

На правах рукописи

Сазонова Маргарита Александровна

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

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва - 2018

Работа выполнена в лаборатории ангиопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

Научный консультант

Доктор биологических наук, профессор

Орехов Александр Николаевич

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор

Даниленко Валерий Николаевич,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, отдел генетических основ биотехнологии, заведующий отделом

Доктор биологических наук, профессор

Трофимов Владимир Александрович,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра генетики факультета биотехнологии и биологии, заведующий кафедрой

Доктор биологических наук, доцент

Машкина Елена Владимировна,

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный Федеральный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, кафедра генетики, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д208.072.16 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1, и на сайте <http://rsmu.ru>

Автореферат разослан _____ 2019 года.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Ларина Вера Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В двадцать первом столетии наибольшее влияние на здоровье человечества оказывают социально значимые полигенные мультифакториальные патологии, такие как атеросклероз, диабет, рак (Нагорнев, 2005; Чазов, 1992; Torrente, 2004; Arai, 2010; Bishop, 2009). Основной причиной смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, зачастую, является артериальный атеросклероз (Аничков, 1965; Анестеади, 1984; Жданов, 1989), при котором развиваются дегенеративные изменения в интиме магистральных сосудов. Следствием этих изменений является окклюзия просвета артерий и уменьшение кровоснабжения органов человека (Мясников, 1965; Нагорнев, 1998; Вихерт, 1976; Бобрышев, 2011). В настоящее время возникновение и развитие атеросклероза у людей приобрело характер эпидемии (Нагорнев, 1996; Ланкин, 1980; Климов, 1993; Мясоедова, 2011). Поэтому изучение данного заболевания представляется весьма актуальным и своевременным (Сазонова, 2014).

Следует отметить, что атеросклероз трудно распознать с помощью клинических методов в начальных стадиях заболевания. Молекулярные маркеры, ассоциированные с данной патологией, могли бы помочь в ее ранней диагностике. В последнее время большое количество исследований было посвящено поиску генетических биомаркеров атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в ядерном геноме человека (Arvanitis, 2005; Kristiansson, 2008; Laurila, 2010). Однако прогностическая и диагностическая значимость ядерных мутаций значительно ниже, чем у каждого отдельного традиционного фактора риска этих заболеваний (Собенин, 2012). Относительный риск каждой из известных мутаций, ассоциированных с атеросклерозом или ССЗ, составляет 1,06-1,40. Суммарный риск наличия сердечно-сосудистых заболеваний по известным мутациям ядерного генома составляет приблизительно 5% (Сазонова, 2014).

Согласно литературным источникам, некоторые заболевания человека (инфаркт миокарда, стеноз коронарных артерий, диабет, миопатия, глухота, кардиомиопатия) связаны с определенными мутациями мтДНК (Andreu, 1998; Chamkha, 2011; Matsunaga, 2001). Данные патологии часто встречаются совместно с атеросклерозом (Сазонова, 2014).

Митохондриальный геном нестабилен, в нем нередко возникают, в течение жизни человека, соматические мутации (Игамбердиев, 2010). Пенетрантность мутаций митохондриального генома зависит, в основном, от уровня гетероплазмии (соотношения мутантных и нормальных копий митохондриального генома). Поэтому при исследовании связи мутаций мтДНК с заболеваниями требуется количественный анализ уровня гетероплазмии данных мутаций (Сазонова, 2014).

Отметим, что в исследовательских работах ученых всего мира, анализируются, в основном, мутации ядерного генома, ассоциированные с атеросклеротическими поражениями (Bressler, 2010; Castro, 2000; Иванова, 2012; Митрофанов, 2012; Evans, 2011; Yasuda, 2007; Woo, 2012; Wassel, 2011). Анализ мутаций мтДНК, связанных с атеросклерозом, представлен лишь в

нескольких исследованиях (Naini, 2005; Mukae, 2003; Roder, 2011; Nomiya, 2004, Yamagata, 2002). В них, в основном, исследовались крупные делеции, результатом которых была полная дисфункция митохондриальной ДНК (Ballinger, 1992; Thajeb, 2006; Dhillon, 2007; Tomari, 2003; Botto, 2005; Сазонова, 2014).

В связи с этим особенно актуальным представляется исследование при атеросклеротических поражениях точечных мутаций, микроделеций и микроинсерций, локализованных в митохондриальных генах (Сазонова, 2014).

Цель исследования

Выяснение связи мутаций митохондриального генома с атеросклеротическими поражениями артериальной 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 интимае 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

Апробация диссертации состоялась в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» 25 апреля 2018 года.

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 национальном 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».

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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые мутации

Мутации митохондриального генома, исследованные в настоящей работе, приведены в таблице 1 (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Sazonova, 2017). Алгоритм исследования включал выделение ДНК из образцов интимы аорты или клеток крови, получение и пиросиквенс ПЦР-фрагментов, содержащих область мутации.

Таблица 1. Локализация исследуемых мутаций в митохондриальном геноме (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014)

№ 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	MT-TN
15	m.5692T>C	MT-TC
16	m.5814T>C	MT-CO1
17	m.6489C>A	MT-TW
18	m.5540G>A	MT-TK
19	m.8362T>G	
20	m.8363G>A	
21	m.8993T>G	
22	m.8993T>C	MT-CO3
23	m.9379G>A	
24	m.9480del15	
25	m.9537insC	MT-TL2
26	m.12315G>A	MT-ND5
27	m.13513G>A	MT-ND2
28	m.5178C>A	
29	m.5132insAA	
30	m.14459G>A	MT-ND6
31	m.14482C>G	
32	m.14482C>A	
33	m.14484T>C	
34	m.14487T>C	
35	m.14709T>C	MT-TE
36	m.14846G>A	MT-CYTB
37	m.15059G>A	
38	m.15084G>A	
39	m.15452C>A	
40	m.15498del24	
41	m.15723G>A	
42	m.15762G>A	

Материалы

Для проведения данной работы были использованы:

I. Образцы нормальной интимы и липофиброзные бляшки 7 аорт индивидов, которые погибли из-за внезапной смерти или несчастного случая (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

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 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

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. 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, рН 7,6 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

Был проведен анализ пораженных атеросклерозом и нормальных участков аорт, при котором использовалась классификация атеросклеротических поражений, разработанная Советом по атеросклерозу Американского Общества по исследованию сердца (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

III. Суммарные гомогенаты нормальной или пораженной атеросклерозом интимы аорты 10 человек (Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

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.

IV. Образцы клеток крови гетерогенной выборки из Московского региона, состоящей из 700 участников исследования (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017). Мужчины были старше 40 лет, а женщины – старше 50. 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).

Методы

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 (Сазонова, 2014).

Ультрасонографическое исследование

Тип поражения артерий участников исследования из поликлиник Москвы и Московской области определяли с помощью ультрасонографии с высоким

разрешением в В-режиме. При этом использовался ультразвуковой сканер SonoScape SSI-1000 (Китай) с линейным сосудистым датчиком (частота 7,5 МГц). Толщину интимо-медиального слоя сонных артерий (ТИМС СА) измеряли с использованием программы Prosound (R.Selzer, США) (Touboul, 2012; Amato, 2017; Sobenin, 2014; Сазонова, 2014; Myasoedova, 2016; Kirichenko, 2017).

Наличие атеросклеротических бляшек сонных артерий (АСБ СА) оценивали по 4-бальной системе (0 – отсутствие возвышенных атеросклеротических поражений, 1-2 – стабильные атеросклеротические бляшки со стенозом просвета сосуда до 20% и от 20 до 50%, соответственно,

3 – гемодинамически значимые атеросклеротические бляшки со стенозированием более 50%) (Touboul, 2012; Amato, 2017; Sobenin, 2014; Сазонова, 2014; Myasoedova, 2016; Kirichenko, 2017).

