura T., Morimoto T., Miyauchi K., Nakagawa Y., Yamagishi M., Ozaki Y., Kimura K., Saito S., Yamaguchi T., Daida H., Matsuzaki M. More intensive lipid lowering is associated with regression of coronary atherosclerosis in diabetic patients with acute coronary syndrome-subanalysis of JAPAN-ACS study. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2010. – V.17. – Issue 10. – P.1096-1107.
144. Araujo V.P., Aguiar-Oliveira M.H., Oliveira J.L., Rocha H.M., Oliveira C.R., Rodrigues T.M., Nunes M.A., Britto I.M., Ximenes R., Barreto-Filho J.A., Meneguz-Moreno R.A., Pereira R.M., Valença E.H., Oliveira-Neto L.A., Vicente T.A., Blackford A., Salvatori R. Arrest of atherosclerosis progression after interruption of GH replacement in adults with congenital isolated GH deficiency. // *Eur. J. Endocrinol.* – 2012. – V.166. – Issue 6. – P.977-982.
145. Arbustini E., Fasani R., Morbini P., Diegoli M., Grasso M., Dal Bello B., Marangoni E., Banfi P., Banchieri N., Bellini O., Comi G., Narula J., Campana C., Gavazzi A., Danesino C., Viganò M. Coexistence of mitochondrial DNA and beta myosin heavy chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy with late congestive heart failure. // *Heart.* – 1998. – V.80. – Issue 6. – P.548-558.
146. Arvanitis D.A., Flouris G.A., Spandidos D.A. Genomic rearrangements on VCAM1, SELE, APEG1 and AIF1 loci in atherosclerosis. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2005. – V.9. – Issue 1. – P.153-159.
147. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. // *Science.* – 1997. – V.275. – Issue 5302. – P.964-967.

148. Aschoff L. Atherosclerosis, in lectures on pathology. // Hoeber. N.Y. – 1924. – P.131-153
149. Asif A.R., Hecker M., Cattaruzza M.. Disinhibition of SOD-2 expression to compensate for a genetically determined NO deficit in endothelial cells-brief report. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V.29. – Issue 11. – P.1890-1893.
150. Aviv A., Chen W., Gardner J.P., Kimura M, Brimacombe M., Cao X., Srinivasan S.R., Berenson G.S. Leukocyte telomere dynamics: longitudinal findings among young adults in the Bogalusa Heart Study. // *Am. J. Epidemiol.* – 2009. – V.169. – P.323-329.
151. Babaya N., Ikegami H., Fujisawa T., Nojima K., Itoi-Babaya M., Inoue K., Nakura J., Abe M., Yamamoto M., Jin J.J., Wu Z., Miki T., Fukuda M., Ogihara T. Association of I27L polymorphism of hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene with high-density lipoprotein cholesterol level. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – V.88. – Issue 6. – P.2548-2551.
152. Bacci S., Rizza S., Prudente S., Spoto B., Powers C., Facciorusso A., Pacilli A., Lauro D., Testa A., Zhang Y.Y., Di Stolfo G., Mallamaci F., Tripepi G., Xu R., Mangiacotti D., Aucella F., Lauro R., Gervino E.V., Hauser T.H., Copetti M., De Cosmo S., Pellegrini F., Zoccali C., Federici M., Doria A., Trischitta V. The ENPP1 Q121 variant predicts major cardiovascular events in high-risk individuals: evidence for interaction with obesity in diabetic patients. // *Diabetes.* – 2011. – V.60. – Issue 3. – P.1000-1007.
153. Bachen E.A., Muldoon M.F., Matthews K.A., Manuck S.B. Effects of hemoconcentration and sympathetic activation on serum lipid responses to brief mental stress. // *Psychosom. Med.* – 2002. – V.64. – Issue 4. – P.587-594.
154. Bai R.K., Wong L.J. Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach.//*Clin.Chem.* – 2004. – Jun.; V.50. – Issue 6. – P.996-1001.

155. Baldassarre D., Castelnovo S., Frigerio B., Amato M., Werba J.P., De Jong A., Ravani A.L., Tremoli E., Sirtori C.R. Effects of timing and extent of smoking, type of cigarettes, and concomitant risk factors on the association between smoking and subclinical atherosclerosis. // *Stroke*. – 2009. – V.40. – Issue 6. – P.1991-1998.
156. Ballinger S.W., Shoffner J.M., Hedaya E.V., Trounce I., Polak M.A., Koontz D.A., Wallace D.C. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. // *Nat. Genet.* – 1992. V.40. – Issue 1 (1). – P.11-15.
157. Bang O.Y., Saver J.L., Liebeskind D.S., Lee P.H., Sheen S.S., Yoon S.R., Yun S.W., Kim G.M., Chung C.S., Lee K.H., Ovbiagele B. Age-distinct predictors of symptomatic cervicocephalic atherosclerosis. // *Cerebrovasc. Dis.* – 2009. – V.27. – Issue 1. – P.13-21.
158. Bannwarth S., Procaccio V., Paquis-Flucklinger V. Surveyor Nuclease: A New Strategy for a Rapid Identification of Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations in Patients With Respiratory Chain Defects. // *Hum. Mutat.* – 2005. – V.25. – P.575-582.
159. 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; V.275. – Issue 6. – P.4177-4182.
160. Barinova V.A., Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Postnov A.Y., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Association of mitochondrial mutation T3336C with lipofibrous plaques in human aortic intima.// *Atherosclerosis*. – 2015. – V.241. – Issue 1. – e228-e229.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.1064>
161. Barlovic D.P., Soro-Paavonen A., Jandeleit-Dahm K.A. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2011. – V.121. – Issue 2 – P.43-55.

162. Barton M. Obesity and aging: determinants of endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. // *Pflugers. Arch.* – 2010. – V.460. – Issue 5. – P.825-837.
163. Baumgart D., Haude M., Gorge G., Liu F., Ge J., Grosse-Eggebrecht C., Erbel R., Heusch G. Augmented alpha-adrenergic constriction of atherosclerotic human coronary arteries. // *Circulation.* – 1999. – V.99. – Issue 16. – P.2090-2097.
164. Ben Assayag E., Shenhar-Tsarfaty S., Bova I., Berliner S., Usher S., Peretz H., Shapira I., Bornstein N.M. Association of the -757T>C polymorphism in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and carotid atherosclerosis. // *Thromb. Res.* – 2009. – V.124. – Issue 4. – P.458-462.
165. Benditt E.P. Implications of the monoclonal character of human atherosclerotic plaques // *Am. J. Pathol.* – 1997. – V.86. – P.693-702.
166. Benditt E.P. The origin of atherosclerosis. // *Sci. Am.* – 1997. – V.236. – P.74-85.
167. Benditt E.P., Barret T., McDougall J.T. Viruses in the aetiology of arteriosclerosis. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1983. – Vol.80. – P.6386-6389.
168. Bentley D.R. Whole-genome resequencing. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2006. – V.16. – P.545-552.
169. Berenson G.S., Srinivasan S.R., Bao W. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – V. 338. – P.1650-1656.
170. Berg K., Svindland A., Smith A.J., Lawn R.M., Djurovic S., Aleström A., Aleström P., Eliassen K. Spontaneous atherosclerosis in the proximal aorta of LPA transgenic mice on a normal diet. // *Atherosclerosis.* – 2002. – V.163. – Issue 1. – P.99-104.
171. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J. Atherosclerosis: basic mechanism oxidation, inflammation, and genetic // *Circulation.* – 1995. – V. 91. – P.2488-2496.
172. Bhagwat A.G., Roberstson A.L. Distribution and severity of atherosclerosis in the human thoracic aorta // *Angiology.* – 1973. – V.24. – P.181-190.

173. Bhat H.K., Hiatt W.R., Hoppel C.L., Brass E.P. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. // *Circulation*. – 1999. – V.99. – Issue 6. – P.807-812.
174. Bielecka-Dabrowa A., Barylski M., Mikhailidis D.P., Rysz J., Banach M. HSP 70 and atherosclerosis – protector or activator?// *Expert. Opin. Ther. Targets*. – 2009. – V.13. – P.307-317.
175. Bishop F.K., Maahs D.M., Snell-Bergeon J.K., Ogden L.G., Kinney G.L., Rewers M. Lifestyle risk factors for atherosclerosis in adults with type 1 diabetes. // *Diab. Vasc. Dis. Res*. – 2009. – V.6. – Issue 4. – P.269-275.
176. Bocan T.M., Guyton J.R. Human aortic fibrolipid lesions. Progenitor lesions for fibrous plaques, exhibiting early formation of the cholesterol-rich core. // *Am. J. Pathol*. – 1985. – V.120. – P.193-206.
177. Bocan T.M., Schifani T.A., Guyton J.R. Ultrastructure of the human aortic fibrolipid lesion. Formation of the atherosclerotic lipid-rich core. // *Am. J. Pathol*. – 1986. – V.123. – P.413-424.
178. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G. Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity. // *Handb. Exp. Pharmacol*. – 2005. – V.170. – P.645-663.
179. Bornstein B., Mas J.A., Patrono C., Fernández-Moreno M.A., González-Vioque E., Campos Y., Carrozzo R., Martín M.A., del Hoyo P., Santorelli F.M., Arenas J., Garesse R. Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. // *Biochem. J*. – 2005. – V.387. – Issue 3. – P.773-778.
180. Botto N., Berti S., Manfredi S., Al-Jabri A., Federici C., Clerico A., Ciofini E., Biagini A., Andreassi M.G. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. // *Mutat. Res*. – 2005. – V.570. – Issue 1. – P.81-88.
181. Bressler J., Folsom A.R., Couper D.J., Volcik K.A., Boerwinkle E. Genetic variants identified in a European genome-wide association study that were found

- to predict incident coronary heart disease in the atherosclerosis risk in communities study. // *Am. J. Epidemiol.* – 2010. – V.171. – Issue 1. – P.14-23.
182. Brevetti G., Schiano V., Chiariello M. Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? // *Atherosclerosis.* – 2008. – V.197. – P.1-11.
183. Brown M.D., Voljavec A.S., Lott M.T., Torroni A., Yang C.C., Wallace D.C. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Genetics.* – 1992. – V.130. – Issue 1. – P.163-173.
184. Brown X.Q., Bartolak-Suki E., Williams C., Walker M.L., Weaver V.M., Wong J.Y. Effect of substrate stiffness and PDGF on the behavior of vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis. // *J. Cell. Physiol.* – 2010. – V.225. – Issue 1. – P.115-122.
185. Burchard H.U., Tischendorf F.W. The effects of the intake of cod liver oil on the blood lipid level, the lipoprotein profile and bleeding time. // *Z. Ernährungswiss.* – 1989. – V.28. – Issue 1. – P.84-91.
186. Caesar R., Fåk F., Bäckhed F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. // *J. Intern. Med.* – 2010. – V.268. – Issue 4. – P.320-328.
187. Campbell G.R., Campbell J.H., Manderson J.A., Horrigan S., Rennick R.E. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 1988. – V.112. – P.977-986.
188. Campbell L.A., Kuo C.C. *Chlamydia pneumoniae* - an infectious risk factor for atherosclerosis? // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2004. – V.2. – P.23-32.
189. Campbell G.R., Campbell J.H. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. // *Exp. Mol. Pathol.* – 1985. – V.42. – P.139-162.
190. Castillo-Díaz S.A., Garay-Sevilla M.E., Hernández-González M.A., Solís-Martínez M.O., Zaina S. Extensive demethylation of normally hypermethylated

- CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries. // *Int. J. Mol. Med.* – 2010. – V.26. – Issue 5. – P.691-700.
191. Castro E., Edland S.D., Lee L., Ogburn C.E., Deeb S.S., Brown G., Panduro A., Riestra R., Tilvis R., Louhija J., Penttinen R., Erkkola R., Wang L., Martin G.M., Oshima J. Polymorphisms at the Werner locus: II. 1074Leu/Phe, 1367Cys/Arg, longevity, and atherosclerosis. // *Am. J. Med. Genet.* – 2000. – V.95. – Issue 4. – P.374-380.
192. Chai S., Chai Q., Danielsen C.C., Hjorth P., Nyengaard J.R., Ledet T., Yamaguchi Y., Rasmussen L.M., Wogensen L. Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis. // *Circ. Res.* – 2005. – V.96. – Issue 5. – P.583-591.
193. Chamkha I., Mkaouar-Rebai E., Aloulou H., Chabchoub I., Kifagi C., Fendri-Kriaa N., Kammoun T., Hachicha M., Fakhfakh F. A novel m.3395A>G missense mutation in the mitochondrial ND1 gene associated with the new tRNA(Ile) m.4316A>G mutation in a patient with hypertrophic cardiomyopathy and profound hearing loss. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – V.404. – Issue 1. – P.504-510.
194. Chamley-Campbell J.H., Campbell G.R. What controls smooth muscle phenotype? // *Atherosclerosis.* – 1981. – V.40. – P.347-357.
195. Chazov E.I., Repin V.S., Orekhov A.N., Antonov A.S., Preobrazhensky S.N., Soboleva E.L., Smirnov V.N. Atherosclerosis: what has been learned studying human arteries. // *Atherosclerosis Reviews.* – 1987. – V.14. – P.7-60.
196. Chen F.L., Liu Y., Song X.Y., Hu H.Y., Xu H.B., Zhang X.M., Shi J.H., Hu J., Shen Y., Lu B., Wang X.C., Hu R.M. A novel mitochondrial DNA missense mutation at G3421A in a family with maternally inherited diabetes and deafness. // *Mutat. Res.* – 2006. – V.602. – Issue 1-2. – P.26-33.
197. Chen H., Yu M., Li M., Zhao R., Zhu Q., Zhou W., Lu M., Lu Y., Zheng T., Jiang J., Zhao W., Xiang K., Jia W., Liu L. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase

- (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. // *Mol. Cell. Biochem.* – 2012. – V.363. – Issue 1-2. – P.85-91.
198. Chen H., Zheng J., Xue L., Meng Y., Wang Y., Zheng B., Fang F., Shi S., Qiu Q., Jiang P., Lu Z., Mo J.Q., Lu J., Guan M.X. The 12S rRNA M.1555A>G mutation in the mitochondrial haplogroup D5a is responsible for maternally inherited hypertension and hearing loss in two Chinese pedigrees. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. – V.20. – Issue 6. – P.607-612.
199. Chen J., Jin Y., Wang H., Wei S., Chen D., Ying L., Zhou Q., Li G., Li J., Gao J., Kato N., Hu W., Li Y., Wang Y. A Haplotype of Two Novel Polymorphisms in δ -Sarcoglycan Gene Increases Risk of Dilated Cardiomyopathy in Mongoloid Population. // *PLoS One.* – 2015. – Dec.31; V.10. – Issue 12. – e0145602. doi:10.1371/journal.pone.0145602. eCollection 2015.
200. Chen Q., Reis S.E., Kammerer C., Craig W., McNamara D.M., Holubkov R., Sharaf B.L., Sopko G., Pauly D.F., Merz C.N., Kamboh M.I.; WISE study group Association of anti-oxidized LDL and candidate genes with severity of coronary stenosis in the Women's Ischemia Syndrome Evaluation study. // *J. Lipid. Res.* – 2011. – V.52. – Issue 4. – P.801-807.
201. Chen S.N., Cilingiroglu M., Todd J., Lombardi R., Willerson J.T., Gotto A.M. Jr, Ballantyne C.M., Marian A.J. Candidate genetic analysis of plasma high-density lipoprotein cholesterol and severity of coronary atherosclerosis. // *BMC Med. Genet.* – 2009. – V.10. – P.111-114.
202. Chen T.J., Boles R.G., Wong L.J. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. // *Clin Chem.* – 1999. – Aug.; V.45. – Issue 8 (Pt 1). – P.1162-1167.
203. Chien K.L., Hsu H.C., Chen Y.C., Su T.C., Lee Y.T., Chen M.F. Association between sequence variant of c.553G>T in the apolipoprotein A5 gene and metabolic syndrome, insulin resistance, and carotid atherosclerosis. // *Transl. Res.* – 2009. – V.154. – Issue 3. – P.133-141.

