

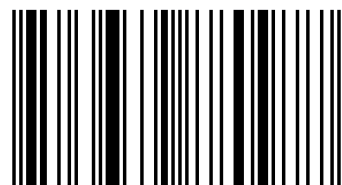
## Дефекты митохондриального генома и атеросклероз

Монография посвящена выяснению роли мутаций митохондриального генома в формировании атеросклеротических поражений сосудистой стенки. В ней описан разработанный автором с сотрудниками новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, позволяющий изучать ассоциацию наследственных и соматических мутаций с патологиями у человека. С помощью данного метода подтверждена фокальность атеросклеротических поражений в интиме аорты человека: обнаружены отличия в уровне гетероплазии 11 митохондриальных мутаций для разных участков как нормальной, так и пораженной атеросклерозом морфологически картированной интимы аорт человека. Выявлено, что различные типы атеросклеротических поражений интимы аорт и сонных артерий характеризуются определенным набором про- и антиатерогенных мутаций митохондриального генома. Обнаружена корреляция уровня гетероплазии некоторых митохондриальных мутаций участников исследования с возрастом. Описаны преобладающие при атеросклеротических поражениях гаплотипы, состоящие из ряда мутантных аллелей митохондриального генома. Выявлены мажорные гаплогруппы, как ассоциированные с атеросклерозом, так и имеющие антиатерогенный эффект.



Мargarita Сазонова

М. А. Сазонова закончила Харьковский государственный университет в 1986 году. Защитила кандидатскую диссертацию в 1999 году. В настоящее время работает в НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН в лаборатории клеточных механизмов атерогенеза, где занимается анализом мутаций митохондриального генома при атеросклерозе. Имеет 70 публикаций.



978-3-639-88097-7

МИТОХОНДРИИ-ГЕНЫ-АТЕРОСКЛЕРОЗ

Сазонова, Орехов, Собенин



Мargarita Сазонова · Александр Орехов · Игорь Собенин

## Дефекты митохондриального генома и атеросклероз

Роль патологии митохондриального генома в формировании атеросклеротических поражений артериальной стенки

  
**Palmarium**  
academic publishing

**Маргарита Сазонова  
Александр Орехов  
Игорь Собенин**

**Дефекты митохондриального генома и атеросклероз**



**Маргарита Сазонова  
Александр Орехов  
Игорь Собенин**

# **Дефекты митохондриального генома и атеросклероз**

**Роль патологии митохондриального генома в  
формировании атеросклеротических поражений  
артериальной стенки**

**Palmarium Academic Publishing**



## **Impressum / Выходные данные**

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

Verlag / Издатель:

Palmarium Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

OmniScriptum GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: [info@palmarium-publishing.ru](mailto:info@palmarium-publishing.ru)

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

**ISBN: 978-3-639-88097-7**

Zugl. / Утверд.: Москва, НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, 2014

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2014 OmniScriptum GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2014

## Оглавление

<b>Введение</b> .....	9
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	14
1.1. Медицинские и социальные аспекты атеросклероза.....	14
1.2. Патогенез атеросклероза.....	16
1.2.1. Общие сведения об атеросклерозе.....	16
1.2.2. План строения стенки здоровой артерии.....	19
1.2.3. Воззрения на проблему атеросклероза.....	21
1.2.4. Гипотезы патогенеза атеросклероза.....	23
1.2.4.1. Роль эндотелия в атеросклерозе.....	31
1.2.4.2. Моноциты-макрофаги и их роль в атеросклерозе.....	33
1.2.4.3. Вовлеченность гладкомышечных клеток в атеросклероз.....	35
1.3. Факторы риска развития атеросклероза.....	38
1.3.1. Средовые факторы риска развития атеросклероза .....	38
1.3.1.1. Психологический стресс.....	38
1.3.1.2. Экологическая обстановка.....	39
1.3.2. Поведенческие факторы риска развития атеросклероза.....	40
1.3.2.1. Курение.....	40
1.3.2.2. Гиподинамия.....	41
1.3.2.3. Питание.....	42
1.3.3. Биохимические факторы риска развития атеросклероза.....	44
1.3.3.1. Ожирение.....	44
1.3.3.2. Сахарный диабет.....	46

1.3.3.3. Нарушения липидного обмена.....	47
1.3.3.4. Факторы, влияющие на липидный обмен.....	48
1.3.4. Независимые факторы риска развития атеросклероза.....	49
1.3.4.1. Пол.....	49
1.3.4.2. Возраст.....	50
1.3.5. Генетические факторы риска развития атеросклероза.....	51
1.3.5.1. Длина теломерных повторов.....	51
1.3.5.2. Мутации ядерного генома.....	53
1.3.5.3. Митохондриальные болезни.....	73
1.3.5.3.1. Симптомы митохондриальных цитопатий.....	76
1.3.5.3.2. Характеристика мутаций митохондриального генома.....	77
1.3.5.3.2.1. Крупные структурные перестройки.....	78
1.3.5.3.2.2. Мутации одного или нескольких нуклеотидов.....	79
<b>Глава 2. Материалы и методы.....</b>	<b>97</b>
2.1. Исследуемые мутации.....	97
2.2. Материалы.....	99
2.3. Методы.....	102
2.3.1. Подготовка образцов интимы аорты для выделения ДНК.....	102
2.3.2. Ультрасонографическое исследование.....	103
2.3.3. Получение и подготовка образцов крови для анализа.....	105
2.3.4. Выделение ДНК.....	105
2.3.5. Электрофорез образцов ДНК и ПЦР-фрагментов.....	107

2.3.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	108
2.3.7. Пиросеквенирование.....	120
2.3.7.1. Краткое описание метода.....	120
2.3.7.2. Приготовление проб.....	123
2.3.7.3. Используемое оборудование.....	125
2.3.8. Трансмиссионная электронная микроскопия.....	128
2.3.9. Статистическая обработка данных.....	128
<b>Глава 3. Результаты.....</b>	<b>130</b>
3.1. Сравнительный электронно-микроскопический анализ митохондрий клеток интимы в нормальных участках сосудистой стенки и атеросклеротических поражениях.....	130
3.2. Разработка метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома.....	131
3.2.1. Способы определения процента гетероплазмы.....	135
3.2.2. Общая формула для подсчета процента гетероплазмы мутаций митохондриального генома....	147
3.2.2.1. Общая формула.....	147
3.2.2.2. Пример расчета процента гетероплазмы мутации A1555G митохондриального генома по общей формуле.....	147
3.2.3. Примеры гистограмм исследованных мутаций и уровня гетероплазмы, определенного по пирограммам ПЦР-фрагментов образцов ДНК.....	148
3.2.3.1. Для мутации T3336C.....	148
3.2.3.2. Для мутации C5178A.....	150
3.2.3.3. Для G15059A.....	150
3.2.4. Оценка воспроизводимости метода измерения	

степени гетероплазмии.....	150
3.3. Исследование интимы аорты человека с помощью метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома.....	155
3.3.1. Цель исследования интимы аорт индивидов.....	155
3.3.2. Детекция уровня гетероплазмии 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзных бляшках и нормальной интиме аорт.....	157
3.4. Теоретическое обоснование дальнейших исследований интимы артерий.....	175
3.5. Анализ уровня гетероплазмии в гомогенатах нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт.....	177
3.6. Анализ уровня гетероплазмии в участках морфологически картированной стенки аорт.....	184
3.6.1. Морфологическое и мутационное картирование аорт.....	184
3.6.2. Анализ 11 мутаций митохондриального генома..	188
3.6.3. Совокупная мутационная нагрузка 11 мутаций в морфологически картированных аортах.....	191
3.7. Преобладающие мутации в атеросклеротических поражениях аорт.....	195
3.8. Анализ уровня гетероплазмии в клетках крови.....	195
3.8.1. Принцип исследования атеросклеротических поражений интимы сонных артерий.....	196
3.8.1.1. Оценка размера атеросклеротической бляшки.....	196
3.8.1.2. Оценка толщины интимы-медии (ТИМ).....	197
3.8.2. Ассоциация уровня гетероплазмии мутаций с	

возрастом.....	200
3.8.3. Ассоциация мутаций митохондриального генома с атеросклеротическими бляшками сонных артерий.....	201
3.8.3.1. Анализ 11 мутаций.....	201
3.8.3.2. Уровень гетероплазмии мутации G13513A.....	202
3.8.3.3. Совокупная мутационная нагрузка при атеросклеротических бляшках в сонных артериях.....	203
3.8.3.3.1. Логистическая регрессия.....	204
3.8.3.3.2. ROC-анализ.....	206
3.8.4. Ассоциация мутаций с толщиной интимо-медиаьного слоя сонных артерий.....	207
3.8.4.1. Анализ 11 мутаций митохондриального генома.....	207
3.8.4.2. Совокупная мутационная нагрузка при патологическом утолщении интимо-медиаьного слоя сонных артерий.....	209
3.8.4.2.1. Логистическая регрессия.....	209
3.8.4.2.2. ROC-анализ.....	211
3.8.5. Генодиагностика атеросклероза.....	213
3.8.5.1. Пороговое значение процента гетероплазмии отдельных мутаций, ассоциированное с образованием атеросклеротических бляшек в сонных артериях.....	213
3.8.5.2. Пороговое значение процента гетероплазмии отдельных мутаций, ассоциированное с патологическим утолщением интимо-медиаьного слоя сонных артерий.....	214
3.8.6. Ассоциация мутаций с факторами риска	

атеросклероза.....	215
3.9. Ассоциация гаплогрупп митохондриального генома с атеросклеротическими поражениями.....	217
3.9.1. Анализ ассоциации гаплогрупп с атеросклеротическими бляшками.....	218
3.9.1.1. Гаплогруппа М у индивидов с атеросклеротическими бляшками.....	218
3.9.1.2. Гаплогруппа Т у индивидов с атеросклеротическими бляшками.....	221
3.9.1.3. Гаплогруппа У у индивидов с атеросклеротическими бляшками.....	224
3.9.2. Анализ ассоциации гаплогрупп с факторами риска атеросклероза.....	228
3.9.2.1. Гаплогруппа U у индивидов с гипертонией.....	228
3.9.2.2. Гаплогруппа U у индивидов с наличием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ).....	231
3.10. Ассоциация популяционных гаплогрупп с мутациями митохондриального генома.....	234
3.10.1. Гаплогруппа U и митохондриальные мутации...	234
3.10.2. Гаплогруппа H и митохондриальные мутации...	235
3.10.3. Гаплогруппа T и митохондриальные мутации...	236
3.10.4. Гаплогруппа M и митохондриальные мутации...	237
11. Гаплотипы мутаций митохондриального генома и атеросклероз.....	238
<b>Глава 4. Обсуждение.....</b>	<b>242</b>
<b>Глава 5. Заключение.....</b>	<b>275</b>
<b>Список литературы.....</b>	<b>276</b>

## Список сокращений

dCTP - цитозилтрифосфат

dGTP - гуанозилтрифосфат

dTTP - тимидилтрифосфат

Ala - аминокислота аланин

dATP - аденозилтрифосфат

del - делеция (нуклеотида при мутировании)

DHU - дигидроуридин

dNTP - дезоксирибонуклеотидилтрифосфат

Glu - аминокислота глутамин

Gly - аминокислота глицин

Ile - аминокислота изолейцин

ins - инсерция (нуклеотида при мутировании)

Leu - аминокислота лейцин

Met - аминокислота метионин

MQ - бидистиллированная вода высокой степени отчистки

NADH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ND1 - субъединица 1 NADH-дегидрогеназы

SDS - додецилсульфат натрия

Ser - аминокислота серин

SNP - однонуклеотидная замена

Val - аминокислота валин

АСБ - атеросклеротическая бляшка

АТ - атеросклероз

АТФ – аденозинтрифосфат

БЗГ – боль за грудиной

ГК - гипертрофическая кардиомиопатия

ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка



ДИУ - диффузное интимальное утолщение стенки сонной артерии

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

ИМС - интимо-медиаальный слой

ЛФБ – липофиброзная бляшка

НАП – начальное атеросклеротическое поражение

ОХ - общий холестерин

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЦР / ПДРФ - ПЦР с последующим рестрикционным анализом

рРНК - рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

ТВЕ - трис-борат-ЭДТА буфер

ТГ - триглицерид

ТИМ - толщина интимо-медиаального слоя

тРНК - транспортная рибонуклеиновая кислота

ФБ – фиброзная бляшка

ХС ЛПВП - липопротеиды высокой плотности

ХС ЛПНП - липопротеиды низкой плотности

ХС ЛПОНП - липопротеиды очень низкой плотности

ЭДТА - этилендиаминтетраацетат

## **Введение**

В двадцать первом столетии наибольшее влияние на здоровье человечества оказывают социально значимые полигенные мультифакториальные патологии, такие как атеросклероз, диабет, рак [5-7, 9, 16, 23, 27-30, 33, 37, 43, 46-50, 52, 56-58, 65, 76-78, 102, 121, 136, 266, 507, 554]. Изучение их патофизиологических механизмов и возможные приемы предупреждения являются одной из приоритетных задач научных исследований в области медицины. В России, как и в большинстве индустриальных стран, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают первое место в структуре инвалидизации и смертности, в том числе, преждевременной, а также ведут к эскалации расходов на здравоохранение [257]. Морфологической основой смертности от сердечно-сосудистых патологий в большинстве случаев является атеросклероз магистральных сосудов человека [5-8, 16, 17, 57, 65, 216,246]. Для атеросклероза характерно развитие дегенеративных изменений в стенках крупных артерий с последующей окклюзией просвета сосудов и ограничением кровоснабжения жизненно важных органов, таких, как сердце, головной мозг, почки [5-8,16,17, 57, 65]. Ранее считалось, что атеросклероз является заболеванием людей пожилого возраста. Однако в настоящее время оно приняло характер эпидемии и охватило практически все население развитых стран [246]. Атеросклероз все чаще поражает людей молодого возраста. Это свидетельствует о том, что изучение проблемы атеросклероза являет собой одну из актуальнейших научных и медицинских задач.

Так как на начальных стадиях заболевания атеросклероз распознать крайне трудно, необходимо более детальное рассмотрение патофизиологии данного заболевания и наследственных маркеров, которые являются ранними предикторами атеросклероза. В последнее время большое количество исследований было посвящено поиску генетических биомаркеров атеросклероза и ССЗ в ядерном геноме человека. Корреляция с атеросклерозом и сердечно-сосудистыми заболеваниями была обнаружена для ряда полиморфизмов, локализованных в генах, продукты которых вовлечены в метаболизм артериальной стенки, таких как гены эндотелина-1 и -2 (EDN1, EDN2), эндотелин-преобразующего фермента (ECE1), селектина-Е (SELE), молекулы сосудистой клеточной адгезии 1 (VCAM1), ангиотензин-превращающего фермента 1 (ACE), рецептора ангиотензина II типа 1 (AGTR1), аполипептидов A2, A4, A5, C3, B и H, адренорецептора альфа-2 (ADRA2B), рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [123, 138, 175, 176, 209, 210, 215, 227, 251-253, 273, 301, 304, 310, 317, 343, 388, 392, 416, 461, 539]. На развитие и прогрессирование атеросклеротических поражений и ССЗ могут повлиять генетически обусловленные вариации активности белков, вовлеченных в атерогенез, в том числе участвующие в процессах активации эндотелия, развитии воспалительных реакций, регуляции миграции и пролиферации гладкомышечных клеток, а также связанные с коагуляцией и фибринолизом [29, 43, 112, 125, 127, 128, 139, 165, 166, 168, 173, 175, 176, 178, 180, 183, 195, 200, 209, 210, 212, 213, 215, 22, 227, 230, 238, 245, 251-253, 273, 293, 304, 306, 308, 310, 311, 317, 319, 320, 326-330, 332, 341, 343, 346, 348, 370, 377, 385, 388, 391, 392, 399, 416, 421-424, 434, 444, 445, 447, 451, 461,

475-477, 485, 488, 503, 511, 529-531, 539, 548]. Но даже в сравнении с отдельными традиционными факторами риска атеросклероза и ССЗ, мутации ядерного генома имеют довольно низкую диагностическую и прогностическую значимость, как факторы риска. При наличии любого из вариантов полиморфизмов, достоверно ассоциированного с атеросклерозом или какой-либо сердечно-сосудистой патологией, относительный риск варьирует в пределах 1,06-1,40. В совокупности, все известные полиморфизмы ядерного генома объясняют не более 5% наличия сердечно-сосудистых заболеваний [301].

На развитие патологий могут влиять изменения как в ядерном, так и в митохондриальном геноме человека.

Согласно данным литературы, в патологии человека показана ассоциация различных заболеваний с некоторыми мутациями митохондриального генома. Митохондриальные мутации ассоциируются с различными патологиями, часто встречающимися в сочетании с атеросклеротическими поражениями, такими как стеноз коронарных сосудов, некоторые формы диабета и глухоты, предрасположенность к острым инфарктам миокарда, кардиомиопатии [24, 25, 27, 28, 30, 46-49, 136, 137, 182, 224, 259, 266, 300, 318, 325, 334-339, 344, 345, 349, 352, 358, 359, 368, 378, 379, 382, 389, 394, 396, 403, 404, 413, 426, 427, 429, 433, 437, 443, 448, 450, 464, 468, 469, 473, 474, 486, 490, 492, 494, 497-499, 501, 502, 506, 509, 513-515, 518, 526, 527, 542, 544, 546, 552-554].

Митохондриальная ДНК человека представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу и содержит 37 генов: 22 гена транспортных РНК, 2 гена рибосомальных РНК и 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи: цитохрома В,

АТФазы, цитохром-С-оксидазы, NADH-дегидрогеназы. В каждой митохондрии содержится несколько копий ее генома. Митохондриальный геном наследуется по материнскому типу. Он отличается выраженной нестабильностью, поэтому в нем нередко соматические мутации, возникающие в течение жизни индивида. Пенетрантность и экспрессивность таких мутаций варьируют в широких пределах между родственниками (по материнской линии) от семьи к семье и зависят от многих факторов, но главным образом, от генотипа и уровня гетероплазмии (смеси мутантных и нормальных молекул ДНК). Следовательно, при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями людей необходима не только качественная (есть мутация или ее нет), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (процент гетероплазмии).

Исследования зарубежных и отечественных исследователей посвящены, в основном, аутосомным мутациям, ассоциированным с атеросклерозом [29, 48, 50, 123, 127, 128, 139, 156, 166, 173, 175, 176, 178, 180, 183, 195, 200, 209, 210, 213, 215, 221, 227, 228, 230, 245, 251-253, 270, 273, 301, 304, 306, 308, 310, 311, 317, 319, 320, 322, 326, 328-330, 332, 341, 343, 346, 348, 360, 385, 388, 391, 392, 399, 406, 416, 421-424, 432, 434, 444, 445, 447, 451, 461, 477, 485, 488, 503, 511, 516, 529-531, 539, 547, 548]. Молекулярно-генетическим дефектам митохондриального генома, ассоциированным с атеросклеротическими поражениями, посвящено всего несколько работ [132, 148, 155, 176, 202, 325, 368, 379, 389, 394, 404, 434, 499, 502, 506, 519, 537, 542]. В большинстве таких исследований анализировались обширные делеции,

приводящие к полной дисфункции митохондриального генома [132, 155, 202, 325, 379,499, 502, 506, 542].

В связи с этим особенно актуальным представляется исследование при атеросклеротических поражениях точечных мутаций, микроделеций и микроинсерций, локализованных в митохондриальных генах [24, 25, 27, 28, 30, 46-49].

## **Глава 1. Обзор литературы**

### **1.1. Медицинские и социальные аспекты атеросклероза**

Атеросклероз является полигенным мультифакториальным заболеванием, одной из наиболее грозных патологий 21 века. Спектр патологий, сопутствующих атеросклеротическим поражениям, включает в себя такие сердечно-сосудистые заболевания, как ишемическая болезнь сердца, гипертрофическая кардиомиопатия, фибрилляция предсердий, хроническая сердечная недостаточность, а также большинство метаболических расстройств генерализованного характера, таких как диабет, астма, клиническое ожирение и т. д. [5-9, 16, 33, 34, 37, 42, 45-53, 62, 64, 67, 77, 78,98,102, 107, 113, 118-120,137, 141, 144, 146, 150, 156, 161, 172, 176, 178, 181, 185, 191, 208, 209, 215, 219, 225, 230, 231, 240, 242, 246, 253, 257, 268, 287, 294, 296, 302, 310, 327, 350, 361, 364, 367, 368, 372, 373, 376, 381, 390, 397, 404, 419, 422, 434, 440, 445, 460, 465, 516, 539, 548].

В России, как и в большинстве индустриальных стран, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) атеросклеротического генеза занимают первое место в структуре инвалидизации и смертности. Раннее выявление лиц, предрасположенных к развитию атеросклероза и его клинических проявлений, и последующая эффективная профилактика имеет большое значение не только для снижения сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности, но и для уменьшения расходов на здравоохранение.

Смертность от ССЗ в Российской Федерации составляет в среднем 535 случаев на 1000 смертей; среди них смертность от

ИБС занимает 47%, от острых нарушений мозгового кровообращения – 36%, от атеросклероза нижних конечностей – 7%, от острого инфаркта миокарда – 5%. Морфологической основой смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 90% случаев является атеросклероз [5-8, 16, 17, 57, 65, 216, 246]. Поэтому вклад заболеваний атеросклеротического генеза и их последствий в России в общую смертность, составляющую около 1300000 человек в год, представляется весьма значительным [246]. Клиническая и социально-экономическая значимость ССЗ во всех странах неуклонно возрастает по мере повышения среднего возраста населения в популяции и усиления воздействия ключевых факторов риска.

Россия характеризуется ненормально высокими показателями сердечно-сосудистой смертности. Такой показатель, как стандартизованная сердечно-сосудистая смертность, по данным ВОЗ в России составляет 375 случаев на 100000 населения. При этом в Финляндии этот показатель (наивысший в Европе) составляет 176, а в Швеции – 124 случая на 100000 населения. В наиболее благополучных по сердечно-сосудистой заболеваемости странах Западной Европы, например, в Италии и Франции, этот показатель составляет 75 и 49 случаев на 100000 человек, соответственно [246]. Несмотря на существенные достижения в области медицины и биологии, заболеваемость и смертность от атеросклеротических заболеваний остаются на недопустимо высоком уровне. К сожалению, арсенал эффективных терапевтических средств и адекватных целей антиатеросклеротической терапии остается весьма ограниченным. Современные алгоритмы оценки сердечно-сосудистого риска, учитывающие совокупное взаимодействие



нескольких факторов риска, в состоянии объяснить около 70% variability возникновения острого инфаркта миокарда [292]. Одной из причин этого является недостаточное количество биомаркеров ССЗ.

Атеросклероз развивается и прогрессирует в сосудистой системе с различной скоростью. Аорта является наиболее вероятным регионом для развития раннего атеросклероза [17-19, 133, 137, 144, 183, 185, 208, 234, 240, 244, 355, 356, 371, 374, 397, 411, 510, 520]. В аорте уже в подростковом и юношеском периоде часто встречаются начальные атеросклеротические поражения, например, жировые полосы. Это было отмечено в исследованиях, проведенных на жертвах военных действий [375] и в многоцентровом исследовании «The pathobiological determinants of atherosclerosis in youth» (PDAY) [374, 446]. Распространенность атеросклеротического поражения сосудов среди пожилых людей достигает 100% [133, 144, 218, 298, 371, 397, 475, 489, 510, 511].

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

Атеросклероз трудно распознаваем на начальных стадиях возникновения и развития заболевания. Представляется необходимым детальное изучение патофизиологических механизмов данного заболевания, а также молекулярно-генетических маркеров, являющихся ранними предикторами атеросклеротических поражений.

## **1.2. Патогенез атеросклероза**

### **1.2.1. Общие сведения об атеросклерозе**

В 1965 году А.Л. Мясников дал определение атеросклероза, как «патологического процесса, основой которого является липоидоз - отложение липидов, главным образом холестерина, в интиме артерий эластического типа - с последующим образованием соединительнотканых очаговых уплотнений - бляшек» [52]. При этом для атеросклероза характерно хроническое очаговое поражение артерий [1-3, 5-9, 14, 16, 20, 23, 37, 52, 54, 55, 57, 58, 64, 65]. Как известно, термин "атеросклероз" произошел от греческих слов *athero* ("каша") и *sclerosis* ("затвердение"). Гиперхолестеринемия является одним из факторов риска развития атеросклероза [61, 219, 225, 313, 382, 489, 491]. Холестерин циркулирует в кровеносном русле сосудов в связанном с белками и другими липидами (триглицеридами, фосфолипидами) состоянии, то есть в виде комплексов, которые называются липопротеидами. Липопротеиды подразделяются на несколько разных групп, в зависимости от процентного соотношения составных частей этих комплексов. Две группы, являющиеся активными переносчиками холестерина из крови в ткань, а именно липопротеиды низкой и очень низкой плотности, называются атерогенными.

В результате формирования атеросклеротической бляшки происходит стеноз (сужение просвета сосуда). Кровоток по артерии уменьшается, возникают его завихрения. Последствием этого может быть тромбоз артерии, хроническая недостаточность кровоснабжения обслуживаемого органа. Следует подчеркнуть, что при стрессовых нагрузках, даже без образования тромба, инсульт или инфаркт может наступить из-за перераспределения крови и недостатка кровотока по пораженной атеросклерозом артерии. Еще одной причиной

инсульта или инфаркта является наличие в кровотоке кусочков распадающейся атеросклеротической бляшки (процесс ее распада носит название эмболия) и последующая закупорка мелких сосудов.

Диагноз атеросклероза ставится при наличии следующих параметров:

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

Субклинический (бессимптомный) атеросклероз является наиболее широко распространенной патологией; атеросклеротические поражения артерий выявляются уже у молодых лиц и постоянно прогрессируют в течение десятилетий, прежде чем приводят к возникновению клинических проявлений [17-19, 133, 137, 144, 183, 185, 208, 234, 240, 244, 355, 356, 371, 374, 397, 411, 510, 520]. В среднем и пожилом возрасте у лиц без клинических проявлений атеросклероза частота выявления атеросклеротических поражений сосудов приближается к 100% [133, 144, 218, 298, 371, 397, 475, 489, 510, 511].

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

Основной мишенью атеросклеротического процесса являются крупные и средние артерии мышечного типа [6-9, 16-

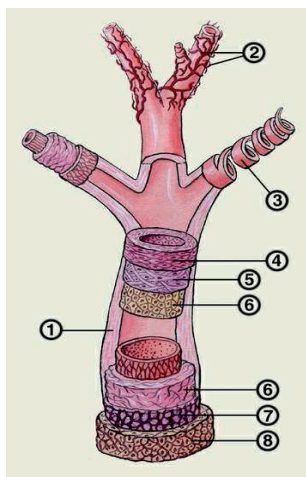
19, 64, 65, 99, 232, 233, 446]. Так как в атерогенез вовлечены все основные слои сосудистой стенки – интима, медиа, адвентиция и отделяющие медию от других оболочек внутренняя и наружная эластические мембраны [3, 5, 8, 16, 17], представляется необходимым рассмотреть морфологическое строение артерии.

### **1.2.2. План строения стенки здоровой артерии**

По типу строения сосудистой стенки крупные артерии нашего организма разделяют на 2 класса - мышечные (артерии поперечнополосатой мускулатуры, внутренних органов) и эластические (самые крупные артерии, такие как аорта). Ряд артерий относят к промежуточному мышечно-эластическому типу (сонная, подключичная артерии). План строения сосудистой стенки представлен на рисунке 1 [281].

Артерия мышечного типа состоит из трех оболочек [233]. Внутренняя оболочка называется интимой. Она представлена эндотелием, подэндотелиальным слоем и внутренней эластической мембраной. Данная мембрана отделяет внутреннюю оболочку от средней. Поверхность здорового эндотелия имеет антитромбогенные и антиадгезивные свойства. Эндотелий синтезирует и секретирует ряд регуляторных соединений, обеспечивающих нормальное состояние других сосудистых тканей. Он функционирует как полупроницаемая мембрана, Средняя оболочка называется «медия». Состоит данная оболочка из гладких миоцитов, расположенных по спирали. При сокращении миоцитов происходит уменьшение просвета сосуда. Таким образом, они поддерживают кровяное давление и обеспечивают проталкива-

ние крови в дистальные отделы. Эндотелин, оксид азота и некоторые простагландины являются основными эффекторами данной функции сосудистой стенки. Между гладкими миоцитами находится небольшое количество эластических волокон. Наружная эластическая мембрана расположена на границе между наружной и средней оболочкой. Адвентиция (наружная оболочка артерии) состоит из рыхлой соединительной ткани, пронизанной кровеносными сосудами и нервными волокнами. Спаданию артерий препятствуют вышеупомянутые эластический каркас, эластические волокна и эластические пограничные мембраны. Это обеспечивает непрерывность кровотока в сосудах.



**Рисунок 1 . Схема строения стенок артерий**

1. Артерия;
2. Сосуды сосудистой стенки;
3. Мышечные тяжи стенки артерии (располагаются по спирали);

4. Мышечная оболочка (медия);
5. Внутренняя эластическая мембрана;
6. Эндотелий (интима);
7. Наружная эластическая мембрана;
8. Наружная оболочка (адвентиция).

Из трех оболочек состоит и стенка артерии эластического типа. Интима такой артерии представлена эндотелием и подэндотелиальным слоем с тонкофибриллярной соединительной тканью, в которой много гликозаминогликанов и фосфолипидов. В толстом подэндотелиальном слое содержится большое количество звездчатых малодифференцированных клеток. На границе со средней оболочкой располагается густое сплетение эластических волокон. Медия очень широкая, представлена большим количеством пластических окончатых мембран и связанных с ними и между собой эластических волокон, которые, вместе с эластическими волокнами внутренней и наружной оболочек, составляют выраженный эластический каркас, смягчающий толчки крови во время систолы и поддерживающий тонус во время диастолы. Между мембранами имеются гладкие миоциты. Наружная эластическая мембрана отсутствует, в рыхлой волокнистой соединительной ткани адвентиции имеются эластические и коллагеновые волокна, сосуды сосудов и нервные стволы.

### **1.2.3. Воззрения на проблему атеросклероза**

Атеросклероз является системным заболеванием сердечно-сосудистой системы, вследствие чего необходимы

четкие представления об этиологии, пато- и морфогенезе, а также генетических аспектах данной патологии, без которых невозможна разработка эффективных профилактических и терапевтических мероприятий.