Получение и подготовка образцов крови для анализа

Образцы крови (9 мл) брали из локтевой вены в пробирку объемом 10 мл, рано утром натощак. Антикоагулянтom служила $\text{Na}_2\text{-ЭДТА}$ в конечной концентрации 10 ммоль/л. Кроме молекулярно-генетического исследования, у пациентов был проведен биохимический анализ крови для измерения уровней сахара, общего холестерина, ЛНП, ЛВП и ТГ (Сазонова, 2014).

Выделение ДНК

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани аорты (10 мкг) или крови (5мл) проводилось методом фенол-хлороформной экстракции (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2017).

ПЦР

Для исследованных мутаций митохондриального генома информация об условиях для ПЦР и последовательностях использованных праймеров была взята из литературных источников (Han, 2005; Chol, 2003; Andreu, 1998; Tanimoto, 2004; Yamagata, 2002; Matsunaga, 2001; Fu, 1996; Horváth, 2002; Man, 2003; Wong, 2004; Kim, 2002; Wallace, 1994; Gropman, 2004; Nishigaki, 2003; Varacca, 2000; Jeppesen, 2003; Varlamov, 2002; Solano, 2003). Для ПЦР была взята ДНК в концентрации 0,1 мкг/мл и праймеры в концентрации 10 пмоль/мкл. Следует отметить, что один из двух праймеров, использованных при полимеразной цепной реакции, был подвергнут биотинилированию, т.к. при последующем пиросеквенировании использовалась биотинилированная цепь амплификата. Полимеразные цепные реакции были проведены на приборе «PTC DNA Engine 200» (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2017).

Пиросиквенс

Алгоритм анализа исследуемого биотинилированного одноцепочечного фрагмента ДНК при пиросеквенировании включал гибридизацию праймера для пиросиквенса для сиквенса с одноцепочечным ПЦР-фрагментом, использовавшимся как матрица. Затем проводилась инкубация полученного фрагмента ДНК с энзимами, 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 (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Sazonova, 2014; Sazonova, 2017).

После этого 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. После этого 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 пирогаммы. Величина пика нуклеотида была пропорциональна интенсивности световой вспышки, и, следовательно, количеству встроенных в цепь ДНК нуклеотидов (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2017).

ПЦР-фрагменты, содержащие область исследуемых мутаций, были пиросеквенированы для выявления точечных замен или микроделений с помощью соответствующих праймеров (таблица 2). Исследования проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQTMHS96MA. Визуализация результатов осуществлялась с помощью программы, прилагающейся при установке пиросеквенатора.

Таблица 2. Праймеры для пиросиквенса (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014)

№ п/п	Мутации	Праймеры для сиквенса
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	TTTAGTTGGGGCATTT (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	CATTCAACCAATAGCC (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	TTGCAATTCAATATGAAAA (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)

Определение митохондриальных гаплогрупп

Гаплогруппы митохондриального генома в образцах ДНК, выделенных из лейкоцитов крови участников исследования, были определены согласно общепринятым в мире стандартам, посредством анализа определенных однонуклеотидных полиморфизмов кодирующего региона митохондриального генома и первого гипервариабельного сегмента (ГВС1) мтДНК (позиции генома 16024-16400) (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

Трансмиссионная электронная микроскопия

Электронномикроскопический анализ проводили на базе ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития России (Сазонова, 2014).

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 пропилен. 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. 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 (Сазонова, 2014).

Статистическая обработка данных

Полученные, в ходе настоящего исследования, результаты, обрабатывали с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics версии 21.0 (SPSS Inc., США) (Сазонова, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015; Сазонова, 2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Собственные данные

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.

В подавляющем большинстве клеток нормальной интимы, кристы митохондрий в основном были хорошо различимы и окружающие мембраны не имели каких-либо структурных дефектов (рисунок 1а). Напротив, анализ митохондрий в клетках, присутствующих в атеросклеротических поражениях, выявил наличие в них структурных альтераций (рисунок 1б-1е). Хотя в некоторых митохондриях кристы были различимы и окружающие мембраны изменений не имели (рисунок 1б), другие митохондрии характеризовались нарушением структуры крист (рисунок 1б-1е). В матриксе митохондрий с нарушенной структурой крист отмечалось формирование вакуолеподобных структур (рисунок 1б-1е). В зонах митохондрий, где отмечалось образование вакуолеподобных структур, наблюдался также отек матрикса, выражающийся в локальной потере матриксом электронной плотности (рисунок 1б-1е) (Сазонова, 2014; Сазонова, 2017; Sazonova, 2017).

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% (Сазонова, 2014; Сазонова, 2017; Sazonova, 2017).

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.