204. Chironi G., Walch L., Pernollet M.G., Gariépy J., Levenson J., Rendu F., Simon A. Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. // *Atherosclerosis*. – 2007. – V.191. – Issue 1. – P.115-120.
205. Chiu C., Ingles J., Lind J.M., Semsarian C. Mutation analysis of the natriuretic peptide precursor B (NPPB) gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy. // *DNA Seq.* – 2006. – V.17. – Issue 5. – P.392-395.
206. Choi S.W., Kim H.Y., Lee Y.H., Ryu S.Y., Kweon S.S., Rhee J.A., Choi J.S., Shin M.H. eGFR is associated with subclinical atherosclerosis independent of albuminuria: the Dong-gu Study. // *Atherosclerosis*. – 2010. – V.212. – Issue 2. – P.661-667.
207. Chol M., Lebon S., Bénit P., Chretien D., de Lonlay P., Goldenberg A., Odent S., Hertz-Pannier L., Vincent-Delorme C., Cormier-Daire V., Rustin P., Rötig A., Munnich A. The mitochondrial DNA m.13513G>A 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. – V.40. – Issue 3. – P.188-191.
208. Chu N.F., Lin F.H., Chin H.C., Hong Y.J. Association between interleukin-6 receptor gene variations and atherosclerotic lipid profiles among young adolescents in Taiwan. // *Lipids. Health Dis.* – 2011. – V.12. – Issue 10. – P.136-140.
209. Chui B., Vira E., Tucker W., Fong I.W. Chlamidia pneumoniae, cytomegaloviruses and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. // *Circulation*. – 1997. – V.96. – P.2144-2148.
210. Chumaeva N., Hintsanen M., Hintsala T., Ravaja N., Juonala M., Raitakari O.T., Keltikangas-Järvinen L. Early atherosclerosis and cardiac autonomic responses to mental stress: a population-based study of the moderating influence of impaired endothelial function. // *BMC Cardiovasc. Disord.* – 2010. – V.10. – P.16-21.

211. Clark K.M., Taylor R.W., Johnson M.A., Chinnery P.F., Chrzanowska-Lightowlers Z.M., Andrews R.M., Nelson I.P., Wood N.W., Lamont P.J., Hanna M.G., Lightowlers R.N., Turnbull D.M. An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. – V.64. – Issue 5. – P.1330-1339.
212. Clarke M., Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. // *Am. J. Nephrol.* – 2006. – V.26. – P.531-535.
213. Claudio Ottoni, François-X Ricaut, Nancy Vanderheyden, Nicolas Brucato, Marc Waelkens, and Ronny Decorte. Mitochondrial analysis of a Byzantine population reveals the differential impact of multiple historical events in South Anatolia. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2011. – May; V.19. – Issue 5. – P.571-576. Published online 2011 Jan 12. doi: 10.1038/ejhg.2010.230.
214. Clement CM, Thomas LK, Mou Y, Croslan DR, Gibbons GH, Ford BD. Neuregulin-1 attenuates neointimal formation following vascular injury and inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells. // *J. Vasc. Res.* – 2007. – V.44. – Issue 4. – P.303-312.
215. Conley Y.P., Brockway H., Beatty M., Kerr M.E. Qualitative and quantitative detection of mitochondrial heteroplasmy in cerebrospinal fluid using denaturing high-performance liquid chromatography. // *Brain Res. Protocol.* – 2003. – Issue 12. – P.99-103.
216. Constantinides P. The morphological basis for altered endothelial permeability in arteriosclerosis. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1997. – V.82. – P.969-974.
217. Constantinides P. The role of arterial wall injury in atherogenesis and arterial thrombogenesis. // *Zentralbl. Allg. Pathol.* – 1989. – V.135. – P.517-530.
218. Cornhill J.F., Herderick E.E., Sary H.C. Topography of human aortic sudanophilic lesions. // *Monograph. Atherosclerosis. Karger.* – 1990. – V.15. – P.13-19 (athol. – 1986. – V.123. – P.413-424).

219. Cornhill J.F., Roach M.R. A quantitative study of the localization of atherosclerotic lesions in the rabbit aorta. // *Atherosclerosis*. – 1976. – V.23. – P.489-501.
220. Cornhill J.F., Roach M.R. Quantitative method for the evaluation of atherosclerotic lesions. // *Atherosclerosis*. – 1974. – V.20. – P.131-136.
221. Cutler R. G. Cross-linkage hypothesis of aging: DNA adducts in chromatin as a primary aging process. // In: *Aging, carcinogenesis and radiation biology*. New York, 1976. – P.443-492.
222. Damani S.B., Topol E.J. Future use of genomics in coronary artery disease. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – V.50. – Issue 20. – P.1933-1940.
223. Danesh J., Collins R., Peto R.. Chronic infection and coronary heart disease. Is there a link? // *Lancet*. – 1997. – V.350. – P.430-436.
224. Davies M.J. : A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. // *Circulation*. – 1990. – V.82 (II). – P.38-46.
225. Davies P.F. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. // *Lab. Invest.* – 1986. – V.55. – P.5-24.
226. Davies P.F., Robotewskyj A., Griem M.L., Dull R.O., Polacek D.C. Hemodynamic forces and vascular cell communication in arteries. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 1992. – V.116. – P.1301-1306.
227. Delgado-Lista J., Garcia-Rios A., Perez-Martinez P., Solivera J., Yubero-Serrano E.M., Fuentes F., Parnell L.D., Shen J., Gomez P., Jimenez-Gomez Y., Gomez-Luna M.J., Marin C., Belisle S.E., Rodriguez-Cantalejo F., Meydani S.N., Ordovas J.M., Perez-Jimenez F., Lopez-Miranda J. Interleukin 1B variant -1473G/C (rs1143623) influences triglyceride and interleukin 6 metabolism. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – V.96. – Issue 5. – P.816-820.
228. Dempsey R.J., Moore R.W. Amount of smoking independently predicts carotid artery atherosclerosis severity. // *Stroke*. – 1992. – V.23. – Issue 5. – P.693-696.

229. Dhillon V.S., Shahid M., Husain S.A. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2007. – V.13. – Issue 4. – P.213-222.
230. DiMauro S., Hirano M., Kaufmann P., Tanji K., Sano M., Shungu D.C., Bonilla E., DeVivo D.C. Clinical features and genetics of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. // *Adv. Neurol.* – 2002. – V.89. – P.217-229.
231. Dobrowolski S.F., Hendrickx A.T., van den Bosch B.J., Smeets H.J., Gray J., Miller T., Sears M. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling. // *Hum Mutat.* – 2009. – Jun.; V.30. – Issue 6. – P.891-898. doi:10.1002/humu.21003.
232. Dong C., Yoon W., Goldschmidt-Clermont P.J. DNA methylation and atherosclerosis. // *J. Nutr.* – 2002. – V.132. – P.2406-2409.
233. Doran A.C., Meller N., McNamara C.A. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – V.28. – P.812-819.
234. Down R.H., Whiting M.J., Watts J.M., Jones W. Effect of synthetic oestrogens and progestagens in oral contraceptives on bile lipid composition. // *Gut.* – 1983. – V.24. – Issue 3. – P.253-259.
235. Drager L.F., Bortolotto L.A., Krieger E.M., Lorenzi-Filho G. Additive effects of obstructive sleep apnea and hypertension on early markers of carotid atherosclerosis. // *Hypertension.* – 2009. – V.53. – Issue 1. – P.64-69.
236. Dryomov S.V., Nazhmidenova A.M., Shalaurova S.A., Morozov I.V., Tabarev A.V., Starikovskaya E.B., Sukernik R.I. Mitochondrial genome diversity at the Bering Strait area highlights prehistoric human migrations from Siberia to northern North America. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2015. – Oct.; V.23. – Issue 10. – P.1399-1404. doi: 10.1038/ejhg.2014.286. Epub 2015 Jan 7.
237. Elosua R., Ordovas J.M., Cupples L.A., Lai C.Q., Demissie S., Fox C.S., Polak J.F., Wolf P.A., D'Agostino R.B. Sr, O'Donnell C.J. Variants at the APOA5 locus,

- association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. // *J. Lipid. Res.* – 2006. – V.47. – Issue 5. – P.990-996.
238. Elovainio M., Puttonen S., Heponiemi T., Reuter M., Kivimaki M., Viikari J., Keltikangas-Jarvinen L. Relationship between DRD4 polymorphism and lipid metabolism: what is the role of novelty seeking? // *Neuropsychobiology.* – 2005. – V.51. – Issue 1. – P.53-58.
239. Elphinstone M.S., Baverstock P.R. Detecting mitochondrial genotypes by temperature gradient gel electrophoresis and heteroduplex analysis. // *BioTechniques.* – 1997. – V.23. – P.982-986.
240. Engel D., Beckers L., Wijnands E., Seijkens T., Lievens D., Drechsler M., Gerdes N., Soehnlein O., Daemen M.J., Stan R.V., Biessen E.A., Lutgens E. Caveolin-1 deficiency decreases atherosclerosis by hampering leukocyte influx into the arterial wall and generating a regulatory T-cell response. // *FASEB J.* – 2011. – V.25. – Issue 11. – P.3838-3848.
241. Enquobahrie D.A., Rice K., Williams O.D., Williams M.A., Gross M.D., Lewis C.E., Schwartz S.M., Siscovick D.S. IL1B genetic variation and plasma C-reactive protein level among young adults: the CARDIA study. // *Atherosclerosis.* – 2009. – V.202. – Issue 2. – P.513-520.
242. Erbay E., Babaev V.R., Mayers J.R., Makowski L., Charles K.N., Snitow M.E., Fazio S., Wiest M.M., Watkins S.M., Linton M.F., Hotamisligil G.S. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. // *Nat. Med.* – 2009. – V.15. – Issue 12. – P.1383-1391.
243. Evans D., Bode A., von der Lippe G., Beil F.U., Mann W.A. Cerebrovascular atherosclerosis in type III hyperlipidemia is modulated by variation in the apolipoprotein A5 gene. // *Eur. J. Med. Res.* – 2011. – V.16. – Issue 2. – P.79-84.
244. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. // European Heart Network and European Society of Cardiology. – 2012. – 127 p.
245. Fabricant C.G., Fabricant J., Minick C.R., Literna M.M. Herpes virus induced atherosclerosis in chicken. // *Fed. Proc.* – 1983. – Vol.42. – P.2467–2469.

246. Fadini G.P., Coracina A., Baesso I., Agostini C., Tiengo A., Avogaro A., de Kreutzenberg S.V. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. // *Stroke*. – 2006. – V.37. – Issue 9. – P.2277-2282.
247. Faggiotto A., Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. // *Arteriosclerosis*. – 1984. – V.4. – P.341-356.
248. Feng X., Pu W., Gao D. Diagnostic and differential diagnostic potential of mitochondrial DNA assessment in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Zhonghua. Yan. Ke. Za. Zhi*. – 2001. – V.37. – Issue 3. – P.174-177.
249. Fernández-Hernando C., Yu J., Suárez Y., Rahner C., Dávalos A., Lasunción M.A., Sessa W.C. Genetic evidence supporting a critical role of endothelial caveolin-1 during the progression of atherosclerosis. // *Cell. Metab.* – 2009. – V.10. – Issue 1. – P.48-54.
250. Fingert J.H., Grassi M.A., Janutka J.C., East J.S., Howard J.G., Sheffield V.C., Jacobson D.M., Hayreh S.S., Stone E.M. Mitochondrial variant G4132A is associated with familial non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy in one large pedigree. // *Ophthalmic. Genet.* – 2007. – V.28. – Issue 1. – P.1-7.
251. Finsterer J. Is atherosclerosis a mitochondrial disorder? // *Vasa*. – 2007. – V.36. – Issue 4. – P.229-240.
252. Fu K., Hartlen R., Johns T., Genge A., Karpati G., Shoubridge E.A. A novel heteroplasmic tRNA^{Leu}(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. – V.5. – Issue 11. – P.1835-1840.
253. Fujiwara T., Chiba S. Alterations of vascular alpha 1-adrenergic contractile responses in hypercholesterolemic rabbit common carotid arteries. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 1993. – V.22. – Issue 1. – P.58-64.

254. Galle J., Heermeier K. Angiotensin II and oxidized LDL: an unholy alliance creating oxidative stress. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 1999. – V.14. – P.2585-2589.
255. García-Bermúdez M., González-Juanatey C., Rodríguez-Rodríguez L., Vazquez-Rodriguez T.R., Miranda-Fillooy J.A., Fernández-Gutierrez B., Llorca J., Martin J., González-Gay M.A. Lack of association between LEP rs2167270 (19 G>A) polymorphism and disease susceptibility and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 2011. – V.29. – Issue 2. – P.293-298.
256. Gardener H., Beecham A., Cabral D., Yanuck D., Slifer S., Wang L., Blanton S.H., Sacco R.L., Juo S.H., Rundek T. Carotid plaque and candidate genes related to inflammation and endothelial function in Hispanics from northern Manhattan. // *Stroke.* – 2011. – V.42. – Issue 4. – P.889-896.
257. Gattermann N., Wulfert M., Junge B., Germing U., Haas R., Hofhaus G. Ineffective hematopoiesis linked with a mitochondrial tRNA mutation (G3242A) in a patient with myelodysplastic syndrome. // *Blood.* – 2004. – V.103. – Issue 4. – P.1499-1502.
258. Gaukrodger N., Mayosi B.M., Imrie H., Avery P., Baker M., Connell J.M., Watkins H., Farrall M., Keavney B. A rare variant of the leptin gene has large effects on blood pressure and carotid intima-medial thickness: a study of 1428 individuals in 248 families. // *J. Med. Genet.* – 2005. – V.42. – Issue 6. – P.474-478.
259. Gauvreau D., Villeneuve N., Deshaies Y., Cianflone K. Novel adipokines: links between obesity and atherosclerosis. // *Ann. Endocrinol. (Paris).* – 2011. – V.72. – Issue 3. – P.224-231.
260. Geer J.C., Catsulis C., McGill H.C Jr., Stron J.P. Fine structure of the baboon aortic fatty streak. // *Am. J. Pathol.* – 1968. – V.52. – P.265-286.
261. Geer J.C., Haust M.D. Smooth muscle cells in atherosclerosis. // *Basel. Karger,* 1972.