Наиболее ранние воззрения на механизм развития атеросклероза принадлежат Р. Вирхову, С. Рокитанскому [435], Л. Ашоффу [119]. В последние 30 лет были сформулированы гипотезы, объясняющие возникновение и развитие атеросклероза как следствие повреждения эндотелия [439], моноклональной пролиферации ГМК [140,141], дефектов функции рецепторов к липопротеидам низкой плотности (ЛПНП), в частности, к окисленным ЛПНП [247, 248], а также инфильтрационно–комбинационная теория [32-39]. Эти гипотезы и теории, наряду с оригинальными работами отечественных исследователей Н.Н. Аничкова [6-9], А.Н. Климова [32-39], В.А. Нагорнева [53-76, 393] и других [1-5, 18-23, 106, 107, 151-153, 157], требуют дальнейшего изучения и осмысливания. Между тем, число исследований по различным аспектам атеросклероза неуклонно и стремительно возрастает. Появились авторитетные научные журналы, публикующие преимущественно материалы по изучению атеросклероза (*Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Atherosclerosis; Cardiovascular Research*) [282-284].

Разумеется, в одной работе отсутствует возможность осветить все аспекты столь многогранной проблемы, как атеросклероз. Поэтому в настоящем обзоре литературы, посвященном структурно-функциональным и молекулярно-генетическим аспектам атеросклероза, не претендуя на полноту изложения материала, будет приведен анализ ключевых публикаций данной тематики. Наряду с этим кратко

будут рассмотрены основные гипотезы патогенеза атеросклероза.

#### **1.2.4. Гипотезы патогенеза атеросклероза**

Согласно определению Всемирной Организации Здравоохранения (1958), атеросклероз - это переменная комбинация изменений в интиме артерий (в отличие от артериол), состоящая из очагового накопления липидов, сложных углеводов, крови и кровяных веществ, фиброзной ткани и кальциевых отложений и связанная с изменениями в меди. К сожалению, данное определение отражает только морфологическую сущность атеросклероза, не затрагивая патогенетические аспекты заболевания.

Несмотря на то, что количество публикаций по проблеме атеросклероза стремительно возрастает, морфогенез атеросклероза человека изучен недостаточно. Мало информации о ранних формах проявления этого заболевания, что связано не только со сложностью выявления ранних поражений, но и с отсутствием достоверных доказательств их трансформации в атеросклеротическую бляшку. Имеющиеся данные по экспериментальному атеросклерозу не могут восполнить этот пробел, так как при существующих моделях воспроизведения атеросклероза у животных высока вероятность смещения или полного извращения реально существующей последовательности развития заболевания. Все это свидетельствует о необходимости расширения существующих и поиска новых подходов к изучению аутопсийного материала, прежде всего полученного от лиц молодого возраста. По мнению Н.Н. Аничкова, «особенно



тщательно должны быть исследованы ранние стадии заболевания, так как от их выявления во многом зависит правильность представлений о морфогенезе, патогенезе и сущности заболевания” [6].

Сведения о ранних формах атеросклеротического поражения артерий человека, приведенные в различных публикациях, различаются между собой и могут трактоваться по-разному. Так Velican и Velican, анализируя ранние атеросклеротические поражения у детей и подростков, приводят статистические выкладки по частоте выявления липидных полосок и фиброзных бляшек [519, 520]. Ross также считает, что липидные полоски являются ранними атеросклеротическими поражениями, которые в последующем трансформируются в фиброзные бляшки [438-441]. В доказательство приведены экспериментальные данные по эволюции поражений, развивающихся в артерии приматов при кормлении их холестерином [219]. Вместе с тем известно, что у детей до 10 лет липидные полоски, занимающие зачастую более 10% поверхности аорты, локализуются обычно в тех участках сосуда, в которых редко встречаются фиброзные бляшки [374]. Более того, эти полоски часто обнаруживаются у детей, живущих в тех районах земного шара, где относительно редко встречаются атеросклеротические поражения в более позднем возрасте [374, 375]. В ряде работ А. М. Вихерта, В.С. Жданова и других внимание было сфокусировано на очагах желатинозного набухания и ритмических структурах интимы, которые были расценены как ранние предатеросклеротические поражения артерий человека [16, 17, 19, 20, 23, 107].

Некоторые ученые выделяют три основные формы ранних атеросклеротических поражений:

- 1) фокальный отек интимы, обозначенный как желатинозное набухание;
- 2) пристеночные микротромбы;
- 3) локальные липидные скопления, визуально проявляющиеся в виде зеленоватых пятен и полосок [151, 152].

Восап и соавторы считают, что каждый из перечисленных вариантов поражений сосудов может являться непосредственным предшественником фиброзных бляшек [151, 152]. Однако до настоящего времени эти воззрения ни подтверждены, ни опровергнуты. Окончательно сформировавшихся представлений о возникновении наиболее ранних атеросклеротических поражений в артериях человека среди ученых нет.

Компьютерный анализ с картированием зон поражения позволил уточнить зависимость выраженности атеросклеротических поражений от их топографии [192-194]. Зоны с особой предрасположенностью к поражению (ПП) атеросклерозом были выявлены в артериях человека [192,495]. По площади и степени поражения атеросклерозом ПП участки всегда сильно отличаются от близлежащих резистентным к поражению (РП) атеросклерозом участков аорты [192]. Например, в грудном отделе аорты человека ПП участки локализуются на задней стенке аорты вокруг устьев межреберных артерий, тогда как РП участки распределены по передней или вентральной стенке сосуда [147,192]. У детей и подростков в ПП участках аорты отмечали липидные полоски, которые у более взрослых лиц замещались липидными и фиброзными бляшками [192,194]. По данным Bhagwat и Robinson, в ПП участках аорты атеросклеротические поражения обнаруживаются уже у детей и подростков, тогда как в РП

участках аорты интима может сохраняться без особых изменений до 40-летнего возраста [147]. По мнению ряда исследователей, путем сравнения ПП и РП участков у лиц различного возраста можно выяснить особенности строения и клеточного состава интимы сосуда в начальных и более продвинутых стадиях развития атеросклероза [147,192-194]. Перспектива такого исследования особенно важна в связи с отсутствием данных об особенностях клеточного состава интимы в участках раннего атеросклеротического поражения артерий человека.

Трудно назвать другое такое заболевание, как атеросклероз, в отношении патогенеза которого было выдвинуто столь большое количество теорий, гипотез, предположений и спекуляций. Заслуживавшие внимания теории и гипотезы относительно патогенеза атеросклероза укладываются в рамки двух концепций. Одна исходит из того, что причиной возникновения атеросклероза являются липопротеиды и некоторые белки, например фибриноген плазмы крови, иммуноглобулины, и, таким образом, инициация развития атеросклероза “привносится” в артериальную стенку из крови (“теории плазменной концепции”). Другое концептуальное видение проблемы объединяет гипотезы, в которых в качестве первопричины развития атеросклеротического процесса выдвигаются изменения клеточных, соединительнотканых и других структур артериальной стенки, наступающие под воздействием различных факторов, в том числе и старения организма человека (“гипотезы сосудистой концепции”) [32-35].

Среди существующих теорий наибольшее признание получила инфильтрационная гипотеза, разработанная Н.Н. Аничковым и его учениками [32-39, 59, 60]. Эта гипотеза основывается на положении, согласно которому большая часть энергетических потребностей артериальной стенки, особенно ее структур, лишенных сосудов (интимы, внутренней трети меди) восполняется за счет липидов плазмы крови. В норме липиды из плазмы крови проходят без задержки через интиму в адвентицию, удовлетворяя необходимые потребности клеток сосудистой стенки, а “излишки” удаляются из адвентиции через систему лимфатических сосудов. При этом, когда количество липидов повышено, они накапливаются в сосудистой стенке, вызывая развитие липоидоза. Действительно, одним из наиболее ярких, ранних и постоянных признаков атеросклеротического поражения является отложение липидов в стенке крупных артерий человека [32-39, 59, 60]. Источником образования липидов сосудистой стенки могут быть ЛПНП крови, о чем свидетельствует их сходство по составу [40, 41, 277]. Иммуноморфологические исследования также указывают на постоянное присутствие в жировых отложениях сосудов апопротеина В (апо В) - основного белка ЛПНП [40, 41]. Эти факты согласуются с результатами эпидемиологических исследований, свидетельствующих, что уровень ЛПНП в крови коррелирует со степенью поражения сосудов атеросклерозом, а стойкое его повышение у пациентов рассматривают как фактор риска развития заболевания [40, 41].

Несмотря на свою логичность, инфильтрационная гипотеза не смогла удовлетворить всех исследователей, работающих в области изучения патогенеза атеросклероза, поскольку она не давала ответа на ряд вопросов, например

таких как, почему атеросклерозом поражаются артерии и не поражаются вены; почему артерии поражаются в определенных местах, а не тотально; почему атеросклерозом поражаются главным образом сосуды пожилых людей, а не молодых; почему наблюдаются случаи, когда у людей атеросклероз встречается при невысоком содержании холестерина в крови. Необходимость ответить на неразрешенные вопросы привела к формированию альтернативных гипотез развития атеросклероза, включающих “гипотезу повреждения эндотелия” [438-441], в которой в качестве основной причины развития атеросклеротических поражений выдвигается появление дефектов в эндотелиальном монослое, вызванных различными агентами и “моноклональную гипотезу”, разработанную Benditt [140-142]. Benditt обратил внимание на известный факт, что для атеросклеротических поражений характерна пролиферация ГМК, увеличение количества коллагена, эластина и самой бляшки в целом [140-142]. Benditt пришел к заключению, что атеросклеротические поражения можно рассматривать как доброкачественно растущую опухоль [140-142]. Согласно гипотезе Benditt, под действием мутагенов или вирусов часть ГМК подвергается мутационным изменениям, которые характеризуются как “подпороговое неопластическое состояние” [140-142]. В таком состоянии клетки могут существовать годами. Затем под влиянием промоторных факторов, к которым Benditt относит гипертензию и гиперхолестеринемию, наиболее чувствительная клетка начинает пролиферировать с большей скоростью, чем соседние клетки, и ускоренная пролиферация ведет к

образованию атеросклеротических бляшек с моноклональным набором клеток [140-142].

В последние годы становится все более и более популярно рассматривать развитие атеросклероза с позиций иммунного воспаления [53-79, 98, 99]. Аутоиммунный механизм атеросклероза изначально разрабатывался в 70-х годах прошлого столетия под руководством академика А.Н. Климова и соавторов [32, 34-39]. К настоящему времени достигнут явный прогресс в понимании механизмов вовлечения и активации иммунных клеток при атеросклерозе [57, 58]. В частности, стало понятным, что стенка сосуда находится под иммунным надзором, также как и другие ткани [57, 58]. Были идентифицированы атеросклерозоассоциированные аутоантигены, включая окисленные ЛПНП и белки теплового шока [22, 313, 313].

Помимо аутоантигенов, в атерогенез вовлечены различные семейства молекул воспаления, включая цитокины, интегрины, селектины, клеточные рецепторы, белки острой фазы воспаления [57, 58]. Сложность иммунного ответа при атеросклерозе состоит в том, что цитокины, секретируемые при атеросклерозе, могут оказывать прямо противоположные эффекты - либо проатерогенный, либо антиатерогенный [57, 58, 268, 269, 340]. Баланс между провоспалительными и противовоспалительными факторами является решающим для прогрессирования атеросклероза [57, 58]. Провоспалительными и, следовательно, проатерогенными, являются С-реактивный белок [57, 58, 268, 269, 340]. Е-селектин, эндотоксин, фактор некроза опухоли, интерлейкины (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, IL-18), макрофагальный хемоаттрактантный протеин, лейкотриены, продукты деградации липоксигеназы и

другие [268, 269, 340]. Противовоспалительными и, соответственно, антиатерогенными, являются в частности IL-4, IL-10, TGFb (transforming growth factor) и PDGF (platelet-derived growth factor) [268, 269, 340].

Наиболее выраженными атерогенными свойствами обладают модифицированные липопротеиды, в частности, окисленные. Окисленные ЛПНП являются аутоантигенами, индуцирующими локальный иммунный ответ в бляшке. Многие Т-клетки, инфильтрирующие бляшку, являются специфически активированными против окисленных ЛПНП [269]. Кроме того, окисленные ЛПНП могут стимулировать клеточную смерть по типу апоптоза [303, 316, 324, 415], что имеет большое значение в процессах дестабилизации атеросклеротической бляшки [303, 316]. Хотя в организме существуют механизмы элиминации окисленных ЛПНП посредством их связывания со скевенджер-рецепторами, или посредством связывания их с антителами, данные защитные механизмы оказываются нарушенными при атеросклерозе [247, 248, 438].

Помимо окисленных ЛПНП, другими важными молекулами в атерогенезе являются белки теплового шока (HSP или шапероны) [57, 58, 149, 534]. Шапероны являются цитопротекторами, определяя правильную конформационную укладку нативных или денатурированных белков. Шапероны синтезируются в повышенных количествах в ответ на клеточный стресс любой этиологии. Показано, что из шаперонов наиболее значимым в патогенезе атеросклероза является HSP60 [57, 58, 534]. HSP60 обнаруживается непосредственно в атеросклеротической бляшке, индуцируя локальную иммуно-воспалительную реакцию [57, 58, 534]. Клетки атеросклеротической бляшки являются мишенями для

циркулирующих HSP60-специфичных Т-клеток или антител. Выявление в атеросклеротических поражениях *Chlamydia pneumoniae* [69, 71-73, 108, 163, 184, 196, 323, 333, 353], содержащих HSP60, определило появление “гипотезы антигенной мимикрии”, которая постулирует, что в результате появления специфических антител к хламидийным HSP происходит перекрестное реагирование с собственными гомологичными HSP [534].

#### **1.2.4.1. Роль эндотелия в атеросклерозе**

По существу, все гипотезы патогенеза атеросклероза в той или иной степени затрагивают эндотелий как важное звено в цепи последовательных событий, разыгрывающихся в сосудистой стенке [20, 61, 124, 125, 137, 157, 185, 190, 218, 221, 228, 302, 377, 380, 381, 405, 438, 460, 467, 470, 512, 517]. Очаговый характер морфологических проявлений атеросклероза, сочетание различных стадий течения процесса в ближайших участках сосудистого русла свидетельствуют о важной роли стенки артерий в формировании липидных отложений, и, в частности, - о функциональной неоднозначности состояния эндотелиального барьера при атерогенезе. Существующие в настоящее время гипотезы, пытающиеся объяснить морфогенез атеросклеротической бляшки, подчеркивают активную роль эндотелия. Согласно одной из них, развитию атеросклероза предшествует первичное повреждение эндотелиального покрова, обусловленное образованием ограниченных дефектов на его поверхности и адгезией тромбоцитов [190, 191, 232, 380, 381, 491]. В гипотезе “ответа на повреждение” отмечается много общих черт между



атеросклерозом и реакцией сосудистой стенки на повреждение, которое было вызвано различными факторами [438, 439, 441]. Наличие структурных повреждений в эндотелии, выстилающем атеросклеротические бляшки, послужило поводом для представлений о том, что нарушение целостности эндотелиального монослоя является необходимым условием для развития атеросклеротических изменений [190, 191, 232, 380, 381, 491]. Согласно одной из оригинальных версий гипотезы “ответа на повреждение”, в местах отсутствия эндотелия проявляется митогенный эффект фактора роста тромбоцитов, освобождающегося в процессе адгезии тромбоцитов к оголенному соединительно-тканному матриксу интимы, что ведет к повышенной пролиферации гладкомышечных клеток и эндотелия, окружающего очаг повреждения [438, 441].

Суммируя данные, полученные об эндотелии к настоящему времени, можно сделать вывод о том, что эндотелий представляет собой компактный монослой с многочисленными функциями и особенностями строения. Функции эндотелия направлены как на избирательную регуляцию проницаемости и питания бессосудистых слоев артериальной стенки, так и на адаптацию к окружающей среде (плазме крови или к изменениям сосудистой стенки) и сохранению своей целостности. Помимо важного биологического значения любой функции эндотелия, особый интерес в отношении изучения атеросклеротического процесса представляет анализ механизмов артериальной эндотелиальной проницаемости, и в первую очередь, естественно, атерогенных липопротеидов. Характеризуя ведущее патогенетическое звено атеросклероза, А.Н. Климов и

В.А.Нагорнев [190] отмечают, что в целом вопрос «быть или не быть атеросклерозу», определяется взаимодействием липопротеидов плазмы крови с артериальной стенкой. Тем самым авторы подчеркивают, что для образования атеросклеротических поражений артерий недостаточно только развития дислиппротеидемии атерогенного характера, важное значение в этом процессе отводится самой сосудистой стенке. Становится также понятным, что эндотелий играет важную роль в иммунном воспалении, посредством секреции факторов, влияющих на адгезию и проникновение в артериальную интиму иммунных клеток [470, 517].

#### ***1.2.4.2. Моноциты-макрофаги и их роль в возникновении атеросклероза***

В последние десятилетия все большее и большее значение придают роли моноцитов-макрофагов в развитии атеросклеротических поражений [254, 255, 383, 393, 462, 463, 545]. Этим клеткам посвящен ряд обзоров, в которых детально рассматриваются проблемы синтеза макрофагами различных факторов, особенности их рецепторного аппарата, механизмы и особенности взаимодействия их с липопротеидами [11, 254, 255, 462, 463, 545].

Инфильтрацию артерий моноцитами-макрофагами отмечали при экспериментальном моделировании атеросклероза у кроликов, свиней, крыс, и обезьян [11, 57, 236, 237, 438]. Выявленная адгезия моноцитов на луминальной поверхности артерий, наличие их большого числа непосредственно под эндотелием, а более зрелых макрофагов

- в глубине интимы, свидетельствует в пользу поступления этих клеток из крови.

Используя планиметрический метод, было наглядно показана возрастная динамика поражения атеросклерозом различных участков аорты человека [438]. Преимущественную локализацию атеросклероза в определенных участках сосуда исследователи объясняют повреждающим действием гемодинамических факторов [198, 199, 242, 383, 462], под воздействием которых эндотелиальные клетки синтезируют макрофагальный хемореактивный фактор, что ведет к накоплению в интиме моноцитов-макрофагов с последующим развитием атеросклероза [146, 438, 495, 545]. Инфильтрация моноцитов-макрофагов в интиму артерий играет важную роль в запуске и развитии атеросклероза [11, 254, 393, 545]. Обычно при обсуждении роли макрофагов в патогенезе атеросклероза, исследователи акцентируют внимание на их активном поглощении липидов с последующей трансформацией в пенистые клетки. Этому способствует известные свойства макрофагов, как фагоцитоз и наличие “скевенджер” рецепторов, так и данные, указывающие на макрофагальную природу пенистых клеток стенки артерий [146, 438, 462, 463, 545].

К настоящему моменту известен большой набор активных веществ, секретируемых макрофагами, большая часть из которых непосредственно участвует в патогенезе многих заболеваний, в том числе и атеросклероза, включая ранние этапы его развития [40, 198, 242, 383, 462]. Следует отметить, что биоактивные вещества синтезируются не в каждой клетке и не постоянно. Продукция данных веществ определяется фенотипом моноцитов-макрофагов [242, 383, 462]. Ряд

исследователей установили, что макрофаги из различных источников и даже из одной и той же ткани значительно варьируют по экспрессии антигенных детерминант поверхности [255, 393, 545]. Более того, клетки свежeweделенной популяции моноцитов крови и моноцитов-макрофагов из атеросклеротической бляшки артерий человека также варьируют по функциональным способностям [255, 393, 545]. Аналогичным образом можно объяснить и полиморфизм ультраструктуры моноцитов-макрофагов в интиме аорты человека. Полиморфизм структуры данных клеток несомненно отражает вариабельность фенотипа моноцитов-макрофагов, что свидетельствует о возможной функциональной специализации клеток и, следовательно, о различном вкладе в патогенез атеросклероза [40, 198, 242, 383, 462]. Предполагается, что моноциты-макрофаги поглощают и катаболизируют белки, а затем экспрессируют на своей поверхности их короткие пептидные фрагменты, которые при участии белков активации, осуществляющих рецепторное связывание, передаются Т-лимфоцитам [40, 198, 242, 383, 462].

#### ***1.2.4.3. Вовлеченность гладкомышечных клеток в атеросклероз***

Со времени установления гладкомышечной природы подавляющей части клеток сосудистой стенки, в том числе и пораженной атеросклерозом, постоянно велись и активно ведутся поиски структурно-функциональных особенностей гладкомышечных клеток атеросклеротических поражений и их отличий от клеток нормальной интимы сосуда. Уже в ранних исследованиях было обнаружено, что в атеросклеротических

бляшках аорты человека и экспериментальных животных, наряду с типичными ГМК, цитоплазма которых заполнена миофиламентами, а слабо развитый эндоплазматический ретикулум локализован в перинуклеарном пространстве, также встречаются клетки, содержащие хорошо развитый эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, при небольшом числе или полном отсутствии микрофиламентов [153, 162, 256, 412, 414]. Такие клетки обозначали как “модифицированные”, “секреторные” или “активированные” ГМК, а также “фиброциты”, и “фибробластоподобные клетки” [162, 164, 170, 315, 412, 414]. Значимость выявленных ультраструктурных особенностей этих клеток стала понятнее лишь после целого ряда исследований, выполненных на культуре гладкомышечных клеток сосудов экспериментальных животных. В серии работ было показано, что гладкомышечные клетки сосудов в условиях первичной культуры спонтанно меняют свой фенотип с “сократительного” на “синтетический” [162, 164, 170]. Этот процесс, обозначаемый термином “фенотипическая модуляция”, сопровождался перестройкой ультраструктуры клеток [170]. В частности, миофиламенты замещались хорошо развитым эндоплазматическим ретикуломом и аппаратом Гольджи [162, 164, 170]. Кроме того, в клетках менялась экспрессия целого ряда белков цитоскелета и сократительного аппарата [162, 164, 170].

Полагают, что сходные изменения фенотипа гладкомышечных клеток имеют место и в стенке сосуда человека атеросклерозе [164, 170, 315, 412, 414]. Именно изменениями фенотипа гладкомышечных клеток, переходом их в “секреторное” состояние с последующей пролиферацией клеток и гиперпродукцией соединительнотканых волокон,

исследователи объясняют феномен утолщения интимы и формирования фиброзной бляшки. Однако до настоящего времени данная гипотеза не имеет окончательного доказательства, а существующие изыскания, свидетельствующие об изменении фенотипа гладкомышечных клеток в артериях человека, носят крайне фрагментарный характер и касаются лишь отдельных сторон этого процесса, чаще всего экспрессии одного из маркерных белков. Белки, экспрессия которых меняется при смене фенотипа гладкомышечных клеток, обозначают маркерами модуляции, включающими миозин, актин, десмин и виментин [10, 12, 206, 274, 484].

Посредством стереометрического анализа ультраструктурных компонентов гладкомышечных клеток пораженной атеросклерозом сонной артерии человека было показано, что относительный объем миофиламентов гладкомышечных клеток в утолщенной интимае, прилежащей к фиброзной бляшке, составляет 52%, а подлежащей меди - 77% [162]. При этом в непораженной части артерий гладкомышечные клетки интимы и меди имели показатели соответственно 75% и 79%, т.е. почти не отличались друг от друга [162]. Таким образом, ультраструктура "усредненной" гладкомышечной клетки пораженного участка сосуда человека приближается к синтетическому фенотипу [10, 12].

В бляшках сосуда человека выявлены также гладкомышечные клетки, активно экспрессирующие антигены главного комплекса гистосовместимости класса II [264, 271, 411, 484]. Эти белки активации свойственны Т-лимфоцитам и макрофагам и участвуют в рецепторной передаче иммунной информации [269]. Идентификация экспрессии молекул

гистосовместимости класса II позволяет предполагать, что гладкомышечные клетки, подобно Т-лимфоцитам и макрофагам, оказываются вовлеченными в иммунные реакции при атеросклерозе.

### **1.3. Факторы риска развития атеросклероза**

#### **1.3.1. Средовые факторы риска развития атеросклероза**

##### ***1.3.1.1. Психологический стресс***

Общий стресс развивается под влиянием различных интенсивных воздействий как внешней, так и внутренней среды. При этом происходят метаболические изменения (повышение в крови глюкозы и липидов), подготавливающие организм к интенсивной мышечной деятельности, которая на заре эволюции человека была необходима в борьбе за выживание. Современные люди значительно реже используют мышечную активность, однако механизм общего стресса практически не изменился. Психоэмоциональные конфликты остаются без физических действий, что способствует накоплению выработанных организмом веществ, провоцирующих запуск атеросклеротического процесса [298]. Именно поэтому люди, занимающиеся спортом или имеющие профессию, связанную с физической нагрузкой, значительно реже заболевают атеросклерозом, чем лица преимущественно умственного труда, либо ведущие малоподвижный образ жизни.

По данным группы ученых из Финляндии [185], среди лиц с высоким значением потокозависимой дилатации, медленное восстановление периода предварительно выброса оказалось

предиктором высоких значений ТИМ. Следовательно, развитие эндотелиальной дисфункции может быть одним из возможных механизмов, связывающих с атеросклерозом медленное восстановление сердечной деятельности после выполнения задания, вызывающего стресс в условиях эксперимента.

Развитию атеросклероза могут также способствовать гемодинамические реакции на психический стресс. Исследование группы ученых из США [533] показало, что систолическое артериальное давление в ответ на психологические проблемы является предиктором атеросклероза у мужчин среднего и старшего возраста, вне зависимости от других известных факторов риска.

Известно, что атеросклероз порождает реактивность коронарных артерий в ответ на физические упражнения. Группа ученых из Бостона [551] предположила, что атеросклероз может также влиять на вазомоторные реакции коронарных артерий в ответ на психическое напряжение. Их данные подтверждают, что при атеросклерозе ответ коронарных артерий на психологический стресс действительно отличается от нормы.

### ***1.3.1.2. Экологическая обстановка***

Авторы статьи, посвященной изучению различных внешних факторов, влияющих на формирование атеросклероза [551], утверждают, что термин «атеросклероз» используется для описания различных видов патологий, каждая из которых имеет не только свои характерные структурные признаки, но и конкретные причины и механизмы развития. У лиц молодого возраста наблюдаются, в основном, безлипидные АСБ со сформированными миофибриллами - фиброзные бляшки. Этот



тип атеросклероза чаще всего встречается у людей, которые подвергаются воздействию ксенобиотиков в силу своей профессиональной деятельности.

### **1.3.2. Поведенческие факторы риска развития атеросклероза**

#### **1.3.2.1. Курение**

Группы ученых во главе с Bishop F.K. [150] провела сравнение уровня самооценки, физической активности, потребления алкоголя и табака среди людей с различным уровнем кальцификации коронарных артерий. В значительной степени связанными с кальцификацией коронарных артерий оказались физическая активность и курение. Диабет 1 типа также был независимо связан с повышенной вероятностью кальцификации коронарных артерий, но в меньшей степени.

По данным группы исследователей из Италии [131] ТИМ достоверно ассоциирована с интенсивностью курения, как в настоящем, так и в прошлом. Однако, содержание смол и никотина в сигаретах не коррелировало с ТИМ. Наличие сахарного диабета или гипертонии делало ассоциацию между курением и атеросклерозом более значимой.

Группой австралийских ученых [540] были проведены популяционные исследования для групп азиатов и австралийцев. Среди курильщиков риск развития ИБС был в 1,60, а инсульта - в 1,19 раз выше, чем у некурящих. Найдена четкая зависимость вероятности ИБС и инсульта от количества выкуриваемых сигарет в день для обеих популяций. Курящие женщины имели более высокий риск сердечно-сосудистых

осложнений атеросклероза, чем мужчины. Кроме того, риск ИБС и инсультов оказался достоверно выше среди экс-курильщиков по сравнению с людьми, не курившими никогда. Группа ученых из США [391] в своих исследованиях подтвердила, что курение влияет на степень атеросклеротических поражений. Среди курильщиков уровень потребления оказался связан с интенсивностью развития атеросклероза, причем этот эффект не зависел от возраста, наличия гипертонии и сахарного диабета.

Группа голландских ученых [234] изучила взаимосвязь между воздействием табачного дыма в период перинатального развития с ранним атеросклерозом. Для группы молодых людей были собраны данные о курении матерей в период беременности, каждому было проведено ультразвукографическое исследование. ТИМ у потомства куривших во время беременности матерей была в среднем больше, чем у потомства некурящих матерей. Кроме того, более высокая ТИМ наблюдалась для группы молодых людей, в семье которых во время беременности матери курил отец.

### ***1.3.2.2. Гиподинамия***

Отсутствие физической активности, курение и ожирение являются ключевыми факторами риска развития ИБС. По данным Lee C.D. et al. [331] среди физически активных и некурящих мужчин с нормальным обхватом талии риск ИБС был на 59% ниже по сравнению с группой мужчин, у которых по всем факторам риска были нежелательные показатели.

Группой ученых из Италии [420] была выдвинута гипотеза: фактором риска при развитии атеросклероза и сахарного

диабета может стать хроническое вялотекущее системное воспаление, а физическая активность вызывает увеличение выработки ряда цитокинов и хемокинов с противовоспалительными свойствами. Гипотеза была подтверждена. Были найдены миокины IL-6, IL-8 и IL-15, играющие роль в борьбе с хроническим воспалением.

Группа ученых из США [124] выдвинула другую гипотезу, в соответствии с которой основной целью физических упражнений является укрепление эндотелия сосудов. Было обнаружено, что эндотелиальные клетки-предшественники мобилизуются из костного мозга в кровоток посредством физических нагрузок. Пока неясно, дифференцируются предшественники в зрелые эндотелиальные клетки или стимулируют зрелые эндотелиальные клетки к пролиферации, но достоверно известно, что они участвуют в укреплении сосудов при регулярных физических нагрузках.

### **1.3.2.3. Питание**

Существует гипотеза, в соответствии с которой гиперосмолярная пища вызывает атеросклероз [367], при этом одним из главных проатерогенных факторов считается генерация тепла в организме. Высокий гликемический индекс пищи и диабет приводят к высокому уровню глюкозы в крови, что повышает температуру тела. Принятие в пищу гиперосмолярных солей, сахаров и аминокислот самостоятельно или синергически вызывает повышение температуры тела. Это заставляет крупные артерии организма изолировать стенки, формируя атеросклеротические поражения. Осмолярность пищи уменьшается, когда в организм

попадает вода. Следовательно, распространенность атеросклероза снижается с увеличением потребления воды.

По данным Satomura K. et al. [449], в группе пациентов с ИБС, показавшей прогрессирование стеноза, по данным коронарной ангиографии, чаще встречалась гипертония, а также значительно выше был уровень общего холестерина и сахара в крови, хотя процент больных, сидящих на лечебной диете, был в данной группе выше, чем в общей выборке. Эти данные показывают необходимость диеты и медикаментозной терапии пациентам, имеющим факторы риска.