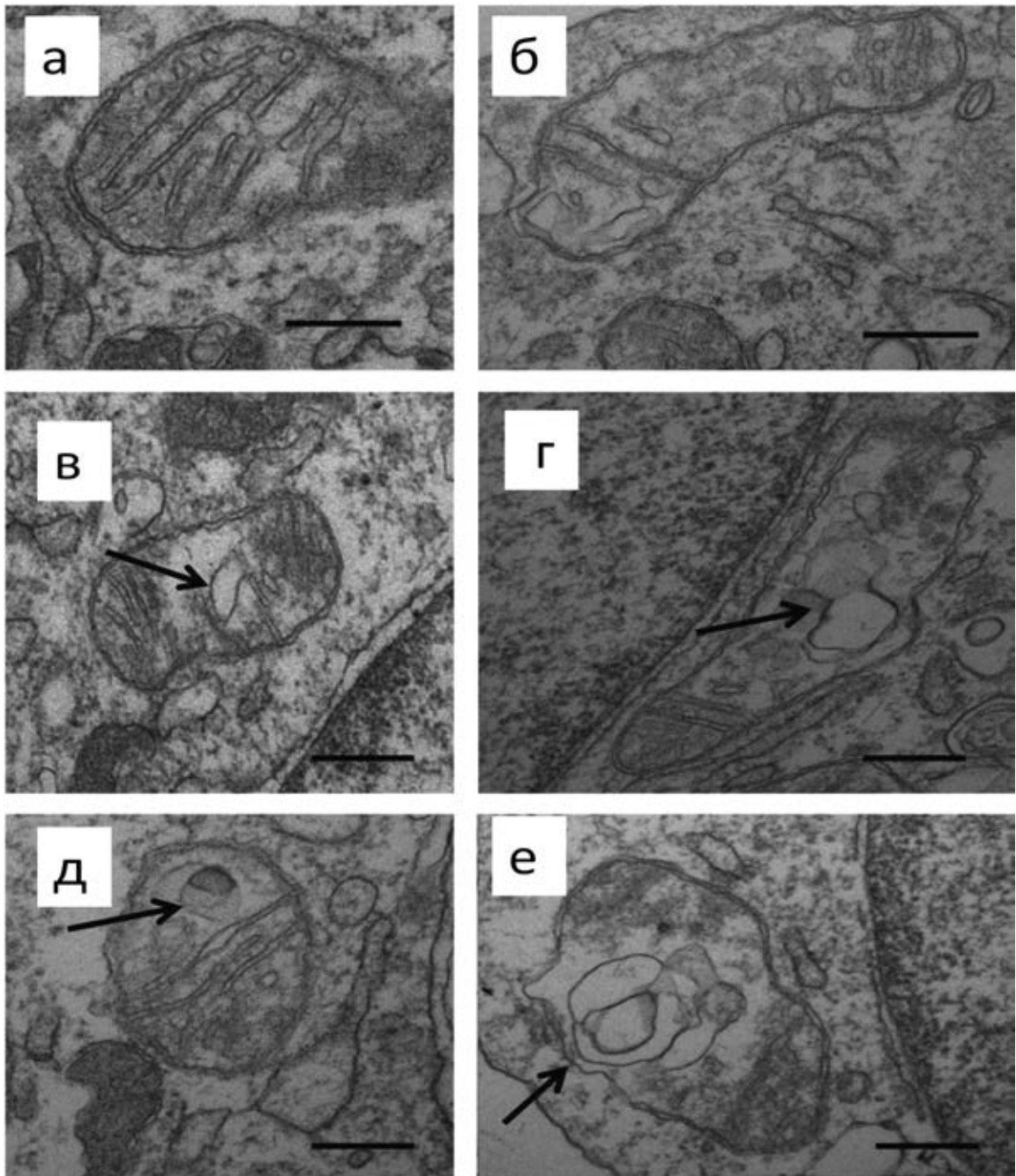


Рисунок 1. Ультраструктура митохондрий в интима аорты (Сазонова, 2014):
(а): типичный вид митохондрии в нормальной интима аорты;
(б): митохондрия с четко выраженными кристами и хорошо выраженной окружающей мембраной в клетке атеросклеротической бляшки;
(в-е): структурные варианты митохондрий, демонстрирующие наличие деструктивных изменений крист митохондрий в клетках атеросклеротических бляшек.

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

В некоторых интимальных клетках, присутствующих в атеросклеротических бляшках, отмечалось также формирование "миелиноподобных" структур в отекающем матриксе митохондрий (рисунок 2а-2г).

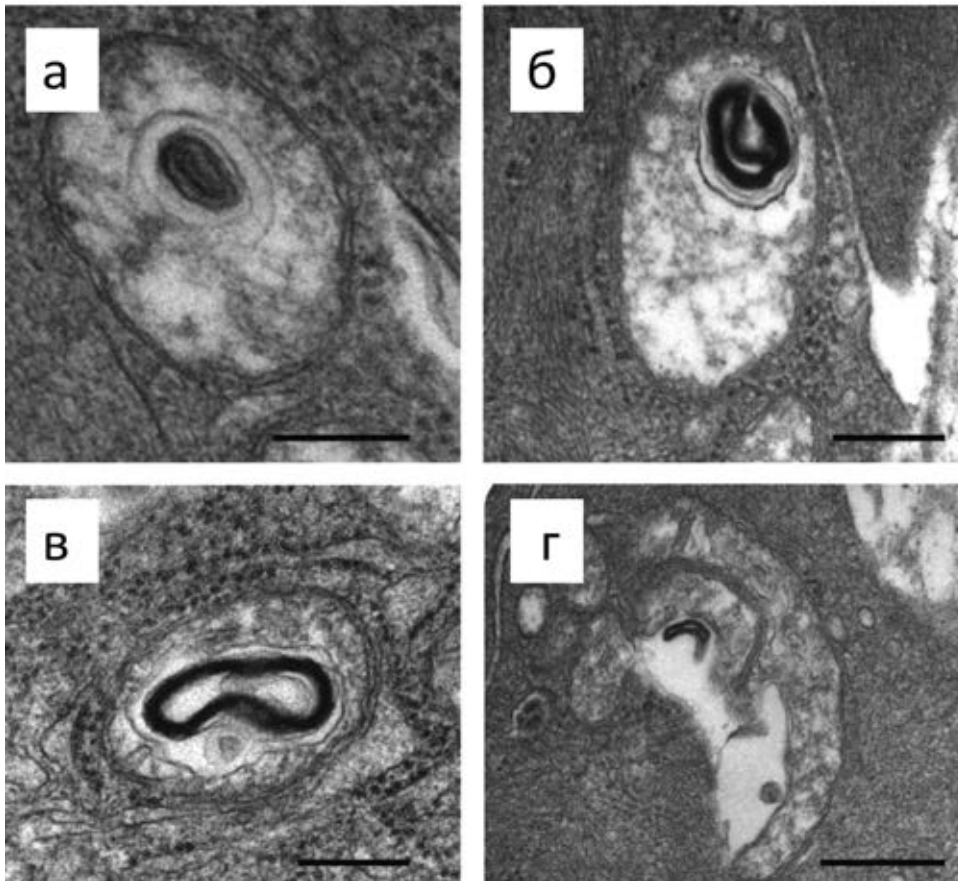


Рисунок 2. Миелиноподобные структуры в опечных митохондриях, наблюдаемые в клетках атеросклеротических бляшек (а-г) (Сазонова, 2014). Электронная микроскопия. Линейка = 200 нм

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. Он базируется на детекции высоты пиков нуклеотидов на исследуемой пирограмме в анализируемом районе одноцепочечного амплификата ДНК (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017). 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 митохондрии, уровень гетероплазии мутаций может варьировать от 0% до 100%. Определить уровень гетероплазии исследованной мутации в образце мтДНК индивида можно, сравнив размер пиков пирограммы при 100% гомоплазии по наличию исследованной мутации и 100% гомоплазии по ее отсутствию.

Общая формула оценки уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома

Вначале для каждой из исследованных мутаций (делеций, инсерций и точечных замен пар нуклеотидов) был разработан способ определения уровня гетероплазии в ПЦР-фрагменте ДНК индивида. После анализа всех разработанных формул была создана общая формула для подсчета процента гетероплазии любых мутаций митохондриального генома (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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

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

h – высота пика исследуемого нуклеотида;

P – процент гетероплазии;

N – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100% нормальных аллелей.

Пример расчета процента гетероплазии мутации m.3256C>T митохондриального генома по общей формуле

В данном случае проводится детекция замены C>T в позиции митохондриального генома 3256 (при использовании обратного праймера для сиквенса – G>A) (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

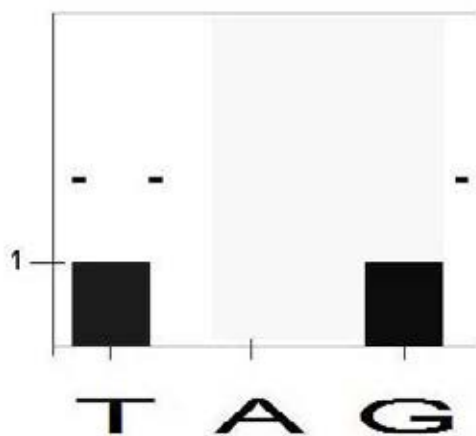
Как следует из гистограммы, позиция T1 является контрольной и в 100% случаев представлена тиминном в митохондриальной ДНК человека (согласно данным NCBI, Human genome resources). При 100% митохондриальных геномов с нуклеотидом G в данной позиции размер пика A2 на теоретической гистограмме будет 0 ед. и пика G3 – 1 ед. (рисунок 3а); при 100% геномов с нуклеотидом A в данной позиции – 0 ед. G3 и 1 ед. A2 (рисунок 3б). Для подсчета процента гетероплазии мутантного аллеля мы принимаем сумму исследуемых пиков за 1 единицу, а затем подсчитываем процент гетероплазии пика A2.

При анализе образца ДНК из сосудистой ткани 29-летнего мужчины размер пика A на практической пирограмме был равен 0,84; а размер пика G – 3,05 (рисунок 3в). Сумма пиков составила 3,89, что было принято за 1 ед. теоретической пирограммы.

Рассчитываем процент гетероплазии по данной замене:

$$P = \frac{0.84 - 0}{3.89 - 0} \cdot 100\% = 22\%$$

Таким образом, уровень гетероплазии участника исследования по мутации m.3256C>T составил 22%.