262. Geerts C.C., Bots M.L., Grobbee D.E., Uiterwaal C.S. Parental smoking and vascular damage in young adult offspring: is early life exposure critical? The atherosclerosis risk in young adults study. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – V.28. – Issue 12. – P.2296-2302.
263. George S.J., Williams A., Newby A.C. An essential role for platelet-derived growth factor in neointima formation in human saphenous vein in vitro. // *Atherosclerosis.* – 1996. – V.120. – Issue 1-2. – P.227-240.
264. Gerrity R.G. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. // *Am. J. Pathol.* – 1981. – V.103. – P.191-200.
265. Gerrity R.G. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. // *Am. J. Pathol.* – 1981. – V.103. – P.181-190.
266. Giaginis C., Klonaris C., Katsargyris A., Kouraklis G., Spiliopoulou C., Theocharis S.. Correlation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma (PPAR-gamma) and Retinoid X Receptor-alpha (RXR-alpha) expression with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. // *Med. Sci. Monit.* – 2011. – V.17. – Issue 7. – P.381-391.
267. Gil Borlado M.C., Moreno Lastres D., Gonzalez Hoyuela M., Moran M., Blazquez A., Pello R., Marin Buera L., Gabaldon T., Garcia Peñas J.J., Martín M.A., Arenas J., Ugalde C. Impact of the mitochondrial genetic background in complex III deficiency. // *PLoS One.* – 2010. – V.5. – Issue 9. – e12801.
268. Gilardini L., Pasqualinotto L., Di Matteo S., Caffetto K., Croci M., Girola A., Invitti C. Factors associated with early atherosclerosis and arterial calcifications in young subjects with a benign phenotype of obesity. // *Obesity. (Silver Spring).* – 2011. – V.19. – Issue 8. – P.1684-1689.
269. Giordano C., Pallotti F., Walker W.F., Checcarelli N., Musumeci O., Santorelli F., d'Amati G., Schon E.A., DiMauro S., Hirano M., Davidson M.M. Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – V.293. – Issue 1. – P.521-529.

270. Glass C.K., Witztum J.L. Atherosclerosis. The road ahead. // *Cell*. – 2001. – V.104. – P.503-516.
271. Glenn T.C. Field guide to next-generation DNA sequencers. // *Mol. Ecol. Resour.* – 2011. – Sep.; V.11. – Issue 5. – P.759-769.
272. Gmiński J., Drózd M., Ulfing-Maślanka R., Najda J. Evaluation of elastin metabolism in children from families with high risk of atherosclerosis. // *Atherosclerosis*. – 1991. – V.91. – Issue 3. – P.185-189.
273. Gnasso A., Motti C., Irace C., Di Gennaro I., Pujia A., Leto E., Ciamei M., Crivaro A., Bernardini S., Federici G., Cortese C. The Arg allele in position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. // *Atherosclerosis*. – 2002. – V.164. – Issue 2. – P.289-295.
274. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Franco S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Huffman M.D., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Magid D., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McGuire D.K., Mohler E.R., Moy C.S., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Schreiner P.J., Sorlie P.D., Stein J., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D., Woo D., Turner M.B.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2013 update: a report from the American Heart Association. // *Circulation*. – 2013. – V.127. – Issue 1. – P.6-245.
275. Goldstein J.L., Brown M.S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. // *Ann. Rev. Biochem.* – 1997.Vol. 46. – P.897-930.
276. Goldstein J.L., Brown M.S. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. // *Metabolism*. – 1977. – V.26. – P.1257-1275.
277. Gomaschi M, Sinagra G, Serdoz LV, Pitzorno C, Fonda M, Cattin L, Calabresi L, Franceschini G. The plasma concentration of Lpa-I:A-II particles as a predictor of the inflammatory response in patients with ST-elevation myocardial infarction. // *Atherosclerosis*. – 2009. – V.202. – Issue 1. – P.304-311.

278. Gonçalves I., Edsfeldt A., Ko N.Y., Grufman H., Berg K., Björkbacka H., Nitulescu M., Persson A., Nilsson M., Prehn C., Adamski J., Nilsson J. Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2012. – V.32. – Issue 6. – P.1505-1512.
279. Goodarzi M.O., Taylor K.D., Jones M.R., Fang B., Guo X., Xiang A.H., Buchanan T.A., Hodis H.N., Raffel L.J., Rotter J.I. Replication of calpain-10 genetic association with carotid intima-media thickness. // *Atherosclerosis.* – 2009. – V.205. – Issue 2. – P.503-505.
280. Gorący J., Gorący I., Kaczmarczyk M., Parczewski M., Brykczyński M., Clark J., Safranow K., Ciechanowicz A. Low frequency haplotypes of E-selectin polymorphisms G2692A and C1901T give increased protection from coronary artery disease. // *Med. Sci. Monit.* – 2011. – V.17. – Issue 6. – P.334-340.
281. Gorący J., Gorący I., Safranow K., Taryma O., Adler G., Ciechanowicz A. Lack of association of interleukin-1 gene cluster polymorphisms with angiographically documented coronary artery disease: demonstration of association with hypertension in the Polish population. // *Arch. Med. Res.* – 2011. V.42. – Issue 5. – P.426-432.
282. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity.// *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – V.5. – P.953-964.
283. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. // *J. Clin. Invest.* – 2007. – V.117. – P.89-93.
284. Gown A.M., Tsukada T., Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. // *Am. J. Pathol.* – 1986. – V.125. – P.191-207.
285. Graham I., Atar D., Borch-Johnsen K. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in

- clinical practice). // *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* – 2007. – V.14, Suppl.2. – P. S1-S113.
286. Grasso M., Diegoli M., Brega A., Campana C., Tavazzi L., Arbustini E. The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated with dilated cardiomyopathy. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2001. – V.9. – Issue 4. – P.311-315.
287. Gropman A., Chen T.J., Perng C.L., Krasnewich D., Chernoff E., Tifft C., Wong L.J. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2004. – V.124A. – Issue 4. – P.377-382.
288. Gu L., Johnson M.W., Lusis A.J. Quantitative trait locus analysis of plasma lipoprotein levels in an autoimmune mouse model. Interaction between lipoprotein metabolism, autoimmune disease and atherosclerosis. // *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* – 1999. – V.19. – P.442-453.
289. Guan M.X., Fischel-Ghodsian N., Attardi G. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. // *Hum. Mol. Genet.* – 1996. – V.5. – Issue 7. – P.963-971.
290. Guo Z.F., Guo W.S., Xiao L., Gao G.Q., Lan F., Lu X.G., Li K., Liao D.F. Discrimination of A1555G and C1494T Point Mutations in the Mitochondrial 12S rRNA Gene by On/Off Switch. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2011. – V.166. – Issue 1. – P.234-242.
291. Gutierrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. // *Circ. Res.* – 2006. – V.99. – P.924-932.
292. Halayko A.J., Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – V.90. – P.358-368.
293. Hall J.G., Eis P.S., Law S.M. et al. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Jul.18; V.97. – Issue 15. – P.8272-8277.

294. 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. – V.11. – Issue 1. – P.31-35.
295. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – V.352. – P.1685-1695.
296. Hansson G.K., Libby P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – V.6. – P.508-519.
297. Hao H., Gabbiani G., Bochaton-Piallat M.L. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – V.23. – P.1510-1520.
298. Hecker R., Wang Z., Steger G. and Riesner D. Analysis of RNA structure by temperature-gradient gel electrophoresis: viroid replication and processing. // *Gene.* – 1988. – V.72. – P.59-74.
299. Heinonen P., Jartti L., Järvisalo M.J., Pesonen U., Kaprio J.A., Rönnemaa T., Raitakari O.T., Scheinin M. Deletion polymorphism in the alpha2B-adrenergic receptor gene is associated with flow-mediated dilatation of the brachial arter. // *Clin. Sci. (Lond).* – 2002. – V.103. – Issue 5. – P.517-524.
300. Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Galli A., Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. // *Am. J. Pathol.* – 2007. – V.170. – P.1807-1816.
301. Hirai M, Suzuki S, Onoda M, Hinokio Y, Ai L, Hirai A, Ohtomo M, Komatsu K, Kasuga S, Satoh Y, Akai H, Toyota T. Mitochondrial DNA 3394 mutation in the NADH dehydrogenase subunit 1 associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – V.219. – Issue 3. – P.951-955.
302. Hoffbuhr K.C., Davidson E., Filiano B.A., Davidson M., Kennaway N.G., King M.P. A pathogenic 15-base pair deletion in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit III results in the absence of functional cytochrome c oxidase. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V.275. – Issue 18. – P.13994-14003.

303. Holland M.M., McQuillan M.R., O'Hanlon K.A. Second generation sequencing allows for mtDNA mixture deconvolution and high resolution detection of heteroplasmy. // *Croat. Med. J.* – 2011. – Jun.; V.52. – Issue 3. – P.299-313.
304. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathy. // *Nature.* – 1988. – V.331. – P.717-9501.
305. Horváth R, Scharfe C, Hoeltzenbein M, Do BH, Schröder C, Warzok R, Vogelgesang S, Lochmüller H, Müller-Höcker 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. – V.39. – Issue 11. – P.812-816.
306. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения 11.01.2016).
307. <http://www.nedug.ru/library/c/Схема-строения-стенок-артерий#.UoTE0RrIbv4> (дата обращения 17.01.2016).
308. <http://atvb.ahajournals.org> (дата обращения 09.02.2016).
309. <http://www.atherosclerosis-journal.com> (дата обращения 11.09.2016).
310. <http://smjournals.com/atherosclerosis/journal-score.php> (дата обращения 11.12.2016).
311. <http://spss.ru.joydownload.com/&c=20?gclid=COTnxtbesLwCFaHbcgodiiMAtQ> (дата обращения 17. 03.2016).
312. <http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96id.aspx> (дата обращения 27.05.2016).
313. <http://russia.sibenzyme.com/info231.php>. (дата обращения 29.01.2016).
314. http://бмэ.орг/index.php/ВСЕМИРНАЯ_ОРГАНИЗАЦИЯ_ЗДРАВООХРА
[НЕНИЯ](http://бмэ.орг/index.php/ВСЕМИРНАЯ_ОРГАНИЗАЦИЯ_ЗДРАВООХРА) (дата обращения 19.05.2016).
315. Hu Q, Zhang XJ, Liu CX, Wang XP, Zhang Y. PPAR γ 1-induced caveolin-1 enhances cholesterol efflux and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. // *J. Vasc. Res.* – 2010. – V.47. – Issue 1. – P.69-79.

316. Huijgen R, Vissers MN, Kindt I, Trip MD, de Groot E, Kastelein JJ, Hutten BA. Assessment of carotid atherosclerosis in normocholesterolemic individuals with proven mutations in the low-density lipoprotein receptor or apolipoprotein B genes. // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2011. – V.4. – Issue 4. – P.413-417.
317. Hulsmans M., De Keyzer D., Holvoet P.. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. // *FASEB J.* – 2011. – V.25. – Issue 8. – P.2515-2527.
318. Huoponen K. Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. // *Neurogenetics.* – 2001. – V.3. – Issue 3. – P.119-125.
319. Hwang J.M., Chang B.L., Koh H.J., Kim J.Y., Park S.S. Leber's hereditary optic neuropathy with 3460 mitochondrial DNA mutation. // *J. Korean. Med. Sci.* – 2002. – V.17. – Issue 2. – P.283-286.
320. Ihling C., Bohrmann B., Schaefer H.E., Technau-Ihling K., Loeffler B.M. Endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in human atherosclerosis--novel targets for pharmacotherapy in atherosclerosis. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2004. – V.2. – Issue 3. – P.249-258.
321. Ilyas M, Kim JS, Cooper J, Shin YA, Kim HM, Cho YS, Hwang S, Kim H, Moon J, Chung O, Jun J, Rastogi A, Song S, Ko J, Manica A, Rahman Z, Husnain T, Bhak J. Whole genome sequencing of an ethnic Pathan (Pakhtun) from the north-west of Pakistan. // *BMC Genomics.* – 2015. – Mar.; V.12. – Issue 16. – P.172. doi:10.1186/s12864-015-1290-1.
322. International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease. Pocket guide to prevention of coronary heart disease. // Boerm. Bruckmeier. Verlag. GmbH. – 2003. – 128 P.
323. Irvine C.D., George S.J., Sheffield E., Johnson J.L., Davies A.H., Lamont P.M. The association of platelet-derived growth factor receptor expression, plaque morphology and histological features with symptoms in carotid atherosclerosis. // *Cardiovasc. Surg.* – 2000. – V.8. – Issue 2. – P.121-129.
324. Ishizaka Y., Ishizaka N., Tani M., Toda A., Toda E., Koike K., Yamakado M. Relationship between albuminuria, low eGFR, and carotid atherosclerosis in

- Japanese women. // *Kidney Blood Press. Res.* – 2008. – V.31. – Issue 3. – P.164-170.
325. Ivey M.E., Osman N., Little P.J. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. // *Atherosclerosis.* – 2008. – V.199. – Issue 2. – P.237-247.
326. Jakel H., Fruchart-Najib J., Fruchart J.C. Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha as a therapeutic target in the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. // *Drug News Perspect.* – 2006. – V.19. – Issue 2. – P.91-97.
327. Jeong-Yu. S., Clayton D. Regulation and function of the mitochondrial genome. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1996. – V.19. – P.443-451.
328. Jennings J.R., Kamarck T.W., Everson-Rose S.A., Kaplan G.A., Manuck S.B., Salonen J.T. Exaggerated blood pressure responses during mental stress are prospectively related to enhanced carotid atherosclerosis in middle-aged Finnish men. // *Circulation.* – 2004. – V.110. – Issue 15. – P.2198-2203.
329. Jensen-Seaman M.I., Wildschutte J.H., Soto-Calderón I.D., Anthony N.M. A comparative approach shows differences in patterns of numt insertion during hominoid evolution. // *J. Mol. Evol.* – 2009. – V.68. – Issue 6. – P.688-699.
330. 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. – V.214. – Issue 1-2. – P.17-20.
331. John P.A., Ioannidis M.D. Prediction of Cardiovascular Disease Outcomes and Established Cardiovascular Risk Factors by Genome-Wide Association Markers. // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2009. – V.2. – Issue 1. – P.7-15.
332. Jones C.A., London N.R., Chen H., Park K.W., Sauvaget D., Stockton R.A., Wythe J.D., Suh W., Larrieu-Lahargue F., Mukoyama Y.S., Lindblom P., Seth P., Frias A., Nishiya N., Ginsberg M.H., Gerhardt H., Zhang K., Li D.Y. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. // *Nat. Med.* – 2008. – V.14. – Issue 4. – P.448-453.