Группа ученых из Португалии обнаружила, что диета западного типа (с высоким содержанием насыщенных жиров, простых сахаров и соли, и низким содержанием рыбы, овощей и клетчатки) связана с провоспалительными, проокислительными и протромботическими тенденциями [364]. Данные факторы повышают риск эндотелиальной дисфункции, которая представляет собой первую стадию атеросклероза. В то же время, диета средиземноморского типа (с меньшим количеством мяса, но большим количеством рыбы, волокна, фруктов, овощей, оливкового масла и вина) ассоциирована с более низким риском развития сердечно-сосудистых заболеваний. Другое исследование также показало, что рыба и соевая диета способствуют профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Это подтверждает тот факт, что уровень выводимых с мочой в течение 24 часов таурина и изофлавонов (а именно этими веществами богаты рыба и соя) находится в обратной зависимости от смертности при ишемической болезни сердца [543].

### **1.3.3. Биохимические факторы риска развития атеросклероза**

#### **1.3.3.1. Ожирение**

По последним оценкам Всемирной организации здравоохранения, более миллиарда человек в мире имеют лишний вес. В экономически развитых странах почти 50% населения имеет избыточный вес, из них 30% страдает ожирением. В России примерно 30% лиц трудоспособного возраста имеют ожирение и 25% — избыточную массу тела.

Жировая ткань производит много цитокинов и секреторных адипокинов, влияющих на атерогенез. Васпин может иметь антиатерогенный эффект из-за своих инсулиносенсибилизирующих свойств. Висфатин рассматривается как молекула-кандидат, повышающая чувствительность к инсулину, но так как он дестабилизирует АСБ, данный эффект в качестве лекарственного использоваться не может. Апельин подавляет потребность в пище, а также увеличивает физическую активность, следовательно, может способствовать потере веса, что ведет за собой понижение риска развития атеросклероза [231].

Проблема ожирения, как фактора риска атеросклероза, также освещена в работе группы бельгийских исследователей [287]. По мнению авторов, триггером атеросклероза является проникновение клеток, активированных по провоспалительному пути, из кровяного русла в стенку сосуда. Там они выделяют активные формы кислорода и окисляют липопротеиды, вызывая образование пенистых клеток и апоптоз клеток эндотелия. Это, в свою очередь, приводит к росту бляшек, их

эрозии и разрушению. Были получены сведения, что этот порочный круг между окислительным стрессом и воспалением происходит не только в артериальной стенке, но и в жировой ткани при ожирении. Окислительный стресс и воспаление нарушают созревание адипоцитов. В результате этого, под воздействием инсулина, формируется неверный адипокиновый сигнал. Это наводит на мысль, что молекулы-регуляторы у патологических процессов в жировой ткани и ткани сосудов общие. Кандидатами на роль таких регуляторов, по мнению авторов, являются микроРНК, которые контролируют экспрессию генов, вызывая деградацию мРНК или блокирование трансляции. Данная гипотеза объясняет сходство и одновременность молекулярных изменений в жировой и сосудистой ткани.

Группа ученых из Швейцарии [137] занималась изучением вазоактивных факторов, выделяемых клетками эндотелия. Из-за эндотелиальной дисфункции эти факторы не синтезируются должным образом, в результате чего способствуют возникновению и развитию атеросклероза. Сходный молекулярный механизм был обнаружен авторами и в жировой ткани, что подтвердило взаимосвязь между ожирением и атерогенезом.

В работе группы итальянских ученых [240] была оценена связь между риском раннего атеросклероза и такими факторами, как ожирение и пищевые привычки. Были обследованы тучные дети и подростки с факторами риска раннего атеросклероза и контрольная группа нормальных детей. Достоверные отличия между группами были обнаружены по уровню белка PAI-1, участвующего в метаболизме кальция и фосфора. Полученные данные свидетельствуют о том, что еще

один возможный механизм влияния ожирения на атерогенез - дисбаланс гомеостаза кальция и фосфора.

### **1.3.3.2. Сахарный диабет**

Известно, что обмен углеводов и жиров в определенной степени связан между собой, поэтому очевидно, что нарушение углеводного обмена, имеющееся при сахарном диабете, усиливает изменения и в обмене жиров. Изменения в метаболизме липидов, в свою очередь, запускает атеросклеротический процесс.

Другим важным механизмом, посредством которого гипергликемия способствует повреждению сосудов, является внутриклеточное формирование дефектных продуктов гликозилирования [136]. Они представляют собой гетерогенную группу белков, липидов и нуклеиновых кислот, которые необратимо коагулируют при снижении уровня сахара. Продукты гликозилирования вовлечены в атерогенез либо непосредственно, либо через рецептор-опосредованные механизмы. Наиболее широко изучен рецептор RAGE. Взаимодействие продуктов гликолиза с RAGE видоизменяет внутриклеточные сигналы, способствуя экспрессии генов и усиливая высвобождение провоспалительных цитокинов, что вызывает прогрессирование атеросклероза.

Группой ученых из США [376] было показано, что предиктором сердечно-сосудистых заболеваний при сахарном диабете 2 типа является метаболический синдром, так как по результатам исследования он показал ассоциацию с кальцификацией коронарных артерий.

Риск атеросклероза у женщин с диабетом оказался заметно выше при применении заместительной гормональной терапии в период постменопаузы. Заместительная гормональная терапия, несомненно, снижает уровень липопротеидов и повышает ХС ЛПВП, но уровень этих показателей значительно хуже у женщин, больных сахарным диабетом, по сравнению с контрольной группой. Кроме того, в группе женщин с сахарным диабетом сильнее прогрессирует ИБС [327].

Предиктором атеросклероза среди людей, больных диабетом, могут также служить классические сердечно-сосудистые патологии. Например, группа исследователей из Голландии [465] информирует о том, что в выявлении атеросклероза коронарных артерий среди больных сахарным диабетом могут помочь данные о наличии систолической дисфункции ЛЖ.

### ***1.3.3.3. Нарушения липидного обмена***

Общепринятой терапией при гиперлипидемиях является назначение статинов. При приеме статинов снижение уровня ХС-ЛПНП и отношения ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП связано с меньшей степенью выраженности атеросклероза у обследуемых пациентов [120]. Это еще раз подтверждает адекватность применения статинов в клинической практике.

В исследовании Schreiner P.J. et al. рассматривалась ассоциация ТИМ с уровнем липопротеида А в крови. Результаты показали, что повышение концентрации липопротеида А в крови связано с доклиническим атеросклерозом сонных артерий у всех людей, но у мужчин - безусловно, а у женщин эта связь опосредована через такие



классические факторы риска, как сахарный диабет и курение в анамнезе [466].

При атерогенезе в макрофагальных клетках наблюдается напряжение эндоплазматического ретикулума. Результаты работы группы американских ученых свидетельствуют о центральной роли липидных шаперонов в регуляции гомеостаза эндоплазматического ретикулума макрофагов при атеросклерозе. Более того, было показано, что подобный ответ макрофагов может защитить организм от вредных последствий гиперлипидемии [214].

Многие исследователи пытаются найти ранние предикторы атеросклероза и сопутствующих патологий. Так группа ученых из Финляндии занималась изучением предикторной способности уровня липидов и липопротеидов крови в детском возрасте при прогнозировании атеросклероза и гиперлипидемии в дальнейшем [355, 356]. Ассоциация была найдена, но диагностические признаки были далеки от идеала - наблюдалась низкая прогностическая ценность. Группа исследователей из Великобритании пыталась найти факторы, приемлемые для ранней диагностики гиперхолестеринемии у родственников пациентов с уже поставленным диагнозом [489]. Оказалось, что большую точность при диагностике может давать тестирование на мутации в генах рецепторов ХС ЛПНП.

#### ***1.3.3.4. Факторы, влияющие на липидный обмен***

Одним из факторов, влияющих на обмен липидов, является общий стресс (вероятно, данный фактор риска влияет на атерогенез опосредованно). Общий стресс может влиять на липидный обмен посредством усиления липолиза:

высвобождаются жирные кислоты и глицерин, повышается уровень триглицеридов крови. Другим механизмом, с помощью которого острый психологический стресс способен вызвать повышение уровня общего холестерина, а также ряда его субфракций, может быть сгущение крови. Данные, полученные группой американских ученых [129], говорят о том, что первичным механизмом влияния психологического стресса на уровень холестерина является сгущение крови, в то время как сопутствующее повышение содержания свободных жирных кислот и триглицеридов является результатом метаболических эффектов симпатической активации.

Еще одним фактором, влияющим на обмен липидов, является прием пероральных контрацептивов. Пероральные противозачаточные средства повышают содержание триглицеридов и холестерина крови. Поэтому женщинам с гиперхолестеринемией, имеющим в анамнезе наследственные заболевания сердечно-сосудистой системы, следует применять пероральные контрацептивы с осторожностью или вовсе их не использовать [207].

#### **1.3.4. Независимые факторы риска развития атеросклероза**

##### **1.3.4.1. Пол**

Атерогенез имеет свои особенности в зависимости от половой принадлежности пациента. До 50 лет заболеваемость атеросклерозом резко преобладает у мужчин. Женские половые гормоны (эстрогены) задерживают развитие атеросклероза. Отмечено, что во время менопаузы у женщин увеличивается

риск развития атеросклероза, так как происходит резкое снижение уровня эстрогенов, нарастание уровня холестерина и ЛПНП крови [51]. К тому же, у женщин ранний атеросклероз коронарных артерий и артерий головного мозга ассоциирован со снижением выработки эстрогенов.

Зависеть от пола могут также и другие факторы, влияющие на атерогенез, например, маркеры воспаления. Так, среди женщин уровень С-реактивного белка был выше в группе, испытывавшей психологический стресс, по сравнению с группой, не подвергавшейся стрессу. В то же время для мужчин никакой разницы между данными группами не наблюдалось [476]. Результаты подчеркивают важность учета пола, как фактора риска.

#### **1.3.4.2. Возраст**

В возрасте 40—49 лет атеросклероз выявляется в 85,7 % случаев, из них резко выраженный — в 25,5% [298]. С возрастом происходит изменение основных обменных процессов (жирового, углеводного, витаминного), определенные нарушения системы иммунитета, эндокринологических параметров, свертывающей системы крови, а также изменения в работе печени. В совокупности эти факторы способствуют усугублению атерогенеза у людей старшего возраста.

Вследствие этого для каждого возраста существуют свои профили значимости различных факторов риска атеросклероза. Установлено, что среди молодых пациентов единственным предиктором инсульта было курение, в то время как предиктором инсульта у атеросклеротических пациентов пожилого возраста оказался метаболический синдром [133].

### **1.3.5. Генетические факторы риска развития атеросклероза**

#### **1.3.5.1. Длина теломерных повторов**

В статье Yang Z. et al. [547] сообщается, что длина теломеров (LTL) лейкоцитов короче у больных артериальной гипертензией, чем у пациентов того же возраста с нормальным артериальным давлением. Более того, через 5 лет наблюдения больные артериальной гипертензией с короткими LTL оказались склонны к развитию ИБС, в то время как люди с нормальным артериальным давлением, являющиеся носителями коротких LTL, обычно становились гипертониками.

Okuda K. et al. [407] выявили, что LTL сильно варьирует у индивидов при рождении и на протяжении жизни. Также известно о возрастнoзависимом сокращении длины LTL [447], которое происходит заметно быстрее в раннем возрасте. Возможно, это происходит в связи с быстрым распространением гемопоэтических стволовых клеток в процессе роста и развития. Сокращение длины теломерных повторов на протяжении всей жизни в значительной степени отражает укорочение теломеров гемопоэтических стволовых клеток [114]. В этих клетках, как и в других соматических клетках с рудиментарной активностью теломеразы, укорочение длины теломеров зависит от репликации [525]. Концы хромосом, состоящие из множества TTAGGG повторов, при каждой последующей репликации постепенно сокращаются из-за необходимости нового места для посадки ДНК-полимеразы, которое не реплицируется и отсутствует в последующем цикле репликации. Кроме того, большое влияние на укорочение

теломеров имеет окислительный стресс, ввиду того, что GGG триплеты очень чувствительны к гидроксильным радикалам [525]. Гипотеза механизмов старения также учитывает сокращение длины теломерных повторов в течение жизни индивида, вследствие того, что после укорочения теломеров до минимальной длины, хромосомы начинают укорачиваться за счет функциональной части генома. Различие длины теломерных повторов у индивидов при рождении и активности теломеразы в течение жизни делает интенсивность и время наступления старения уникальной характеристикой каждого человека.

Следует отметить, что хроническое воспаление влечет за собой увеличение числа лейкоцитов, а, следовательно, возрастание количества циклов репликации, ведущее к укорочению длины теломерных повторов лейкоцитов [126]. Поэтому еще одним возможным механизмом укорочения длины теломерных повторов в результате окислительного стресса является повышенный оборот клеток иммунитета. Таким образом, взаимосвязь воспаления и окислительного стресса с болезнями старения, особенно атеросклерозом, может быть объяснена с помощью гипотезы укорочения длины теломерных повторов. В работах Gutierrez J. et al., Hansson G.K. и Libby P. отмечено, что укорочение LTL может быть выражено в ограниченной способности костного мозга производить функциональные эндотелиальные клетки-предшественники [263, 269].

Развитие большинства заболеваний является результатом дисбаланса между вызывающими их вредными факторами и защитными системами организма, призванными им противодействовать. Эндотелиальные клетки-предшественники

в норме обладают уникальной способностью проникновения в места повреждения эндотелия, где они интегрируются в сосудистую стенку и участвуют в восстановлении эндотелия [512]. При атеросклерозе - заболевании, начинающемся с травмы эндотелия - наблюдается уменьшение количества эндотелиальных клеток-предшественников и снижение их функциональности, что может быть результатом укорочения LTL [406]. Это наводит на мысль, что у некоторых людей склонность к атеросклерозу объясняется малой длиной теломерных повторов при рождении.

### ***1.3.5.2. Мутации ядерного генома***

Долгое время исследования по медицинской генетике в области атеросклероза были сконцентрированы на мутациях ядерного генома, как предикторах данной патологии. Сведения об изученных на данный момент мутациях, демонстрирующих ассоциацию с атеросклеротическими поражениями, а также заболеваниями, сопровождаемыми атеросклерозом, приведены в таблицах 1-9. В частности, показана ассоциация с такими патологиями как нарушения липидного обмена [176, 183, 346, 447, 476], ИБС [155, 348, 416, 488], непосредственно атеросклероз [123, 139, 306, 308].

Однако существует ограничение, характерное для исследований, посвященных ассоциации мутаций ядерного генома с атеросклерозом: при наличии любого из вариантов полиморфизмов, достоверно ассоциированного с какими-либо сердечно-сосудистыми заболеваниями, относительный риск варьирует в пределах 1,06-1,40. Это означает, что мутации ядерного генома, как факторы риска, имеют крайне низкую

диагностическую и прогностическую значимость, даже в сравнении с отдельными традиционными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. Так относительный риск развития атеросклероза при повышении уровня триглицеридов в крови составляет 1,60. В целом, все известные полиморфизмы ядерного генома объясняют не более 5% вариабельности сердечно-сосудистых заболеваний в популяции [301].

**Таблица 1. Мутации первой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
AGT	1q42.2	Ангиотензиноген	Риск хронической сердечной недостаточности и атеросклероза	[416]
APOA2	1q21-q23	Аполипопротеид А-II	Клинический атеросклероз, сочетающийся с высоким уровнем плазменного ХС ЛПВП	[116]
DOCK7	1p31.3	Белок, обеспечивающий цитокинез 7	Повышенный уровень ХОЛ	[346]
CRP	1q21-q23	С-реактивный белок	Атеросклероз сонных артерий	[139]
			Висцеральное	[113]

			ожирение, сердечно-сосудистые заболевания	
			Субклинический атеросклероз у мужчин	[308]
ECE1	1p36.1	Эндотелин-преобразующий фермент	Атеросклероз на выборке мужчин с гипертонией	[139]
EDN2	1p34	Эндотелин-2	Фибрилляция предсердий у больных с гипертрофической кардиомиопатией	[392]
FMN2	1q43	Формин 2	ИБС	[156]
GALNT2	1q41-q42	N-ацетил-галактозаминилтрансфераза 2	Инсульт	[423]
GJA5	1q21.1	Белок разрыва связи альфа А5	ИБС	[485]
IL6R	1q21	Рецептор интерлейкина 6	Изменения липидного профиля (ХОЛ, ТГ, ХС ЛПВП, ХС-ЛПНП) у подростков	[183]
LEPR	1p31	Рецептор лептина	Ассоциация с факторами риска раннего атеросклероза	[451]
PSRC1	1p13.3	Pro/Ser-богатый биспиральный	Болезнь Моямая	[434]



		й белок 1		
MTHFR	1p36.3	Метилентетрагидрофолат-редуктаза NADH	Атеросклероз сонных артерий. Факторы риска раннего атеросклероза	[406]
			Атеросклеротические бляшки в крупных артериях	[444]
NPPA	1p36.21	Натриуретический белок А	Сердечно-сосудистые заболевания. Повышенное артериальное давление	[348]
NPPB	1p36.2	Натриуретический белок В	Гипертрофическая кардиомиопатия	[180]
PROX1	1q41	Белок гомеобокса 1 просперго	Статус метилирования в клетках артерий, имеющих атеросклеротические поражения	[165]
CELSR2	1p21	Семиповторный рецептор-2 кадгерина G-типа	Общая концентрация ХОЛ	[447]
SELE	1q22-q25	Селектин-Е	ИБС	[253]
			Атеросклеротические поражения аорты	[123]
SORT1	21.3-p13.1	Сортилин 1	Гиперхолестеринемия. Атеросклеротические	[311]

			поражения	
			Повышение плазменного уровня ХС ЛПНП у молодых людей	[475]
TGFB2	1q41	Транскрипционный фактор роста бета-2	Развитие атеросклероза посредством удержания атерогенных липопротеидов	[467]
TGFBR3	1p33-p32	Рецептор фактора роста фибробластов 3	Возникновение атеросклеротических поражений в ответ на ранозаживляющую терапию	[370]
VCAM1	1p32-p31	Молекула сосудистой клеточной адгезии 1	Атеросклеротические бляшки с выраженной кальцификацией	[228]
USF1	1q22-q23	Upstream-связывающий транскрипционный фактор 1	Фиброзные атеросклеротические бляшки сонных артерий. ИБС.	[330]
			Коронарный атеросклероз	[320]

**Таблица 2. Мутации второй хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
-----	-------------	---------	-----------	------------------

ADAM17	2p25	Металло-пептидаза, домен 17 (TNF альфа-превращающий фермент)	Атеросклероз	[417]
			Острый инфаркт миокарда	[471]
ADRA2B	2p13-q13	Адренорецептор альфа 2B	Субклинический атеросклероз плечевой и сонной артерии. Нарушение функции эндотелия	[273]
			Микрососудистые сужения в структуре эпикарда. Атеросклероз. ИБС	[138]
APOB	2p24-p23	Аполипопротеид В	Риск сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с наследственной гиперхолестеринемией	[270]
CAPN10	2q37.3	Калпин 10	Сахарный диабет. Атеросклероз.	[251]
CXCR4	2q21	Хемокин (С-Х-С мотив) рецептор 4	Торможение адгезии моноцитов в эндотелии.	[532]
			Атеропротективный эффект	[377]
IL1B	2q14	Интерлейкин 1B	Фактор риска развития гипертензии у пациентов с ИБС	[253]
			Патологическое	[200]

			изменение обмена липидов	
			Полнота, опосредованная ассоциацией с действием С-реактивного белка	[213]

**Таблица 3. Мутации четвертой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ADD1	4p16.3	Аддуктин альфа 1	Атеросклероз, сердечно-сосудистые и цереброваскулярные заболевания, особенно у больных гипертонией	[516]
			Сердечно-сосудистые заболевания	[385]
KDR	4q11-q12	Рецептор тирозинкиназы типа III	Атеросклероз бедренной и сонной артерий, аорты	[179]
			Увеличение каротидной ТИМ	[218]
PDGFC	4q32	Тромбоцитарный фактор роста C	Атерогенез, стимулируемый аномальной миграцией и пролиферацией гладкомышечных	[159]

			клеток сосудов	
PDGFRA	4q12	Рецептор тромбоцитарного фактора роста, полипептид альфа	Атеросклероз, стимулируемый окислительным стрессом	[524]
			Увеличение ТИМ, связанное с усложнением плавной миграции мышечных клеток	[293]

**Таблица 4. Мутации семнадцатой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ACE	17q23.3	Ангиотензин-превращающий фермент 1	Тяжелый атеросклероз сонных артерий	[317]
			Атеросклероз, гипертония и инфаркт миокарда	[539]
			Атеросклероз аорты и коронарных артерий	[461]
APOH	17q23-pter	Аполипопротеид Н	Повышенный уровень антител IgM и IgG к ХС ЛПНП у женщин с подтвержденным диагнозом ИБС	[175]
ERBB2	17q21.1	Второй гомолог	Повышение риска развития	[405]

		вирусных онкогенов эритробластической лейкемии	атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний	
HNF1B	17cen-q21.3	HNF1-содержащий белок гомеобокса В	Повышенный сывороточный уровень ХС ЛПВП, риск развития атеросклероза	[127]

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

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
<b>Пятая хромосома</b>				
DRD1	5q35.1	Рецептор дофамина D1	Атеросклероз, вызванный нарушениями миграции и пролиферации гладкомышечных клеток сосуда	[549]
				[550]
<b>Шестая хромосома</b>				
EDN1	6p24.1	Эндотелин 1	Развитие атеросклероза и сосудистых осложнений при сахарном диабете	[418]
				Развитие атеросклероза

			у пациентов при хроническом гемодиализе	
			Атеросклероз (опосредованное влияние через G-белок)	[295]
			Связан с провоспалительными цитокинами при развитии атеросклероза	[500]
			Способствует росту клеток и повышению сосудистого тонуса на ранних стадиях атеросклероза, далее концентрируется в области атеросклеротических бляшек	[291]
ENPP1	6q22-q23	Эктонуклеотидная пирофосфатаза / фосфодиэстераза 1	Полиморфизм K121Q - предиктор сердечно-сосудистых заболеваний. При диабете 2 типа эффект усугубляется ожирением.	[128]
			Кальцификация артерий младенцев	[432]
LPA	6q26	Липопротеид А, Lp(a)	Повышенная вероятность атеросклероза аорты даже при	[145]

			низколипидной диете	
			Ассоциация с провоспалительными цитокинами в атеросклеротических бляшках	[250]
			Участвует в формировании атеросклеротических бляшек посредством активации тромбоцитов	[309]
			Независимый предиктор более тяжелой воспалительной реакции у пациентов с инфарктом миокарда.	[249]
МТНFD1L	6q25.1	Метилентетрагидрофолат дегидрогеназа (NADP+ зависимая)	Исследователями предположена общая причина возникновения болезни Мюммия и атеросклероза. Мутации в гене ассоциированы с болезнью Мюммия	[434]
SOD2	6q25.3	Супероксиддисмутаза 2	Мутантный генотип связан со снижением риска ИБС	[503]
			Стабилизирует атеросклеротические бляшки у пациентов	[125]



			с диагнозом ИБС. Предотвращает эндотелиальную дисфункцию на ранней стадии развития атеросклероза	
SRF	6p22.3	Сывороточный фактор	Регулятор пролиферации и старения клеток сосудистой стенки. Мутация имеет антиатерогенный эффект	[533]

**Таблица 6. Мутации седьмой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
CAV1	7q31.1	Кавеолин 1	Негемопоэтический кавеолин-1 определяет размер атеросклеротической бляшки, гемопоэтический - регулирует лимфоидную иммунную систему. Оба ассоциированы с прогрессией атеросклероза	[212]

			Мутации CAV-1 вызывают повышение уровня холестерина и прогрессию атеросклероза у apoE-нокаутных мышей.	[277]
			Мутирование CAV-1 снижает ЛПНП инфильтрацию в стенку артерии, стимулирует выработку оксида азота, снижает экспрессию молекул адгезии лейкоцитов. Ассоциирован с ранним атеросклерозом.	[221]
EGFR	7p12	Рецептор эпидермального фактора роста	Ассоциирован с ДИУ у женщин доклимактерического возраста с диагнозом «альбуминурия»	[294]
			Атеросклероз сонных артерий у пациентов старше 50 лет	[181]
ELN	7q11.23	Эластин	Повышение риска болезни Мюммия, которая имеет общие патофизиологические изменения с атеросклерозом	[434]
			Вызывает изменения в структуре волокон актина, подавляет пролиферацию,	[305]

			миграцию, снимает напряжение ГМК сосуда. Влияет на артериальный морфогенез, играет роль в патогенезе сосудистых заболеваний	
			Увеличение жесткости стенки сосуда, расслабление ГМК.	[471]
			Концентрация продуктов частичного разложения эластина значительно выше среди детей, находящихся в группе риска развития атеросклероза.	[244]
GHRHR	7p14	Гормон роста, рецептор рилизинг гормона	При мутации в гене атеросклероз развивается после лечения гормоном роста	[121]
KRIT1	7q21.2	Белок, содержащий повтор анакирина	Регулирует морфогенез сосудистой стенки. Ассоциирован с ишемической болезнью сердца	[504]
LEP	7q31.3	Лептин	Оказывает влияние на давление и ТИМ. Участвует в аутокринной и паракринной системе	[230]

			регуляции тонуса сосудистой ткани	
			Ранний атеросклероз у пациентов с ревматоидным артритом	[227]
NOS3	7q36	Синтаза оксида азота 3 (для эндоте- лиальных клеток)	Определяет повышенный риск ИБС и инсульта у курящих пациентов	[332]
PDGFA	7p22	Тромбоцита рный фактор роста альфа- полипептид	Играет роль в миграции ГМК в неоинтимае. Ассоциирован с ДИУ	[235]
PON1	7q21.3	Параоксо- наза 1	Ассоциирован с атеросклерозом коронарных артерий	[529]
			Ассоциирован с атеро- склерозом сонных артерий у пациентов с повышенной концентрацией холестерина ЛПВП	[245]
PON3	7q21.3	Параоксо- наза 3	Фермент снижает уровень апоптотической гибели клеток. Антиатерогенный эффект	[531]

**Таблица 7. Мутации восьмой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ADAM9	8p11.22	ADAM металлопептидаза, домен 9	Регулирует действие интегринов и миграцию клеток, моделирует прогрессию неointимы в атеросклеротических артериях	[112]
ADRA1A	8p21.2	Адренорецептор альфа 1A	Сосудосуживающий эффект. Уровень в ГМК понижается при гиперхолестеринемии, оттягивая момент формирования атеросклеротических бляшек	[225]
CYP11B2	8q21-q22	Цитохром P450, семейство 11, подсемейство B, полипептид 2	Ассоциирован с гипертонией	[322]
			Мутации в гене увеличивают риск гипертонии и ишемического инсульта	[391]
GATA4	8p23.1-p22	GATA-связывающий	Ассоциирован с гиперхолестеринемией	[326]

		белок 4	неимей	
HAS2	8q24.12	Гиалауронан-синтаза типа 2	Способствует накоплению гиалаурона в процессе формирования АСБ	[493]
			<p>Диабетическая макроангиопатия. Накопление гиалаурона в ГМК. Стимуляция атерогенеза</p>	[168]
			Взаимодействует с ингибиторами циклооксигеназы посредством накопления гиалаурона при формировании атеросклеротических бляшек	[365]
LPL	8p22	Липопротеид-липаза	Мутация в гене, снижающая липолиз, является проатерогенной	[445]
NRG1	8p12	Неурегулин 1	NRG-1 - новый терапевтический кандидат для лечения рестеноза и атеросклероза	[188]
TRIB1	8q24.13	Триблл гомолог 1	Повышенный уровень триглицеридов. Тенденция к формированию атеросклеротической	[361]

			бляшки	
WRN	8p12	RecQ хеликазо- подобные	Ассоциирован с ожирением, тенденцией к хроническим воспалительным процессам	[166]

**Таблица 8. Мутации одиннадцатой хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
APOA4	11q23	Аполипо- протеид А4	Кальцификация коронарных артерий у пациентов с сахарным диабетом первого типа	[319]
			Нарушение гомеостаза холестерина. Ранний атеросклероз	[304]
APOA5	11q23	Аполипо- протеид А4	Плазменный уровень ХС ЛПВП, ТГ	[178]
			Атеросклероз сонных артерий	[209]
APOC3	11q23.1- q23.2	Аполипо- протеид С3	Повышенный риск развития АСБ у больных с гипертриглицери- демией третьего типа	[215]
			Атеропротективная	[424]

			мутация для популяции амишей	
			Ангиографически определенная ишемическая болезнь сердца	[388]
			Повышение уровня ТГ крови	[343]
DRD4	11p15.5	Рецептор дофамина D4	Высокий уровень ХС ЛПВП у мужчин, но низкий - у женщин	[210]
INS	11p15.5	Инсулин	Различия в уровне метилирования ДНК между здоровой и пораженной атеросклерозом тканью	[205]
			U-аллель является маркером развития атеросклероза	[360]
			U-аллель является проатерогенным, L-аллель - антиатерогенным	[511]
MYBPC3	11p11.2	Сердечный миозин-связывающий белок	Сердечная недостаточность у пациентов с ангиографически подтвержденной ИБС	[488]
			Гипертрофическая кардиомиопатия	[341]
ROBO4	11q24.2	Каруселеподобный центральный	Роль в поддержании сосудистой целостности	[302]



		аксональный рецептор (гомолог 4)	на начальных этапах атерогенеза	
--	--	----------------------------------	---------------------------------	--

**Таблица 9. Мутации третьей хромосомы ядерного генома, ассоциированные с атеросклерозом и сопутствующими патологиями**

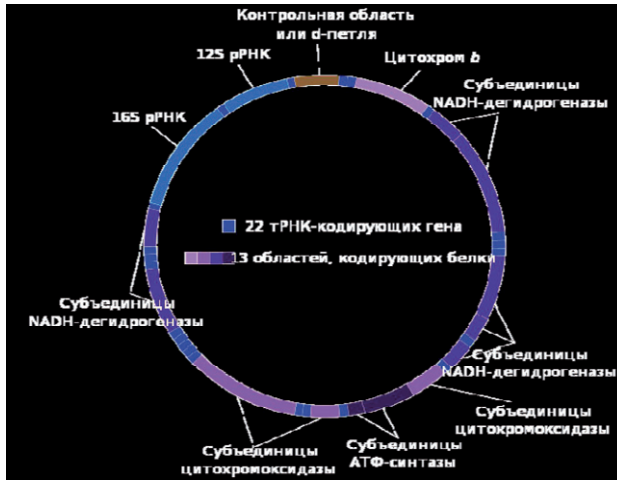
Ген	Локализация	Продукт	Патология	Ссылка на статью
ADIPOQ	3q27	Адипонектин, C1Q	Субклинические проявления сердечно-сосудистых заболеваний	[531]
AGTR1	3q24	Рецептор ангиотензина II, тип 1	Раннее проявление ИБС среди жителей Египта	[118]
CAV3	3p25	Кавеолин 3	Антиатерогенный эффект	[329]
CHRD	3q27	Хордин	Кальцификация атеросклеротических бляшек	[395]
GPX1	3p21.3	Глутатион пероксидаза 1	Предрасположенность к коронарному атеросклерозу у пациентов с сахарным диабетом типа 2. Пониженная утилизация АФК	[399]
			Сахарный диабет типа 2. Диабетические ССЗ	[173]

			и гиперглицидемия	
MYL3	3p21.- 3p21.2	Миозин, легкая цепь 3	Ишемические поражения, опосредованные нефункциональностью гладких мышц стенки сосуда	[528]
PPARG	3p25	Перокси-сомальный рецептор гамма, активируемый пролиферацией	Прогрессирование атеросклероза сонных артерий	[238]
			Ассоциация с атеросклеротическим и поражениями через регуляцию интерлейкина-6	[477]
RARB	3p24.2	Рецептор ретиноевой кислоты бета	Дислипидемия. Воспаление. Атеросклероз	[296]
TGFBR2	3p22	$\beta$ -рецептор фактора роста	Диабетический атеросклероз, опосредованный действием CDA1	[419]
TNNC1	3p21.1	Тропонин С типа 1	Дилатационная кардиомиопатия	[421]

### **1.3.5.3. Митохондриальные болезни**

Митохондрии - двумембранные органеллы, в матриксе которых содержится собственный геном, представленный кольцевой молекулой ДНК бактериального типа. Митохондриальная ДНК человека - кольцевая двухцепочечная молекула, состоящая приблизительно из 16500 пар нуклеотидов, которая содержит 37 генов: 22 гена транспортных

РНК, 2 гена рибосомальных РНК и 13 субъединиц комплексов дыхательной цепи: цитохрома *b*, АТФазы, цитохром-С-оксидазы, NADH-дегидрогеназы (рисунок 2) [31, 526] .