б) A/A

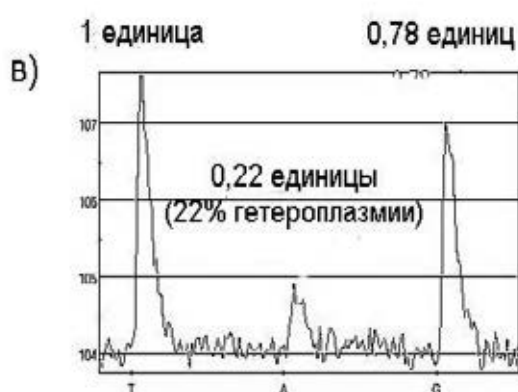
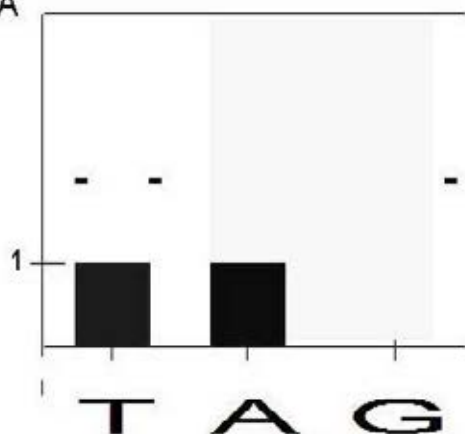


Рисунок 3. Детекция мутации $m.3256C>T$ (при использовании обратного праймера для сиквенса – $G>A$).

а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по нормальному аллелю G в позиции 3256 митохондриального генома;

б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по мутантному аллелю A в позиции 3256 митохондриального генома;

в) практическая пиелограмма исследуемого образца ДНК (22% хромосом имеют мутантный аллель, то есть степень гетероплазии составляет 22%).

Оценка воспроизводимости метода измерения уровня гетероплазии

Для определения воспроизводимости метода был применен подход, использующий три последовательные независимые измерения уровня гетероплазии в одном и том же образце. Воспроизводимость оценивали по коэффициенту вариации (отношению стандартного отклонения к средней величине, выраженному в процентах) (Сазонова, 2014).

Коэффициент вариации по результатам трехкратного измерения уровня гетероплазии по произвольно выбранной мутации в 46 образцах интимы аорты человека составил 11,4 ($SD=6,5$); при этом отклонение индивидуальных измерений от средней результирующей величины составило 1,4 ($SD=1,2$).

Таким образом, показатели чувствительности и специфичности метода, составили 88,2% и 77,1%, соответственно ($p \leq 0,05$). Воспроизводимость метода измерения уровня гетероплазии составила 88,6% (Сазонова, 2014).

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

Цель исследования интимы аорт индивидов

В последнее время все чаще высказывается предположение, что мозаичность атеросклероза может быть объяснена генетическими факторами. Вследствие того, что митохондриальный геном менее стабилен, чем ядерный, соматические мутации в нем возникают во много раз чаще. В результате накопления мутантных копий мтДНК могут появиться отличия по уровню гетероплазмии мутаций мтДНК между клетками пораженных и нормальных участков интимы аорты. С целью проверки данного предположения был проведен пилотный анализ интимы аорт (Сазонова, 2014).

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

Анализ научной литературы позволил составить список 42 мутаций митохондриального генома, для которых теоретически могла бы наблюдаться ассоциация уровня гетероплазмии с атеросклерозом (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

С помощью разработанного метода прямой количественной оценки митохондриального генома проведен анализ данных мутаций в образцах ДНК из участков ткани из липофиброзной бляшки и нормальной интимы 7 аорт (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015)..

Следует отметить, что при анализе пирогамм 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.

Сравнение величины гетероплазмии в нормальных и атеросклеротических участках проводили методами непараметрической статистики с использованием рангового теста Уилкоксона, согласно которому было выявлено 18 мутаций, у которых арифметическая разница между количеством положительных и отрицательных рангов была не менее 2, направление связи совпадало как по среднему значению ранга, так и по суммарным рангам. Разница между значениями одного из видов рангов (среднего или суммарного) была не менее двухкратной. Такими мутациями оказались 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.14482|C>G, m.14487T>C, m.14846G>A, m.15059G>A (Сазонова, 2014).

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 $p \leq 0,05$ (Сазонова, 2014).

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.

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. Данные по образцам аорт, имеющих значительные отличия в проценте гетероплазии по данным мутациям в липофиброзных бляшках по сравнению с нормальной сосудистой тканью, представлены в таблице 3. 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 гетероплазии 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) (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

Таким образом, при количественной оценке мутантного аллеля митохондриального генома отмечаются значительные отличия процента гетероплазии по 11 мутациям между образцами из липофиброзной бляшки и нормальной интимы аорты (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

После анализа результатов как формального, так и неформального статистических подходов было принято решение продолжить исследование 11 мутаций митохондриального генома в образцах интимы аорты и клеток крови пораженных атеросклерозом индивидов (Сазонова, 2014).

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 непораженной интимы и атеросклеротического поражения сосудистой стенки (Сазонова, 2014).

Таблица 3. Сравнение процента 11 митохондриальных мутаций в атеросклеротических бляшках и нормальной интиме аорт (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015)

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

Анализ уровня гетероплазии в участках морфологически картированной стенки аорт

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.

Интима каждой из аорт имела приблизительный размер 7х9 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 интиме, 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. Общее количество проанализированных зон (участков сосудистой стенки) было равно 265 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

На основании проведенного морфологического анализа интимы аорт были созданы морфологические карты. На данных картах были отмечены идентифицированные зоны. В качестве примера приведена морфологическая карта первой аорты (рисунок 4). Кроме того, использована возможность более грубой классификации зон: норма, ранние поражения (сочетание 2+3), поздние поражения (сочетания 4+5) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).



Рисунок 4. Морфологическая карта первой аорты.

Анализ 11 мутаций митохондриального генома

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 мтДНК m.3256C>T, m.15059G>A, m.12315G>A, m.3336T>C, m.14459G>A и m.5178C>A – высокодостоверно, а мутация m.652delG – на уровне значимости 0,1. В то же время мутация m.13513G>A высокодостоверно связана с отсутствием суммарного атеросклеротического поражения картированных аорт (таблица 4) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015). Эти данные хорошо совпадают с результатами, полученными при анализе суммарных атеросклеротических гомогенатов.

Согласно критерию сдвига Уилкоксона для зависимых выборок (на усредненных данных – для всех аорт одновременно) выявлено (таблица 5), что с суммарным начальным атеросклеротическим поражением (суммой всех участков аорт, имеющих жировые точки и жировые полосы) и суммой всех участков липофиброзных бляшек ассоциированы, на уровне значимости $p \leq 0,05$, митохондриальные мутации, характерные для суммарного атеросклеротического поражения. Мутация m.13513G>A высокодостоверно связана с отсутствием данных типов суммарного поражения. 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. Также выявлено, что с отсутствием суммы липофиброзных бляшек высокодостоверно ассоциирована мутация m.14846G>A (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

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 $p \leq 0,1$. При этом данная мутация отсутствует в суммарном начальном атеросклеротическом поражении. Кроме того, мутации m.3256C>T и m.5178C>A оказались высокодостоверно ассоциированы с суммой участков с фиброзными бляшками. Однонуклеотидная замена гуанина на аденин в позиции мтДНК 12315 связана с отсутствием суммы фиброзных бляшек в аортах (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

Таблица 4. Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции между уровнем гетероплазмии и наличием суммарного атеросклеротического поражения картированных аорт (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015)