333. Karafrou M., Lambrinouadaki I., Christodoulakos G. Apoptosis in atherosclerosis: a mini-review. // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2008. – V.8. – P.912-918.
334. Karathanasis S.K., Ferris E., Haddad I.A. DNA inversion within the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – V.84. – Issue 20. – P.7198-7202.
335. Karnik S.K., Brooke B.S., Bayes-Genis A., Sorensen L., Wythe J.D., Schwartz R.S., Keating M.T., Li D.Y. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. // *Development.* – 2003. – V.130. – Issue 2. – P.411-423.
336. Kawamoto R., Kohara K., Tabara Y., Miki T., Doi T., Tokunaga H., Konishi I. An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and common carotid atherosclerosis. // *J. Hum. Genet.* – 2001. – V.46. – Issue 9. – P.506-510.
337. Kermode A.G., Moseley I.F., Kendall B.E., Miller DH, MacManus D.G., McDonald W.I. Magnetic resonance imaging in Leber's optic neuropathy. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 1989. – V.52. – Issue 5. – P.671-674.
338. Kettunen T., Eklund C., Kähönen M., Jula A., Päivä H., Lyytikäinen L.P., Hurme M., Lehtimäki T.. Polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene affects CRP levels in plasma and one early marker of atherosclerosis in men: The Health 2000 Survey. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2011. – V.71. – Issue 5. – P.353-361.
339. Khadzhieva MB, Kamoeva SV, Ivanova AV, Abilev SK, Salnikova LE. Elastogenesis-Related Gene Polymorphisms and the Risk of Pelvic Organ Prolapse Development. // *Genetika.* – 2015. – Oct.; V.51. – Issue 10. – P.1191-1198. Russian.
340. Khandoga A.L., Pandey D., Welsch U., Brandl R., Siess W. GPR92/LPA₅ lysophosphatidate receptor mediates megakaryocytic cell shape change induced

- by human atherosclerotic plaques. // *Cardiovasc. Res.* – 2011. – V.90. – Issue 1. – P.157-164.
341. Kim D.-S., Jung D.-S., Park K.-H. et al. Histochemical and molecular genetic study of MELAS and MERF in Korean patients. // *J. Korean Med. Sci.* – 2002. V.17. – P.103-112.
342. Kirichenko T.V., Myasoedova V.A., Orekhova V.A., Ravani A.L., Nikitina N.A., Grechko A.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Phytoestrogen-Rich Natural Preparation for Treatment of Climacteric Syndrome and Atherosclerosis Prevention in Perimenopausal Women.// *Phytother. Res.* – 2017. – Aug.; 31(8). – 1209-1214. doi: 10.1002/ptr.5841.
343. Kjolby M., Andersen O.M., Breiderhoff T., Fjorback A.W., Pedersen K.M., Madsen P., Jansen P., Heeren J., Willnow T.E., Nykjaer A. Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. // *Cell Metab.* – 2010. – V.12. – Issue 3. – P.213-223.
344. Klimov A.N., Denisenko A.D., Popov A.V. Lipoprotein–antibody immune complexes. Their catabolism and role in foam cell formation. // *Atherosclerosis.* – 1985. – V.58. – P.1-5.
345. Klimov A.N., Denisenko A.D., Vinogradov A.G., Nagornev V.A., Pivovarova Y.I., Sitnikova O.D., Pleskov V.M. Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein–antibody autoimmune complex. // *Atherosclerosis.* – 1988. – V.74. – P.41-46.
346. Kobayashi Z., Tsunemi T., Miake H., Tanaka S., Watabiki S., Morokuma Y. A mother and a child with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) showing atrophy of the cerebrum, cerebellum and brainstem on magnetic resonance imaging (MRI). // *Intern. Med.* – 2005. – V.44. – Issue 4. – P.328-331.
347. Kocher O., Gabbiani G. Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. // *Human Pathol.* – 1986. – V.17. – P.875-880.

348. Kockx M.M., De Meyer G.R., Muhring J., Jacob W., Bult H., Herman A.G. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. // *Circulation*. – 1998. – V.97. – P.2307-2315.
349. Kolaković A., Zivković M., Radak D., Djurić T., Koncar I., Davidović L., Dincić D., Alavantić D., Stanković A. The association of ACE I/D gene polymorphism with severe carotid atherosclerosis in patients undergoing carotid endarterectomy. // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* – 2012. – V.13. – Issue 1. – P.141-147.
350. Kolačkov K, Łaczmański Ł, Lwow F, Ramsey D, Zdrojowy-Wełna A, Tupikowska M, Bednarek-Tupikowska G. The Frequencies of Haplotypes of FTO Gene Variants and Their Association with the Distribution of Body Fat in Non-Obese Poles. // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2016. – Jan.-Feb.; V.25. – Issue 1. – P.33-42. doi:10.17219/acem/60645.
351. Kong Q.P., Bandelt H.J., Sun C., Yao Y.G., Salas A., Achilli A., Wang C.Y., Zhong L., Zhu C.L., Wu S.F., Torroni A., Zhang Y.P. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. // *Hum. Mol. Genet.* – 2006. – V.15. – Issue 13. – P.2076-2086.
352. Kretowski A., Hokanson J.E., McFann K., Kinney G.L., Snell-Bergeon J.K., Maahs D.M., Wadwa R.P., Eckel R.H., Ogden L.G., Garg S.K., Li J., Cheng S., Erlich H.A., Rewers M. The apolipoprotein A-IV Gln360His polymorphism predicts progression of coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes. // *Diabetologia*. – 2006. – V.49. – Issue 8. – P.1946-1954.
353. Kristiansson K., Ilveskoski E., Lehtimäki T., Peltonen L., Perola M., Karhunen P.J. Association analysis of allelic variants of USF1 in coronary atherosclerosis. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – V.28. – Issue 5. – P.983-989.
354. Kronenberg F., Steinmetz A., Kostner G.M., Doeplinger H. Lipoprotein (a) in health and disease. // *Clin. Rev. Clin. Lab. Sci.* – 1996. – V.36. – P.495-543.

355. Kumar R., Nejatizadeh A., Gupta M., Markan A., Tyagi S., Jain S.K., Pasha M.A.. The epistasis between vascular homeostasis genes is apparent in essential hypertension. // *Atherosclerosis*. – 2012. – V.220. – Issue 2. – P.418-424.
356. Kuo C.-C., Grayston J.T., Campbell L.A. , Goo Y,A., Wissler R,W,, Benditt E,P. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Jul.18; V.92. – P.6911-6914.
357. Kurabayashi M., Sakuma I., Kawamori R., Daida H., Yamazaki T., Yoshida M., Hata M., Masuda I., Kaku K., Yokoi H., Kishimoto J., Nohara R. Can intensive lipid-lowering therapy with statins ameliorate atherosclerosis in Japanese patients? Rationale and design of the JART study. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2010. – V.17. – Issue 4. – P.416-422.
358. Lai L.P., Tsai C.C., Su M.J., Lin J.L., Chen Y.S., Tseng Y.Z., Huang S.K. Atrial fibrillation is associated with accumulation of aging-related common type mitochondrial DNA deletion mutation in human atrial tissue. // *Chest*. – 2003. – V.123. – Issue 2. – P.539-544.
359. Lamina C., Coassin S., Illig T., Kronenberg F. Look beyond one's own nose: combination of information from publicly available sources reveals an association of GATA4 polymorphisms with plasma triglycerides. // *Atherosclerosis*. – 2011. – V.219. – Issue 2. – P.698-703.
360. Lamon-Fava S., Herrington D.M., Horvath K.V., Schaefer E.J., Asztalos B.F.. Effect of hormone replacement therapy on plasma lipoprotein levels and coronary atherosclerosis progression in postmenopausal women according to type 2 diabetes mellitus status. // *Metabolism*. – 2010. – V.59. – Issue 12. – P.1794-1800.
361. Lane D.A., Grant P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. // *Blood*. – 2000. – V.95. – Issue 5. – P.1517-1532.
362. Lau P., Nixon S.J., Parton R.G., Muscat G.E. RORalpha regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: caveolin-3 and CPT-1 are direct targets of ROR. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V.279. – Issue 35. – P.36828-36840.

363. Laurila P.P., Naukkarinen J., Kristiansson K., Ripatti S., Kauttu T., Silander K., Salomaa V., Perola M., Karhunen P.J., Barter P.J., Ehnholm C., Peltonen L. Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – V.30. – Issue 2. – P. 346-352.
364. Lee C.D., Sui X., Blair S.N. Combined effects of cardiorespiratory fitness, not smoking, and normal waist girth on morbidity and mortality in men. // *Arch. Intern. Med.* – 2009. – V.169. – Issue 22. – P.2096-2101.
365. Lee C.R., North K.E., Bray M.S., Avery C.L., Mosher M.J., Couper D.J., Coresh J., Folsom A.R., Boerwinkle E., Heiss G., Zeldin D.C. NOS3 polymorphisms, cigarette smoking, and cardiovascular disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities study. // *Pharmacogenet. Genomics.* – 2006. – V.16. – Issue 12. – P.891-899.
366. Leinonen M., Saikku P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. // *Lancet Infect. Dis.* – 2002. – V.2. – P.11-17.
367. Leo-Kottler B., Luberichs J., Besch D., Christ-Adler M., Fauser S. Leber's hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic results in a patient with a point mutation at np T11253C (isoleucine to threonine) in the ND4 gene and spontaneous recovery. // *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2002. – V.240. – Issue 9. – P.758-764.
368. Li M., Schönberg A., Schaefer M., Schroeder R., Nasidze I., Stoneking M. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2010. – Aug. 13; V.87. – Issue 2. – P.237-249.
369. Li R., Xing G., Yan M., Cao X., Liu X.Z., Bu X., Guan M.X. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2004. – V.124A. – Issue 2. – P.113-117.
370. Li Z., Li R., Chen J., Liao Z., Zhu Y., Qian Y., Xiong S., Heman-Ackah S., Wu J., Choo D.I., Guan M.X. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA

- gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. // *Hum. Genet.* – 2005. – V.117. – Issue 1. – P.9-15.
371. Li Z., Liu Y., Yang L., Wang S., Guan M.X. Maternally inherited hypertension is associated with the mitochondrial tRNA(Ile) A4295G mutation in a Chinese family. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V.367. – Issue 4. – P.906-911.
372. Liang M.H., Wong L.J. Yield of mtDNA mutation analysis in 2,000 patients. // *Am. J. Med. Genet.* – 1998. – V.77. – Issue 5. – P.395-400.
373. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. // *Nature.* – 2002. – V.420. – P.868-874.
374. Lin J., Zheng D.D., Tao Q., Yang J.H., Jiang W.P., Yang X.J., Song J.P., Jiang T.B., Li X. Two novel mutations of the MYBPC3 gene identified in Chinese families with hypertrophic cardiomyopathy. // *Can. J. Cardiol.* – 2010. – V.26. – Issue 10. – P.518-522.
375. Liu H., Peng Y., Liu F., Liu Y., Ouyang L., Xiao W., Cheng M., Chen X., Gao L. Correlation between endothelin-1 and atherosclerosis in chronic hemodialysis patients. // *J. Nephrol.* – 2010. – V.23. – Issue 5. – P.593-602.
376. Liu S., Song Y., Hu F.B., Niu T., Ma J., Gaziano M., Stampfer M.J. A prospective study of the APOA1 XmnI and APOC3 SstI polymorphisms in the APOA1/C3/A4 gene cluster and risk of incident myocardial infarction in men. // *Atherosclerosis.* – 2004. – V.177. – Issue 1. – P.119-126.
377. Liu Y., Zhuang S.L., Tong Y., Qu J., Zhou X.T., Zhao F.X., Zhang J.J., Zhang Y.M., Zhang Y., Guan M.X. Leber's hereditary optic neuropathy and limbs abnormality claudication may be associated with the mitochondrial ND1 T3866C mutation. // *Yi. Chuan.* – 2010. – V.32. – Issue 2. – P.141-147.
378. Löwik M.M., Hol F.A., Steenbergen E.J., Wetzels J.F., van den Heuvel L.P. Mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation in a patient with steroid-resistant nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2005. – V.20. – Issue 2. – P.336-341.

379. Lu Y., Feskens E.J., Boer J.M., Imholz S., Verschuren W.M., Wijmenga C., Vaarhorst A., Slagboom E., Müller M., Dollé M.E. Exploring genetic determinants of plasma total cholesterol levels and their predictive value in a longitudinal study. // *Atherosclerosis*. – 2010. – V.213. – Issue 1. – P.200-205.
380. Lyamichev V., Mast A.L., Hall J.G. Prudent J.R., Kaiser M.W., Takova T., Kwiatkowski R.W., Sander T.J., de Arruda M., Arco D.A., Neri B.P., Brow M.A. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. / *Nature Biotechnology*. – 1999. – V.17. – P.292-296.
381. Lynch A.I., Boerwinkle E., Davis B.R., Ford C.E., Eckfeldt J.H., Leiendecker-Foster C., Arnett D.K. Pharmacogenetic association of the NPPA T2238C genetic variant with cardiovascular disease outcomes in patients with hypertension. // *JAMA*. – 2008. – V.299. – Issue 3. – P.296-307.
382. Ma L., Wang H., Chen J., Jin W., Liu L., Ban B., Shen J., Hua Z., Chai J. Mitochondrial gene variation in type 2 diabetes mellitus: detection of a novel mutation associated with maternally inherited diabetes in a Chinese family. // *Chin. Med. J. (Engl)*. – 2000. – V.113. – Issue 2. – P.111-116.
383. Maahs D.M., Snell-Bergeon J.K., Hokanson J.E., Kinney G.L., Berl T., Rewers M., Ogden L.G. Relationship between cystatin C and coronary artery atherosclerosis progression differs by type 1 diabetes. // *Diabetes Technol. Ther.* – 2010. – V.12. – Issue 1. – P.25-33.
384. Machnicki M.M., Glodkowska-Mrowka E., Lewandowski T., Ploski R., Wlodarski P., Stoklosa T. ARMS-PCR for detection of BRAF V600E hotspot mutation in comparison with Real-Time PCR-based techniques. // *Acta Biochim. Pol.* – 2013. – V.60. – Issue 1. – P.57-64.
385. Mackey D.A., Oostra R.J., Rosenberg T., Nikoskelainen E., Bronte-Stewart J., Poulton J., Harding A.E., Govan G., Bolhuis P.A., Norby S. Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1996. – V.59. – Issue 2. – P.481-485.