**Рисунок 2.**  
**Схема расположения генов в митохондриальном геноме человека**

В том случае, если все митохондрии в клетке имеют одинаковую копию ДНК дикого типа - наблюдается гомоплазмия (однотипность митохондриальной ДНК у индивидов). Но так как в митохондриях проходит процесс дыхания, связанный с повышенным количеством АФК, митохондриальный геном отличается выраженной нестабильностью, поэтому в нем нередки мутации, возникающие в течение жизни индивида. Кроме того, ряд мутаций митохондриального генома может быть передан по наследству от матери к ребенку. Вследствие одновременного присутствия в митохондриях нормальных и

мутантных молекул ДНК возникает гетероплазмия [526]. Митохондриальные мутации могут накапливаться в течение жизни индивида, формируя фенотип носителя.

По литературным данным, в патологии человека показана ассоциация ряда заболеваний с мутациями митохондриального генома, как врожденными, так и соматическими, накопленными в течение онтогенеза. Митохондриальные цитопатии - гетерогенная группа системных расстройств, вызываемых нарушениями в функционировании митохондрий. Данные патологии поражают преимущественно мышечную и нервную системы и, как правило, характеризуются поздним началом клинических проявлений. К настоящему времени описано много вариантов нарушения процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях человека. Дефект может быть связан с одним или несколькими белковыми комплексами. В одной клетке, как было сказано ранее, могут одновременно существовать митохондрии с геномом дикого типа и несущие мутации, которые могут нарушать нормальное функционирование органелл. За счет первых клетка будет нормально функционировать некоторое время. Если же количество дефектных копий митохондриального генома в органелле превысит определенный уровень, продукция энергии в ней может упасть ниже допустимого порога. Когда в клетке становится слишком много таких плохо справляющихся со своими функциями органелл, потребность в энергии нарастает, в результате чего происходит компенсаторная пролиферация всех митохондрий, включая дефектные. Это лишь приводит к эскалации проблемы. Естественно, при этом в худшем положении оказываются те ткани, которые потребляют наибольшее количество энергии - мышечная и нервная. Таким

образом, если пациент несет смесь нормальных и мутантных молекул митохондриальной ДНК, долгое время мутация может вообще не иметь внешних проявлений. На практике это проявляется более или менее длительным бессимптомным периодом при многих митохондриальных цитопатиях. Однако может наступить момент, когда дефектные молекулы накопятся в количестве, достаточном для проявления патологических признаков. Возраст манифестации заболевания варьирует у разных больных. Раннее начало заболевания приводит к более тяжелому течению и неутешительному прогнозу.

#### **1.3.5.3.1. Симптомы митохондриальных цитопатий**

Характерными симптомами митохондриальных цитопатий являются:

1. В скелетных мышцах - гипотония, проксимальная миопатия, включающая фациальные и фарингеальные мышцы, низкая толерантность к физической нагрузке, птоз и офтальмопарез.
2. В сердце - гипертрофическая кардиомиопатия, аритмия.
3. В центральной нервной системе - пигментная ретинопатия, атрофия зрительного нерва, инсультоподобные эпизоды, расстройства психики.
4. В периферической нервной системе - нарушения двигательной функции гастроинтестинального тракта, аксональная нейропатия.
5. В эндокринной системе - нарушение экзокринной функции поджелудочной железы, гипопаратиреоз, диабет.

Комплексы часто встречающихся симптомов клиницисты объединили в синдромы (большинство их названий состоит из первых букв английских названий симптомов):

1. MELAS - Mitochondrial Myopathy+Encephalopathy,+Lactic Acidosis+Stroke-like episodes (митохондриальная миопатия, энцефалопатия, лактацидоз и инсультоподобные эпизоды).
2. CPEO/PEO - External Ophthalmoplegia+Ophthalmoplegia plus syndrome (офтальмоплегия, связанная с поражением глазодвигательных мышц; офтальмоплегия плюс синдром).
3. KSS - Kearns-Sayre Syndrome (ретинопатия+слабость проксимальных мышц+аритмия +атаксия).
4. MIDD - Maternally Inherited Diabetes and Deafness (диабет+глухота, наследуемые по материнской линии).
5. MERRF - Myoclonic Epilepsy associated with Ragged Red Fibres (миоклоническая эпилепсия с красными волокнами или мышечными волокнами с измененными митохондриями).
6. LHON - Leber Hereditary Optic Neuropathy (врожденная нейропатия глазного нерва).
7. Leigh syndrome - детская острая некротизирующая энцефалопатия.
8. NAPR - Neuropathy, Ataxia and Pigmentary Retinopathy (нейропатия+атаксия +пигментная ретинопатия).
9. NIDDM - Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (проявления инсулин-независимого сахарного диабета).
10. Синдром Альпера (прогрессивная дегенерация нейронов+прогрессивная полидистрофия).

#### ***1.3.5.3.2. Характеристика мутаций митохондриального генома***

Митохондриальные мутации, вызывающие заболевания человека, подразделяются на крупные структурные перестройки (обширные делеции, инсерции и дупликации) и

однонуклеотидные замены, микроделеции и микроинсерции в генах белковых субъединиц ферментов дыхательной цепи, транспортных и рибосомальных РНК (таблицы 11-17).

#### **1.3.5.3.2.1. Крупные структурные перестройки**

Обширные делеции и дупликации являются наиболее изученными крупными структурными перестройками митохондриального генома (таблица 10). Они исследуются такими методами, как гнездная ПЦР [414], ПЦР-ПДРФ с выбором двух сайтов рестрикции [203], рестрикционный анализ с последующим гель-фракционированием тотальной ДНК [499].

**Таблица 10. Обширные делеции и дупликации митохондриального генома**

<b>Мутация</b>	<b>Патология</b>	<b>Ссылка на статью</b>
Делеция митохондриального генома с 5788 по 15448 пары оснований	Синдром Кернса-Сейра и гипопаратиреоз	[499]
Делеция митохондриального генома с 4308 по 14874 пары оснований	MIDD	[132]

Дубликации нуклеотидов (СССССТСССС-тандемные повторы в позициях 305-314 и 956-965, позволяющие удвоить участок в 652 пары оснований)	Непереносимость нагрузок, хронический прогрессирующий паралич наружных мышц глазного яблока, миопатия	[359]
Делеция митохондриального генома с 8469 по 13447 пары оснований	Мерцательная аритмия	[325]
	Семейный нефротический синдром с фокально-сегментарным гломерулосклерозом	[542]
	Одностороннее поражение периферических артерий	[148]
	Ишемическая болезнь сердца	[155]

### **1.3.5.3.2.2. Мутации одного или нескольких нуклеотидов**

Данные мутации могут затрагивать как кодирующий, так и не кодирующий регионы митохондриального генома. Если данные мутации находятся в участке регуляции транскрипции (промоторе или операторе) или находятся в кодирующей части митохондриального гена, они могут проявиться фенотипически, повлиять на механизмы обмена веществ (таблицы 11-16).



**Таблица 11. Митохондриальные мутации генов малой (12S) и большой (16S) субъединиц рибосомальной РНК**

Мутация	Ген	Номер нуклеотида в субъединице рРНК	Патология	Ссылка на статью
<b>Однонуклеотидные замены</b>				
T716G	12S рРНК	69	Рак желудка	[266]
T1095C		448	Наследуемая по материнской линии	[336]
C1494T		847	аминогликозид-индуцированная и бессимптомная потеря слуха	[553]
A1555G		908	Гипертония, наследуемая по материнской линии	[174]
			Тугоухость, наследуемая по материнской линии	[241, 261, 336]
T3200C	16S рРНК	1529	Сахарный диабет типа 2	[546]
<b>Микроделеции и микроинсерции</b>				
652insG	12S рРНК	Нуклеотид 5, дупликация G	Рак желудка	[266]
961insC		Нуклеотид 314, дупликация C	Аминогликозид-индуцированная потеря слуха	[336, 337]

**Таблица 12. Митохондриальные мутации генов транспортных РНК**

Мутация	Ген	Номер нуклеотида	Патология	Ссылка на
---------	-----	------------------	-----------	-----------

		<b>в тРНК</b>		<b>статью</b>
T1658C	тРНК-Val	Нуклеотид 61, входит в состав стебелька Т-петли	CPEO	[544]
G3242A	тРНК-Leu (кодон узнавания UUR)	Нуклеотид 13, входит в область терминации транскрипции петли DHU	Миелодиспласти- ческий синдром (МДС)	[229]
A3243G		Нуклеотид 14, входит в область терминации транскрипции петли DHU	Сахарный диабет типа 2	[431]
			Гломерулонефрит и нефротический синдром	[345, 474]
			MELAS	[538]
			MIDD	[314]
A3252C	Нуклеотид 23, входит в область терминации транскрипции петли DHU	Сахарный диабет типа 2	[386]	
C3256T	Нуклеотид 25, входит в область терминации транскрипции стебелька петли DHU	MELAS , инсульто- подобный удар, оксидативный дефект мышечного метаболизма	[300]	

A3260G		Нуклеотид 29, входит в состав стебелька петли антикодона	Кардиомиопатия, миопатия	[508]
T3264C		Нуклеотид 33, входит в состав петли антикодона	Сахарный диабет типа 2	[494]
T3271C		Нуклеотид 40, входит в состав стебелька петли антикодона	MELAS	[490]
C3285T		Нуклеотид 54, входит в состав стебелька петли антикодона	Сахарный диабет типа 2	[349]
A4269G		Нуклеотид 7, входит в состав стебелька акцептора	Дилатационная кардиомиопатия, энцефалопатия, глухота, эпилепсия	[508]
A4316G	tРНК-Ile	Нуклеотид 58, входит в состав Т-петли	Гипертрофическая кардиомиопатия, потеря слуха	[169]
A4295G		Нуклеотид 37, входит в состав петли	Гипертензия, наследуемая по материнской линии	[338]

		антикодона		
A4300G		Нуклеотид 42, входит в состав стебелька петли антикодона	Гипертоническая кардиомиопатия, ассоциированная с повреждением тяжелой цепи миозина	[122]
A4317G		Нуклеотид 59, входит в состав Т-петли	Фатальная детская кардиомиопатия	[506]
G5540A	тРНК-Trp	Нуклеотид 30, входит в состав петли антикодона.	Энцефаломиопатия, проявляющаяся спинальной атаксией, нейросенсорной глухотой и деменцией	[469]
T5692C	тРНК-Asn	Нуклеотид 38, входит в состав петли антикодона	СРЕО	[468]
T5814C	тРНК-Cys		Окулофарингеальная миопатия	[502]
A8296G	tRNA-Lys	Нуклеотид 2, входит в состав стебелька акцептора	Гипертрофическая кардиомиопатия	[169]
A8326G		Нуклеотид 37, входит в состав петли антикодона	Муковисцидоз	[521]

A8344G		Нуклеотид 55, входит в состав Т-петли	Миоклоническая эпилепсия, MERRF	[203, 537, 538]
A8348G		Нуклеотид 59, входит в состав Т-петли	Кардиомиопатия	[501]
T8356C		Нуклеотид 65, входит в состав стебелька Т-петли	MERRF	[203]
G8363A		Нуклеотид 72, входит в состав стебелька акцептора	Гипертрофическая кардиомиопатия	[448]
			Энцефало- миопатия, нейросенсорная тугоухость, гипертрофическая кардиомиопатия, MERRF	[154]
G12192A	tRNA-His	Нуклеотид 59, входит в состав Т-петли	Кардиомиопатия	[473]
T12297C	тРНК-Leu (кодон узнавания CUN)	Нуклеотид 33, входит в состав петли антикодона	Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП)	[258]
G12315A		Нуклеотид 52, входит в состав стебелька	Энцефалопатия	[224]

		Т-петли		
T14709C	tPHK-Glu	Нуклеотид 37, входит в состав петли антикодона	Врожденная миопатия, отставание в умственном развитии; медленно прогрессирующая миопатия и диабет	[358]
G15995A	tRNA-Pro	Нуклеотид 31, входит в состав стебелька петли антикодона	Муковисцидоз	[521]

**Таблица 13. Митохондриальные мутации генов субъединиц NADH-дегидрогеназы**

Мутация	Ген	Замена аминокислоты при мутации	Патология	Ссылка на статью
G3316A		Аминокислота 4: аланин→ треонин	Сахарный диабет типа 2	[396]
T3336C		Молчащая мутация. Замены изолейцина на другую аминокислоту в позиции 10 не происходит	Сахарный диабет типа 2	[368]
G3337A	ND1, комплекс	Аминокислота 11: валин→	DIDMOAD (несахарное)	[379]

	1	изолейцин	мочеизнурение, сахарный диабет, атрофия зрения, глухота)	
T3394C		Аминокислота 30: тирозин→ гистидин	Сахарный диабет типа 2	[276]
A3395G		Аминокислота 30: тирозин→ серин	Гипертрофическая кардиомиопатия, потеря слуха	[169]
A3421G		Аминокислота 39: валин→ изолейцин	MIDD	[172]
G3460A		Аминокислота 52: аланин→ треонин	LHON	[81, 288, 289, 307, 357, 427, 464]
G3635A		Аминокислота 110: серин→ аспарагиновая кислота	LHON	[552]
T3866C		Аминокислота 187:изолейцин→ треонин	LHON и хромота	[344]
G4132A		Аминокислота 276: аланин→ треонин	NA-AION (наследственная потеря зрения)	[222]
A4833G	ND2, комплекс	Аминокислота 122: треонин→ аланин	NIDDM	[318]
A5178C	1	Аминокислота	Предрасполо-	[389]

		237: лейцин→ изолейцин	женность к острому инфаркту миокарда	
T11253C		Аминокислота 165:изолейцин→ треонин	LHON	[334]
G11778A	ND4, комплекс 1	Аминокислота 340: аргинин→ гистидин	LHON	[220, 288, 307, 352, 366, 402, 427, 433, 526, 527]
G13042A		Аминокислота 236: аланин→ треонин	MELAS и MERRF	[394]
G13513A	ND5, комплекс 1	Аминокислота 393: аспарагиновая кислота→ аспарагин	Синдром Ли и пониженная активность CO1, атипичный синдром Ли, синдром Вульфа- Паркинсона-Уайта	[182, 443]
G14459A	ND6, комплекс 1	Обратное направление синтеза. Аминокислота 72: аланин→ валин	LHON, дисфункция базальных ганглиев, энцефалопатия	[158, 259]
C14482A		Обратное направление	LHON	[514]



		синтеза. Аминокислота 64: метионин→ изолейцин		
C14482G		Обратное направление синтеза. Аминокислота 64: метионин→ изолейцин	LHON, митохондриаль- ные миопатии	[288, 307, 352, 464, 514]
T14484C		Обратное направление синтеза. Аминокислота 64: метионин→ валин	LHON	[514]
			Двухсторонний некроз хвостатого ядра, бледного шара и черного вещества головного мозга	[486]
T14577C		Обратное направление синтеза. Аминокислота 33: изолейцин→ валин	Сахарный диабет типа 2	[498]

**Таблица 14. Митохондриальные мутации генов субъединиц цитохром-С-оксидазы**

Мутация	Ген	Замена аминокислоты при мутации	Патология	Ссылка на статью
C6489A	CO1, комплекс 4	Аминокислота 196: лейцин→ изолейцин	Парциальные эпилептические припадки	[518]

T7587C	CO <sub>2</sub> , комплекс 4	Аминокислота 1: метионин→ треонин	Пониженный уровень выработки белка, митохондриальная энцефаломио- патия	[186]
T7671A		Аминокислота 29: метионин→ лизин	Лактацидоз, миопатия	[429]
G7706A		Аминокислота 41: аланин→ пролин	Синдром Альпера в раннем возрасте	[513]
G9379A	CO <sub>3</sub> , комплекс 4	Аминокислота 58: триптофан→ стоп-кодон Amber	Миопатия, молочнокислый ацидоз, замедленный рост	[267]
9480del15		Делеция аминокислот с 92 по 96 включительно.	Миоглобинурия и недостаток активности цитохром-С- оксидазы	[278]
G9804A		Аминокислота 200: аланин→ треонин	LHON	[464]
T9957C		Аминокислота 251: фенилаланин→ лейцин	Гипертоническая кардиомиопатия, ассоциированная с повреждением тяжелой цепи миозина	[122]

**Таблица 15. Митохондриальные мутации гена цитохрома В**

Мутация	Замена	Патология	Ссылка на
---------	--------	-----------	-----------

	<b>аминокислоты при мутации</b>		<b>статью</b>	
G14846A	Аминокислота 34: глицин→серин	Лактацидоз в покое, непереносимость физических нагрузок	[110]	
G15084A	Аминокислота 113: триптофан→стоп- кодон охра			
G15059A	Аминокислота105: глицин→аргинин	Митохондриальны е миопатии		
G15168A	Аминокислота141: триптофан→стоп- кодон охра	Лактацидоз в покое, непереносимость физических нагрузок		
G15257A	Аминокислота 171: аспарагиновая кислота→ аспарагин	LHON		[288, 464]
A15533G	Аминокислота 263: аспарагин→ аспарагиновая кислота	Гипертония, эпизоды удушья, цианоз, молочнокислый ацидоз		[239]
G15723A	Аминокислота 326: триптофан→ стоп-кодон охра	Лактацидоз в покое, непереносимость физических нагрузок		[110]
G15762A	Аминокислота 339: глицин→ глутамин	Прогрессирующая непереносимость физических нагрузок, проксимальная слабость,		

		недостаток комплекса 3 дыхательной цепи в скелетных мышцах	
--	--	--	--

**Таблица 16. Митохондриальные мутации гена АТФ-синтазы и некодирующего региона**

Мутация	Ген	Замена аминокислоты при мутации	Патология	Ссылка на статью
T8993G	субъединицы 6 АТФ-синтазы, комплекс 5	Аминокислота 156: лейцин→ аргинин	NARP (нейропатия, атаксия, пигментный ретинит)	[537]
T8993C	субъединицы 6 АТФ-синтазы, комплекс 5	Аминокислота 156: лейцин→ пролин	NARP (нейропатия, атаксия, пигментный ретинит)	[537]
A4401G	Некодирующий регион	-	Матерински наследуемая гипертония	[437]

Методами исследования таких мутаций являются:

1. Прямое секвенирование [541].
2. Пиросеквенирование [111, 286, 436].
3. ПЦР в реальном времени [474].
4. Аллель-специфическая ПЦР [262].
5. Блот-гибридизация фрагментов ПЦР по Саузерну [339].
6. ПЦР-ПДРФ-анализ [382].

Исходя из данных литературы можно предположить, что митохондриальные мутации могут играть роль в возникновении и развитии атеросклеротических поражений. В интима артерий человека при раннем атеросклеротическом поражении возникают патофизиологические процессы, которые могут повышать уровень метаболической активности клеток. Другим результатом мутации митохондриального генома может быть снижение концентрации АТФ, ведущее, в конечном итоге, к усугублению атеросклероза.

Полагают, что митохондриальные мутации, атеросклероз и старение организма – взаимосвязанные процессы. В настоящее время есть две гипотезы биологического старения клетки. Первая гипотеза, разработанная Orgel в 60-ые годы, гласит, что старение является производной от суммы всех имеющихся повреждений на уровне белковых молекул, РНК и ДНК ("катастрофа ошибок") [410]. Предположительно, эти факторы запускают цепную реакцию общеклеточного разрушения, т.к. данные повреждения вызывают другие дефекты обмена веществ в организме человека.

Вторая гипотеза, разработанная в 70-ые годы Cutler, связывает продолжительность жизни с возможностью репарации ДНК [167]. Люди с более совершенной системой репарации дезоксирибонуклеиновых кислот живут дольше. Одной из основных причин клеточной дисфункции могут быть митохондрии человека, вследствие того, что они имеют более слабую систему репарации, по сравнению с митохондриальным геномом. Литературные данные о том, что ультраструктурные изменения в митохондриях мышечных клеток, нарушение дыхания митохондрий, повышение дефицита цитохром-С-

оксидазы и увеличение процента делеций в митохондриальном геноме ассоциированы с продолжительностью жизни индивидов, подтверждает данную гипотезу [109, 537].

Обращает на себя внимание, что делеции митохондриального генома начинают возникать уже у детей. Например, одна из самых крупных делеций Исследование "обширной делеции" (одной из самых больших) показало, что происходит ее значительное накопление в течение жизни индивида. При этом клетки мозга, скелетных и сердечных мышцы и другие медленно обновляющиеся ткани накапливают намного больше дефектных молекул митохондриального генома, по сравнению с быстро обновляющимися популяциями клеток [109, 275].

Показано, компенсаторное увеличение количества митохондрий при нарушениях энергетического обмена в клетках у детей сказывается на клинических показателях, когда они становятся взрослыми [109]. Например, у детей первых трех лет жизни незначительно выражены количество и размер аномальных скоплений митохондрий. Данные показатели обычно используются как тест на выявление полисистемной митохондриальной недостаточности. С возрастом у ряда пациентов происходит их увеличение. При семейном анализе обнаружена большая выраженность аномальных скоплений митохондрий у старших братьев и сестер, по сравнению с младшими. Кроме того, матери, у которых отсутствовала клиническая симптоматика нарушений клеточного энергообмена, могли иметь значительно больше аномальных скоплений митохондрий, чем их дети с тяжелыми митохондриальными заболеваниями. Можно предположить, что увеличение количества митохондрий происходит для

компенсации качественных нарушений энергетического обмена клетки. Это наводит на мысль, что при лечении митохондриальных болезней необходимо использовать те методы, которые приведут к увеличению количества митохондрий в клетках, а также их повышенной пролиферации [109].

Учеными было продемонстрировано, что процент мутаций митохондриальной ДНК у пациентов с митохондриальной патологией значительно выше, чем у их здоровых сверстников. При этом с увеличением возраста значительно повышается чувствительность тканей некоторых отделов мозга к действию митохондриальных ингибиторов. Обнаружено, что данные показатели у индивида с митохондриальной кардиомиопатией соответствовали 78-летнему возрасту здорового человека [109, 523].

В первую очередь при старении происходит дисфункция ферментов и полимеризация митохондриальных липидов. Полагают, что эти явления могут лежать в основе общих возрастных изменений. Кроме того, они могут послужить причиной дегенеративных патологий, сопровождающих старение, а именно - сахарного диабета, болезнью Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона, ишемической болезни сердца и т.д. [275, 297, 298, 325, 389, 450, 535. 537].

Группа ученых из США обнаружила целый спектр точечных мутаций митохондриального генома, количество которых значительно увеличивается у здоровых индивидов при старении. Особенно большое количество мутантных вариантов однонуклеотидных замен было выявлено в некодирующем регионе [535].

Гипотеза, гласящая, что ключевую роль при старении играет изменяющаяся функциональная активность митохондрий, логически является квинтэссенцией первых двух [523].

Моноклональная гипотеза возникновения атеросклероза в качестве причины возникновения одного или нескольких клеточных клонов, начинающих неограниченно пролиферировать, результатом чего являются, например, атеросклеротические бляшки на стенках сосудов, выдвигает генетические мутации, в том числе, митохондриальные. Данные мутации могут иметь соматическую природу и возникнуть в результате стресса, а также неблагоприятного воздействия внешней или внутренней среды организма. Кроме того, генетические дефекты могут иметь наследственную природу, но начать проявляться в результате попадания организма человека в критические условия, провоцирующие гладкомышечные клетки к неограниченной пролиферации [116,118].

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

В последнее время большинство ученых склоняются к мнению, что в возникновении патологий, и в частности, цитопатий, играет роль суммарный мутантный фон, который формируют все мутации митохондриального генома, а не только каждая в отдельности [404, 492, 555]. Полагают, что



именно после достижения определенного порога мутационной нагрузки организма начинают возникать симптомы заболевания. Эти сведения могут помочь в поиске возможных причин такого тяжелого и грозного заболевания, как атеросклероз.

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1. Исследуемые мутации

Для изучения ассоциации атеросклеротического поражения с мутациями митохондриального генома была выделена ДНК из образцов интимы аорты или клеток крови, проведен ряд ПЦР с праймерами на область мутации и дальнейшее пиросеквенирование амплификатов для выявления точечных замен или микроделаций. Исследуемые мутации локализованы в кодирующем регионе митохондриального генома (таблица 17).

**Таблица 17. Локализация исследуемых мутаций в митохондриальном геноме**

№ п/п	Мутация	Ген
1	652delG	Ген рРНК 12S
2	652insG	
3	T716G	
4	A750G	
5	961insC	
6	961delC	
7	A1555G	
8	C3256T	Ген тРНК-Leu (кодон узнавания UUR)
9	T3258C	
10	T3271C	
11	A3280G	
12	C3285T	
13	G3316A	Ген субъединицы 1

14	T3336C	NADH-дегидрогеназы
15	5132insAA	Ген субъединицы 2 NADH-дегидрогеназы
16	C5178A	
17	G5540A	Ген тРНК-Trp
18	T5692C	Ген тРНК-Asn
19	T5814C	Ген тРНК-Cys
20	C6489A	Ген субъединицы 1 цитохром-С-оксидазы
21	T8362G	Ген тРНК- Lys
22	G8363A	
23	T8993G	
24	T8993C	
25	G9379A	Ген субъединицы 3 цитохром-С-оксидазы
26	9480del15	
27	9537insC	
28	G12315A	Ген тРНК-Leu (кодон узнавания CUN)
29	G13513A	Ген субъединицы 5 NADH-дегидрогеназы
30	G14459A	Ген субъединицы 6 NADH-дегидрогеназы
31	C14482G	
32	C14482A	
33	T14484C	
34	T14487C	
35	T14709C	Ген тРНК-Glu
36	G14846A	Ген цитохрома В
37	G15059A	
38	G15084A	
39	C15452A	

40	del 15498 to 15521	
41	G15723A	
42	G15762A	

## 2.2. Материалы

Для проведения данной работы были использованы:

I. Образцы нормальной интимы и липофиброзные бляшки 7 аорт лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти.

II. 265 нормальных и пораженных атеросклерозом различной степени тяжести участков морфологически картированной стенки аорт пяти индивидов.

Образцы аутопсийного материала брались из грудного отдела интимы аорты мужчин и женщин, скончавшихся в возрасте 30-65 лет в результате несчастного случая или внезапной смерти (за исключением острого алкогольного или иного отравления, а также электротравмы). Сосуды вскрывали продольно и промывали изотоническим фосфатным буфером, рН 7,6.

При идентификации типа поражения внешне непораженные участки аорт и участки с атеросклеротическими поражениями идентифицировали макроскопически, а затем микроскопически в соответствии с классификацией Совета по атеросклерозу Американского Общества по изучению сердца [246].

Внешне неизмененные участки аорты имели гладкую люминальную поверхность. На вертикальных срезах в интимае можно было выявить два слоя: прилежащий к просвету

протеогликановый слой и примыкающий к меди мышечно-эластический слой.

Участки интимы с начальными поражениями (I тип поражения) макроскопически представляли собой участки с гладкой желтоватой поверхностью, иногда с мелкими желтыми точками. Микроскопические изменения были минимальны. Наблюдались небольшие накопления внеклеточных липидных капель в соединительно-тканном матриксе. Помимо оседлых клеток, в участках начальных поражений можно было обнаружить увеличенное, по сравнению с внешне неизменной интимой, количество мононуклеарных клеток. Никаких нарушений в структуре ткани не выявлялось.

Жировые полосы (поражения II типа) макроскопически представляли собой полоски и точки желтого цвета, немного выступающие над поверхностью сосуда. Часто можно было обнаружить жировые полосы, слившиеся между собой в более крупные структуры (кластеры). На срезах ткани липиды выявлялись в основном внутриклеточно. В соединительно-тканном матриксе обнаруживались также внеклеточные липиды. Иногда в жировых полосах наблюдалось обильное разрастание внеклеточного матрикса.

Липофиброзные бляшки (поражения Va типа). При макроскопическом изучении липофиброзные бляшки выглядели как сильно выступающие над люминальной поверхностью желтоватые или перламутровые, круглые или эллипсоидные образования. Микроскопически в этих поражениях обнаруживались все изменения, характерные для жировых полос: накопление внутриклеточных липидов, разрастание внеклеточного матрикса. Кроме этого, в липофиброзных бляшках выявлялось массивное некротическое ядро и

расположенная над ним соединительно-тканная покрывка. В липофиброзных бляшках имелись участки, по морфологии похожие на участки жировых поражений - плечи липофиброзных бляшек.

Фиброзные бляшки (поражения Vc типа). Фиброзные бляшки макроскопически представляли собой сильно приподнятые, жемчужного цвета, округлые или овальные образования, микроскопически состоящие в основном из грубого соединительно-тканного матрикса, с “замурованными” в нем клетками. Липидный компонент был минимальным или отсутствовал.

Интима аорты была морфологически картирована согласно наличию участков атеросклеротического поражения различной степени тяжести или здоровой сосудистой ткани.