Мутация	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость (двусторонняя)
m.652delG	0,311*	0,088*
m.652insG	-0,301	0,121
m.1555A>G	-0,307	0,113
m.3256C>T	0,353**	0,050**
m.3336T>C	0,439**	0,023**
m.5178C>A	0,357**	0,047**
m.12315G>A	0,403**	0,045**
m.13513G>A	-0,456**	0,035**
m.14459G>A	0,453**	0,036**
m.14846G>A	-0,297	0,129

m.15059G>A	0,451**	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 5. Преобладающие мутации мтДНК в различных типах суммарного атеросклеротического поражения морфологически картированных аорт (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015)

Мутация	Начальное атеросклеротическое поражение		Липофиброзная бляшка		Фиброзная бляшка	
	Коэффициент корреляции	Асимптотическая значимость	Коэффициент корреляции	Асимптотическая значимость	Коэффициент корреляции	Асимптотическая значимость
m.652delG	0,093	0,146	0,308*	0,091*	0,323*	0,071*
m.652insG	- 0,075	0,186	- 0,095	0,125	- 0,058	0,232
m.1555A>G	-0,359**	0,048**	-0,401**	0,039**	- 0,084	0,195
m.3256C>T	0,368**	0,045**	0,407**	0,045**	0,352**	0,050**
m.3336T>C	0,426**	0,034**	0,437**	0,025**	0,103	0,119
m.5178C>A	0,365**	0,046**	0,439**	0,023**	0,356**	0,048**
m.12315G>A	0,353**	0,050**	0,409**	0,041**	-0,367**	0,046**
m.13513G>A	-0,423**	0,035**	-0,437**	0,021**	0,095	0,143
m.14459G>A	0,403**	0,042**	0,463**	0,026**	0,073	0,191
m.14846G>A	-0,107	0,117	-0,351**	0,050**	0,052	0,214
m.15059G>A	0,405**	0,043**	0,471**	0,015**	0,062	0,203

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

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

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. 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 гетероплазмы, определены межквартильные границы. Индивидуальные

скалярные показатели гетероплазии были трансформированы в ординарные величины 1,2,3 или 4, характеризующие принадлежность показателя к определенной квантили в пределах данного аутопсийного образца. Результаты представлены в таблицах 6 и 7 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

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 99,9% вероятностью безошибочного прогноза (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

Таблица 6. Сводка модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклероза в аортах

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

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

Таблица 7. Дисперсионный анализ модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклероза

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, квантили *m.14846G>A*, квантили *m.625delG*, квантили *m.3336T>C*, квантили *m.5178C>A*, квантили *m.1555A>G*, квантили *m.14459G>A*, квантили *m.15059G>A*, квантили *m.625insG*, квантили *m.12315G>A*, квантили *m.13513G>A*, квантили *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.5) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

Для данного анализа ранговые значения (номера квантилей) 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».

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).

Таким образом, совокупная мутационная нагрузка по 11 исследованным мутациям митохондриального генома ассоциирована с 88,2% случаев атеросклеротических поражений морфологически картированных аорт (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

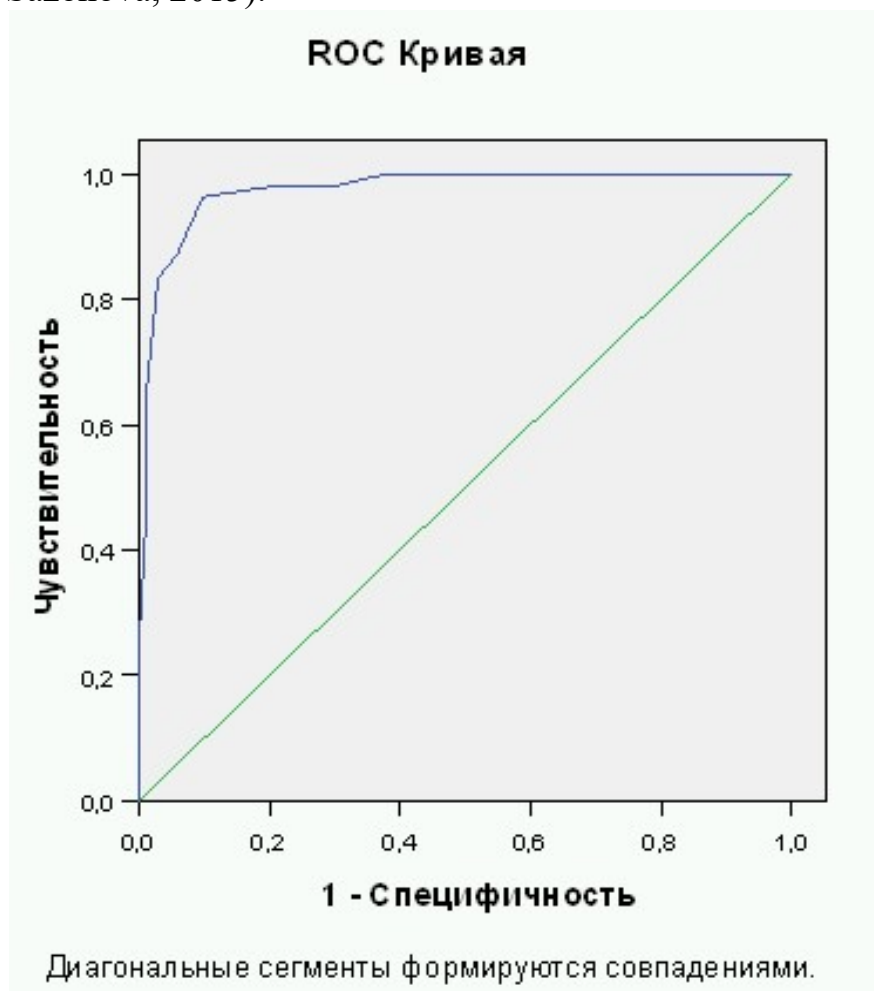


Рисунок 5. ROC-кривая для оценки чувствительности и специфичности показателя «мутационная нагрузка» в отношении атеросклероза. Положительным реальным состоянием является атеросклеротическая бляшка. Площадь под кривой составляет 0,975 ($p < 0.001$)

Анализ уровня гетероплазмы 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 ультразвукографическом обследовании. Средний возраст участников составлял 64,73 года (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Принцип исследования атеросклеротических поражений интимы сонных артерий

Оценка размера атеросклеротической бляшки

При ультразвукографическом обследовании атеросклеротические бляшки (АСБ) оценивались, в зависимости от размера бляшки, согласно 4-бальной шкале (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017):

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 8).

Таблица 8. Размер атеросклеротических бляшек у 700 участников исследования

Выборка	Размер атеросклеротической бляшки			
	0 баллов	1 балл	2 балла	3 балла
Женщины	223 (44%)	173 (34%)	107 (21%)	5 (1%)
Мужчины	62 (32%)	66 (35%)	58 (30%)	6 (3%)
Общая	285 (41%)	239 (34%)	165 (23%)	11 (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. 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. Выявлены пограничные (межквартильные) значения ТИМС СА для участников исследования из Москвы и Московской области (таблица 9) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

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). Принадлежность ко 2-й и 3-й квартилям рассматривали как среднюю степень атеросклеротической нагрузки (2). 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. 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.