386. Madjid M., Vela D., Khalili-Tabrizi H., Casscells S.W., Litovsky S. Systemic infections cause exaggerated local inflammation in atherosclerotic coronary arteries: clues to the triggering effect of acute infections on acute coronary syndromes. // *Tex. Heart Inst. J.* – 2007. – V.34. – P.11-18.
387. Mahmood U., Imran M., Naik S.I., Cheema H.A., Saeed A., Arshad M., Mahmood S. Detection of common mutations in the GALT gene through ARMS. // *Gene.* – 2012. – Nov.10; V.509. – Issue 2. – P.291-294. doi:10.1016/j.gene.2012.08.010.
388. Magnussen C.G., Raitakari O.T., Thomson R., Juonala M., Patel D.A., Viikari J.S., Marniemi J., Srinivasan S.R., Berenson G.S., Dwyer T., Venn A. Utility of currently recommended pediatric dyslipidemia classifications in predicting dyslipidemia in adulthood: evidence from the Childhood Determinants of Adult Health (CDAH) Study, Cardiovascular Risk in Young Finns Study, and Bogalusa Heart Study. // *Circulation.* – 2008. – V.117. – P.32-42.
389. Magnussen C.G., Venn A., Thomson R., Juonala M., Srinivasan S.R., Viikari J.S., Berenson G.S., Dwyer T., Raitakari O.T. The association of pediatric low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol dyslipidemia classifications and change in dyslipidemia status with carotid intimal-medial thickness in adulthood: evidence from the Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Bogalusa Heart Study, and the CDAH (Childhood Determinants of Adult Health) Study. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2009. – V.53. – P.860-869.
390. Malhi R.S., Cybulski J.S., Tito R.Y., Johnson J., Harry H., Dan C. Brief communication: mitochondrial haplotype C4c confirmed as a founding genome in the Americas. // *Am. J. Phys. Anthropol.* – 2010. – Mar.; V.141. – Issue 3. – P.494-497. doi:10.1002/ajpa.21238.
391. 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. – V.72. – Issue 2. – P.333-339.

392. Mancuso M., Ferraris S., Nishigaki Y., Azan G., Mauro A., Sammarco P., Krishna S., Tay S.K., Bonilla E., Romansky S.G., Hirano M., DiMauro S. Congenital or late-onset myopathy in patients with the T14709C mtDNA mutation. // *J. Neurol. Sci.* – 2005. – V.228. – Issue 1. – P.93-97.
393. Mancuso M., Vives-Bauza C., Filosto M., Marti R., Solano A., Montoya J., Gamez J., DiMauro S., Andreu A.L. A mitochondrial DNA duplication as a marker of skeletal muscle specific mutations in the mitochondrial genome. // *J. Med. Genet.* – 2004. – V.41. – Issue 6. – P.73-82.
394. Mandrup-Poulsen T., Owerbach D., Nerup J., Johansen K., Tybjaerg Hansen A. Diabetes mellitus, atherosclerosis, and the 5' flanking polymorphism of the human insulin gene. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1986. – V.9. – Issue 1. – P.98-110.
395. Manichaikul A., Palmas W., Rodriguez C.J., Peralta C.A., Divers J., Guo X., Chen W.M., Wong Q., Williams K., Kerr K.F., Taylor K.D., Tsai M.Y., Goodarzi M.O., Sale M.M., Diez-Roux A.V., Rich S.S., Rotter J.I., Mychaleckyj J.C. Population structure of Hispanics in the United States: the multi-ethnic study of atherosclerosis. // *PLoS Genet.* – 2012. – V.8. – Issue 4. – e1002640.
396. Mardis E.R. Next-generation DNA sequencing methods. // *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2008. – V.9. – P.387-402.
397. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. // *Nature.* – 2005. – V.437. – P.376-380.
398. Martins e Silva J., Saldanha C. Diet, atherosclerosis and atherothrombotic events. // *Rev. Port. Cardiol.* – 2007. – V.26. – Issue 3. – P.277-294.
399. Marzoll A., Nagy N., Wördehoff L., Dai G., Fries S., Lindner V., Grosser T., Fischer J.W. Cyclooxygenase inhibitors repress vascular hyaluronan-synthesis in murine atherosclerosis and neointimal thickening. // *J. Cell. Mol. Med.* – 2009. – V.13. – Issue 9B. – P.3713-3719.
400. Mashima Y., Kigasawa K., Hasegawa H., Tani M., Oguchi Y. High incidence of pre-excitation syndrome in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Clin. Genet.* – 1996. – V.50. – Issue 6. – P.535-537.

401. Mathur R.K. Role of diabetes, hypertension, and cigarette smoking on atherosclerosis. // *J. Cardiovasc. Dis. Res.* – 2010. – V.1. – Issue 2. – P.64-68.
402. Matsunaga H., Tanaka Y., Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Nomiya T., Ogawa O., Ogihara T., Yamada Y., Yagi K., Kawamori R. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes. // *Diabetes Care.* – 2001. – V.24. – Issue 3. – P.500-503.
403. Mazzone A., De Servi S., Ricevuti G., Mazzuchelli I., Fossati G., Passoti D., Dramuchi E. Increased expression of neutrophils and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. // *Circulation.* – 1993. – V.88. – P.358-363.
404. McCaffrey T.A., Consigli S., Du B., Falcone D.J., Sanborn T.A., Spokojny A.M., Bush H.L. Jr. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. // *J. Clin. Invest.* – 1995. – V.96. – Issue 6. – P.2667-2675.
405. McGill H.C., Herderick E.E., McMahan C.A., Zieske A.W., Malcolm G.T., Tracy R.E., Strong J.P. Atherosclerosis in youth. // *Minerva Pediatr.* – 2002. – V.54. – Issue 5. – P.437-447.
406. McGill H.C., McMahan C.A., Herderick E.E., Tracy R.E., Malcolm G.T., Zieske A.W., Strong J.P. Effects of coronary heart disease risk factors on atherosclerosis of selected regions of the aorta and right coronary artery. PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – V.20. – Issue 3. – P.836-845.
407. McGill H.C. Jr., Strong J.P. The geographic pathology of atherosclerosis. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1968. – V.149. – P.923-927.
408. McMahan C.A., Gidding S.S., Fayad Z.A., Zieske A.W., Malcolm G.T., Tracy R.E., Strong J.P., McGill H.C. Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. // *Arch. Intern. Med.* – 2005. – V.165. – Issue 8. – P.883-890.
409. McNamara J.J., Molot M.A., Stremple J.F., Cutting R.T. Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. // *J.A.M.A.* – 1971. – V.216. – P.1185-1187.

410. Mehta N.N., Krishnamoorthy P., Martin S.S, St Clair C., Schwartz S., Iqbal N., Braunstein S., Schutta M., Rader D.J., Reilly M.P. Usefulness of insulin resistance estimation and the metabolic syndrome in predicting coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus. // *Am. J. Cardiol.* – 2011. – V.107. – Issue 3. – P.406-411.
411. Melchionna R., Porcelli D., Mangoni A., Carlini D., Liuzzo G., Spinetti G., Antonini A., Capogrossi M.C., Napolitano M. Laminar shear stress inhibits CXCR4 expression on endothelial cells: functional consequences for atherogenesis. // *FASEB J.* – 2005. – V.19. – Issue 6. – P.629-631.
412. Merante F., Tein I., Benson L., Robinson B.H. Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA-glycine gene. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1994. – V.55. – P.437-446.
413. Mezghani N., Mnif M., Mkaouar-Rebai E., Kallel N., Salem I.H., Charfi N., Abid M., Fakhfakh F. The mitochondrial ND1 m.3337G>A mutation associated to multiple mitochondrial DNA deletions in a patient with Wolfram syndrome and cardiomyopathy. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. – V.411. – Issue 2. – P.247-252.
414. Mizuno F, Gojobori J, Wang L, Onishi K, Sugiyama S, Granados J, Gomez-Trejo C, Acuña-Alonzo V, Ueda S. Complete mitogenome analysis of indigenous populations in Mexico: its relevance for the origin of Mesoamericans. // *J. Hum. Genet.* – 2014. – Jul.; V.59. – Issue 7. – P.359-367. doi:10.1038/jhg.2014.35.
415. Minick C.R. Endothelial cell abnormalities. // *Mt. Sinai. J. Med.* – 1982. – V.49. – P.194-207.
416. Minick C.R., Stemerman M.B., Insull W Jr. Role of endothelium and hypercholesterolemia in intimal thickening and lipid accumulation. // *Am. J. Pathol.* – 1979. – V.95. – P.131-158.
417. Mkaouar-Rebai E., Tlili A., Masmoudi S., Charfeddine I., Fakhfakh F. New polymorphic mtDNA restriction site in the 12S rRNA gene detected in Tunisian

- patients with non-syndromic hearing loss. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V.369. – Issue 3. – P.849-852.
418. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – V.8. – P.958-969.
419. Morre S.A., Stoker W., Lagrand W.K. Microorganism in the aetiology of atherosclerosis. // *J. Clin. Pathol.* – 2000. – V.53. – P.647-654.
420. Morrison A.C., Bray M.S., Folsom A.R., Boerwinkle E. ADD1 460W allele associated with cardiovascular disease in hypertensive individuals. // *Hypertension.* – 2002. – V.39. – Issue 6. – P.1053-1057.
421. Morten K.J., Cooper J.M., Brown G.K., Lake B.D., Pike D., Poulton J. A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. // *Hum. Mol. Genet.* – 1993. – V.2. – Issue 12. – P.2081-2087.
422. Mozar H.N., Bal D.G., Farag S.A. The natural history of atherosclerosis: an ecologic perspective. // *Atherosclerosis.* – 1990. – V.82. – Issue 1-2. – P.157-164.
423. Muendlein A., Saely C.H., Marte T., Schmid F., Koch L., Rein P., Langer P., Aczel S., Drexel H. Synergistic effects of the apolipoprotein E epsilon3/epsilon2/epsilon4, the cholesteryl ester transfer protein TaqIB, and the apolipoprotein C3 -482 C>T polymorphisms on their association with coronary artery disease. // *Atherosclerosis.* – 2008. – V.199. – Issue 1. – P.179-186.
424. Mukae S., Aoki S., Itoh S., Sato R., Nishio K., Iwata T., Katagiri T. Mitochondrial 5178A/C genotype is associated with acute myocardial infarction. // *Circ. J.* – 2003. – V.67. – Issue 1. – P.16-20.
425. Munro J.M., Cotran R.S. Biology of disease. The pathogenesis of atherosclerosis; atherogenesis and inflammation. // *Lab. Invest.* – 1988. – V.58. – P.249-261.
426. Munshi A., Sharma V., Kaul S., Rajeshwar K., Babu M.S., Shafi G., Anila A.N., Balakrishna N., Alladi S., Jyothy A. Association of the -344C/T aldosterone synthase (CYP11B2) gene variant with hypertension and stroke. // *J. Neurol. Sci.* – 2010. – V.296. – Issue 1-2. – P.34-38.

427. Myasoedova V.A., Kirichenko T.V., Melnichenko A.A., Orekhova V.A., Ravani A., Poggio P., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Anti-Atherosclerotic Effects of a Phytoestrogen-Rich Herbal Preparation in Postmenopausal Women. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Aug.11;17(8). pii: E1318. doi: 10.3390/ijms17081318.
428. Nagai T., Ogimoto A., Okayama H., Ohtsuka T., Shigematsu Y., Hamada M., Miki T., Higaki J. A985G polymorphism of the endothelin-2 gene and atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. // *Circ. J.* – 2007. – V.71. – Issue 12. – P.1932-1936.
429. Nagornev V.A., Maltseva S.V. The phenotype of macrophages which are not transformed into foam cells in atherogenesis. // *Atherosclerosis.* – 1996. – V.121. – P.245-251.
430. Naini A.B., Lu J., Kaufmann P., Bernstein R.A., Mancuso M., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S. Novel mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. // *Arch. Neurol.* – 2005. – V.62. – Issue 3. – P.473-476.
431. Nakagawa Y., Ikeda K., Akakabe Y., Koide M., Uraoka M., Yutaka K.T., Kurimoto-Nakano R., Takahashi T., Matoba S., Yamada H., Okigaki M., Matsubara H. Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – V.30. – Issue 10. – P.1908-1915.
432. Nakagawa Y., Ikegami H., Yamato E., Takekawa K., Fujisawa T., Hamada Y., Ueda H., Uchigata Y., Miki T., Kumahara Y. A new mitochondrial DNA mutation associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. – V.209. – Issue 2. – P.664-668.
433. Natori S., Lai S., Finn J.P., Gomes A.S., Hundley W.G., Jerosch-Herold M., Pearson G., Sinha S., Arai A., Lima J.A., Bluemke D.A. Cardiovascular function in multi-ethnic study of atherosclerosis: normal values by age, sex, and ethnicity. // *AJR Am. J. Roentgenol.* – 2006. – V.186. – Issue 6. – P.357-365.

434. Naue J., Sanger T., Schmidt U., Klein R., Lutz-Bonengel S. Factors affecting the detection and quantification of mitochondrial point heteroplasmy using Sanger sequencing and SNaPshot minisequencing. // *Int. J. Legal. Med.* – 2011. – V.125. – Issue 3. – P.427-436.
435. Nemoto M., Nishimura R., Sasaki T., Hiki Y., Miyashita Y., Nishioka M., Fujimoto K., Sakuma T., Ohashi T., Fukuda K., Eto Y., Tajima N. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography. // *Cardiovasc. Diabetol.* – 2007. – V.6. – P.23-30.
436. Newton C. R., A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith, and A. F. Markham. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). // *Nucleic. Acids Res.* – 1989. – April 11; V.17. – Issue 7. – P.2503–2516.
437. Newton C.R., Summers C., Schwarz M.J. et al. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assesment in cystic fibrosis. // *Lancet.* – 1989. – Dec.23-30; V.2. – Issue 8678-8679. – P.1481-1483.
438. Nikoskelainen E., Wanne O., Dahl M. Pre-excitation syndrome and Leber's hereditary optic neuroretinopathy. // *Lancet.* – 1985. – V.1. – Issue 8430. – P.696-707.
439. Nishigaki Y., Martí R., Copeland W.C., Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. // *J. Clin Invest.* - 2003. –Jun.; V.111. – Issue 12. – P.1913-1921.
440. Nomiyama T., Tanaka Y., Piao L., Hattori N., Uchino H., Watada H., Kawamori R., Ohta S. Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA and atherosclerosis in diabetic patients. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – V.1011. – P.193-204.
441. Nuntharatanapong N., Chen K., Sinhaseni P., Keaney J.F. Jr. EGF receptor-dependent JNK activation is involved in arsenite-induced p21Cip1/Waf1 upregulation and endothelial apoptosis. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2005. – V.289. – Issue 1. – P.99-107.