III. Общие гомогенаты нормальной или пораженной атеросклерозом интимы аорты 10 человек.

Все пораженные атеросклерозом участки интимы гомогенизировались, тщательно перемешивались и отбирались по 10 мкг образца для выделения ДНК. Таким же способом получали гомогенат интимы нормальных участков аорты.

IV. Образцы клеток крови гетерогенной выборки из Московского региона, состоящей из 700 участников исследования. 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 гипертензию, сахарный диабет 2 типа, ишемическую болезнь сердца, острый инфаркт миокарда, бронхиальную астму, нарушение мозгового кровоснабжения).

## 2.3.Методы

### 2.3.1.Подготовка образцов интимы аорты для выделения ДНК

После макроскопической идентификации из внешне непораженных и атеросклеротических участков (начальные поражения, жировые полосы, липофиброзные и фиброзные бляшки) вырезали кусочки необходимого размера перпендикулярно длинной оси сосуда. Образцы для вертикальных срезов фиксировали в течение 18 часов метакарне (метанол : хлороформ : ледяная уксусная кислота в объемных соотношениях 6:3:1). После фиксации образцы дегидратировали в серии спиртов восходящей концентрации, просветляли в хлороформе и заливали в парапласт (Sigma Chemical Co., St-Louis, MS, USA), затем готовили серийные срезы толщиной 5 мкм. Срезы каждого образца окрашивали гематоксилином-эозином по стандартной методике для идентификации изучаемого участка методами световой микроскопии.

Во всех образцах артериальной ткани, соответствующие норме, начальным поражениям, жировым полосам, липофиброзным и фиброзным бляшкам механически отделяли интимальный слой от подлежащего медиального слоя и замораживали в жидком азоте. Замороженную интиму растирали в ступке под жидким азотом до порошкообразного состояния.

Хранение полученных образцов интимы аорты осуществлялось при -75°С.

### **2.3.2. Ультрасонографическое исследование**

При определении типа поражения артерий использовали ультрасонографию высокого разрешения в В-режиме с использованием линейного сосудистого датчика с частотой 7,5 МГц на ультразвуковом сканере SonoScape SSI-1000 (Китай). Измерение толщины интимо-медиального слоя проводили с помощью программы Prosound (R. Selzer, США).

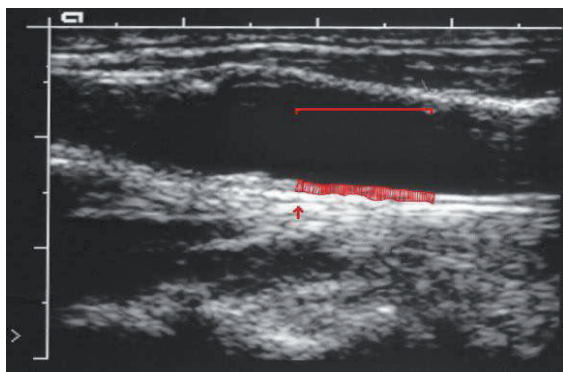
Ультрасонография - применение ультразвука, частота которого составляет примерно 30 000 Гц, для получения изображения глубоких структур тела. Ультразвуковой луч направляется на исследуемую поверхность тела через специальный датчик, эхо отраженного звука используется для формирования электронного изображения различных структур тела.

Протокол обследования включал сканирование левой и правой сонных артерий, области каротидного синуса, а также наружной и внутренней сонных артерий с фокусировкой на задней стенке артерии в трех фиксированных проекциях – переднебоковой, боковой и заднебоковой [51, 446]. Предварительные измерения проводили на участке общей сонной артерии длиной 10 мм, противолежащем началу каротидного синуса. Толщину интимо-медиального слоя задней стенки общей сонной артерии определяли как расстояние от ведущего края первой эхогенной зоны до ведущего края второй эхогенной зоны. Среднее значение трех измерений (в переднебоковой, боковой и заднебоковой проекциях) рассматривали как интегральный показатель толщины интимо-медиального слоя. Вся процедуру сканирования записывали в цифровом формате для последующего анализа с помощью



специализированного программного пакета M'Ath 3.0 (ИМТ, Франция). Наличие атеросклеротических бляшек (АСБ) 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%).

Пример сканированного изображения, полученного при ультразвукографическом исследовании сонной артерии человека, представлен на рисунке 3. Как интегральный показатель толщины ИМС рассматривалось среднее значение трех измерений (в переднебоковой, боковой и заднебоковой проекциях).



***Рисунок 3. Пример сканированного изображения, получаемого при ультразвукографическом исследовании сонной артерии человека для определения толщины ИМС в программе «ProSound».***

### **2.3.3. Получение и подготовка образцов крови для анализа**

Кровь для проведения генетического анализа брали утром натощак в количестве 9 мл из локтевой вены в пластиковую пробирку объемом 10 мл, содержащую в качестве антикоагулянта натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Na-ЭДТА). Использовался маточный раствор 0,1 М Na-ЭДТА в воде (рН 8,0), к которому добавляли свежую кровь в соотношении 9:1 для получения конечной концентрации Na-ЭДТА 10 ммоль/л. Хранение образцов осуществлялось при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Следует отметить, что кроме генетического скрининга у участников исследования проводился анализ крови на ряд биохимических показателей: уровень сахара, общего холестерина, липопротеидов низкой и высокой плотности, триглицеридов.

### **2.3.4. Выделение ДНК**

Выделение тотальной ДНК из образцов ткани аорты (10 мкг) или крови (5 мл) проводилось с помощью метода фенол-хлороформной экстракции [96, 454].

В 50 мл-пробирки помещали по 5 мл размороженной крови и добавляли 40 мл лизирующего раствора А (0,32 М сахароза; 5мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 100% тритон X-100; 0,01М трис- $\text{HCl}$ , рН 7,6). Гемолиз проводили 40 минут при  $+4^{\circ}\text{C}$ . Далее пробирки попарно уравнивали лизирующим раствором А и центрифугировали 20 минут на 4000 об/мин при  $+4^{\circ}\text{C}$ , после чего аккуратно сливали надосадочную жидкость. После

сливания в полученную ядерную фракцию добавляли по 1мл лизирующего раствора А и ресуспендировали с помощью пипетки на 1000 мкл со срезанным наконечником (для сохранения целостности ДНК). Далее ресуспендированный раствор переносили в пробирки на 15 мл, в них доводили общий объем жидкости до 12 мл с помощью лизирующего раствора А и вторично центрифугировали на 4500 об/мин при +4°C. Надосадочную жидкость сливали, подсушивали пробирки на фильтровальной бумаге и давали осадку подсохнуть в течение 20 минут при комнатной температуре. В подсохший осадок добавляли 700 мкл буфера В (25 мМ ЭДТА рН 8,0; 75 мМ NaCl) и вновь ресуспендировали полученный раствор пипеткой с обрезанным наконечником. Далее переносили раствор в пробирки на 1,5 мл, добавляли 30 мкл протеиназы с концентрацией 20мкг/мкл К и тщательно перемешивали переворачиванием пробирок. Пробирки с пробами встряхивали 30 минут на термостатированной качалке на +55°C в течение 30 минут и оставляли в термостате на +56°C не менее, чем на 16 часов. Периодически перемешивали пробы переворачиванием пробирок.

После инкубирования пробы переносили в пробирки на 2 мл для очистки. К каждой пробе добавляли 900 мкл фенола, хорошо перемешивали их содержимое и центрифугировали на 13,4 тыс. об/мин 15 минут. Далее в новые пробирки на 2 мл переносили верхнюю водную фазу центрифугата с ДНК и межфазную пленку, добавляли в пробы по 450 мкл фенола и хлороформа, после чего вновь центрифугировали на 13,4 тыс. об/мин 15 минут. На третьей стадии очистки добавляли в водную фазу с межфазной пленкой, отобранную из проб и перенесенную в новые пробирки по 2 мл, по 900 мкл

хлороформа, снова хорошо перемешивали и центрифугировали на 13,4 тыс. об/мин 15 минут. Третью стадию очистки повторяли, только во второй раз межфазную пленку в новые пробирки не переносили.

Следующую стадию выделения ДНК - осаждение - проводили с помощью добавления в пробы 900 мкл изопропанола. Далее пробы перемешивали и центрифугировали на 13,4 тыс. об/мин 5 минут. Супернатант сливали аккуратно, чтобы не захватить небольшой осадок, после чего подсушивали пробы на фильтровальной бумаге и подсушивали в течение трех минут при комнатной температуре. После - добавляли по 900 мкл охлажденного 70% этилового спирта, давали постоять при комнатной температуре 5-10 минут и центрифугировали на 13,4 тыс. об/мин 5 минут. После центрифугирования супернатант аккуратно удаляли, а осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре до исчезновения видимых следов этанола (примерно 20-30 мин). Осадок ДНК растворяли в 300 мкл ТЕ-буфера (10мМ Трис-НСl, рН 8,0, 1мМ ЭДТА) и помещали на +4°C на 5 суток.

Концентрацию ДНК в полученной пробе определяли с помощью наноспектрофотометра IMPLEN NanoPhotometrTM (см. раздел 2.2.2.). После измерения концентрации пробы ДНК хранили при -20°C.

Для работы с коллекцией пробы разводили в ТЕ-буфере до концентрации 0,03 мкг/мкл, помещали разведенные образцы в отдельные пробирки.

### **2.3.5. Электрофорез образцов ДНК и ПЦР-фрагментов**

Электрофорез выделенных образцов ДНК, а также амплификатов проводили в горизонтальном аппарате фирмы «Хеликон» в агарозном геле с использованием 0,5X TBE буфера. Концентрация агарозы («Fluka») составляла 0,8% (для образцов ДНК) и 1,5-2,0 % (для ПЦР-фрагментов). Гель окрашивали с помощью добавления раствора бромистого этидия (0,5 мкг/мл). В качестве красителя использовали раствор бромфенолового синего (1мкл на 10 мкл образца).

Для идентификации молекулярного веса исследованных ПЦР-фрагментов использовали ДНК-маркеры 1 Kb (13 фрагментов от 0.25 до 10 Kb) и 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.) (ЗАО «Сибэнзим», Россия; <http://russia.sibenzyme.com/info231.php>) (рисунки 4 и 5).

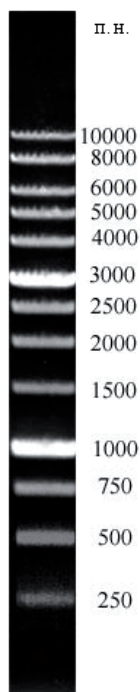
Состав 10X TBE: TrisHCl - 108 г, борная кислота - 55 г, 0,5M ЭДТА pH 8,0 - 40 мл на 1 л буфера.

Примеры гель/электрофорезов ПЦР-фрагментов исследованных митохондриальных мутаций представлены на рисунках 6-13.

### **2.3.6. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)**

Данные о последовательности праймеров и условиях реакций ПЦР были найдены в статьях, посвященных митохондриальным мутациям-кандидатам для исследования их ассоциации с атеросклерозом [110, 135, 182, 224, 259, 266, 267, 300, 310, 357, 368, 403, 486, 497, 518, 536, 542].

Концентрация раствора ДНК в нг/мкл измерялась на наноспектрофотометре IMPLEN NanoPhotometr™ с использованием микроюветы LabelGuard™ в режиме «DS DNA» при длине волны 260 нм.



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

Для реакции брали ДНК с концентрацией 0,1 мкг/мл, разбавленную MQ, и синтезированные фирмой «Синтол» праймеры с концентрацией 10 пмоль/мкл.

Реакционная смесь и условия ПЦР были следующие [96, 454]:

MQ (H<sub>2</sub>O) - 4,6 мкл;

Смесь dNTPs 10x: 2 мМ dATP, 2 мМ dTTP, 2 мМ dGTP, 2 мМ dCTP - 4 мкл;

10x буфер для ПЦР (16,6 μМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ tris-HCl (pH 8,8)- 4 мкл;

MgCl<sub>2</sub>: 25мМ - 4 мкл (при необходимой концентрации 2,5 мМ);

- 2,4 мкл (при необходимой концентрации 1,5 мМ);

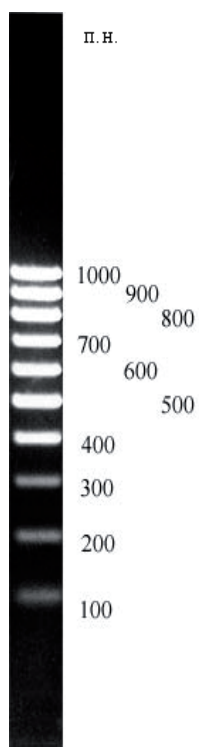
Таq-полимераза («Синтол») - 1,33 мкл

Матричная ДНК - 4 мкл;

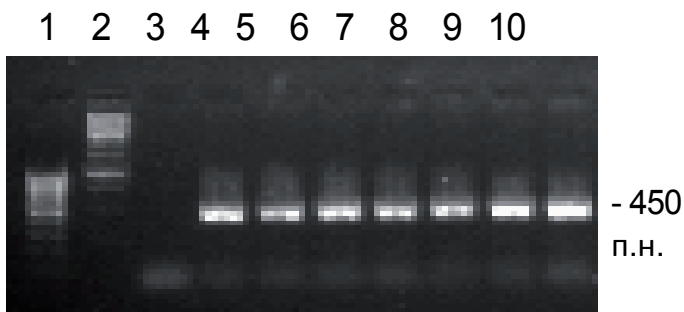
Праймер F (+) - 2,7 мкл;

Праймер R (-) - 2,7 мкл.

Реакцию проводили в 40 мкл реакционной смеси.

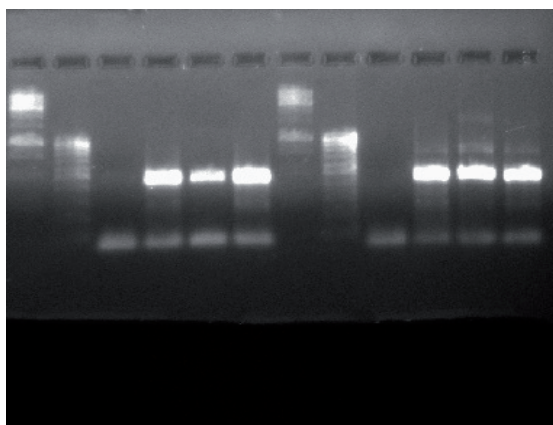


**Рисунок 5. ДНК-маркер 100 бр (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.)**



**Рисунок 6. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутаций T14709C, G14846A, G15059A и G15084A:**

1. ДНК-маркер 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.);
2. ДНК-маркер 1 Kb (13 фрагментов от 0.25 до 10 т.п.н.);
3. Отрицательный контроль;
- 4-10. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутаций T14709C, G14846A, G15059A и G15084A.





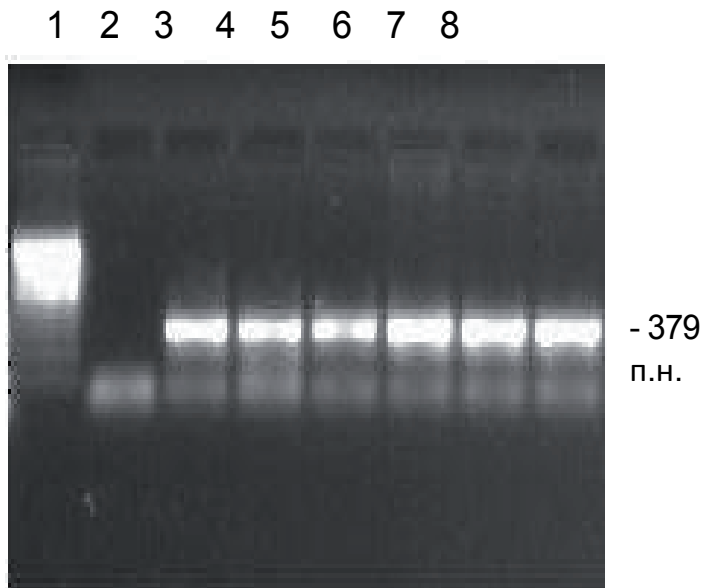
**Рисунок 7. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутаций 652insG, T716G, A750G, 652delG и 961insC:**

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

**2 и 8. ДНК-маркер 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.);**

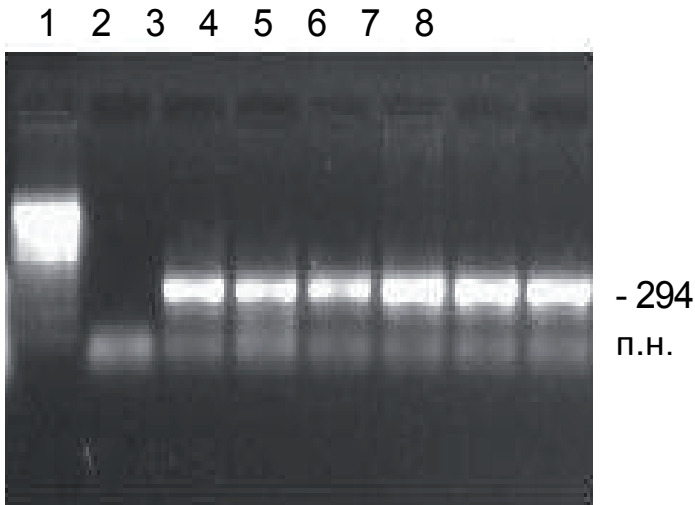
**3 и 9. Отрицательный контроль;**

**4-6 и 10-12. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутаций 652insG, T716G, A750G, 652delG и 961insC.**



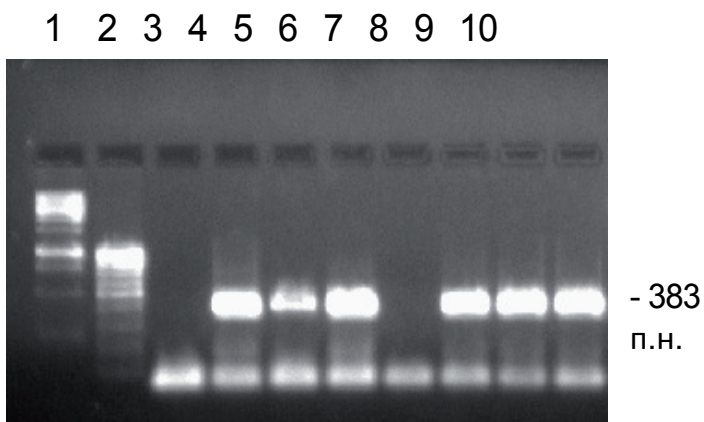
**Рисунок 8. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутации A1555G:**

1. ДНК-маркер 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.);
2. Отрицательный контроль;
- 3-8. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутации A1555G.



**Рисунок 9. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутаций С3256Т, Т3258С, Т3271С, А3280G, С3285Т, G3316А и Т3336С:**

1. ДНК-маркер 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.);
2. Отрицательный контроль;
- 3-8. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутаций С3256Т, Т3258С, Т3271С, А3280G, С3285Т, G3316А и Т3336С.



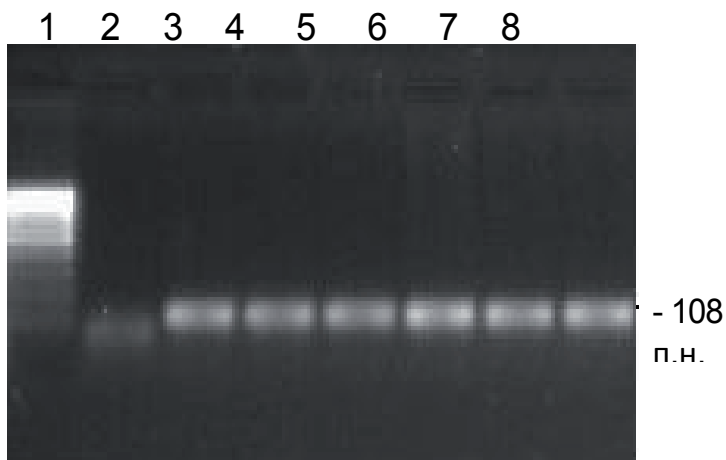
**Рисунок 10. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутаций 5132insAA и C5178A:**

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

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

**3 и 7. Отрицательный контроль;**

**4-6 и 8-10. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутаций 5132insAA и C5178A.**

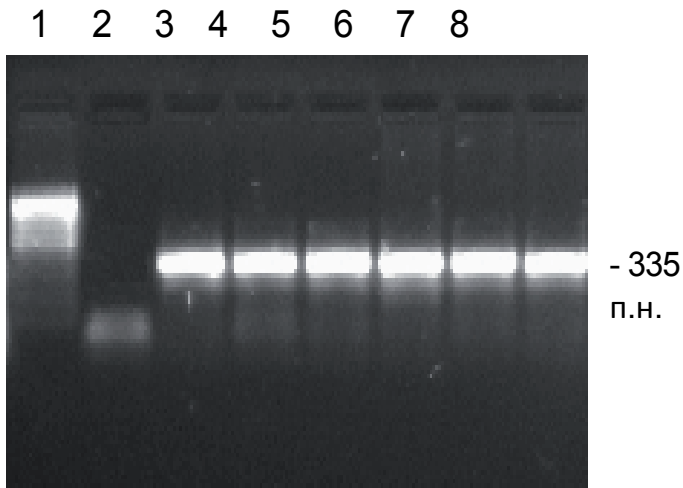


**Рисунок 11. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутации G12315A:**

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

**2. Отрицательный контроль;**

**3-8. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутации G12315A.**

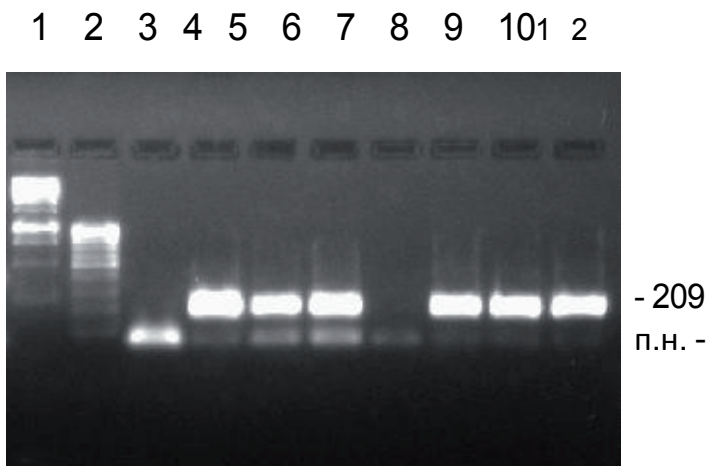


**Рисунок 12. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутации G13513A:**

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

**2. Отрицательный контроль;**

**3-8. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутации G13513A.**



**Рисунок 13. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутаций G14459A, C14482G, C14482A, T14484C и T14487C:**

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

**2. ДНК-маркер 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.);**

**3 и 7. Отрицательный контроль;**

**4-6 и 8-10. ПЦР-фрагменты, содержащие область мутаций G14459A, C14482G, C14482A, T14484C и T14487C.**

Последовательности праймеров для ПЦР приведены в таблице 18.

**Таблица 18. Праймеры для ПЦР [110, 182, 224, 266, 267, 310, 368, 486, 497, 518, 536, 542]**

Мутация	Прямой праймер для ПЦР	Обратный праймер для ПЦР
652delG	TAGACGGGCTCACATCAC (621-638)	bio-GGGGTATCTAATCCC- AGTTTGGGT (1087-1064)
652insG		
T716G		
A750G		
961insC		
961delC		
A1555G	TAGGTCAAGGTGTAGCCCA TGAGGTGGCAA (1326-1355)	bio-GTAAGGTGGAGTGGG TTTGGG (1704-1684)
C3256T	bioAGGACAAGAGAAATAAG- GCC (3129-3149)	ACGTTGGGGCCTTTGCGT AG (3422-3403)
T3258C		
T3271C		
A3280G		
C3285T		
G3316A		
T3336C		
5132insAA	bio-GCAGTTGAGGTGGATT AAAC (4963- 4982)	GGAGTAGATTAGGCGTA GGTAG (5366-5345)
C5178A	ACACTCATCACCCCTTACCA (5451-5469)	bio-CGAATAAGGAGGC TTAGAG (6016-5998)
G5540A		
T5692C		
T5814C		
C6489A	GGGCCATCAATTTTCATCACA ACAA (6382–6405)	bio-CAGCAGCTAGGAC TGG-GAGAGATAGGA (6516-6490)
T8362G	bio-AGATTAAGAGAACCAAC ACCTCTTTACA (8333-8360)	GGGGTAATTATGGTGG GCC (8410-8391)
G8363A	bio-CACTAACCATATACCAA TGA (9358–9377)	CTCCTGATGCGAGTAATA CGGATGT (9630-9605)
G9379A		
9480del15		
9537insC		
G12315A	bio-CTCATGCCCCCATGTC TAA (12230–12249)	TTACTTTTATTTGGAGTTG CAC (12337-12317)

G13513A	CCTCACAGGTTTCTACTCCA AA (13491–13512)	bio-AAGTCCTAGGAAAGT GACAGCGAGG (13825-13806)
G14459A	CAGCTTCCTACACTATTA GT (14303 –14334)	bio-GTTTTTTTAATTTAT TTAGGGGG (14511-14489)
C14482G		
C14482A		
T14484C		
T14487C		
T14709C	bio-CATTATTCTCGCACGGA CT (14671–14689)	GCTATAGTTGCAAGCAGG AG (15120 –15100)
G14846A		
G15059A		
G15084A		
C15452A del 15498 to 15521	bio-ACCTTCCACCTTACTA CA (15401–15419)	TGTAGGCGAATAGGAAAT ATC (15581-15561)
G15723A G15762A	GCCCGAATGATATTCCTAT (15553–15572)	bio-GCTTTGGGTGCTA- ATGGTGG (15996-15977)

Условия для ПЦР представлены в таблице 19.

**Таблица 19. Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома [96, 454]**

Мутации	Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl <sub>2</sub> в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
G5540A, T5692C, T5814C	566 п.н.	2,5 мМ	94 <sup>0</sup>	62 <sup>0</sup>	72 <sup>0</sup>
652delG, 652insG T716G, A750G,	467 п.н.	2,5 мМ	94 <sup>0</sup>	60 <sup>0</sup>	72 <sup>0</sup>

961insC, 961delC					
5132insAA, C5178A	383 п.н.				
C3256T, T3258C, T3271C, A3280G, C3285T, G3316A, T3336C	294 п.н.	2,5 мМ			
T8993G, T8993C	180 п.н.	1,5 мМ			
G9379A, 9480del15, 9537insC, 9537delC	273 п.н.	2,5 мМ	94°	55°	72°
G13513A	335 п.н.				
T14709C, G14846A, G15059A, G15084A	450 п.н.	1,5 мМ			
C15452A, del 15498 to 15521	181 п.н.	2,5 мМ			
G15723A, G15762A	444 п.н.	1,5 мМ			
A1555G	379 п.н.	2,5 мМ	94°	50°	72°
C6489A	135 п.н.	1,5 мМ			
G12315A	108 п.н.	2,5 мМ			
G14459A, C14482G, C14482A, T14484C,	209 п.н.	1,5 мМ			



T14487C					
T8362G, G8363A	78 п.н.	1,5 мМ	94 <sup>0</sup>	45 <sup>0</sup>	72 <sup>0</sup>

Один из праймеров для ПЦР был биотинилирован в целях последующего пиросеквенирования ПЦР-фрагмента.

Исследование проводилось с использованием амплификатора «PTC DNA Engine 200».

### **2.3.7. Пиросеквенирование**

#### **2.3.7.1. Краткое описание метода**

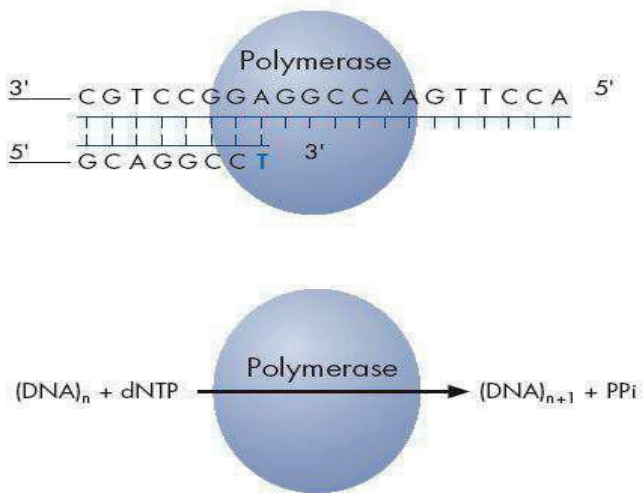
Проведение реакции пиросеквенирования включает в себя пять этапов [111, 286, 436].

##### *Этап 1.*

Праймер для сиквенса гибридизируется с одноцепочечным ПЦР-амплификатом, который используется в качестве матрицы. Полученный фрагмент инкубируется с ферментами: ДНК-полимеразой, АТФ-сульфурилазой, люциферазой и апиразой; а также с субстратом: аденозин-5-фосфосульфатом и люциферинном (рисунок 14).

##### *Этап 2.*

В реакционную смесь добавляется первый нуклеотид. ДНК-полимераза достраивает его к цепи ДНК, в соответствии с принципом комплементарности. При этом реакция сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквивалентном сумме включенных нуклеотидов (рисунок 14).

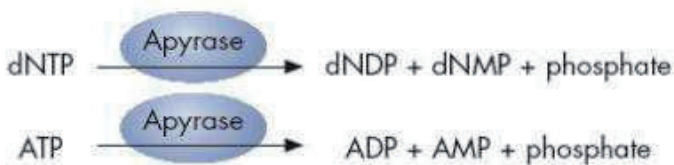
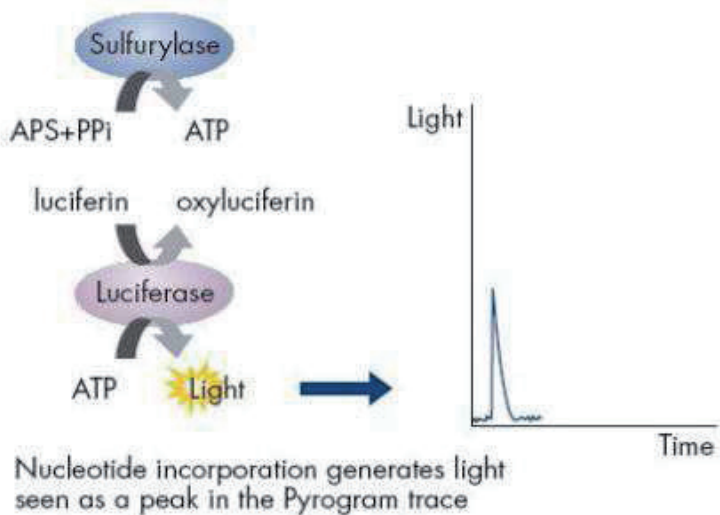


**Рисунок 14. Технология пиросеквенирования: этапы 1 и 2**

**Этап 3.**

АТФ-сульфурилаза преобразует РРi в АТФ в присутствии аденозин-5-фосфосульфата. При этом происходит преобразование люциферина в оксилюциферин, который генерирует видимый свет пропорционально количеству АТФ.