Для исследуемой выборки средние значения ТИМС СА по выделенным группам представлены в таблице 10 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Таблица 9. Средние значения ТИМС СА для участников исследования из Москвы и Московской области

	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

Таблица 10. Величина ТИМС СА у участников исследования с различной степенью атеросклеротической нагрузки

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

В результате проведенной работы были получены рабочие данные в формате таблицы 11×700, где был приведен процент гетероплазии каждой мутации для каждого из 700 участников исследования (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Полученные, в ходе настоящего исследования, данные были подвергнуты статистической обработке. Для этого были использованы программы пакета SPSS версии 21.0 (SPSS Inc., США). Были применены U-тест для независимых выборок по Манну-Уитни и тест для зависимых выборок по Уилкоксоу. Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза. 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 гетероплазмии по отдельным мутациям. Итогом статистической обработки было определение статистической мощности исследования (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Ассоциация мутаций митохондриального генома с атеросклеротическими бляшками сонных артерий

Анализ 11 мутаций

Согласно статистическим данным (таблица 11), 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 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

В то же время с отсутствием АСБ СА связаны мутации m.14846G>A ($p \leq 0,001$) и m.652insG ($p \leq 0,1$) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Таблица 11. Корреляция атеросклеротических бляшек индивидов с уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	0,124**	0,010**
m.652insG	-0,090*	0,060*
m.1555A>G	-0,063	0,247
m.3256C>T	0,074*	0,101*
m.3336T>C	0,143**	0,002**
m.5178C>A	0,095*	0,064*
m.12315G>A	0,275**	0,001**
m.13513G>A	0,061	0,187
m.14459G>A	0,158**	0,001**
m.14846G>A	-0,128**	0,010**
m.15059G>A	-0,006	0,912

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

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

Уровень гетероплазмии мутации m.13513G>A

Особое положение занимает мутация митохондриального генома m.13513G>A. Уровень гетероплазмии данной однонуклеотидной замены, равный 65%, высокодостоверно ассоциирован с отсутствием атеросклеротических бляшек в интима сонных артерий ($p \leq 0,05$) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

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. Для этого на предварительном этапе была построена модель логистической регрессии (таблицы 12 и 13). 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 14) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Таблица 12. Классификация случаев ассоциации атеросклеротических бляшек с совокупной нагрузкой 11 мутаций

Модель	Обнаруженные случаи		Предсказанные случаи		
			Ассоциация АСБ СА с суммарной нагрузкой 11 мутаций		Процентный показатель верных прогнозов
			0,00	1,00	
1	Ассоциация АСБ СА 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 13. Анализ включенных переменных и коэффициента силы и направления связи

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 ($p \leq 0,05$);

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

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 (таблица 14) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Таблица 14. ROC-анализ взаимосвязи мутационной нагрузки с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях

Вероятность безошибочного прогноза				
Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Асимптоматическая 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 ($p \leq 0,05$).

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. Совокупная мутационная нагрузка 11 исследованных мутаций митохондриального генома ассоциирована с 84,2% атеросклеротических бляшек в сонных артериях человека (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Ассоциация мутаций с толщиной интимо-медиального слоя сонных артерий

Анализ 11 мутаций митохондриального генома

Согласно данным статистики (таблица 15), 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 $p \leq 0,1$ (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Однонуклеотидные замены m.13513G>A и m.14846G>A высокодостоверно ассоциированы с отсутствием утолщения ИМС СА ($p \leq 0,05$) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Таблица 15. Корреляция мутаций митохондриального генома с утолщением интимо-медиального слоя сонных артерий

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
m.652delG	0,061	0,206
m.652insG	0,017	0,722
m.1555A>G	0,009	0,865
m.3256C>T	0,079*	0,091*
m.3336T>C	0,041	0,383
m.5178C>A	0,074*	0,103*

m.12315G>A	0,219**	0,001**
m.13513G>A	-0,105*	0,050**
m.14459G>A	0,057	0,236
m.14846G>A	-0,100**	0,045**
m.15059G>A	0,109**	0,028**

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

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

Совокупная мутационная нагрузка при утолщении интимо-медиального слоя сонных артерий

Аналогично подобному анализу артериальных атеросклеротических бляшек, из-за того, что влияние разных мутаций на изменение ТИМС СА разнонаправленное, необходимо рассматривать совокупное влияние 11 исследованных мутаций, или совокупную мутационную нагрузку. На предварительном этапе была построена бинарная модель логистической регрессии (таблицы 16 и 17). 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 18) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Таблица 16. Классификация случаев ассоциации ТИМС СА с совокупной нагрузкой 11 мутаций

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 17. Анализ включенных переменных, коэффициента силы и направления связи

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 B указывает направленность связи;

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

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 (таблица 18) (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

Таблица 18. ROC-анализ взаимосвязи мутационной нагрузки с ТИМС СА

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

Площадь под кривой составила 0,849, следовательно, модель оказалась значимой. Чувствительность – 0,700; специфичность – 0,900 ($p \leq 0,05$).

Таким образом, предсказательная и объяснительная способность модели для совокупной мутационной нагрузки при утолщении интимо-медиального слоя 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 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2017).

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.

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. Были составлены графики с относительным изменением совместного распределения исследованных мутаций мтДНК по категориям атеросклеротического поражения. Пример такого

графика для мутаций m.12315G>A-m.3256C>T представлен на рисунке 6 (Сазонова, 2014).

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 (Сазонова, 2014).

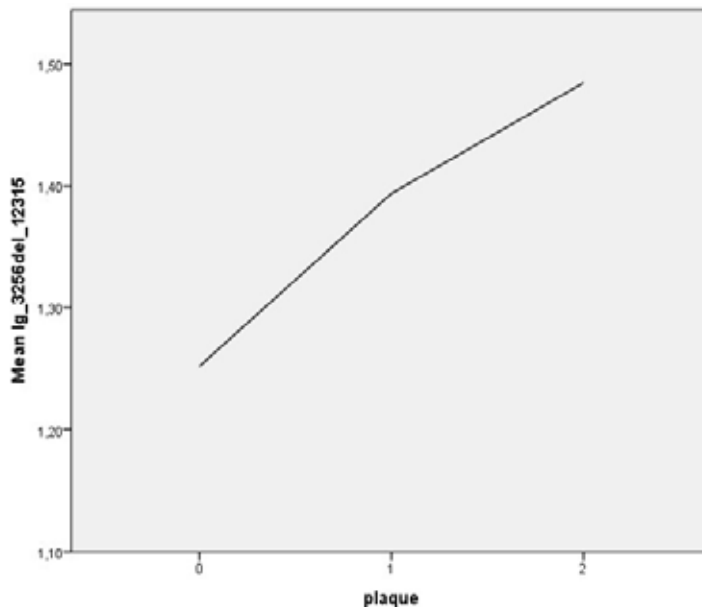


Рисунок 6. Относительное изменение совместного распределения мутаций m.3256C>T и m.12315G>A по категориям атеросклеротического поражения

Совместные исследования

Ассоциация гаплогрупп митохондриального генома с атеросклеротическими поражениями

Анализ ассоциации гаплогрупп с атеросклерозом 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) (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

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.

Анализ ассоциации гаплогрупп с атеросклеротическими бляшками

Гаплогруппа M у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы M с атеросклеротическими бляшками сонных артерий приведен в таблицах 19 и 20 (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

Таблица 19. Оценка ассоциации гаплогруппы M с АСБ СА методом Хи-квадрат

	Значение	Асимптотическая значимость (двухсторонняя)

Хи-квадрат по Пирсону	5,229	0,022*
Количество валидных случаев	384	

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

Таблица 20. Отношение шансов гаплогруппы М быть ассоциированной с АТ или его отсутствием у индивидов

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)	0,596	0,451	0,787
Для валидных случаев с АСБ СА, ассоциированных с гаплогруппой М (1,00)	3,021*	0,848	10,760
Количество валидных случаев	384		

Согласно таблице 20, вероятность появления атеросклеротической бляшки у представителей гаплогруппы М в 5,07 раза ниже по сравнению с теми участниками исследования, у которых гаплогруппа М отсутствует. Поскольку значение статистики Хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым. Это подтвердилось анализом корреляции по Спирмену (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

Гаплогруппа Т у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы Т с атеросклеротическими бляшками сонных артерий приведен в таблицах 21 и 22 (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

Таблица 21. Оценка ассоциации гаплогруппы Т с АСБ СА методом Хи-квадрат

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

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

Таблица 22. Отношение шансов гаплогруппы Т быть ассоциированной с атеросклерозом или его отсутствием у индивидов

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 22, вероятность появления бляшки у носителей гаплогруппы Т в 3,89 раза ниже по сравнению с участниками исследования, у которых гаплогруппа Т отсутствует. Поскольку значение статистики Хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым. Это подтвердилось анализом корреляции по Спирмену (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

Гаплогруппа U у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы U с атеросклеротическими бляшками приведен в таблицах 23 и 24 (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

Таблица 23. Оценка ассоциации гаплогруппы U с АСБ СА методом Хи-квадрат

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

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

Таблица 24. Отношение шансов гаплогруппы U быть ассоциированной с атеросклерозом или его отсутствием у индивидов

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 24, вероятность появления атеросклеротической бляшки у носителей гаплогруппы U в 1,9 раза выше, чем у тех участников исследования, у которых гаплогруппа U отсутствует. Поскольку значение статистики Хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым. Это подтвердилось анализом корреляции по Спирмену (Sazonova, 2013; Сазонова, 2014).