442. Oeseburg H., Westenbrink B.D., de Boer R.A., van Gilst W.H., van der Harst P. Can critically short telomeres cause functional exhaustion of progenitor cells in postinfarction heart failure? // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – V.50. – P.1909-1913.
443. Okuda K., Bardeguet A., Gardner J.P., Rodriguez P., Ganesh V., Kimura M., Skurnick J., Awad G., Aviv A. Telomere length in the newborn. // *Pediatr. Res.* – 2002. – V.52. – P.377-381.
444. Ono T., Isobe K., Nakada K., Hayashi J.I. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. // *Nature Genetics.* – 2001. – V.28. – P.272-275.
445. Olivier M. The Invader® assay for SNP genotyping. // *Mutat Res.* – 2005. – June 3; V.573. – Issue 1-2. – P.103–110.
446. Orekhov A.N., Sobenin I.A., Sazonova M.A., Zhelankin A.V. Atherogenic mitochondrial mutations.// *Journal of World Mitochondrial Society.* – 2015. –V.1. – P.148.
447. Orekhov AN, Melnichenko AA, Sobenin IA. Approach to reduction of blood atherogenicity.// *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2014. – V.2014. – 738679. doi: 10.1155/2014/738679.
448. Orgel L.E. Ageing of clones of mammalian cells. // *Nature.* – 1973. – Jun. 22; V.243. – Issue 5408. – P.441-445. Review.
449. Orlandi A., Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G., Spagnoli L.G. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. // *Atherosclerosis.* – 2006. – V.188. – P.221-230.
450. Osborn M., Caselitz J., Püschel K., Weber K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. // *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* – 1987. – V.411. – P.449-458.
451. Ota Y., Tanaka M., Sato W., Ohno K., Yamamoto T., Maehara M., Negoro T., Watanabe K., Awaya S., Ozawa T. Detection of platelet mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1991. – V.32. – Issue 10. – P.2667-2675.

452. Owens G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. // *Physiol Rev.* – 1995. – V.75. – P.487-517.
453. Packard R.R., Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. // *Clin Chem.* – 2008. – V.54. – Issue 1. – P.24-38.
454. Pávková Goldbergová M., Spinarová L., Spinar J., Pařenica J., Sišková L., Groch L., Máchal J., Vašků A. Difference in angiotensinogen haplotype frequencies between chronic heart failure and advanced atherosclerosis patients - new prognostic factor? // *Physiol. Res.* – 2011. – V.60. – Issue 1. – P.55-64.
455. Peiretti F, Canault M., Morange P., Alessi M.C., Nalbhone G. The two sides of ADAM17 in inflammation: implications in atherosclerosis and obesity. // *Med. Sci. (Paris).* – 2009. – V.25. – Issue 1. – P.45-50.
456. Pernow J., Shemyakin A., Böhm F. New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus. // *Life Sci.* - 2012. – V.91. – Issue 13-14. – P.507-516.
457. Pham Y., Tu Y., Wu T., Allen T.J., Calkin A.C., Watson A.M., Li J., Jandeleit-Dahm K.A., Toh B.H., Cao Z., Cooper M.E., Chai Z. Cell division autoantigen 1 plays a profibrotic role by modulating downstream signalling of TGF-beta in a murine diabetic model of atherosclerosis. // *Diabetologia.* – 2010. – V.53. – Issue 1. – P.170-179.
458. Pinto A., Di Raimondo D., Tuttolomondo A., Buttà C., Milio G., Licata G. Effects of Physical Exercise on Inflammatory Markers of Atherosclerosis. // *Curr. Pharm. Des.* – 2012. – V.18. – Issue 28. – P.4326-4349.
459. Pinto J.R., Siegfried J.D., Parvatiyar M.S., Li D., Norton N., Jones M.A., Liang J., Potter J.D., Hershberger R.E. Functional characterization of TNNC1 rare variants identified in dilated cardiomyopathy. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V.286. – Issue 39. – P.34404-34412.
460. Piřha J., Hubáček J.A., Piřhová P. The connexin 37 (1019C>T) gene polymorphism is associated with subclinical atherosclerosis in women with type 1

- and 2 diabetes and in women with central obesity. // *Physiol. Res.* – 2010. – V.59. – Issue 6. – P.1029-1032.
461. Polgár N., Járomi L., Csöngéi V., Maász A., Sipeky C., Sáfrány E., Szabó M., Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALTN2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. // *Eur. J. Neurol.* – 2010. – V.17. – Issue 8. – P.1033-1039.
462. Pollin T.I., Damcott C.M., Shen H., Ott S.H., Shelton J., Horenstein R.B., Post W., McLenithan J.C., Bielak L.F., Peyser P.A., Mitchell B.D., Miller M., O'Connell J.R., Shuldiner A.R. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. // *Science.* – 2008. – V.322. – Issue 5908. – P.1702-1705.
463. Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis. // *Atherosclerosis Suppl.* – 2007. – V.8. – Issue 1. – P.46.
doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5688\(07\)71126-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5688(07)71126-1)
464. Pulkes T., Siddiqui A., Morgan-Hughes J.A., Hanna M.G. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Tyr) gene associated with exercise intolerance. // *Neurology.* – 2000. – V.55. – Issue 8. – P.1210-1212.
465. Puomila A., Viitanen T., Savontaus M.L., Nikoskelainen E., Huoponen K. Segregation of the ND4/11778 and the ND1/3460 mutations in four heteroplasmic LHON families. // *J. Neurol. Sci.* – 2002. – V.205. – Issue 1. – P.41-45.
466. Qiu P., Shandilya H., D'Alessio J.M., O'Connor K., Durocher J., Gerard G.F. Mutation detection using Surveyor nuclease. // *Biotechniques.* – 2004. – V.36. – P.702–707.
467. Rahman S., Taanman J.W., Cooper J.M., Nelson I., Hargreaves I., Meunier B., Hanna M.G., García J.J., Capaldi R.A., Lake B.D., Leonard J.V., Schapira A.H. A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. – V.65. – Issue 4. – P.1030-1039.

468. Rakesh K., Agrawal D.K. Cytokines and growth factors involved in apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. // *Int. Immunopharmacol.* – 2005. – V.5. – P.1487-1506.
469. Reardon W., Ross R.J., Sweeney M.G., Luxon L.M., Pembrey M.E., Harding A.E., Trembath RC. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. // *Lancet.* – 1992. – V.340. – Issue 8832. – P.1376-1379.
470. Reitter A., Fischer D., Buxmann H., Nitschke Y., Rutsch F., Mottok A., Hansmann M.L., Harms E., Louwen F., Schlosser R. Fetal hydrops, hyperechogenic arteries and pathological doppler findings at 29 weeks: prenatal presentation of generalized arterial calcification of infancy - a novel mutation in ENPP1. // *Fetal. Diagn. Ther.* – 2009. – V.25. – Issue 2. – P.264-268.
471. Riordan-Eva P., Sanders M.D., Govan G.G., Sweeney M.G., Da Costa J., Harding A.E. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. // *Brain.* – 1995. – V.118. – Issue 2. – P.319-337.
472. Roder C., Peters V., Kasuya H., Nishizawa T., Takehara Y., Berg D., Schulte C., Khan N., Tatagiba M., Krischek B. Common genetic polymorphisms in moyamoya and atherosclerotic disease in Europeans. // *Childs. Nerv. Syst.* – 2011. – V.27. – Issue 2. – P.245-252.
473. Rokitansky C. von. A manual of pathological anatomy. // Sydenham, London. – 1952. – V.4.
474. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. // *Genome Reseach.* – 2001. – V.11. – P.3-11.
475. Ronghua Li, Yuqi Liu, Zongbin Li, Li Yang, Shiwen Wang, Min-Xin Guan. Failures in Mitochondrial tRNAMet and tRNAGln Metabolism Caused by the Novel 4401A>G Mutation Are Involved in Essential Hypertension in a Han Chinese Family. // *Hypertension.* – 2009. – V.54. – Issue 2. – P.329-337.
476. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. // *N. Engl. J. Med.* – 1999. – V.340. – P.115-126.

477. Ross R., Glomset J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. // *Science*. – 1973. – V.180. – P.1332-1339.
478. Ross R., Glomset J.A. The pathogenesis of atherosclerosis // *N. Engl. J. Med.* – 1976. – V.295. – P.369-377.
479. Ross R., Glomset J., Harker L. Response to injury and atherogenesis. // *Am J. Pathol.* – 1997. – V.86. – P.675-684.
480. Rufer N., Brümmendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. // *J. Exp. Med.* - 1999. – V.190. – P.157-167.
481. Ruiter E.M., Siers M.H, van den Elzen C., van Engelen B.G., Smeitink J.A., Rodenburg R.J., Hol F.A. The mitochondrial 13513G>A mutation is most frequent in Leigh syndrome combined with reduced complex I activity, optic atrophy and/or Wolff-Parkinson-White. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2007. – V.15. – Issue 2. – P.155-161.
482. Ryzhkova A.I., Sazonova M.A., Sinyov V.V., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Trubinov S..S, Nikitina N.N., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Analysis of heteroplasmy in mitochondrial mutation m.C5178A in gene of subunit 2 of NADH dehydrogenase in homogenates of affected by atherosclerosis aortic intima.// *Atherosclerosis*. – 2015. – V. 241. – Issue 1. – e73.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.253>
483. Ryzhkova A., Sazonova M., Sinyov V., Galitsyna E., Barinova V., Nikitina N., Sobenin I., Orekhov A.. Detection of threshold heteroplasmy level of mtDNA in lipofibrous plaques of human aortic intima.// *Atherosclerosis*. – 2016. – V.252. – e80. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.497>
484. Sawabe M., Arai T., Araki A., Hosoi T., Kuchiba A., Tanaka N., Naito T., Oda K., Ikeda S., Muramatsu M. Smoking confers a MTHFR 677C>T genotype-dependent risk for systemic atherosclerosis: results from a large number of elderly

- autopsy cases that died in a community-based general geriatric hospital. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2009. – V.16. – Issue 2. – P.91-104.
485. Saika Y., Sakai N., Takahashi M., Maruyama T., Kihara S., Ouchi N., Ishigami M., Hiraoka H., Nakamura T., Yamashita S., Matsuzawa Y. Novel LPL mutation (L303F) found in a patient associated with coronary artery disease and severe systemic atherosclerosis. // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2003. – V.33. – Issue 3. – P.216-222.
486. Salonen R., Nyssonen K., Porkkala E., Rummukainen J., Belder R., Park J.S., Salonen J.T. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. // *Circulation.* – 1995. – V.92. – P.1758-1764.
487. Samani N.J., Braund P.S., Erdmann J., Götz A., Tomaszewski M., Linsel-Nitschke P, Hajat C, Mangino M, Hengstenberg C, Stark K, Ziegler A, Caulfield M., Burton P.R., Schunkert H., Tobin M.D. The novel genetic variant predisposing to coronary artery disease in the region of the PSRC1 and CELSR2 genes on chromosome 1 associates with serum cholesterol. // *J. Mol. Med. (Berl).*– 2008. – V.86. – Issue 11. – P.1233-1241.
488. Sans M, Figueiro G, Hughes CE, Lindo J, Hidalgo PC, Malhi RS. A South American Prehistoric Mitogenome: Context, Continuity, and the Origin of Haplogroup C1d. // *PLoS One.* – 2015. – Oct. 28; V.10. – Issue 10. – e0141808. doi:10.1371/journal.pone.0141808.eCollection 2015.
489. Santorelli F.M., Mak S.C., El-Schahawi M., Casali C., Shanske S., Baram T.Z., Madrid R.E., DiMauro S. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene (G8363A). // *Am. J. Hum. Genet.* – 1996. – V.58. – Issue 5. – P.933-939.
490. Satomura K., Mizuno K., Shibuya T. Prevention of progression of coronary atherosclerosis by drug and diet therapy. // *Nihon. Ronen. Igakkai. Zasshi.* – 1990. – V.27. – Issue 4. – P.438-441.

491. Sato W., Tanaka M., Ohno K., Yamamoto T., Takada G., Ozawa T. Multiple populations of deleted mitochondrial DNA detected by a novel gene amplification method. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. – 31 July; V.162. – Issue 2. – P.664-672.
492. Saukko M, Kesäniemi YA, Ukkola O. Leptin receptor Lys109Arg and Gln223Arg polymorphisms are associated with early atherosclerosis. // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* – 2010. – V.8. – Issue 5. – P.425-430.
493. 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. // *Atherosclerosis Suppl.* – 2007. – V.8. – Issue 1. – P.45-46. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5688\(07\)71125-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5688(07)71125-X)
494. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Alexandra A. Melnichenko A.A., Demakova N.A., Bobryshev Y.V., Shkurat T.P., Orekhov A.N. Ultrastructural analysis of mitochondrial cristae in leukocytes of patients with atherosclerosis.// *Atherosclerosis.* – 2017. – V.263. – e281. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.906>
495. Sazonova M., Budnikov E., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A., Orekhov A. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. // *Atherosclerosis.* – 2009. – V.204. – Issue 1. – P.184-190. (Epub 2009 Sep 4). doi: [10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001).
496. Sazonova M.A., Budnikov Ye. Ye., Khazanova Z.B., Postnov A.Yu., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Possible role of somatic mitochondrial mutations in the development of atherosclerotic lesion of human aorta. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. - V.51. – Issue 10. – Suppl.A. – A285.
497. Sazonova M.A., Ivanova M.M., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Korobov G.A., Postnov A.Y., Sobenin I.A. Mutations of mitochondrial genes of subunits 1, 2, 5 and 6 of NADH dehydrogenase are associated with atherosclerotic lipofibrous plaques // 80st Congress of the European Atherosclerosis Society, Milan, Italy. – 2012, May 25-28. – Interactive poster session. – Abstr. № 986.