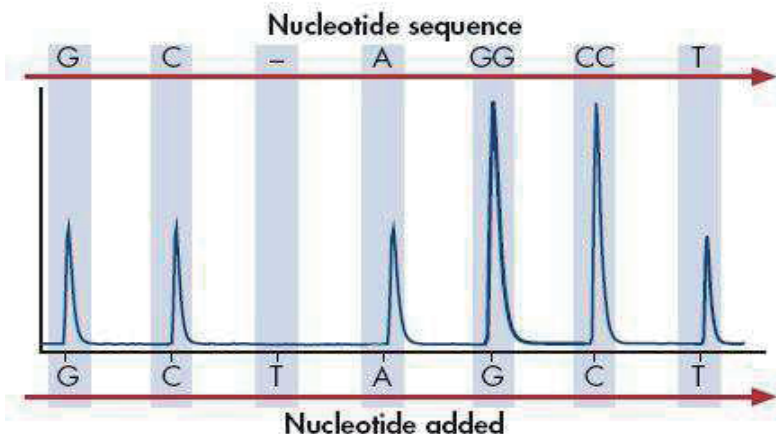
Пиросеквенатор детектирует этот свет и преобразует его в соответствующий пик на пирограмме. Высота каждого пика пропорциональна интенсивности световой вспышки, и, следовательно, количеству встроенных в цепь ДНК нуклеотидов (рисунок 15). Например, если в определенном положении цепи ДНК имеется один нуклеотид С - на пирограмме будет виден пик, соответствующий однократной вспышке, а если подряд три нуклеотида С - трехкратной вспышке (т.е. пик будет в три раза выше).



**Рисунок 15. Технология пиросеквенирования: этапы 3 и 4**

**Этап 4.**

Апираза, нуклеотид-разрушающий фермент, постоянно убирает оставшиеся не присоединенными нуклеотиды и АТФ. Затем в реакционную смесь добавляется другой нуклеотид (рисунок 15).



**Рисунок 16. Технология пиросеквенирования: пример пирограммы исследуемого фрагмента ДНК.**

### **2.3.7.2. Приготовление проб**

Для проведения вышеописанного исследования необходимо из амплификатов получить пробы, содержащие смесь праймеров для сиквенса с одноцепочечными исследуемыми фрагментами.

Это реализуемо при использовании в реакции ПЦР одного биотинилированного праймера (таблица 2), к которому присоединяется частица стрептавидин-сефарозы, что дает возможность оперировать с одноцепочечным амплификатом с помощью взаимодействующего с биотином стрептавидина.

Приготовление проб для пиросеквенирования осуществляли следующим образом. Сначала готовили необходимые для пробоподготовки растворы:

а) 2X Binding buffer (на 100 мл раствора -  $C_4H_{11}NO_3$  - 0,121 г, NaCl - 11,7 г, EDTA - 0,0292 г, Tween 20 - 100 мкл. Доводили pH буфера до 7,6 с помощью 1 М HCl)

б) 1X Annealing buffer (на 100 мл раствора -  $C_4H_{11}NO_3$  - 0,242 г,  $C_4H_6MgO_4 \cdot 4H_2O$  - 0,043 г. Доводили pH буфера до 7,6 с помощью 4 М  $CH_3COOH$ )

в) Washing buffer (на 100 мл раствора -  $C_4H_{11}NO_3$  - 0,121 г. Доводили pH буфера до 7,6 с помощью 4 М  $CH_3COOH$ )

г) 0,2 М NaOH (на 100 мл раствора - NaCl - 0,8 г)

Затем готовили раствор стрептавидин-сефарозы из расчета на 1 пробу: 40 мкл 2ХВВ, 3 мкл стрептоavidин-сефарозных частиц, 7 мкл  $\mu Q H_2O$ . После - задавали режим в компьютерной программе для пиросеквенирования. В каждую пробирку с пробой добавляли по 50 мкл раствора стрептавидин-сефарозы, предварительно взболтав его на вортексе. Пробы ставили в шейкер на 5 мин. В это время в каждую лунку плашки для пиросеквенирования добавляли по 39 мкл 1Х АВ и по 3 мкл соответствующего исследуемой мутации праймера с концентрацией 2 оптические единицы и ставили подготовленную плашку для пиросеквенирования в полозья на вакуумной станции пробоподготовки. В станцию пробоподготовки устанавливали ванночки в соответствующие ниши, во все ванночки разливали следующие реактивы: Washing buffer (WB), 0,2 М NaOH, спирт ректифицированный 70%,  $\mu Q H_2O$ . Насадку с фильтрами помещали в ванночку с  $\mu Q H_2O$  и включали вакуум на станции пробоподготовки. Через 20 сек. вынимали насадку из ванночки и просушивали ее в вертикальном положении в течение 10 сек. Далее насадку с фильтрами помещали в плашку с пробами на 30 сек., доставали и последовательно опускали в плашки с реактивами:

спирт ректифицированный 70% (на 5 сек.), 0,2М NaOH (на 5 сек.), Washing buffer (WB) (на 10 сек),  $\mu\text{Q H}_2\text{O}$  (на 5 сек.). Далее насадку с фильтрами поднимали и держали в вертикальном положении 10 сек. После этой процедуры располагали насадку с фильтрами над плашкой для пиросеквенирования (не касаясь раствора праймеров фильтрами насадки), выключали вакуум и только после этого опускали фильтры насадки в плашку. Через 2 мин. убрали насадку с фильтрами из плашки для пиросеквенирования. Плашку ставили на термостат на  $80^\circ\text{C}$  на 2 мин. Перед тем, как поместить плашку в секвенатор, давали ей остыть. Во время остывания плашки разводили реактивы E (фермент) и S (субстрат) с помощью  $\mu\text{Q H}_2\text{O}$ , разливали E, S, и отдельные dNTP в кювету, согласно инструкции, в количестве, указанном при задании режима для секвенирования. После этого кювету с реактивами и пробы ставили в секвенатор и запускали программу.

Последовательности праймеров для пиросеквенса приведены в таблице 20.

Визуализация результатов осуществлялась с помощью программы, прилагающейся при установке пиросеквенатора.

### **2.3.7.3. Используемое оборудование**

- Пиросеквенатор «PSQ96MA»
- Термостат «НК-120»
- Микроцентрифуга «ЦиклоТемп-901»
- Шейкер «ST-3»
- Вакуумная станция пробоподготовки «Biotage»

**Таблица 20. Праймеры для пиросиквенса [96, 454]**

<b>№ п/п</b>	<b>Мутация</b>	<b>Праймер для сиквенса</b>
1	652delG	CCCATAAACAAATA (639 - 651)
2	652insG	CCCATAAACAAATA (639 - 651)
3	T716G	GCATCCCCGTTCC (702 -714)
4	A750G	TCACCACGATCAAAA (734 - 748)
5	961insC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 - 956)
6	961delC	AAAGAGTGTTTTAGATCA (939 - 956)
7	A1555G	ACGCATTTATATAGAGGA (1537- 1554)
8	C3256T	AAGAAGAGGAATTGA (3300 - 3286)
9	T3258C	
10	T3271C	
11	A3280G	
12	C3285T	
13	G3316A	GGAGTAGGAGGTTGG (3331 - 3317)
14	T3336C	TGCGATTAGAATGGGTAC (3354 - 3337)
15	5132insAA	TCGTGGTGCTGGAG (5148 - 5135)
16	C5178A	ATTAAGGGTGTTAGTCATGT (5200 - 5181)
17	G5540A	TAAATACAGACCAAGA (5524 - 5539)
18	T5692C	ACCCACAAACACTTA (5676 -5690)
19	T5814C	TTGCAATTCAATATGAAAA (5795 - 5813)
20	C6489A	AATCACAGCAGTCCTACT (6470 - 6487)
21	T8362G	TTTAGTTGGGGCATTT (8379 – 8364)

22	G8363A	
23	T8993G	CATTCAACCAATAGCC (8976 - 8991)
24	T8993C	
25	G9379A	TCTCGTGTTACATCGC (9397 - 9382)
26	9480del15	TGGTAAAAGGCTCAGAA (9514 - 9498)
27	9537insC	CCAGTGCCCTCCTAAT (9554 – 9539)
28	G12315A	TTTGGAGTTGCAC (12328 – 12316)
29	G13513A	AGGTTTCTACTCCAA (13497 - 13511)
30	G14459A	GATACTCCTCAATAGCCA (14439 - 14456)
31	C14482G	ATATCCAAAGACAAC (14467 - 14481)
32	C14482A	
33	T14484C	
34	T14487C	
35	T14709C	ATACAACGATGGTTTTTC (14727-14710)
36	G14846A	GCGCCAAGGAGTGA (14861- 14848)
37	G15059A	TTTCTGAGTAGAGAAATGAT (15080-15061)
38	G15084A	GGATAATGCCGATGTT (15101- 15086)
39	C15452A	ATGTCATTAAGGAGAGAA (15470 – 15453)
40	del 15498 to 15521	GTGTTTAAGGGTTGG (15537 - 15522)



41	G15723A	CACTAAGCCAATCACTTT (15701 - 15719)
42	G15762A	TCATTCTAACCTGAATCG (15744 – 15761)

### **2.3.8. Трансмиссионная электронная микроскопия**

Из нормальных участков интимы и из атеросклеротических бляшек вырезали по 4-5 1 мм<sup>3</sup> кусочков ткани, которые фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде, на какодилатном буфере (PH 7,2) (или в фиксаторе Карновского). Затем тканевые образцы постфиксировали в 1% OsO<sub>4</sub> на том же буфере, проводили через спирты возрастающей концентрации, окись пропилена (или ацетон) и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-III и Leica SM2400, используя либо свежеприготовленные стеклянные, либо алмазные ножи. Ультратонкие срезы обрабатывали цитратом свинца и уранилацетатом, а затем изучали с помощью электронного микроскопа Hitachi H7000.

### **2.3.9. Статистическая обработка данных**

Статистическую оценку результатов проводили с использованием пакета IBM SPSS Statistics версии 21.0 (SPSS Inc., США) [285]. Данная обработка проведена с использованием U-теста для независимых выборок по Манну-Уитни и H-теста по Краскеллу-Уоллису, Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза. Межквартильные границы в распределениях процента

гетероплазмии по отдельным мутациям определяли с помощью анализа частот. Для определения коэффициента корреляции Спирмена проводили анализ таблиц сопряженности. Для интерпретации направления связи между стадией атеросклеротического поражения и процентом гетероплазмии использовали метод линейной регрессии и дисперсионный анализ. Для оценки степени ассоциации атеросклеротических поражений со значением процента гетероплазмии по ряду мутаций использовали факториальную регрессию. При распределении признака, отличавшегося от нормального, для статистической оценки значимости различий использовались методы непараметрической статистики (знаково-ранговые тесты по Уилкоксоу и Манну-Уитни), а также бутстрэп-анализ. Достоверными (статистически значимыми) считались различия средних значений показателей при 95% вероятности безошибочного прогноза. В конце исследования производился подсчет его статистической мощности.

## Глава 3. Результаты

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

В подавляющем большинстве клеток нормальной интимы, кристы митохондрий в основном были хорошо различимы и окружающие мембраны не имели каких-либо структурных дефектов (рисунок 17а). Напротив, анализ митохондрий в клетках, присутствующих в атеросклеротических поражениях, выявил присутствие структурных альтераций структуры митохондрий (рисунок 17б-17е). Хотя в некоторых митохондриях, кристы были различимы и окружающие мембраны были без изменений (рисунок 17б), другие митохондрии характеризовались нарушением структуры крист (рисунок 17б-17е). В митохондриях с нарушенной структурой крист отмечалось формирование вакуолеподобных структур в матриксе митохондрий (рисунок 17б-17е). В зонах митохондрий, где отмечалось образование вакуолеподобных структур, наблюдался также отек матрикса, выражающийся в локальной потере матриксом электронной плотности (рисунок 17б-17е). В некоторых интимальных клетках, присутствующих в атеросклеротических бляшках, отмечалось также формирование "миелиноподобных" структур в отечном матриксе митохондрий (рисунок 18а-18г). 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

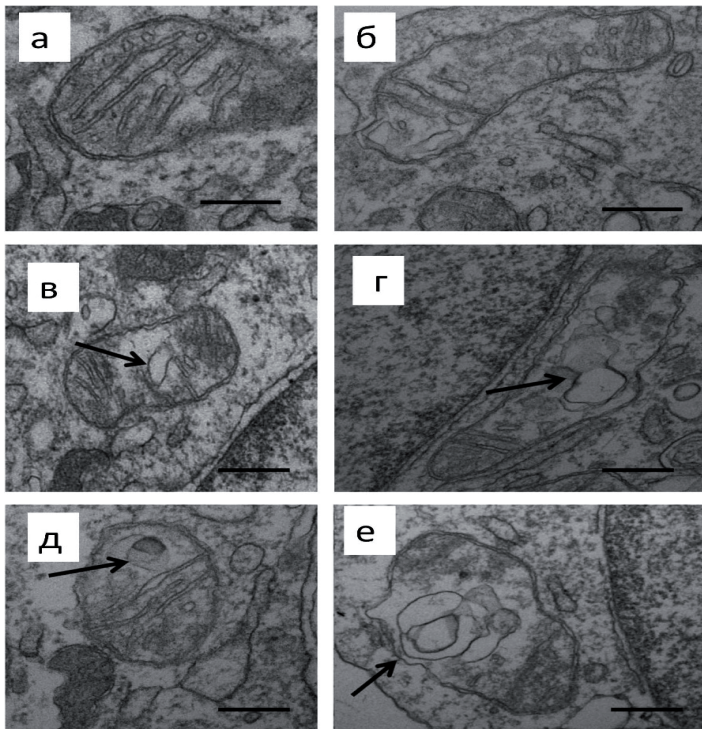
интимы, варьировало от 0,4% до 3,5%, количество митохондрий со структурными повреждениями в атеросклеротических бляшках варьировало от 5,8% до 23,6%.

Хотя классические электронно-микроскопические исследования содержат описания изменения структуры артериальных клеток в атерогенезе [1-3], ультраструктурные исследования, посвященные изучению морфологических изменений митохондрий при атеросклерозе, отсутствуют. Данные настоящего исследования позволили показать, что имеет место большое разнообразие структурных изменений митохондрий в атеросклеротических бляшках.

Наличие структурных изменений в митохондриях в клетках, присутствующих в атеросклеротических поражениях, позволяет предполагать, что в митохондриях могут иметься также нарушения на биохимическом и генетическом уровне. Последующие разделы настоящей работы посвящены анализу генетических характеристик митохондрий в атеросклерозе.

### **3.2. Разработка метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома**

В целях определения критического уровня гетероплазии митохондриальных мутаций, ассоциированного с возникновением и развитием патологий в организме человека, автором с сотрудниками был разработан новый оригинальный метод количественной оценки митохондриального генома, основанный на пиросеквенировании коротких фрагментов ДНК сотрудниками [82, 88, 96, 97, 104, 105, 453-455].



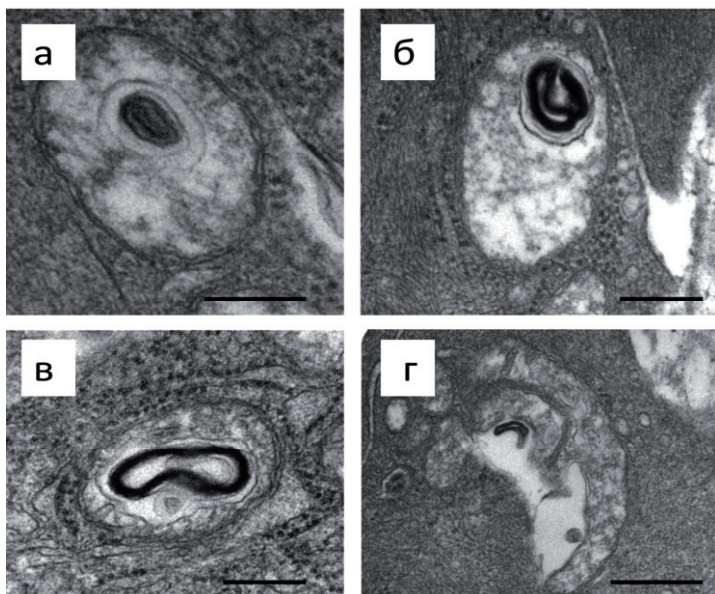
**Рисунок 17. Ультраструктура митохондрий в интимае аорты**

(а): типичный вид митохондрии в нормальной интимае 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



**Рисунок 18.** Миелиноподобные структуры в отечных митохондриях, наблюдаемые в клетках атеросклеротических бляшек (а-г). Электронная микроскопия. Линейка = 200 нм

Технология пиросеквенирования основана на измерении вспышки, возникающей при взаимодействии АТФ, образующейся из пирофосфата с помощью сульфаразы, с люциферинном. Данная реакция катализируется люциферазой. Пирофосфат (давший название всему методу пиросиквенса), в свою очередь, выделяется при взаимодействии нуклеотида, комплементарного нуклеотиду исследуемого биотинилированного одноцепочечного участка, с сиквенсовым праймером или очередным соседним нуклеотидом, которые уже встроены в комплементарную цепь. Если же добавляемый в реакцию нуклеотид не комплементарен изучаемому участку

ДНК, то выделения пирофосфата, а, следовательно, и вспышки, не происходит. Интенсивность вспышки кратна количеству встроившихся нуклеотидов в комплементарной цепи.

В настоящее время описаны различные методы количественной оценки уровня гетероплазии, например, с помощью технологии ПЦР в режиме реального времени (методов инвазивного расщепления олигонуклеотидного зонда (Invader) и RT PAGA-кПЦР), методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), анализа гетеродуплексов, анализа гетероплазии с использованием Surveyor nuclease, секвенирования по Сенгеру, SNaPshot, HRM, TGGE, секвенирования нового поколения на оборудовании 454/Roche, Applied Biosystems SOLiD, серии приборов Illumina [130, 134, 154, 177, 189, 204, 211, 243, 265, 272, 279, 335, 347, 351, 354, 362, 363, 398, 400, 401, 409, 428, 478, 487, 496, 507, 522]. Однако эти методы имеют довольно существенный недостаток – значительно меньшую точность (чувствительность и специфичность). Кроме того, пиросеквенирование обеспечивает возможность анализа области исследуемой мутации на очень короткой последовательности нуклеотидов – 5-10 п.н., что значительно увеличивает точность определения процента гетероплазии мутантного аллеля.

Метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанный и апробированный автором с сотрудниками, основан на анализе высоты пиков пирограммы в исследуемой области одноцепочечного ПЦР-фрагмента [82, 88, 96, 97, 104, 105, 453-455]. Наша задача заключалась в оценке процента гетероплазии по исследуемой мутации. Пирограмма для митохондриальных генов отличается от таковой для ядерных, так как для последних существует

четкое разделение на гомо- и гетерозигот, что делает высоту пиков на пирограмме фиксированной (0% - индивид гомозиготен, оба аллеля не несут мутации, 50% - гетерозигота, и 100% - пациент гомозиготен, оба аллеля мутантны). Для мутаций же митохондриального генома, проанализировав отличия в последовательности и размере пиков для гомозигот, имеющих 100% нормальных и 100% мутантных аллелей, мы можем определить процент гетероплазии в образце ДНК для каждой конкретной мутации.

Вначале для каждой из исследованных мутаций был разработан способ определения уровня гетероплазии в ПЦР-фрагменте ДНК индивида.

### **3.2.1. Способы определения процента гетероплазии**

можно разделить на несколько типов:

#### **I тип**

##### **Делеция одной пары оснований**

В исследуемом одноцепочечном фрагменте ДНК исчезает один нуклеотид. Таким образом, в случае 100% нормальных молекул ДНК мы видим исследуемый пик равным “n” единиц, а в случае 100% мутантных молекул ДНК мы видим исследуемый пик равным “n-1” единиц. В качестве контроля используется ряд контрольных негетероплазмичных пиков из того же участка ДНК, до или после полиморфного фрагмента. Следует отметить, что, если среди контрольных пиков нет пика, одноименного исследуемому, выбираем для сравнения пуриновый или пиримидиновый контрольный пик, в зависимости от того, каким является пик исследуемый.



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

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

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

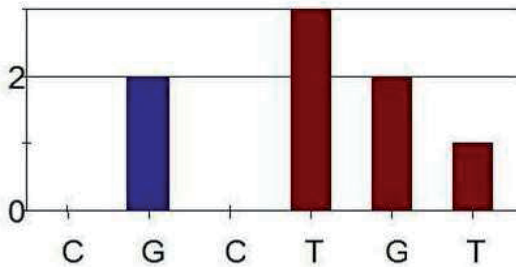
Таким образом, данный образец ДНК имеет 28% гетероплазии по 652delG.

## II тип

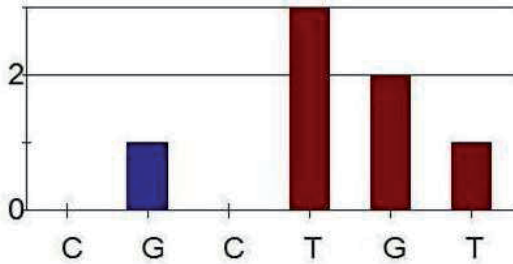
### Делеция двух пар нуклеотидов

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

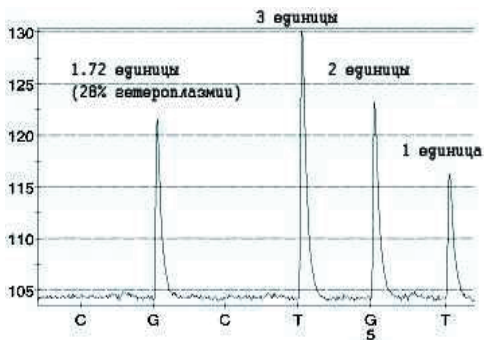
#### а) Гомоплазмия по отсутствию делеции G



#### б) Гомоплазмия по наличию делеции G



#### в)



### **Рисунок 19. Детекция мутации 652delG ([G]GTTTGGT)**

а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по отсутствию делеции G в позиции 652 в митохондриальном геноме;

б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по наличию делеции G в позиции 652 в митохондриальном геноме;

в) практическая пиелограмма исследуемого образца ДНК (гетероплазия по 652delG в исследуемом образце составляет 28%).

### **III тип**

#### **Инсерция одной пары нуклеотидов**

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

Для примера продемонстрируем, как подсчитывается процент гетероплазии при мутации 9537insC. Так как используется реверс-праймер, то анализируем insG. В случае 100% нормальных аллелей величина пика G составляет 6 единиц, а в случае 100% аллелей со вставкой - 7 единиц. В качестве контроля берем пик G, равный 4 ед. Затем процент гетероплазии по данному типу мутаций также вычисляется согласно формуле №1:  $r = \frac{u \times 100\%}{1}$ , где «r» – процент гетероплазии по мутации; однако, в этом случае, «u» – разница между количеством единиц исследуемого и нормального пика.

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

Подсчитаем процент гетероплазии по 9537insC:  
 $0,52 \times 100\% / 1 = 52\%$

Процент гетероплазии по 9537insC равен 52.

#### **IV тип**

##### **Точечные замены одной пары нуклеотидов**

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

##### **1 вариант**

При этом варианте мы изучаем два пика нуклеотидов - нормальный и мутантный. В этом случае мы не берем пиков для контроля, а определяем, сколько единиц составляет сумма двух пиков. Затем суммируем данные по обоим пикам; вычисляем, сколько единиц от суммы составляет мутантный пик и на сколько единиц он больше (или меньше) нормы. После этого подсчитываем процент гетероплазии по формуле №1.

Рассмотрим его на примере мутации С3256Т (т.к. используется реверс-праймер, то исследуется замена G→A). При 100% митохондриальных геномов с нуклеотидом G в

позиции 3256 - 0 ед. А и 1 ед. G (рисунок 20а); при 100% геномов с нуклеотидом А в позиции 3256 – 0 ед. G и 1 ед. А (рисунок 20б). Мы принимаем сумму за 1 единицу, а затем подсчитываем процент гетероплазии.

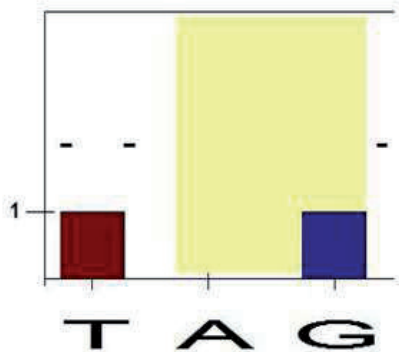
Например, при анализе образца ДНК из сосудистой ткани 29-летнего мужчины размер пика А был равен 0,84; а размер пика G - 3,05 (рисунок 20в). Сумма пиков - 3,89. Принимая во внимание, что 3,89 - это 1 ед., то мутантный пик А составляет 0,22 ед. Рассчитываем процент гетероплазии по С3256Т:  $0,22 \times 100\% / 1 = 22\%$ .

## **2 вариант**

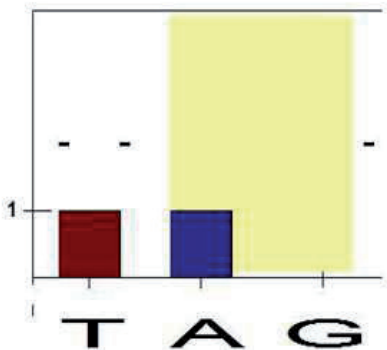
При данной однонуклеотидной замене анализируемая последовательность состоит не из двух, а из нескольких пиков нуклеотидов. В таком случае подсчитываем общее количество единиц данных пиков, суммируем данные по пикам для исследуемого образца ДНК, находим, какое количество единиц составляет пик мутантного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

В качестве примера рассмотрим мутацию G13513A. При 100% нормальных геномов с нуклеотидом G в позиции 13513 - 1 ед. А (пик №2), 1 ед. G (пик №3), 1 ед. А (пик №4) (рисунок 21а); при 100% мутантных геномов с нуклеотидом А в позиции 13513 - 3 ед. А, 0 ед. G, 0 ед. А (рисунок 21б). Как видно из гистограммы, процент гетероплазии необходимо анализировать по пику А (№2), т.к. именно в этой позиции происходит замена.

а) Гомоплазмия по G



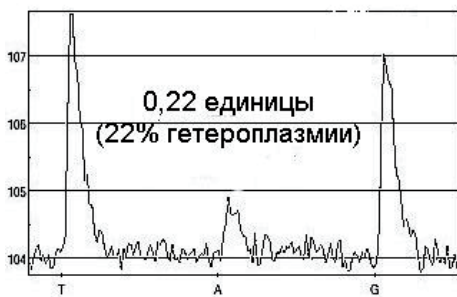
б) Гомоплазмия по A



в)

1 единица

0,78 единиц



**Рисунок 20. Детекция мутации С3256Т (при использовании обратного праймера для сиквенса - GT→AT)**

- а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по отсутствию замены 3256 G→A в митохондриальном геноме;
- б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазии по наличию замены 3256 G→A в митохондриальном геноме;
- в) практическая пираграмма исследуемого образца ДНК (уровень гетероплазии по мутации С3256Т составляет 22%).

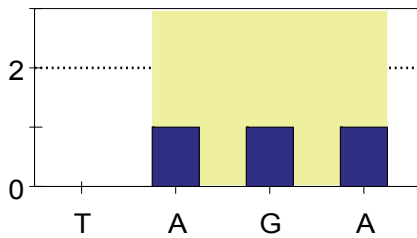
Суммируем данные по трем пикам, принимаем сумму за 3 единицы, после чего рассчитываем, сколько единиц составляет мутантный пик А (№2). Зная, на сколько единиц этот пик больше пика, характерного для 100% нормальных аллелей, мы можем рассчитать процент гетероплазии для данной мутации по формуле №2:  $p = ux100\%/2$ , где «р» – процент гетероплазии по мутации; «у» – разница между количеством единиц исследуемого и нормального пика.

Например, при исследовании образца ДНК из сосудистой ткани 43 – летнего мужчины, пик А (пик №2) составил 10,76; пик Г ( пик №3) – 4,64; пик А (пик №4) – 5,18 (рисунок 21в). Сумма пиков – 20,58. Принимая во внимание, что сумма равна 3 ед., размер мутантного пика С составляет 1,6 ед., т.е. на 0,6 ед. больше нормы.

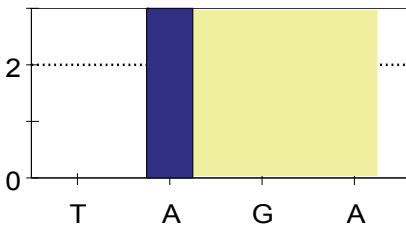
Подсчитываем процент гетероплазии:  $0,6 \times 100\% / 2 = 30\%$

Таким образом, гетероплазия по мутации G13513A составляет 30%.

**а) гомоплазмия по G (100% нормальных геномов)**



**б) гомоплазмия по A (100% мутантных геномов)**



**в) гетероплазмия по A**



**Рисунок 21. Детекция мутации G13513A**

*а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю 13513G в митохондриальном геноме;*

*б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по мутантному аллелю 13513A в митохондриальном геноме;*



*в) практическая пирограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации G13513A составляет 30%).*

## **V тип**

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

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

Рассмотрим пример определения процента гетероплазмии для мутации C14482G/A. В одной и той же анализируемой области пирограммы можно определить гетероплазмю по мутациям C14482G и C14482A. При 100%

нормальных аллелей (С/С) пик С будет составлять 2 ед., пик G - 0 ед., пик А - 1 ед. При 100% замене С→G пик С будет равен 1 ед., G - 1 ед., А - 1 ед. При 100% аллелей с нуклеотидом А в позиции 14482 пик С будет равен 1 ед., пик G - 0 ед., пик А - 2 ед. Таким образом, при каждой из замен пик исследуемого нуклеотида увеличивается на 1 единицу. Мы суммируем данные по всем трем пикам, принимаем их равными 3 единицам и определяем, какое количество единиц составляет пик нуклеотида исследуемого варианта замены и на сколько единиц он больше нормы. Затем считаем процент гетероплазии.

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

а) для *исследуемого пика А*:  $0,47 \times 100\% / 1 = 47\%$ ;

б) для *исследуемого пика G*:  $0,05 \times 100\% / 1 = 5\%$ .

Таким образом, гетероплазия по мутации С14482А в исследуемом образце ДНК оказалась равной 47%, а по мутации С14482G - 5%.