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 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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. 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 (Sazonova, 2007; Сазонова, 2008; Sazonova, 2009; Сазонова, 2010; Сазонова, 2011; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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 (Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

Для того, чтобы проверить данное предположение, было решено провести сравнительный анализ уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома в выборке индивидов с пораженной атеросклерозом и нормальной интимой артерий (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

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 (Sazonova, 2007; Сазонова, 2008; Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015). С помощью разработанного метода оказалось возможным определение уровня гетероплазии как соматических, так и наследственных мутаций мтДНК, а также соматических мутаций ядерного генома.

Схема анализа процента гетероплазии представлена на рисунке 10 (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

Метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанный автором с сотрудниками на основе технологии пиросеквенирования 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, применяемыми для анализа мутаций (Сазонова, 2014; Sobenin, 2014).

Пиросеквенс 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, мог бы служить «золотым стандартом» для всех остальных методов определения процента гетероплазии митохондриального генома и его необходимо применять для верификации уровня гетероплазии мутаций, выявленных с помощью других методов (Sazonova, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

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 (Сазонова, 2014).

Схема анализа процента гетероплазии мутантного аллеля митохондриального генома

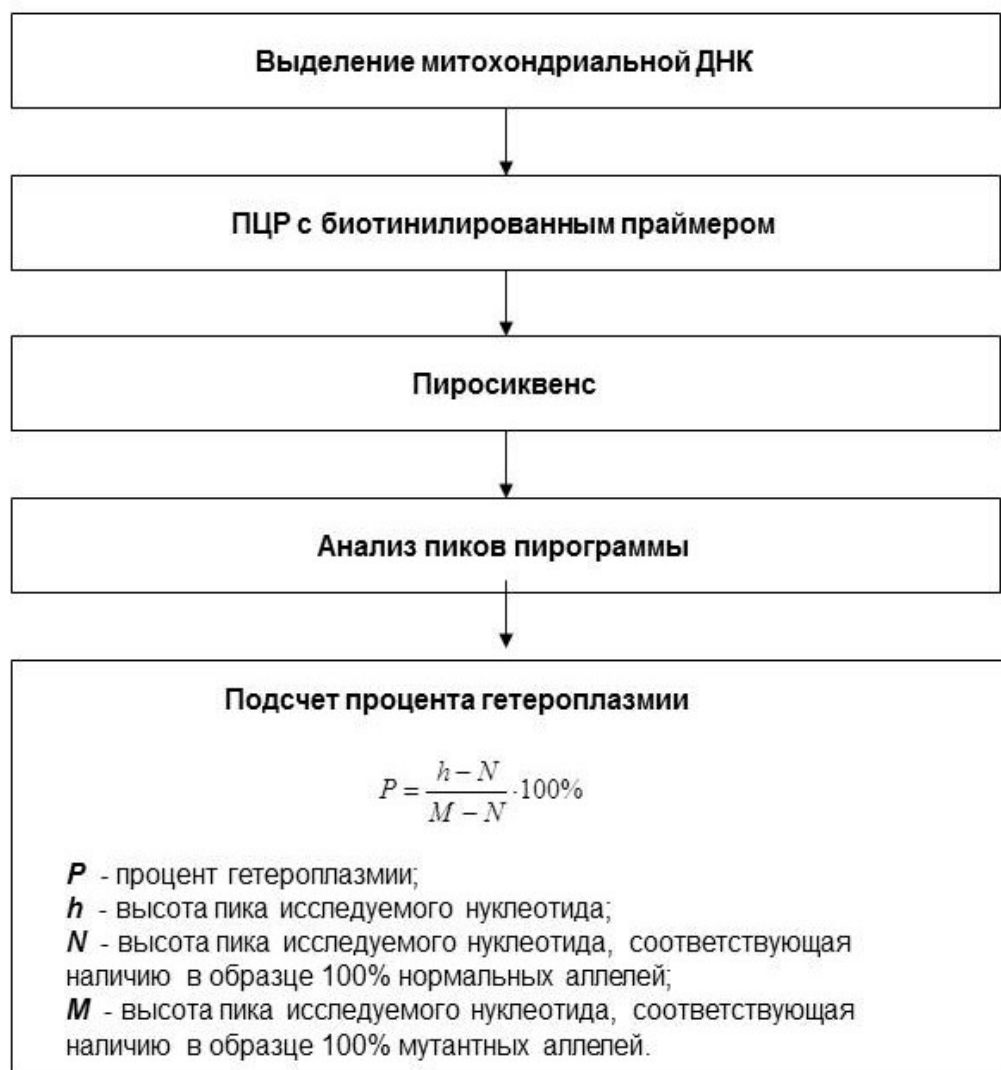


Рисунок 10. Анализ процента гетероплазии мутаций митохондриального генома с помощью разработанного метода (Сазонова, 2009; Сазонова, 2011; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

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. Две из них принадлежат гену 12 субъединицы рибосомальной РНК, а последняя – гену субъединицы 2 NADH дегидрогеназы (Сазонова, 2014; Сазонова, 2015).

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. Одни из них ассоциированы с

атеросклерозом, другие – связаны с отсутствием атеросклеротических поражений у индивидов. Следует подчеркнуть, что в нашем исследовании выявлена ассоциация ранее нигде не описанной мутации 652delG с атеросклерозом (Sazonova, 2007; Sazonova, 2008; Сазонова, 2008; Sazonova, 2009; Сазонова, 2010; Сазонова, 2011; Sazonova, 2011; Sazonova, 2012; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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. 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 (Sazonova, 2014; Сазонова, 2014; Sazonova, 2015).

Следует подчеркнуть, что спектр мутаций при различных типах атеросклеротического поражения интимы аорты может несколько отличаться. 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 (Sazonova, 2009; Сазонова, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2014; Sazonova, 2015).

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. 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 гетероплазмии по данной мутации падает до такой степени, что в нормальной интима он оказывается выше, чем в данном типе атеросклеротического поражения. Уровень гетероплазмии некоторых других мутаций митохондриального генома, по-видимому, в фиброзных бляшках снижается и перестает отличаться от данного параметра в нормальной интима аорт (Сазонова, 2014; Sazonova, 2014; Sazonova, 2015).

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 (Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2014; Sazonova, 2015).