498. Sazonova M.A., Zhelankin A.V., Ivanova M.M., Korobov G.A., Mitrofanov K.Y., Postnov A.Y., Sobenin I.A. Detection of mutations G14846A and G15059A of gene coding cytochrome B in lipofibrous plaques in intima of human aortas // 80st Congress of the European Atherosclerosis Society, Milan, Italy. – 2012, May 25-28. – Interactive poster session. – Abstr. № 991.
499. Sazonova M.A., Chicheva M.M., Balanovsky O.P., Balanovska E.V., Postnov A.Y., Orekhov A.N., Sobenin I.A.. The frequencies of mitochondrial haplogroups U, T and M are different in atherosclerotic and non-atherosclerotic subjects. // 81st Congress of the European Atherosclerosis Society, Lyon, France. – 2013. – June 2-5; Interactive poster session. – Abstr. №1226.
500. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Mitrofanov K.Yu., Bobryshev Yu.V. , Postnov A.Yu. , Sobenin I.A., Orekhov A.N. Analysis of heteroplasmy level in mitochondrial genome mutations of morphologically mapped aortic wall.// 82nd European Atherosclerosis Society Congress, Madrid, Spain. – 2014, May 31 – June 3. – poster presentation with discussion.
501. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Barinova V.A., Ryzhkova A.I., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Association of mitochondrial mutations with the age of patients having atherosclerotic lesions.// *Exp. Mol. Pathol.* 2015 Nov. 14;99(3):717-719. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.019.
502. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Barinova V.A., Ryzhkova A.I., Zhelankin A.V., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V. and Orekhov A.N.. Mosaicism of Mitochondrial Genetic Variation in Atherosclerotic Lesions of the Human Aorta.// *Biomed. Res. Int.* – 2015. – V.2015. – 825468. doi:10.1155/2015/825468.
503. Sazonova M.A., Sinyov V.V. , Ryzhkova A.I., Barinova V.A., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Atherosclerosis and ageing: common mutations of mitochondrial genome.// *Atherosclerosis.* – 2015. – V.241. – Issue 1. – e228.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.1063>
504. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Khasanova Z.B., Postnov A. Yu., Yarygina E.I., Orekhov A.N., Sobenin I.A.. Role of

- Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis.//
Oxid. Med. Cell. Longev. – 2017. – V.2017. – 6934394.
doi: 10.1155/2017/6934394. Epub 2017 Jul 25.
505. Sazonova M.A., Postnov A.Yu., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. 2nd International Conference on Heart & Brain – ICHB, Paris, France, February 27 – March 1, 2014. E-Poster presentation.
506. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Electron microscopic analysis of mitochondria from atherosclerotic plaques.//
Atherosclerosis. – 2017. – V.263. – e280.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.905>
507. Schäfer A., Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2008. – V.6. – P.52-60.
508. Scheer W.D., Boudreau DA., Hixson J.E., McGill H.C., Newman W.P. 3rd, Tracy R.E., Zieske A.W., Strong J.P. ACE insert/delete polymorphism and atherosclerosis. // Atherosclerosis. – 2005. – V.178. – Issue 2. – P.241-247.
509. Secher B, Fregel R, Larruga JM, Cabrera VM, Endicott P, Pestano JJ, González AM. The history of the North African mitochondrial DNA haplogroup U6 gene flow into the African, Eurasian and American continents. BMC Evol Biol. – 2014. – May 19; Issue 14. – P.109. doi:10.1186/1471-2148-14-109.
510. Shibata N., Glass C.K. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. // J. Lipid. Res. – 2009. – V.50. – Suppl. – P.S277-S281.
511. Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease. Heterogeneity of Leukocyte Subsets Participating in the Pathogenesis of Atherosclerosis. // Circ. J. – 2009. – V.73. – P.994-1001.
512. Schollen E., Vandenberk P., Cassiman J.J., Matthijs G. Development of reverse dot-blot system for screening of mitochondrial DNA mutations associated

- with Leber hereditary optic atrophy. // *Clin. Chem.* – 1997. – V.43. – Issue 1. – P.18-23.
513. Scholte A.J., Nucifora G., Delgado V., Djaber R., Boogers M.J., Schuijf J.D., Kharagjitsingh A.V., Jukema J.W., van der Wall E.E., Kroft L.J., de Roos A., Bax J.J. Subclinical left ventricular dysfunction and coronary atherosclerosis in asymptomatic patients with type 2 diabetes. // *Eur. J. Echocardiogr.* – 2011. – V.12. – Issue 2. – P.148-155.
514. Schreiner P.J., Heiss G., Tyroler H.A., Morrisett J.D., Davis C.E., Smith R. Race and gender differences in the association of Lp(a) with carotid artery wall thickness. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1996. – V.16. – Issue 3. – P.471-478.
515. Scott L., Kerr A., Haydock D., Merrilees M. Subendothelial proteoglycan synthesis and transforming growth factor beta distribution correlate with susceptibility to atherosclerosis. // *J. Vasc. Res.* – 1997. – V.34. – Issue 5. – P.365-377.
516. Seibel P., Lauber J., Klopstock T., Marsac C., Kadenbach B., Reichmann H. Chronic progressive external ophthalmoplegia is associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Asn) gene. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – V.204. – Issue 2. – P.482-489.
517. Silvestri G., Santorelli F.M., Shanske S., Whitley C.B., Schimmenti L.A., Smith S.A., DiMauro S. A new mtDNA mutation in the tRNA leu(UUR) gene is associated with maternally inherited cardiomyopathy. // *Hum. Mut.* – 1994. – V.3. – P.37-43.
518. Sima A.V., Stancu C.S., Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. // *Cell Tissue Res.* – 2009. – V.335. – P.191-203.
519. Shields K.J., Stolz D., Watkins S.C., Ahearn J.M. Complement proteins C3 and C4 bind to collagen and elastin in the vascular wall: a potential role in vascular stiffness and atherosclerosis. // *Clin. Transl. Sci.* – 2011. – V.4. – Issue 3. – P.146-152.

520. Shimoda Y., Satoh M., Nakamura M., Akatsu T., Hiramori K. Activated tumour necrosis factor-alpha shedding process is associated with in-hospital complication in patients with acute myocardial infarction. // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2005. – V.108. – Issue 4. – P.339-347.
521. Shin W.S., Tanaka M., Suzuki J., Hemmi C., Toyooka T. A novel homoplasmic mutation in mtDNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – V.67. – Issue 6. – P.1617-1620.
522. Singh R., Ellard S., Hattersley A., Harries L.W. Rapid and sensitive real-time polymerase chain reaction method for detection and quantification of 3243A>G mitochondrial point mutation. // *J. Mol. Diagn.* – 2006. – V.8. – Issue 2. – P.225-230.
523. Shirts B.H., Hasstedt S.J., Hopkins P.N., Hunt S.C. Evaluation of the gene-age interactions in HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglyceride levels: the impact of the SORT1 polymorphism on LDL cholesterol levels is age dependent. // *Atherosclerosis*. – 2011. – V.217. – Issue 1. – P.139-141.
524. Shivpuri S., Gallo L.C., Crouse J.R., Allison M.A. The association between chronic stress type and C-reactive protein in the multi-ethnic study of atherosclerosis: does gender make a difference? // *J. Behav. Med.* – 2012. – V.35. – Issue 1. – P.74-85.
525. Skoczynska A., Dobosz T., Poreba R., Turczyn B., Derkacz A., Zoledziewska M., Jonkisz A., Lebioda A. The dependence of serum interleukin-6 level on PPAR-alpha polymorphism in men with coronary atherosclerosis. // *Eur. J. Intern. Med.* – 2005. – V.16. – Issue 7. – P.501-506.
526. Snyder L.R., Kirkland J.J. and Glajch J.L. Practical HPLC Method Development. // New York: John Wiley & Sons. – 1997. – 747 p.
527. Sobenin I.A., Chistiakov D.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N., Postnov A.Y. Association of the level of heteroplasmy of the 15059G>A mutation in the MT-CYB mitochondrial gene with essential

- hypertension. // *World J. Cardiol.* – 2013. – May 26; V.5. – Issue 5. – P.132-140. doi:10.4330/wjc.v5.i5.132.
528. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Mitochondrial Mutations are Associated with Atherosclerotic Lesions in the Human Aorta. // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012. – V.2012. – 832464. doi: 10.1155/2012/832464
529. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. An association of mutations of mitochondrial DNA with aortic atherosclerotic lesions. // *Atherosclerosis Suppl.* – 2011. – V.12. – Issue 1. – P.68. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5688\(11\)70315-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5688(11)70315-4)
530. Sazonova MA, Ryzhkova AI, Sinyov VV, Galitsyna EV, Orekhova VA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Ravani AL, Sobenin IA. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations.// *Vessel Plus* 2017 Oct xx. [Online First]
531. Sobenin I.A., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Sinyov V.V., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. Mutations of Mitochondrial DNA in Atherosclerosis and Atherosclerosis-Related Diseases.// *Curr Pharm Des.* – 2015. – V.21(9). – P.1158-1163. Review.
532. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Zhelankin A.V., Myasoedova V.A., et al. Mutation C3256T of Mitochondrial Genome in White Blood Cells: Novel Genetic Marker of Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. // *PLoS One.* –2012. – V.7. – Issue 10. – e46573. doi:10.1371/journal.pone.0046573. Epub 2012 Oct 2.
533. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Changes of mitochondria in atherosclerosis: Possible determinant in the pathogenesis of the disease. // *Atherosclerosis.* – 2013. – Apr.; V.227. – Issue 2. – P.283-288. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.006.
534. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Salonen J.T., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mitochondrial genetic variation with carotid

- atherosclerosis. // PLoS One. – 2013. – Jul.9; V.8. – Issue 7. – e68070. doi:10.1371/journal.pone.0068070. Print 2013.
535. Sobenin I.A., Mitrofanov K.Y., Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Revin V.V., Bobryshev Y.V., Orekhov AN. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome: perspectives in diagnostics and methodological pitfalls.// Biomed. Res. Int. – 2014. – V.2014. – 292017. doi: 65.1155/2014/292017
536. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Orekhov A.N.. Mutations of mitochondrial genome and subclinical carotid atherosclerosis.// Atherosclerosis. – 2014. – V.235. – Issue 2. – e65. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.164>
537. Sobenin I.A., Myasoedova V.A., Anisimova E.V., Pavlova X.N., Möhlenkamp S., Schmermund A., Seibel R., Berenbein S., Lehmann N., Moebus S., Jöckel K., Orekhov A.N., Erbel R. Blood serum atherogenicity and coronary artery calcification.// Curr. Pharm. Des. – 2014. – V.20(37). – P.5884-5888.
538. Sobue K., Hayashi K., Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. // Mol. Cell. Biochem. – 1999. – V.190. – P.105-118.
539. Soemedi R., Topf A., Wilson I.J., Darlay R., Rahman T., Glen E., Hall D., Huang N., Bentham J., Bhattacharya S., Cosgrove C., Brook J. D., Granados-Riveron J., Setchfield K., Bu'lock F., Thornborough C., Devriendt K., Breckpot J., Hofbeck M., Lathrop M., Rauch A., Blue G.M., Winlaw D.S., Hurles M., Santibanez-Koref M., Cordell H.J., Goodship J.A., Keavney B.D. Phenotype-specific effect of chromosome 1q21.1 rearrangements and GJA5 duplications in 2436 congenital heart disease patients and 6760 controls. // Hum. Mol. Genet. – 2012. – V.21. – Issue 7. – P.1513-1520.
540. Solano A., Roig M., Vives-Bauza C., Hernandez-Peña J., Garcia-Arumi E., Playan A., Lopez-Perez M.J., Andreu A.L., Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. // Ann. Neurol. – 2003. – V.54. – Issue 4. – P.527-530.

541. Sosa M.X., Sivakumar I.K., Maragh S., Veeramachaneni V., Hariharan R., Parulekar M., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Lin J., Feldman A.B., Tata P., Ehret G.B., Chakravarti A. Next-generation sequencing of human mitochondrial reference genomes uncovers high heteroplasmy frequency. // *PLoS Comput. Biol.* – 2012. – V.8. – Issue 10. – e1002737. doi:10.1371/journal.pcbi.1002737
542. Srivastava A., Garg N., Mittal T., Khanna R., Gupta S., Seth P.K., Mittal B. Association of 25 bp deletion in MYBPC3 gene with left ventricle dysfunction in coronary artery disease patients. // *PLoS One.* – 2011. – V.6. – Issue 9. – e24123.
543. Starr B., Hadfield S.G., Hutten B.A., Lansberg P.J., Leren T.P., Damgaard D., Neil H.A., Humphries S.E. Development of sensitive and specific age- and gender-specific low-density lipoprotein cholesterol cutoffs for diagnosis of first-degree relatives with familial hypercholesterolaemia in cascade testing. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2008. – V.46. – Issue 6. – P.791-803.
544. Stenqvist L., Paetau A., Valanne L., Suomalainen A., Pihko H. A juvenile case of MELAS with T3271C mitochondrial DNA mutation. // *Pediatr. Res.* – 2005. – V.58. – Issue 2. – P.258-262.
545. Stemerman M.B. Effects of moderate hypercholesterolemia on rabbit endothelium.// *Arteriosclerosis.* – 1981. – V.1. – P.25-32.
546. Sternberg D., Danan C., Lombès A., Laforêt P., Girodon E., Goossens M., Amselem S. Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders. // *Hum. Mol. Genet.* – 1998. – V.7. – Issue 1. – P.33-42.
547. Sussmann M., Sarbia M., Meyer-Kirchrath J., Nüsing R.M., Schrör K., Fischer J.W. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. // *Circ. Res.* – 2004. – V.94. – Issue 5. – P.592-600.
548. Suzuki Y., Suzuki S., Hinokio Y., Chiba M., Atsumi Y., Hosokawa K., Shimada A., Asahina T., Matsuoka K. Diabetes associated with a novel 3264

- mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation. // *Diabetes Care.* – 1997. – V.20. – Issue 7. – P.1138-1140.
549. Svendsen E., Eide T.J. Distribution of atherosclerosis in human descending thoracic aorta. A morphometric study. // *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.* – 1980. – V.88. – P.97-101.
550. Tang S., Huang T. Characterization of mitochondrial DNA heteroplasmy using a parallel sequencing system. // *Biotechniques.* – 2010. – Apr.;V.48, – Issue 4. – P.287-296.
551. 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.; V.124. – Issue 3. – P.258-261.
552. Tawata M., Hayashi J.I., Isobe K., Ohkubo E., Ohtaka M., Chen J., Aida K., Onaya T. A new mitochondrial DNA mutation at 14577 T/C is probably a major pathogenic mutation for maternally inherited type 2 diabetes. // *Diabetes.* – 2000. – V.49. – Issue 7. – P.1269–1272.
553. Tengan C.H., Kiyomoto B.H., Rocha M.S., Tavares V.L., Gabbai A.A., Moraes C.T. Mitochondrial encephalomyopathy and hypoparathyroidism associated with a duplication and a deletion of mitochondrial deoxyribonucleic acid. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1998. – V.83. – Issue 1. – P.125-129.
554. Teplyakov A.I. Endothelin-1 involved in systemic cytokine network inflammatory response at atherosclerosis. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2004. – V.44. – Issue 1. – P.274-275.
555. Terasaki F., Tanaka M., Kawamura K., Kanzaki Y, Okabe M., Hayashi T., Shimomura H., Ito T., Suwa M., Gong J.S., Zhang J., Kitaura Y. A case of cardiomyopathy showing progression from the hypertrophic to the dilated form: association of Mt8348A->G mutation in the mitochondrial tRNA (Lys) gene with severe ultrastructural alterations of mitochondria in cardiomyocytes. // *Jpn. Circ. J.* – 2001. – V.65. – Issue 7. – P.691-694.
556. Thajeb P., Ma Y.S., Tzen C.Y., Chuang C.K., Wu T.Y., Chen S.C., Wei Y.H. Oculopharyngeal somatic myopathy in a patient with a novel large-scale