## **VI тип**

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

Анализ таких мутаций похож на анализ двух вариантов замен в одной и той же позиции хромосомы (мутаций V типа). В качестве примера приведем анализ мутаций T8362G и G8363A. Так как используется обратный праймер, то на самом деле будет проводиться анализ процента гетероплазии мутаций A8362C и C8363T, причем в обратном порядке.

В случае 100% нормальных аллелей (C/C, A/A) пики нуклеотидов будут следующих размеров: 0 ед. T (пик №2), 1 ед. C (№3), 1 ед. A (№4), 1 ед. C (№5). При 100% аллелей с заменой C8363T (T/T, A/A) размеры пиков будут составлять: 1 ед. T, 0 ед. C, 1 ед. A, 1 ед. C. При 100% аллелей с мутацией A8362C (C/C, C/C) размеры пиков будут составлять: 0 ед. T, 3 ед. C, 0 ед. A, 0 ед. C. Следует подчеркнуть, что при 100% замене C→T, по сравнению с нормой, на 1 ед. увеличивается пик T; а при 100% замене A→C – на 2 ед. увеличивается пик C. Сумма пиков составляет 3 ед. Мы подсчитываем размер исследуемых пиков в единицах, выясняем, на сколько единиц они отличаются от размера этих пиков при 100% нормальных аллелей (обозначим это значение через "y"), а затем подсчитываем процент гетероплазии по каждой из мутаций:

- а) для C8363T (расчет производится по формуле №1);
- б) для A8362C.

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

оценку гетероплазмы по пику А (по формуле №1), после чего вычтешь данное значение из 100% . Полученная цифра (z%) и будет процентом гетероплазмы по А8362С. Расчет производится по формуле №3:  $z=100\%-y \times 100\%/1$ , где «z» – процент гетероплазмы по мутации А→С; «у» – разница между количеством единиц исследуемого и нормального пика А.

### **3.2.2. Общая формула для подсчета процента гетероплазмы мутаций митохондриального генома**

#### **3.2.2.1. Общая формула**

После анализа всех разработанных формул была создана общая формула для подсчета процента гетероплазмы любых мутаций митохондриального генома (формула № 4):

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

где P – процент гетероплазмы;

h –высота пика исследуемого нуклеотида;

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

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

#### **3.2.2.2. Пример расчета процента гетероплазмы мутации A1555G митохондриального генома по общей формуле (рисунок 22)**

Мутацию A1555G можно определить по пикам нуклеотидов G и A, располагающимися в анализируемой последовательности под номерами 2 и 3, соответственно. По данным компьютерной программы, при 100% нормальных геномов (G/G) пики G2 и A3 составляют по 1 единице (рисунок 22а), а при 100% геномов с мутацией (A/A) пик A3 составляет 2 единицы, а пик G2 – 0 единиц (рисунок 22б).

Таким образом, сумма величин пиков G2 и A3 составляет 2 единицы. Величина исследуемого пика A3 в образце ДНК оказалась равной 1,27; а пика G2 – 3,43. Рассчитываем величину пика, соответствующую одной единице. Она равна 2,35. Подставляем значения в формулу №4:

$$P = \frac{1,27 - 2,35}{3,43 - 2,35} \cdot 100 \% = 27 \%$$

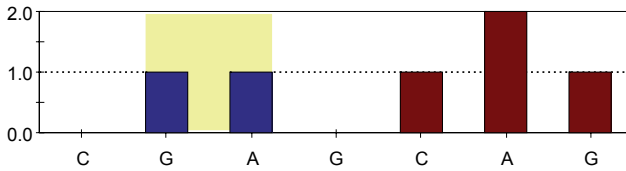
Таким образом, процент гетероплазии по мутации A1555G в образце ДНК, взятом из интимы аорты 70-летней женщины, оказался равен 27% (рисунок 22в).

### **3.2.3. Примеры гистограмм исследованных мутаций и уровня гетероплазии, определенного по пиорограммам ПЦР-фрагментов образцов ДНК**

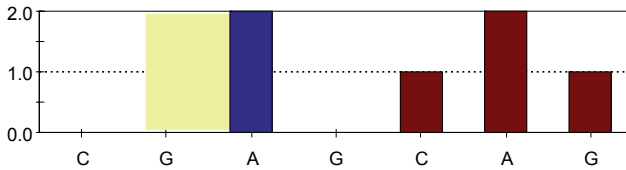
#### **3.2.3.1. Для мутации T3336C**

Для данной однонуклеотидной замены используется обратный праймер для сиквенса, поэтому анализируется замена A на G (рисунок 23).

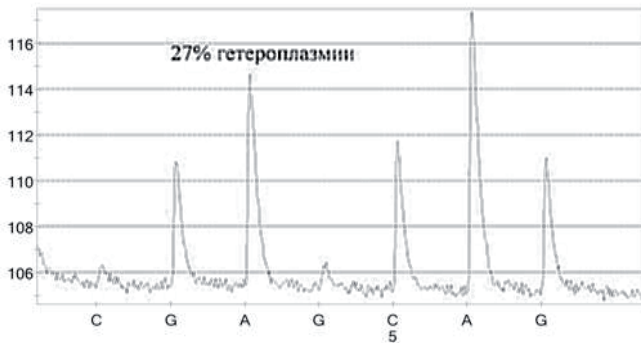
**а) Гомоплазмия по G (100% нормальных геномов)**



**б) Гомоплазмия по A (100% мутантных геномов)**



**в) Гетероплазмия по A**



**Рисунок 22. Детекция мутации A1555G**

а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю 1555G в митохондриальном геноме;

б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по мутантному аллелю 1555A в митохондриальном геноме;

в) *практическая пирограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации A1555G составляет 27%).*

### **3.2.3.2. Для мутации C5178A**

Для C5178A также используется обратный праймер для сиквенса, поэтому анализируется замена G на T (рисунок 24).

### **3.2.3.3. Для G15059A**

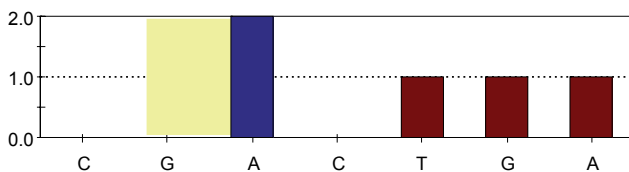
При исследовании данной мутации используется обратный праймер для сиквенса, поэтому анализируется замена C на T (рисунок 25).

### **3.2.4. Оценка воспроизводимости метода измерения степени гетероплазмии**

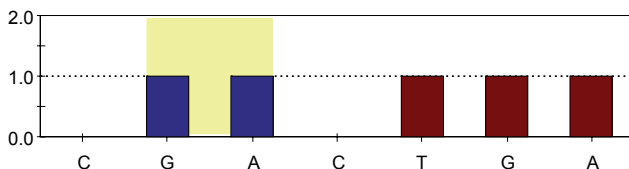
Для определения воспроизводимости метода был применен подход, использующий три последовательные независимые измерения степени гетероплазмии в одном и том же образце [454]. Воспроизводимость оценивали по коэффициенту вариации (отношению стандартного отклонения к средней величине, выраженному в процентах). Результаты измерений представлены в таблице 21.

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

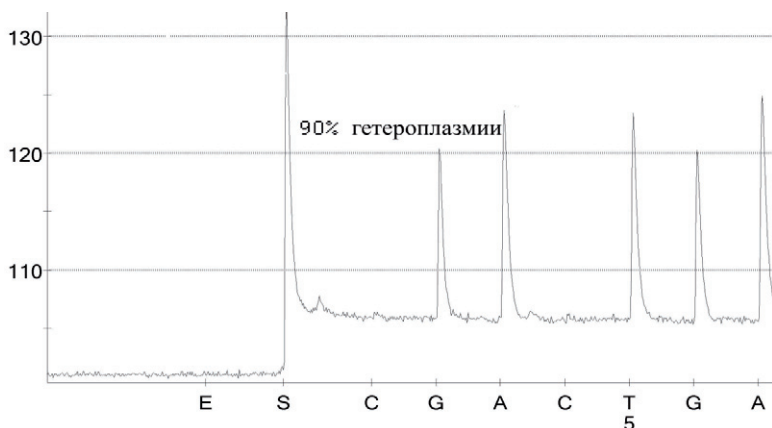
**а) Гомоплазмия по А (100% нормальных геномов)**



**б) Гомоплазмия по G (100% мутантных геномов)**



**в) Гетероплазмия по G**



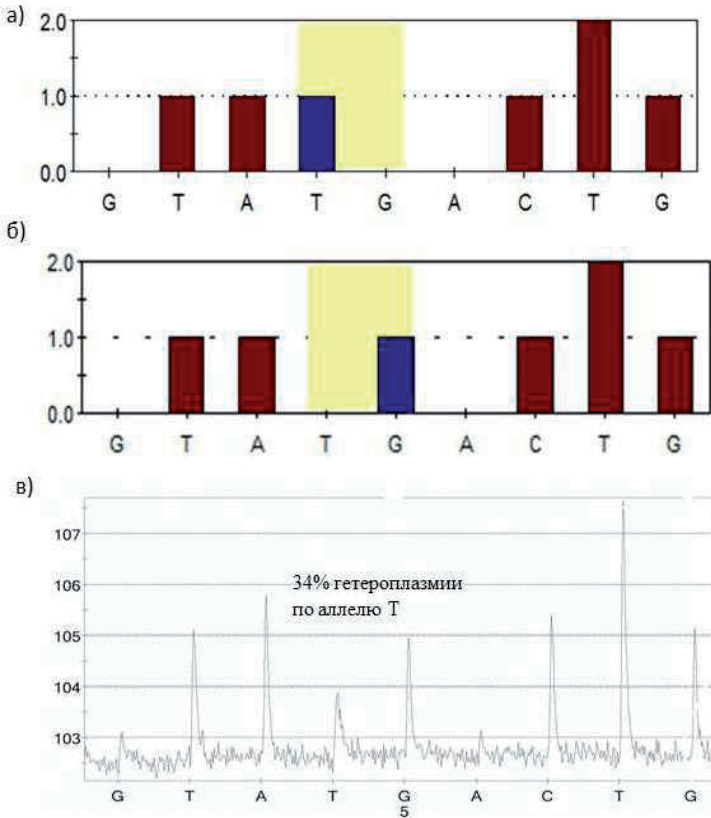
**Рисунок 23. Детекция мутации T3336C (при использовании обратного праймера для сиквенса - A→G).**

а) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по нормальному аллелю 3336A в митохондриальном геноме;

б) теоретическая высота пиков нуклеотидов при гомоплазмии по мутантному аллелю 3336G в митохондриальном геноме;



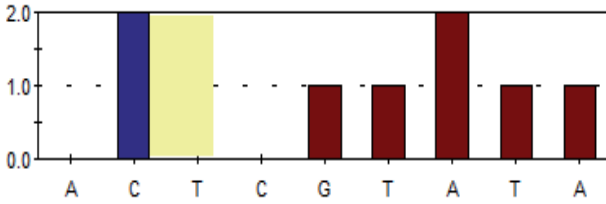
в) практическая пирограмма исследуемого образца ДНК из участка сосудистой стенки (гетероплазмия по мутации A3336G составляет 90%).



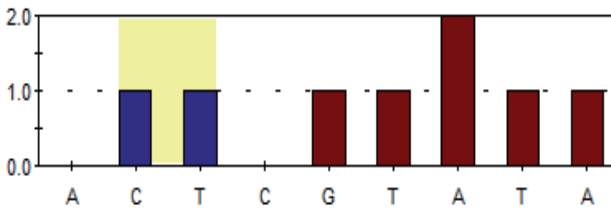
**Рисунок 24. Анализ уровня гетероплазмии мутации C5178A (G→T при использовании обратного праймера для сиквенса)**

- а) Гомоплазмия по мутантному аллелю T;
- б) Гомоплазмия по нормальному аллелю G;
- в) 32% гетероплазмия по мутантному аллелю T.

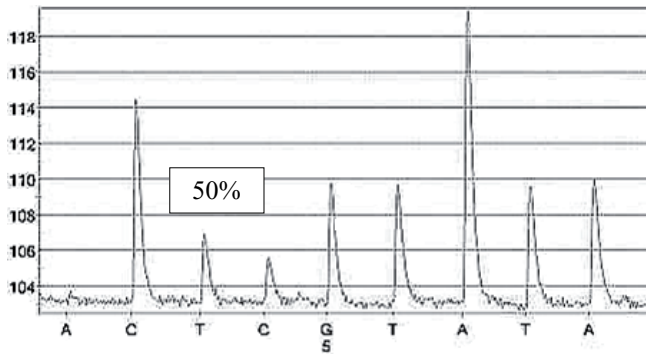
а) Гомоплазмия по С (100% нормальных геномов)



б) Гомоплазмия по Т (100% мутантных геномов)



в) Гетероплазмия по Т



**Рисунок 25. Анализ уровня гетероплазмии мутации G15059A (C→T при использовании обратного праймера для сиквенса)**

а) Гомоплазмия по нормальному аллелю С;

б) Гомоплазмия по мутантному аллелю Т;

в) 50% гетероплазмия по мутантному аллелю Т.

Таким образом, показатели чувствительности и специфичности метода, составили 88,2% и 77,1%, соответственно ( $p \leq 0,05$ ). Воспроизводимость метода измерения степени гетероплазии составила 11,4%.

**Таблица 21. Результаты экспериментов по оценке воспроизводимости измерений степени гетероплазии митохондриального генома**

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

23	52	63	57	57.3	5.5	9.6
24	16	16	16	16.0	0.0	0.0
25	15	17	19	17.0	2.0	11.8
26	14	13	17	14.7	2.1	14.2
27	11	12	14	12.3	1.5	12.4
28	12	9	14	11.7	2.5	21.6
29	12	15	18	15.0	3.0	20.0
30	12	12	12	12.0	0.0	0.0
31	10	17	16	14.3	3.8	26.4
32	18	19	24	20.3	3.2	15.8
33	11	11	13	11.7	1.2	9.9
34	14	11	12	12.3	1.5	12.4
35	7	6	7	6.7	0.6	8.7
36	7	9	7	7.7	1.2	15.1
37	8	5	7	6.7	1.5	22.9
38	9	12	10	10.3	1.5	14.8
39	9	8	8	8.3	0.6	6.9
40	8	8	8	8.0	0.0	0.0
41	8	12	11	10.3	2.1	20.1
42	23	21	21	21.7	1.2	5.3
43	13	14	13	13.3	0.6	4.3
44	22	17	21	20.0	2.6	13.2
45	25	23	23	23.7	1.2	4.9
46	19	16	17	17.3	1.5	8.8

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

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

#### **3.3.1. Цель исследования интимы аорт индивидов**

Как известно, атеросклеротические поражения интимы аорт локальны, а скорее фокальны, так как занимают ограниченное пространство площади сосудистой стенки. Одним из возможных объяснений данного факта является воздействие гемодинамического стресса. Однако гемодинамический стресс не может объяснить сосуществования непораженных и атеросклеротических участков в пределах люминальной поверхности артерий, подверженной приблизительно одинаковой силе стрессового воздействия. Традиционные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний действуют системно, а, следовательно, также не могут объяснить фокальность атеросклеротического поражения. В последнее время все чаще высказывается предположение, что одним из возможных объяснений данного явления могут быть генетические факторы.

Согласно моноклональной гипотезе возникновения атеросклероза, атеросклеротическая бляшка может быть результатом многократного патологического деления одной гладкомышечной клетки сосудистой стенки, так как популяции гладкомышечных клеток в артериях в нормальных физиологических условиях поддерживаются за счет пролиферативной активности относительно небольшого числа клеток. При этом интенсивность возникновения спонтанных мутаций в ядерном геноме недостаточно высока, чтобы объяснить возникновение и развитие атеросклеротических поражений. Однако в митохондриальном геноме, уровень мутабельности которого во много раз выше, вероятность многократного мутирования в клетках интимы, обладающих пролиферативной активностью, вполне достаточна для объяснения фокальности атеросклеротических поражений.

Кроме того, мутантные митохондриальные хромосомы, унаследованные в небольшом количестве от матери, могут избирательно накапливаться в зависимости от условий, в которых находится клетка. При митозе, в результате случайного неравномерного распределения митохондриальных геномов, они могут попасть преимущественно в одну из дочерних клеток.

В результате накопления мутантных геномов в клетках возможны отличия уровня гетероплазии между пораженными и нормальными участками интимы аорты. С целью проверки данного предположения был проведен пилотный анализ интимы аорт.

### **3.3.2. Детекция уровня гетероплазии 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 гетероплазии с атеросклерозом.

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 [26, 44, 80, 82-97, 100, 103, 290, 425, 452-459, 479-483].

Следует отметить, что при анализе данных пирогамм по известным мутациям с помощью нашего метода в образцах интимы аорты удалось выявить три новые, ранее не описанные мутации – 652delG, 961delC и 5132insAA [454].

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

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

Результаты представлены в таблицах 22-24 [44, 82-97, 100, 101, 103, 290, 425, 452-459, 479-483]. Мутации, которым присвоен индекс «\_а», означают показатели гетероплазии в участках липофиброзной бляшки; при отсутствии индекса «а» в названии мутации представлены показатели гетероплазии в нормальных (непораженных) участках.

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

**Таблица 22. Показатели уровня гетероплазии по мутациям митохондриального генома в непораженных участках интимы аорты человека и в атеросклеротических липофиброзных бляшках**

Мутация	Среднее	Стандартное отклонение	Процентили (квартили)		
			25%	50% (медиана)	75%
del652G	5,9	10,3	0,0	0,0	9,0

del652G_a	7,6	8,9	0,0	2,0	17,0
ins652G	2,4	4,6	0,0	0,0	5,0
ins652G_a	2,4	4,2	0,0	0,0	8,0
T716G	1,7	2,4	0,0	0,0	3,0
T716G_a	1,3	1,7	0,0	0,0	3,0
A750G	4,6	1,8	3,0	4,0	7,0
A750G_a	6,0	4,5	3,0	5,0	6,0
del961C	0,9	2,3	0,0	0,0	0,0
del961C_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ins961C	16,9	12,7	4,0	23,0	27,0
ins961C_a	22,7	16,6	11,0	23,0	29,0
A1555G	14,6	19,2	0,0	14,0	19,0
A1555G_a	4,7	4,6	0,0	7,0	8,0
C3256T	11,0	8,2	8,0	10,0	13,0
C3256T_a	14,6	11,2	8,0	12,0	22,0
T3258C	6,7	5,6	3,0	5,0	10,0
T3258C_a	7,9	2,7	5,0	8,0	11,0
T3271C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T3271C_a	2,4	6,4	0,0	0,0	0,0
A3280G	1,3	2,4	0,0	0,0	3,0
A3280G_a	1,9	3,5	0,0	0,0	4,0
C3285T	2,7	2,1	0,0	3,0	5,0
C3285T_a	3,4	2,0	2,0	4,0	5,0
G3316A	3,1	3,5	0,0	2,0	7,0
G3316A_a	4,6	2,9	2,0	5,0	6,0
T3336C	9,9	24,8	0,0	0,0	3,0
T3336C_a	4,3	6,4	0,0	0,0	7,0
del5132AA	0,9	1,6	0,0	0,0	2,0
del5132AA_a	3,3	6,0	0,0	0,0	8,0
ins5132AA	5,6	6,5	0,0	3,0	13,0
ins5132AA_a	3,9	5,3	0,0	0,0	9,0
C5178A	12,3	9,5	7,0	10,0	14,0
C5178A_a	9,0	6,7	5,0	7,0	18,0
G5540A	6,7	4,6	3,0	8,0	11,0



G5540A_a	6,3	3,8	4,0	6,0	7,0
T5692C	5,9	4,3	4,0	5,0	8,0
T5692C_a	5,0	2,4	3,0	5,0	5,0
T5814C	2,3	2,5	0,0	2,0	5,0
T5814C_a	3,4	5,0	0,0	0,0	6,0
C6489A	6,4	6,7	3,0	4,0	8,0
C6489A_a	3,1	2,5	2,0	3,0	4,0
T8362G	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T8362G_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G8363A	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G8363A_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T8993C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T8993C_a	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T8993G	44,7	3,6	42,0	46,0	47,0
T8993G_a	43,7	1,6	43,0	44,0	45,0
G9379A	2,3	2,7	0,0	2,0	2,0
G9379A_a	4,7	2,8	3,0	6,0	7,0
del9480_15	3,3	4,5	0,0	0,0	7,0
del9489_15_a	6,3	5,9	3,0	4,0	9,0
del9537C	15,9	24,4	0,0	9,0	22,0
del9537C_a	15,3	13,0	2,0	12,0	27,0
G12351A	3,7	5,0	0,0	0,0	8,0
G12351A_a	14,4	14,7	5,0	6,0	35,0
G13513A	30,7	12,7	20,0	30,0	45,0
G13513A_a	40,0	16,1	25,0	40,0	60,0
G14459A	3,6	3,5	2,0	3,0	4,0
G14459A_a	11,7	18,4	3,0	4,0	10,0
C14482C	47,4	5,1	42,0	49,0	51,0
C14482C_a	46,0	4,8	42,0	48,0	49,0
C14482G	2,3	2,5	0,0	2,0	5,0
C14482G_a	8,4	14,6	0,0	4,0	7,0
T14484C	1,1	2,0	0,0	0,0	4,0
T14484C_a	2,3	3,7	0,0	0,0	4,0
T14487C	4,4	2,2	3,0	4,0	7,0

T14487C_a	5,3	2,4	3,0	5,0	8,0
T14709C	2,4	3,8	0,0	0,0	5,0
T14709C_a	4,1	3,5	2,0	3,0	6,0
G14846A	4,7	3,1	2,0	5,0	8,0
G14846A_a	6,7	4,1	6,0	6,0	8,0
G15059A	14,6	18,7	0,0	0,0	31,0
G15059A_a	38,6	29,1	0,0	41,0	66,0
G15084A	0,4	1,1	0,0	0,0	0,0
G15084A_a	0,3	0,8	0,0	0,0	0,0
C15452A	74,0	33,2	80,0	82,0	90,0
C15452A_a	73,4	34,3	72,0	86,0	98,0
15498del23	2,4	4,6	0,0	0,0	5,0
15498del23_a	2,6	5,0	0,0	0,0	5,0
G15762A	5,0	4,3	0,0	6,0	7,0
G15762A_a	5,3	4,1	3,0	4,0	9,0

Сравнение величины гетероплазии в нормальных и атеросклеротических участках проводили методами непараметрической статистики с использованием рангового теста Уилкоксона (таблица 23).

**Таблица 23. Сравнение уровня гетероплазии 42 мутаций митохондриального генома в липофиброзной бляшке и нормальной интиме по ранговому тесту Уилкоксона**

Мутации	Вид ранга	Количество рангов	Средний ранг	Суммарный ранг
652delG	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		
652insG	Отрицательный	2	2,50	5,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	3		

T716G	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	5		
A750G	Отрицательный	2	4,50	9,00
	Положительный	4	3,00	12,00
	Нейтральный	1		
961insC	Отрицательный	3	2,67	8,00
	Положительный	3	4,33	13,00
	Нейтральный	1		
961delC	Отрицательный	1	1,00	1,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	6		
A1555G	Отрицательный	4	2,50*	10,00*
	Положительный	0	0,00*	0,00*
	Нейтральный	3		
C3256T	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	5	6,00*	42,00*
	Нейтральный	0		
T3258C	Отрицательный	1	6,00	6,00
	Положительный	5	3,00	15,00
	Нейтральный	1		
T3271C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	6		
A3280G	Отрицательный	1	1,50	1,50
	Положительный	2	2,25	4,50
	Нейтральный	4		
C3285T	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		
G3316A	Отрицательный	1	1,50*	1,50*
	Положительный	4	3,38*	13,50*
	Нейтральный	2		
T3336C	Отрицательный	1	2,00*	4,00*

	Положительный	3	4,00*	6,00*
	Нейтральный	3		
5132insAA	Отрицательный	3	3,00	9,00
	Положительный	2	3,00	6,00
	Нейтральный	2		
5132delAA	Отрицательный	2	1,50*	3,00*
	Положительный	2	3,50*	7,00*
	Нейтральный	3		
C5178A	Отрицательный	4	4,00*	11,00*
	Положительный	1	2,75*	4,00*
	Нейтральный	2		
G5540A	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	3	4,00	12,00
	Нейтральный	0		
T5692C	Отрицательный	4	3,00	12,00
	Положительный	2	4,50	9,00
	Нейтральный	1		
T5814C	Отрицательный	2	1,50	3,00
	Положительный	1	3,00	3,00
	Нейтральный	4		
C6489A	Отрицательный	4	3,38*	13,50*
	Положительный	1	1,50*	1,50*
	Нейтральный	2		
T8362G	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
G8363A	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00
	Нейтральный	7		
T8993G	Отрицательный	5	3,40	17,00
	Положительный	2	5,50	11,00
	Нейтральный	0		
T8993C	Отрицательный	0	0,00	0,00
	Положительный	0	0,00	0,00

	Нейтральный	7		
G9379A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	5	4,70*	23,50*
	Нейтральный	0		
9480del15	Отрицательный	3	2,33*	7,00*
	Положительный	3	4,67*	14,00*
	Нейтральный	1		
9537delC	Отрицательный	2	4,00	8,00
	Положительный	4	3,25	13,00
	Нейтральный	1		
G12315A	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	5	4,00*	20,00*
	Нейтральный	1		
G13513A	Отрицательный	1	3,58*	6,50*
	Положительный	6	6,50*	21,50*
	Нейтральный	0		
G14459A	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	3	3,67*	11,00*
	Нейтральный	2		
C14482C	Отрицательный	4	4,00	16,00
	Положительный	2	2,50	5,00
	Нейтральный	1		
C14482G	Отрицательный	1	1,00*	1,00*
	Положительный	3	3,00*	9,00*
	Нейтральный	3		
T14484C	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	2	2,00	4,00
	Нейтральный	4		
T14487C	Отрицательный	2	2,00*	4,00*
	Положительный	4	4,25*	17,00*
	Нейтральный	1		
T14709C	Отрицательный	2	3,25	6,50
	Положительный	4	3,63	14,50
	Нейтральный	1		

G14846A	Отрицательный	2	2,25*	4,50*
	Положительный	4	4,13*	16,50*
	Нейтральный	1		
G15059A	Отрицательный	0	0,00*	0,00*
	Положительный	5	3,00*	15,00*
	Нейтральный	2		
G15084A	Отрицательный	1	2,00	2,00
	Положительный	1	1,00	1,00
	Нейтральный	5		
del14598 to15521	Отрицательный	2	2,25	4,50
	Положительный	2	2,75	5,50
	Нейтральный	3		
C15452C	Отрицательный	2	4,75	9,50
	Положительный	4	2,88	11,50
	Нейтральный	1		
G15762A	Отрицательный	3	2,33	7,00
	Положительный	2	4,00	8,00
	Нейтральный	2		

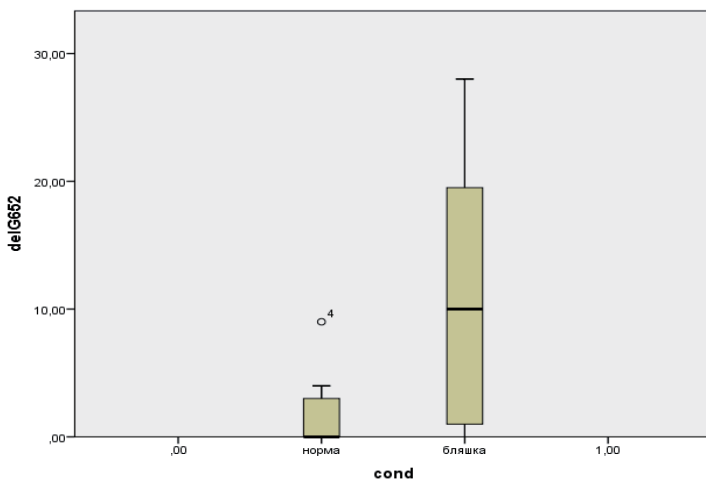
**Примечание:** \* - более, чем двухкратное отличие между положительными и отрицательными значениями рангов.

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

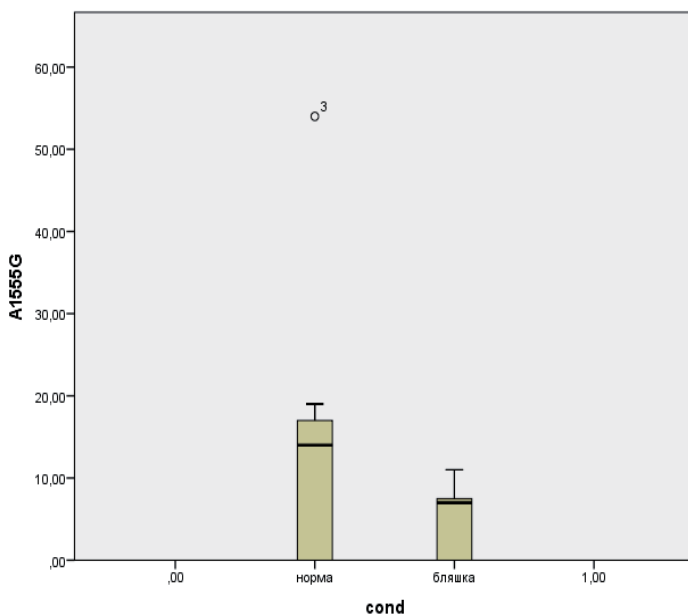
В то же время, корреляционный анализ, проведенный методом бутстрэп, показал, что мутации 652delG, C3256T, G12315A, G14459A и G15059A высокодостоверно ассоциированы с липофиброзной бляшкой аорты ( $p \leq 0,05$ ), а G13513A и G14846A – значимо на уровне  $p \leq 0,1$ . Мутации A1555G и C5178A являются антиатерогенными по отношению к липофиброзной бляшке на уровне значимости  $p \leq 0,05$  (таблица 24). Для ряда значимых мутаций достоверность отличий отобрана на блочных диаграммах (рисунки 26-33).

Помимо формального статистического подхода, был использован подход, использующий в качестве критерия частоту выявления различий между показателями гетероплазии в нормальных и атеросклеротических поражениях в образцах, полученных от одного и того же донора аутопсийного материала.

Обнаружено 11 митохондриальных мутаций, принадлежащих митохондриальным генам: рРНК 12S; тРНК–Leu (кодон узнавания UUR); тРНК–Leu (кодон узнавания CUN); субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH дегидрогеназы; и цитохрома В, 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 25. Как видно из таблицы, по мутациям 652insG и T3336C такие отличия имеются в 29% аорт; по мутациям C3256T, G14459A, G14846A и G15059A – в 43%. Более половины образцов имеют значительные отличия в проценте гетероплазии по мутациям 652delG, A1555G и C5178A – в 57%.