При исследовании клеток крови участников исследования, у которых наличие атеросклероза было определено с помощью ультразвукографии, оказалось, что преобладающей мутацией как в атеросклеротических бляшках, так и в утолщении интимо-медиального слоя сонных артерий является m.12315G>A. 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 (Sazonova, 2007; Sazonova, 2008; Сазонова, 2008; Sazonova, 2009; Сазонова, 2010; Сазонова, 2011; Sazonova, 2011; Sazonova, 2012; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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 (Sazonova, 2007; Sazonova, 2008; Сазонова, 2008; Sazonova, 2009; Сазонова, 2010; Сазонова, 2011; Sazonova, 2011; Sazonova, 2012; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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 (Sazonova, 2007; Sazonova, 2008; Сазонова, 2008; Sazonova, 2009; Сазонова, 2010; Сазонова, 2011; Sazonova, 2011; Sazonova, 2012; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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. 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 (Sazonova, 2007; Sazonova, 2008; Сазонова, 2008; Sazonova, 2009; Сазонова, 2010; Сазонова, 2011; Sazonova, 2011; Sazonova, 2012; Сазонова, 2012; Сазонова, 2013; Сазонова, 2014; Sazonova, 2014; Сазонова, 2015; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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 (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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. 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 (Сазонова, 2014).

Не только мутации и гаплотипы, но и популяционные гаплогруппы митохондриального генома оказались ассоциированными с атеросклерозом. Например, гаплогруппа U связана с атеросклеротическими поражениями, а гаплогруппы M и T ассоциированы с отсутствием атеросклероза (Сазонова, 2014).

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.

Следует подчеркнуть, что при разработке подходов для генетической диагностики атеросклеротических поражений человека, при использовании небольшого количества маркеров, оказалось возможным объяснить 84% вариабельности атеросклеротических поражений. Это значительно превышает диагностические возможности каждого традиционного фактора риска ССЗ (Сазонова, 2014; Sazonova, 2015; Sazonova, 2017).

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. В дальнейших исследованиях, с целью выявления дополнительных молекулярно-генетических маркеров, планируется поиск новых митохондриальных мутаций, которые ассоциированы с атеросклерозом. 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 (Сазонова, 2014).

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.

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 гетероплазии мутаций митохондриального генома при различных патологиях, а также для исследования соматических мутаций в ядерном геноме (Сазонова, 2014).

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 (Сазонова, 2014).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 ИМС СА – интимо-медиальный слой сонных артерий
 ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
 ИМС – интимо-медиальный слой
 ins – инсерция (нуклеотида при мутировании)
 NADH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 ИБС – ишемическая болезнь сердца
 SNP – однонуклеотидная замена
 del – делеция (нуклеотида при мутировании)
 АТ – атеросклероз
 АСБ – атеросклеротическая бляшка
 рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота
 ТИМС СА – толщина интимо-медиального слоя сонных артерий
 АТФ – аденозинтрифосфат
 АСБ СА – атеросклеротическая бляшка сонной артерии
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 ИМ – инфаркт миокарда
 тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота
 ЛФБ – липофиброзная бляшка
 п.о. – пара оснований
 п.н. – пара нуклеотидов
 СА – сонные артерии
 ФБ – фиброзная бляшка
 МТ-СУВ – митохондриальный ген, кодирующий цитохром В
 МТ-ND1 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 1 NADH-дегидрогеназы
 МТ-ND2 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 2 NADH-дегидрогеназы
 МТ-ND3 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 3 NADH-дегидрогеназы
 МТ-ND4 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 4 NADH-дегидрогеназы
 МТ-ND4L – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 4L NADH-дегидрогеназы
 МТ-ND5 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 5 NADH-дегидрогеназы
 МТ-ND6 – митохондриальный ген, кодирующий субъединицу 6 NADH-дегидрогеназы
 МТ-АТФ5 – 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 (Сазонова, 2014).

В качестве дополнительного, уточняющего диагноз анализа рекомендуется проводить детекцию популяционных гаплогрупп U, M и T (Сазонова, 2014).

Рекомендованный алгоритм обследования может быть использован для определения предрасположенности людей к возникновению и развитию атеросклероза, его ранней диагностики и семейного анализа (Сазонова, 2014).

ВЫВОДЫ

1. Выявлена мозаичность распределения митохондриальных мутаций в интимае 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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 2008 Sep 4). doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека. // Кардиол. вестн. – 2012. – Т.7 (19). – №1. – С.57-61.
7. Иванова М.М., Бородачѳв Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2012. – №3. – С.115-122.
8. 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.
9. 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
10. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Zhelankin A.V., Myasoedova V.A., Postnov A.Y., Nurbaev S.D., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Mutation C3256T of Mitochondrial Genome in White Blood Cells: Novel Genetic Marker of Atherosclerosis and Coronary Heart Disease. // PLoS One. – 2012. – V.7(10). – e46573. doi: 10.1371/journal.pone.0046573.
11. Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Чичѳва 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.
12. 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.
13. Сазонова М.А., Синѳв В.В., Чичѳва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Орехов А.Н., Собенин И.А. Ассоциация гетероплазии мутаций митохондриальных генов РНК с гомогенатами пораженной атеросклерозом интимы аорты. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2012. – №4. – С.67-70.
14. Сазонова М.А., Синѳв В.В., Чичѳва М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Анализ гетероплазии некоторых генов субъединиц NADH дегидрогеназы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорты. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2012. – №4. – С.71-74.

15. 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.
16. Синёв В.В., Маляр Н.Л., Косогорова С.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А., Сазонова М.А. Вариабельность митохондриального генома в различных типах клеток крови человека. // Международный научно-исследовательский журнал. - 2013. – Т. 19, № 12. – С. 58-61.
17. 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.
18. 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 гетероплазмии мутации митохондриального генома G14459А в гомогенатах интимы аорты человека. // *Атеросклероз и дислипидемии*. – 2013. – №1. – С.40-44.
19. 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.
20. 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. // *Кардиол. вестн.* – 2013. – Т.8 (20). – №1. – С.32-35.
21. 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(7). – e68070. doi: 10.1371/journal.pone.0068070.
22. 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.
23. Сазонова М.А., Косогорова С.А., Синёв В.В., Баринаева В.А., Хасанова З.Б., Бобрышев Ю.В., Собенин И.А. Анализ гетероплазмии митохондриальной мутации G12315А гена в гомогенатах пораженной интимы аорты. // *Атеросклероз и дислипидемии*. – 2013. – 4(13). – С.46-49.
24. Sobenin I.A., Mitrofanov K.Y., Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Revin V.V., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome: perspectives in diagnostics and methodological pitfalls. // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – V.2014. – 292017. doi: 10.1155/2014/292017
25. 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. doi: 10.2174/1381612820666141013133000

26. 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.
27. 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.
28. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Barinova V.A., Ryzhkova A.I., Zhelankin A.V., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.253>
29. Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома с липофиброзными бляшками интимы аорты человека. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2015. – №1. – С.17-32.
30. 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; V.99(3). – P.717-719. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.019.
31. Баринова В.А., Синев 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.
32. Синёв В.В., Сазонова М.А., Карагодин В.П., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Мельниченко А.А., Демакова Н.А., Шкурят Т.П., Собенин И.А., Орехов А.Н. Изучение митохондриальной дисфункции с помощью цитоплазматических гибридов. // Пат. физиол. и эксп. тер. – 2017. – Т. 61. – № 2. – С.92-97.
33. Sinyov V.V., Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Melnichenko A.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N., Grechko A.V., Sobenin I.A.. Potential use of buccal epithelium for genetic diagnosis of atherosclerosis using mtDNA mutations. // Vessel Plus. – 2017. – V.1. – P.145-150. doi: <http://dx.doi.org/10.20517/2574-1209.2016.04>
34. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., Orekhov A.N., Ravani A.L., Sobenin I.A. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations. // Vessel Plus. – 2017. – V.1. – P.182-191. doi:10.20517/2574-1209.2017.16
35. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Khasanova Z.B., Postnov A.Y., 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