- 3,399 bp deletion and a homoplasmic T5814C transition of the mitochondrial DNA. // *Clin. Neurol. Neurosurg.* – 2006. – V.108. – Issue 4. – P.407-410.
557. Tian C., Liu T., Fang S., Du X., Jia C. Association of C47T polymorphism in SOD2 gene with coronary artery disease: a case-control study and a meta-analysis. // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – V.39. – Issue 5. – P.5269-5276.
558. Timur A.A., Driscoll D.J., Wang Q. Biomedicine and diseases: the Klippel-Trenaunay syndrome, vascular anomalies and vascular morphogenesis. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – V.62. – Issue 13. – P.1434-1447.
559. Toikka J.O., Niemi P., Ahotura M., Nonikosti H., Viirari S.A., Ronnerna T., Hartiala J.J., Raitakari O.T. Large-artery elastic properties in young men. Relationships to serum lipoproteins and oxidized low density lipoproteins. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1999. – V.19. – P.436-441.
560. Tomari Y., Hino N., Nagaike T., Suzuki T., Ueda T. Decreased CCA-addition in human mitochondrial tRNAs bearing a pathogenic A4317G or A10044G mutation. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278. – Issue 19. – P.16828-16833.
561. Touboul P.J., Hennerici M.G., Meairs S., Adams H., Amarenco P., Bornstein N., Csiba L., Desvarieux M., Ebrahim S., Hernandez Hernandez R., Jaff M., Kownator S., Naqvi T., Prati P., Rundek T., Sitzer M., Schminke U., Tardif J.C., Taylor A., Vicaut E., Woo K.S. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis.* 2012; 34(4):290-296. doi: 10.1159/000343145.
562. Ryzhkova A.I., Sazonova M.A., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Melnichenko A.A., Demakova N.A., Sobenin I.A. Shkurat T.P., Orekhov A.N. Mito-SNP in mitochondrial cytopathies.// *Atherosclerosis.* – 2017. – V.263. – e280.
doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.904>

563. Torrente I., Arturi F., D'Aloiso L., Colosimo A., De Luca A., Ferretti E., Russo D., Chiefari E., Scarpelli D., Bisceglia M., Dallapiccola B., Filetti S. Evaluation of a DHPLC-based assay for rapid detection of RET germline mutations in Italian patients with medullary thyroid carcinoma. // *J. Endocrinol. Invest.* – 2004. – V.27. – P.111–116.
564. Torroni A., Achilli A., Macaulay V., Richards M., Bandelt H.J. Harvesting the fruit of the human mtDNA tree // *Trends Genet.* – 2006. – Jun.; V.22. – Issue 6. – P.339-345. Epub 2006 May 4. Review.
565. Tsuji J., Frith M.C., Tomii K., Horton P. Mammalian NUMT insertion is non-random. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2012. – V.40. – Issue 18. – P.9073-9088.
566. Turner L.F., Kaddoura S., Harrington D., Cooper J.M., Poole-Wilson P.A., Schapira A.H. Mitochondrial DNA in idiopathic cardiomyopathy. // *Eur. Heart. J.* – 1998. – V.19. – Issue 11. – P.1725-1729.
567. Tuzcu E.M., Kapadia S.R., Tutar E. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. // *Circulation.* – 2001. – V. 103. – P.2705-2710.
568. Tybjaerg-Hansen A., Gerdes L.U., Overgaard K., Ingerslev J., Faergeman O., Nerup J. Polymorphism in 5' flanking region of human insulin gene. Relationships with atherosclerosis, lipid levels, and age in three samples from Denmark. // *Arteriosclerosis.* – 1990. – V.10. – Issue 3. – P.372-378.
569. Urbich C., Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. // *Circ. Res.* – 2004. – V.95. – P.343-353.
570. Uusimaa J., Finnilä S., Vainionpää L., Kärppä M., Herva R., Rantala H., Hassinen I.E., Majamaa K. A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase II gene in a child with Alpers-Huttenlocher-like disease. // *Pediatrics.* – 2003. – V.111. – Issue 3. – P.262-268.
571. Valentino M.L., Avoni P., Barboni P., Pallotti F., Rengo C., Torroni A., Bellan M., Baruzzi A., Carelli V. Mitochondrial DNA nucleotide changes C14482G and C14482A in the ND6 gene are pathogenic for Leber's hereditary optic neuropathy. // *Ann. Neurol.* – 2002. – V.51. – Issue 6. – P.774-778.

572. Van Hove J.L., Freehauf C., Miyamoto S., Vladutiu G.D., Pancrudo J., Bonilla E., Lovell M.A., Mierau G.W., Thomas J.A., Shanske S. Infantile cardiomyopathy caused by the T14709C mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene. // *Eur. J. Pediatr.* – 2008. – V.167. – Issue 7. – P.771-776.
573. Van Rijn M.J., Bos M.J., Yazdanpanah M., Isaacs A., Arias-Vásquez A., Koudstaal P.J., Hofman A., Witteman J.C., van Duijn C.M., Breteler M.M. Alpha-adducin polymorphism, atherosclerosis, and cardiovascular and cerebrovascular risk. // *Stroke.* – 2006. – V.37. – Issue 12. – P.2930-2934.
574. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction. // *Circ. J.* – 2009. – V.73. – P.595-601.
575. 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. – V.11. – Issue 16. – P.1797-1805.
576. Velican C., Velican D. Progression of coronary atherosclerosis from adolescents to mature adults. // *Atherosclerosis.* – 1983. – V. 47. – P.131-144.
577. Velican D., Velican C. Study of fibrous plaques occurring in the coronary arteries of children. // *Atherosclerosis.* – 1979. – V.33. – P.201-205.
578. Wong L.J., Liang M.H., Kwon H., Bai R.K., Alper O., Gropman A. A cystic fibrosis patient with two novel mutations in mitochondrial DNA: mild disease led to delayed diagnosis of both disorders. // *Am. J. Med. Genet.* – 2002. – V.113. – Issue 1. – P.59-64.
579. Venegas V., Halberg M.C. Quantification of mtDNA mutation heteroplasmy (ARMS qPCR). // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – V.837. – P.313-326. doi:10.1007/978-1-61779-504-6_21.
580. Vibhuti N. Coronary Heart Disease. *Medicine health.* URL: http://www.emedicinehealth.com/coronary_heart_disease/article_em.htm#coronary_heart_disease_overview (Date accessed 3.02.2015)
581. Vindis C, Escargueil-Blanc I, Uchida K, Elbaz M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Lipid oxidation products and oxidized low-density lipoproteins impair

- platelet-derived growth factor receptor activity in smooth muscle cells: implication in atherosclerosis. // *Redox. Rep.* – 2007. – V.12. – Issue 1. – P.96-100.
582. Von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2000. – V.908. – P.99-110.
583. Wallace D.C., Brown M.D., Lott M.T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. // *Gene.* – 1999. – V.238. – Issue 1. – P.211-230.
584. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G., Lezza A.M., Elsas L.J. 2nd, Nikoskelainen E.K. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Science.* – 1988. – V.242. – Issue 4884. – P.1427-1430.
585. Walsh M.P. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications. // *IUBMB Life.* – 2011. V.63. – Issue 11. – P.987-1000.
586. Wang Y., Fu W., Xie F., Wang Y., Chu X., Wang H., Shen M., Wang Y., Wang Y., Sun W., Lei R., Yang L., Wu H., Foo J., Liu J., Jin L., Huang W.. Common polymorphisms in ITGA2, PON1 and THBS2 are associated with coronary atherosclerosis in a candidate gene association study of the Chinese Han population. // *J. Hum. Genet.* – 2010. – V.55. – Issue 8. – P.490-494.
587. Wang H, Sun L, Jiang M, Liu L, Wang G. -1195 A/G promoter variants of the cyclooxygenase-2 gene increases the risk of pain occurrence in endometriotic women. // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2016. – V.43. – Issue 2. – P.254-257.
588. Wassel C.L., Pankow J.S., Rasmussen-Torvik L.J., Li N., Taylor K.D., Guo X., Goodarzi M.O., Palmas W.R., Post W.S. Associations of SNPs in ADIPOQ and subclinical cardiovascular disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). // *Obesity (Silver Spring).* – 2011. – V.19. – Issue 4. – P.840-847.
589. Witte I., Foerstermann U., Devarajan A., Reddy S.T., Horke S. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. // *J. Lipids.* 2012;2012:342806. doi:10.1155/2012/342806.

590. Weber C., Kraemer S., Drechsler M., Lue H., Koenen R.R., Kapurniotu A., Zerneck A., Bernhagen J. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – V.105. – Issue 42. – P.16278–16283.
591. Werth D., Grassi G., Konjer N., Dapas B., Farra R., Giansante C., Kandolf R., Guarnieri G., Nordheim A., Heidenreich O. Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor. // *Eur. J. Cell. Biol.* – 2010. – V.89. – Issue 2-3. – P.216-224.
592. Wick G., Knoflach M., Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis.// *Annu. Rev. Immunol.* – 2004. – V.22. – P.361-364.
593. Williams S.L., Mash D.C., Züchner S., Moraes C.T. Somatic mtDNA mutation spectra in the aging human putamen. // *PLoS Genet.* – 2013. – Dec.; V.9. – Issue 12. – e1003990. Doi:10.1371/journal.pgen.1003990.
594. Wong L.J., Chen T.J., Tan D.J. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. // *Electrophoresis.* – 2004. – Aug.; V.25. – Issue 15. – P.2602-2610.
595. Wong L.J., Liang M.H., Kwon H., Park J., Bai R.K., Tan D.J.: Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. // *Clin. Chem.* – 2002. – V.48. – P.1901-1912.
596. Wong L.J., Senadheera D. Direct detection of multiple point mutations in mitochondrial DNA. // *Clin. Chem.* – 1997. – V.43. – Issue 10. – P.1857-1861.
597. Woo J., Tang N.L., Leung J., Kwok T. The Alu polymorphism of angiotensin I converting enzyme (ACE) and atherosclerosis, incident chronic diseases and mortality in an elderly Chinese population // *J. Nutr. Health. Aging.* – 2012. – V.16. – Issue 3. – P.262-268.
598. Woodward M., Lam T.H., Barzi F., Patel A., Gu D., Rodgers A., Suh I.; Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Smoking, quitting, and the risk of cardiovascular disease among women and men in the Asia-Pacific region. // *Int. J. Epidemiol.* – 2005. – V.34. – Issue 5. – P.1036-1045.

599. Wrischnik L.A., Higuchi R.G., Stoneking M., Erlich H.A., Arnheim N., Wilson A.C. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA. // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – V.15. – Issue 2. – P.529-542.
600. Xiao H., He Z., Gao Y., Yang Y., Zheng J., Cai Z., Zheng B., Tang X., Guan M. Mitochondrial tRNA(Thr)T15943C mutation may be a new position that affects the phenotypic expression of deafness associated 12s rRNA A1555G mutation. // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* – 2015. – Apr.; V.32. – Issue 2. – P.163-168. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2015.02.003. Chinese.
601. 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. – Vol.13. – №7. – P.1816-1823.
602. Yamori Y. Food factors for atherosclerosis prevention: Asian perspective derived from analyses of worldwide dietary biomarkers. // *Exp. Clin. Cardiol.* – 2006. – V.11. – Issue 2. – P.94-98.
603. Yan N., Cai S., Guo B., Mou Y., Zhu J., Chen J., Zhang T., Li R., Liu X. A novel mitochondrial tRNA(Val) T1658C mutation identified in a CPEO family. // *Mol. Vis.* – 2010. – V.16. – P.1736-1742.
604. Yan Z.Q., Hansson G.K. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis // *Immunol Rev.* – 2007. – V.219. – P.187-203.
605. Yang T., Lam C.W., Tsang M.W., Tong S.F., Kam G.Y., Chan L.Y., Poon P.M., Wu X., Pang C.P. Novel mitochondrial 16S rRNA mutation, 3200T-->C, associated with adult-onset type 2 diabetes. // *Chin. Med. J. (Engl).* – 2002. – V.115. – Issue 5. – P.753-758.
606. Yang Z., Huang X., Jiang H., Zhang Y., Liu H., Qin C., Eisner G.M., Jose P., Rudolph L., Ju Z. Short telomeres and prognosis of hypertension in a Chinese population. // *Hypertension.* – 2009. – V.53. – P.639-645.
607. Yasuda H., Kamide K., Takiuchi S., Matayoshi T., Hanada H., Kada A., Yang J., Miwa Y., Yoshii M., Horio T., Yoshihara F., Nakamura S., Nakahama

- H., Tei C., Miyata T., Kawano Y. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. // *J. Hum. Hypertens.* – 2007. – V.21. – Issue 11. – P.883-892.
608. Yasunari K., Kohno M., Kano H., Hanehira T., Minami M., Yoshikawa J. Anti-atherosclerotic action of vascular D1 receptors. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* – 1999. – V.26. – P.36-40.
609. Yasunari K., Kohno M., Kano H., Yokokawa K., Minami M., Yoshikawa J. Dopamine D1-like receptor stimulation inhibits hypertrophy induced by platelet-derived growth factor in cultured rat renal vascular smooth muscle cells. // *Hypertension.* – 1997. – V.29. – Issue 1-2. – P.350-355.
610. Yeung A.C., Vekshtein V.I., Krantz D.S., Vita J.A., Ryan T.J. Jr, Ganz P., Selwyn A.P. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress. // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – V.325. – Issue 22. – P.1551-1556.
611. Zhang A.M., Zou Y., Guo X., Jia X., Zhang Q., Yao Y.G. Mitochondrial DNA mutation m.3635G>A may be associated with Leber hereditary optic neuropathy in Chinese. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – V.386. – Issue 2. – P.392-395.
612. Zhao H., Li R., Wang Q., Yan Q., Deng J.H., Han D., Bai Y., Young W.Y., Guan M.X. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. // *Am. J. Hum. Genet.* – 2004. – V.74. – Issue 1. – P.139-152.
613. Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Nikitina N.A., Sobenin I.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. Association of human mitochondrial DNA mutations with chronic noninflammatory diseases: hypertension, type 2 diabetes, and CHD. // 80st Congress of the European Atherosclerosis Society, Milan, Italy. – 2012. – May 25-28. – Interactive poster session. – Abstr.981.

614. Zhu Y, Li Q, Chen Z, Kun Y, Liu L, Liu X, Yuan H, Zhai S, Han D, Dai P. Mitochondrial haplotype and phenotype of 13 Chinese families may suggest multi-original evolution of mitochondrial C1494T mutation. // *Mitochondrion*. – 2009. – Nov.; V.9. – Issue 6. – P.418-428. doi:10.1016/j.mito.2009.07.006.
615. Zifa E., Daniil Z., Skoumi E., Stavrou M., Papadimitriou K., Terzenidou M., Kostikas K., Bagiatis V., Gourgoulialis K.I., Mamuris Z. Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Apr.39; Issue 4. – P.4697-4708. doi:10.1007/s11033-011-1262-8.