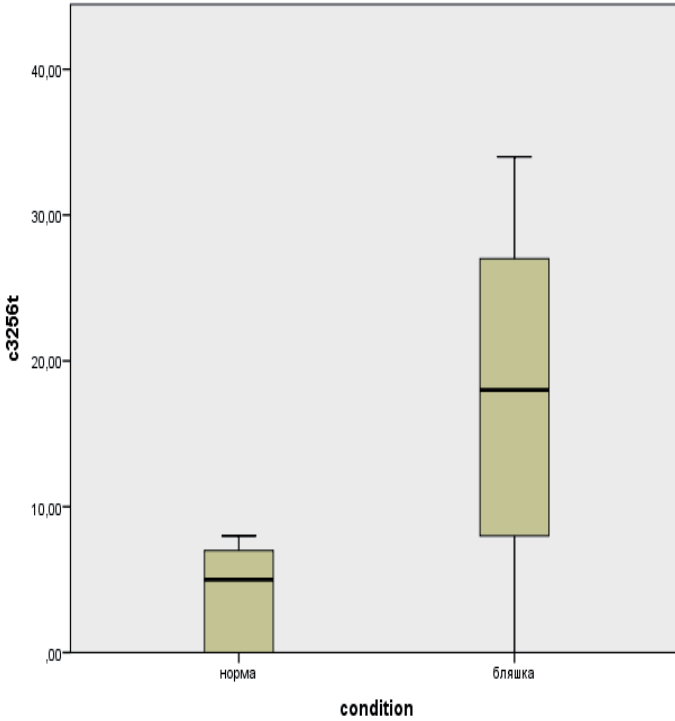


**Рисунок 26. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации 652delG в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**





**Рисунок 27. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации A1555G в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**

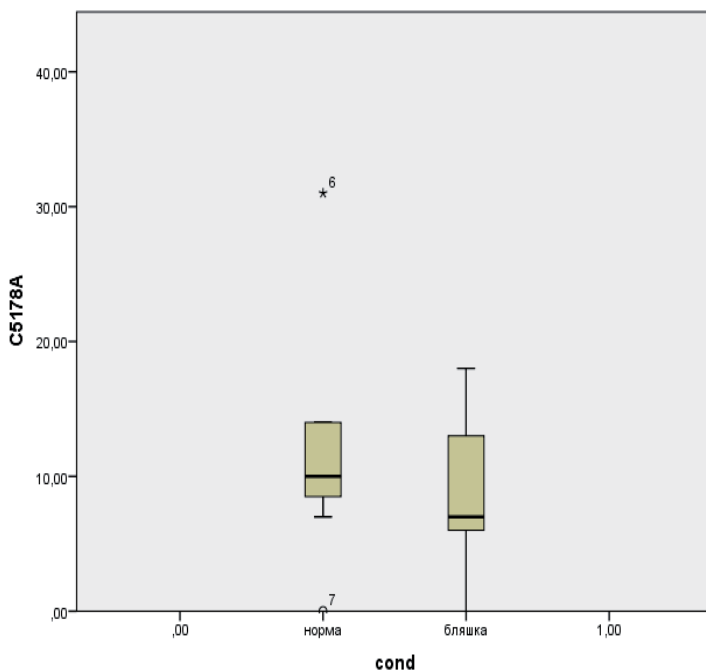


**Рисунок 28. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазмии мутации C3256T в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**

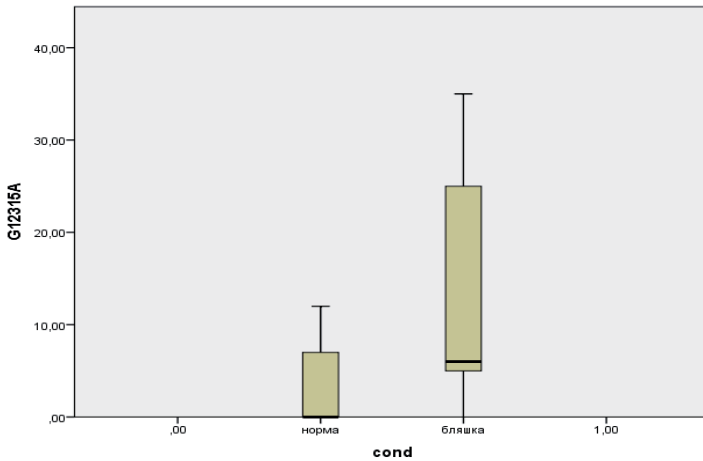
И, наконец, в наибольшем количестве липофиброзных бляшек преобладают, по сравнению с нормальной интимой, мутации G12315A и G13513A – в 71% и 86% (соответственно).

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

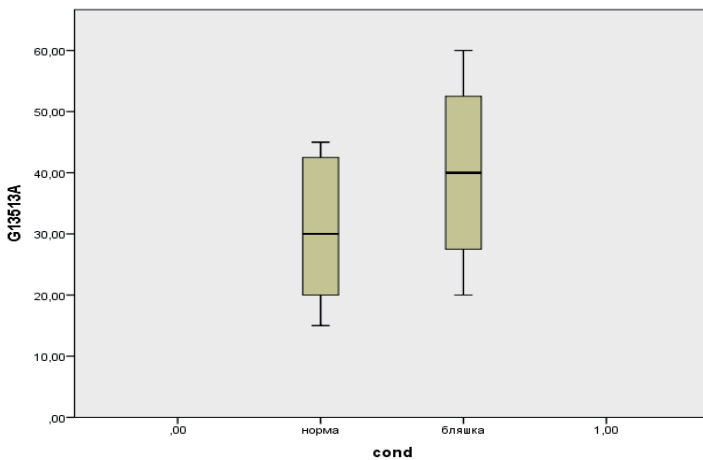
После анализа результатов как формального, так и неформального статистических подходов было принято решение продолжить исследование 11 мутаций митохондриального генома на образцах интимы аорты и клеток крови пораженных атеросклерозом индивидов.



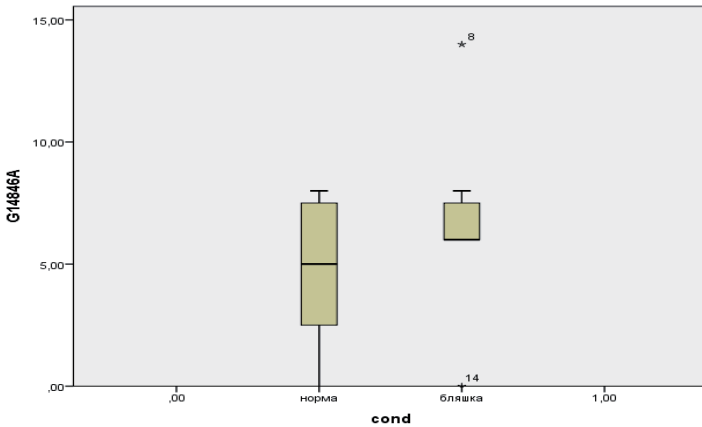
**Рисунок 29. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации C5178A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**



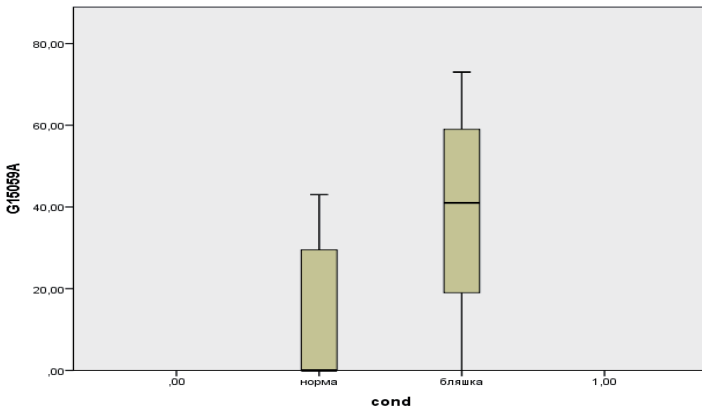
**Рисунок 30. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G12315A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**



**Рисунок 31. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G13513A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**



**Рисунок 32. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G14846A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**



**Рисунок 33. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G15059A в липофиброзной бляшке и нормальной интиме аорт на блочной диаграмме**

**Таблица 24. Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции между уровнем гетероплазии и наличием липофиброзной бляшки**

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

**Примечание:**

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

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

**Таблица 25. Сравнение процента 11 митохондриальных мутаций в атеросклеротических бляшках и нормальной интиме аорт**

Ген	Мутация	№ аорты	Норма	Бляшка	
12S рПНК	652delG	A1	0	2	
		A2	0	17	
		A3	4	22	
		A5	2	28	
	652insG	A6	0	9	
		A7	0	8	
	A1555G	A1	14	11	
		A2	15	7	
		A3	54	8	
		A5	19	7	
	тПНК - Leu (кодон узнавания UUR)	C3256T	A1	8	18
			A3	11	22
A5			12	27	
A6			13	34	
субъединицы 1 NADH дегидрогеназы	T3336C	A1	3	6	
		A3	0	17	
субъединицы 2 NADH	C5178A	A2	14	7	
		A3	14	8	

дегидрогеназы		A5	10	5
		A6	31	18
тРНК – Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	A1	8	35
		A2	0	5
		A3	0	6
		A4	0	15
		A5	12	35
субъединицы 5 NADH дегидрогеназы	G13513A	A1	45	60
		A2	20	30
		A3	20	40
		A4	15	25
		A6	45	60
		A7	30	45
субъединицы 6 NADH дегидрогеназы	G14459A	A3	2	4
		A5	2	10
		A6	0	53
цитохрома В	G14846A	A1	8	14
		A2	2	7
		A6	3	8
	G15059A	A1	31	41
		A3	28	52
		A5	43	66

### **3.4. Теоретическое обоснование дальнейших исследований интимы артерий**

Теоретическим обоснованием для проведения дальнейших исследований интимы аорт послужили обнаруженные различия уровня гетероплазмии между нормальной и пораженной атеросклерозом тканью интимы. Существует несколько возможных механистических объяснений обнаруженных отличий:

1. Клетки, имеющие высокий уровень дефектных митохондриальных геномов, могут способствовать развитию фокальных атеросклеротических поражений, в соответствии с моноклональной гипотезой. Существует вероятность того, что они неверно интерпретируют приходящие извне сигналы и начинают выделять провоспалительные хемокины, привлекая в будущий очаг поражения клетки крови. В случае, если клетки крови также имеют высокий уровень мутантного аллеля, процесс может усугубляться.

2. Дефектные клетки избирательно выживают в формирующихся поражениях, потому что их собственное дыхание угнетено, а, следовательно, они получают преимущество по сравнению с клетками, у которых нормальный уровень метаболической активности.

3. Мутантные клетки избирательно выживают в формирующихся поражениях, вследствие включения механизма компенсаторной пролиферации из-за угнетенного клеточного дыхания. Таким образом, они получают преимущество по сравнению с клетками с нормальным уровнем метаболической активности.



4. В силу некоторых причин в очаги поражения избирательно попадают клетки с дефектным геномом, а с нормальным геномом - в области здоровой сосудистой ткани.

Для того чтобы понять, действительно ли гетероплазмия митохондриального генома имеет патогенетическое значение, было целесообразно провести анализ уровня гетероплазмии мутаций:

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

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

3) В образцах, выделенных из клеток крови.

Существует предположение, что не только клетки интимы, но и клетки крови принимают непосредственное участие в формировании атеросклеротического поражения. Моноциты из кровотока мигрируют через эндотелий сосуда в протеогликановый слой интимы, где, становясь макрофагальными клетками, призваны ликвидировать избыток модифицированных липопротеидов. Лимфоциты, попадая в сосудистую стенку, выполняют сигнальную роль в формировании иммунного ответа и локальной воспалительной реакции.

Вследствие того, что атеросклероз является мультифакториальным заболеванием, вполне вероятно, что

различный уровень гетероплазмы в клетках интимы может возникать под влиянием целого ряда факторов.

### **3.5. Анализ уровня гетероплазмы в гомогенатах нормальной и пораженной атеросклерозом интимы аорт**

Дальнейшие наши исследования были посвящены сравнению ПЦР-фрагментов ДНК, выделенных из суммарных гомогенатов пораженной и нормальной интимы 10 аорт, с целью выявить средний процент выбранных нами 11 мутаций в каждой аорте.

При неформальном статистическом подходе выявлено 6 мутаций, процент которых значительно выше в гомогенатах ткани пораженной интимы по сравнению с гомогенатами ткани нормальной интимы. Это нуклеотидные замены G12315A (6 из 10 аорт), G14459A (5/10), C5178A (4/10), G15059A (3/10), A1555G и T3336C (2/10). Данные по гомогенатам интимы аорт, в которых имеются такие отличия, представлены в таблице 26.

**Таблица 26. Сравнение процента 6 митохондриальных мутаций в гомогенатах пораженной атеросклерозом и нормальной интимы аорт**

Ген	Мутация	№ аорты	Норма	Поражение
12S рPHK	A1555G	B1	6	51
		B10	0	16
субъединицы 1 NADH	T3336C	B2	6	13
		B7	6	30

дегидрогеназы				
субъединицы 2 NADH дегидрогеназы	C5178A	B1	5	25
		B7	25	77
		B8	20	30
		B9	18	23
тРНК – Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	B1	5	14
		B2	6	10
		B3	9	16
		B4	3	6
		B7	16	24
		B8	17	62
субъединицы 6 NADH дегидрогеназы	G14459A	B1	3	16
		B4	4	9
		B5	2	5
		B6	5	10
		B10	6	10
цитохрома В	G15059A	B1	31	43
		B2	30	45
		B9	41	56

Обращают на себя внимание множественные митохондриальные мутации в 7 из 10 исследованных аорт, процент которых в несколько раз выше в гомогенатах из пораженной атеросклерозом интимы, чем из нормальной. Например, в аорте В1 процент гетероплазмии всех 5 мутаций

значительно выше в гомогенате атеросклеротического поражения, чем в гомогенате нормальной интимы. В гомогенатах из пораженных участков аорт В2 и В7 преобладают по три мутации, а в В4, В8, В9 и В10 – по две митохондриальные мутации.

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

**Таблица 27. Сравнение суммарных гомогенатов нормальной интимы и атеросклеротического поражения методом бутстрэп-анализа**

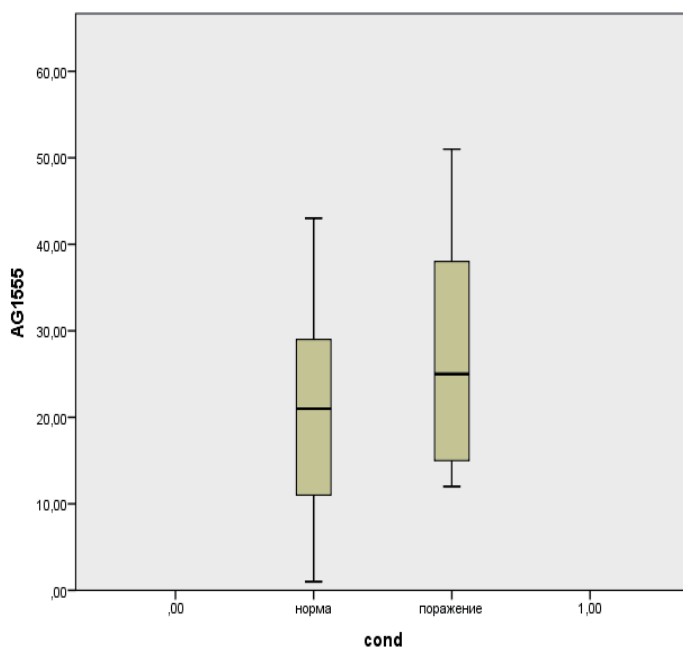
Мутация	Количество аорт	Парные различия	Достоверность отличий
652delG	10	9,14	0,068*
652insG	10	0,73	0,725
A1555G	10	9,86	0,001**
C3256T	10	3,57	0,048**
T3336C	10	0,69	0,003**
C5178A	10	3,29	0,045**
G12315A	10	10,71	0,004**
G13513A	10	2,074	0,839

G14459A	10	8,14	0,050**
G14846A	10	-2,00	0,075*
G15059A	10	0,45	0,103*

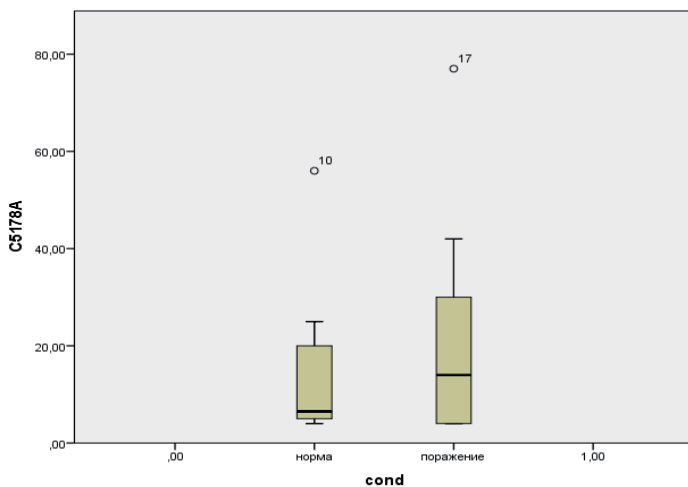
**Примечание:**

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

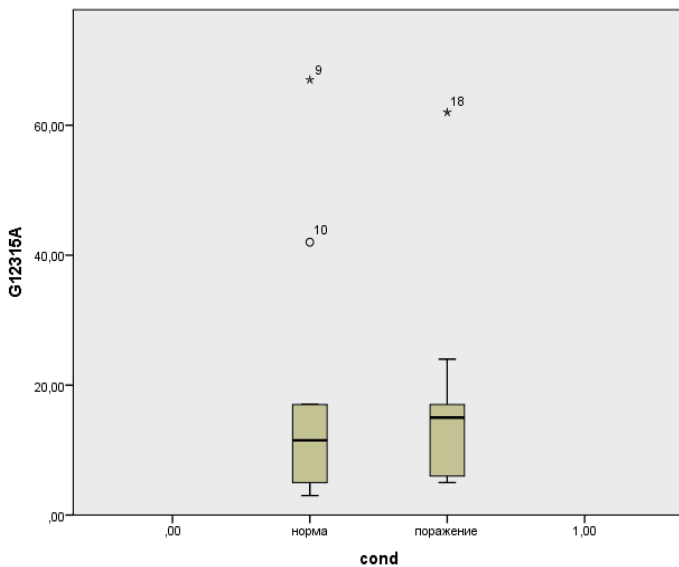
\* - корреляция мутаций с гомогенатами атеросклеротического поражения значима на уровне  $p \leq 0,1$ .



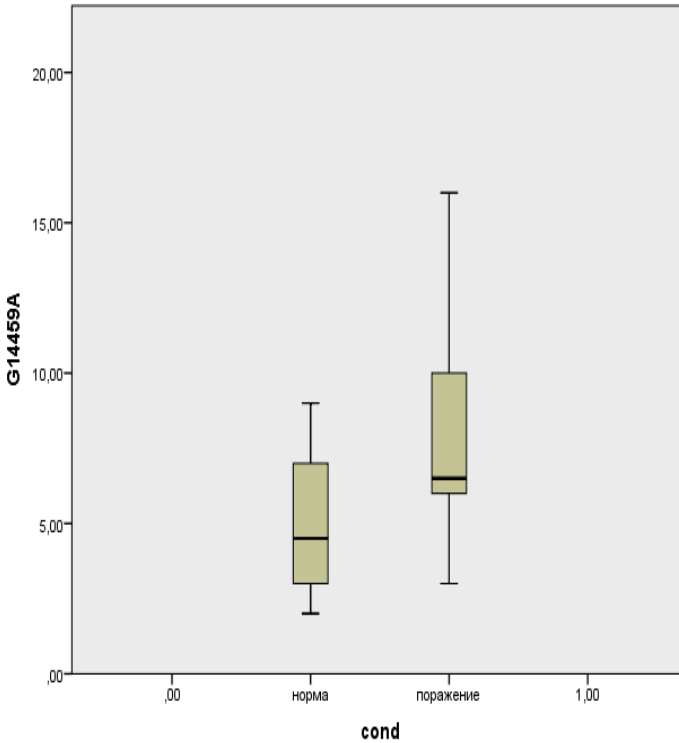
**Рисунок 34. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации A1555G в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме**



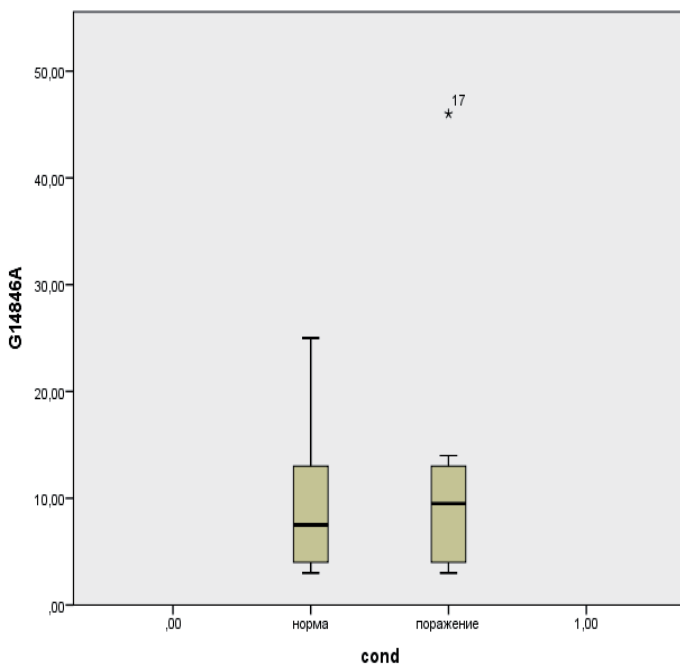
**Рисунок 35. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации C5178A в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме**



**Рисунок 36. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G12315A в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме**



**Рисунок 37. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G14459A в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме**



**Рисунок 38. Демонстрация достоверности отличий уровня гетероплазии мутации G14846A в нормальных и пораженных атеросклерозом суммарных гомогенатах интимы аорт на блочной диаграмме**

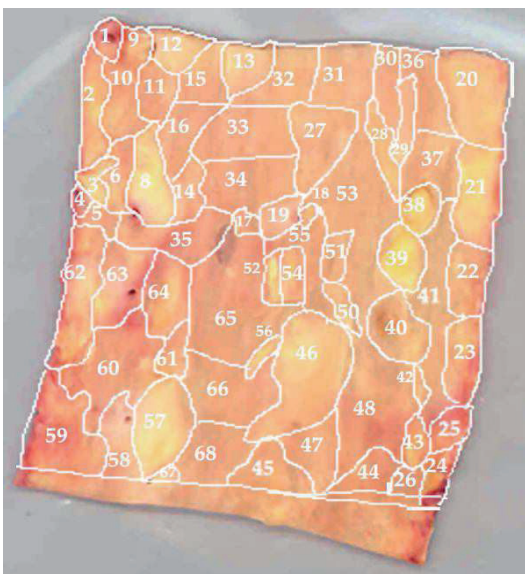
Согласно статистическим данным по суммарным гомогенатам пораженной и нормальной интимы, мутации митохондриального генома C3256T, T3336C, G12315A, A1555G, C5178A, и G14459A высокодостоверно ассоциированы с суммарным атеросклеротическим поражением аорты ( $p \leq 0,05$ ), а мутации G15059A и 652delG – на уровне значимости  $p \leq 0,1$ . В то же время мутация G14846A проявила антиатерогенный эффект ( $p \leq 0,1$ ). Для ряда значимых мутаций достоверность отличий отображена на блочных диаграммах (рисунки 34-38).



### 3.6. Анализ уровня гетероплазмии в участках морфологически картированной стенки аорт

#### 3.6.1. Морфологическое и мутационное картирование аорт

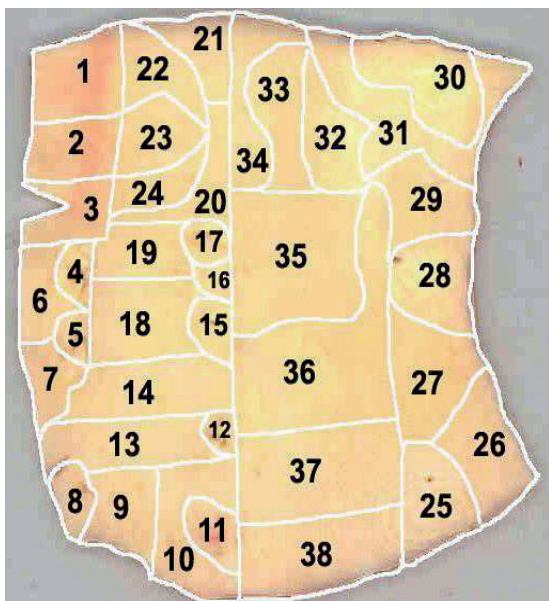
Для оценки взаимосвязи генетических показателей, а именно, 11 митохондриальных мутаций, идентифицированных в качестве потенциальных маркеров атеросклероза, проведено исследование на аутопсийном материале с морфологическим и мутационным картированием. В работе использован аутопсийный материал (5 образцов аорты, полученных при аутопсии у лиц, погибших в результате несчастного случая или внезапной сердечно-сосудистой смерти).



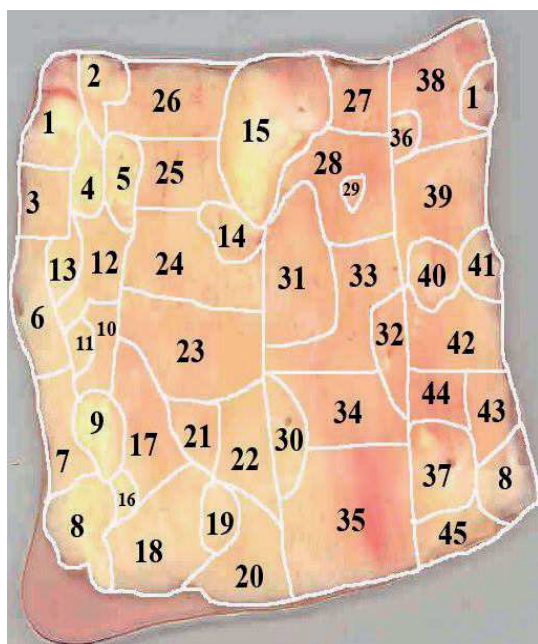
**Рисунок 39. Морфологическая карта аорты №1**



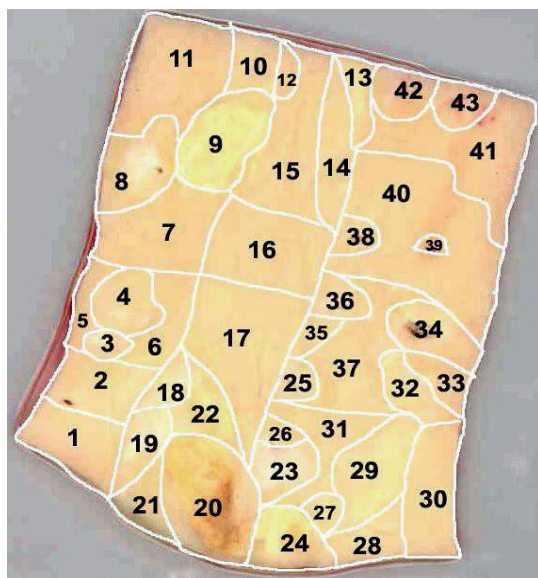
**Рисунок 40. Морфологическая карта аорты №2**



**Рисунок 41. Морфологическая карта аорты №3**



**Рисунок 42. Морфологическая карта аорты №4**



**Рисунок 43. Морфологическая карта аорты №5**

Каждый образец, представлял собой участок сосудистой стенки размером приблизительно 7х9 см, разделенный по морфологическим признакам на зоны с различной степенью атеросклеротического поражения (1 - норма, 2 - жировая инфильтрация, 3 - жировая полоса, 4 - липофиброзная бляшка, 5 - фиброзная бляшка). В каждом образце аорты было идентифицировано от 38 до 70 таких зон (рисунки 39-43). Всего было проанализировано 265 участков интимы аорт (таблица 28).

**Таблица 28. Степень атеросклеротического поражения морфологически картированных аорт**

№ аорты	Степень поражения	Количество участков
1	Норма	9
	Жировая инфильтрация	17
	Жировая полоса	6
	Липофиброзная бляшка	5
	Фиброзная бляшка	1
2	Норма	13
	Жировая инфильтрация	10
	Жировая полоса	7
	Липофиброзная бляшка	12
	Фиброзная бляшка	3
3	Норма	12

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

### **3.6.2. Анализ 11 мутаций митохондриального генома**

При анализе всех участков нормальной и пораженной атеросклерозом интимы 5 аорт посредством бутстрэп-анализа выявлено, что с суммарным атеросклеротическим поражением картированных аорт положительно ассоциированы мутации митохондриального генома С3256Т, Т3336С, С5178А, G12315А, G14459А и G15059А – высокодостоверно, а мутация 652delG – на уровне значимости 0,1. В то же время мутация G13513А

ассоциирована с суммарным атеросклеротическим поражением картированных аорт высокодостоверно отрицательно (таблица 29). 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 30), что с суммарным начальным атеросклеротическим поражением (жировыми точками и жировыми полосами) и суммой всех участков липофиброзных бляшек ассоциированы, на том же уровне значимости, мутации митохондриального генома, характерные для суммарного атеросклеротического поражения. Мутация G13513A с данными типами суммарного поражения коррелирует высокодостоверно отрицательно. Кроме того, с суммарным начальным атеросклеротическим поражением и суммой участков липофиброзных бляшек отрицательно коррелирует на уровне значимости  $p \leq 0,05$  мутация A1555G. Также при анализе суммы участков липофиброзных бляшек выявлена высокодостоверно отрицательная корреляция мутации G14846A с данным типом поражения.

В то же время как в сумме участков липофиброзных, так и фиброзных бляшек выявлена положительная корреляция с мутацией митохондриального генома 652delG на уровне значимости  $p \leq 0,1$ . При этом данная мутация отсутствует в суммарном начальном атеросклеротическом поражении.

Кроме того, с суммой участков фиброзных бляшек коррелировали на уровне значимости 0,05: положительно - C3256T и C5178A, отрицательно - G12315A.

**Таблица 29. Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции между уровнем гетероплазмии и наличием суммарного атеросклеротического поражения картированных аорт**

<b>Мутация</b>	<b>Значение коэффициента корреляции</b>	<b>Асимптотическая значимость (двусторонняя)</b>
652delG	0,311*	0,088*
652insG	-0,301	0,121
A1555G	-0,307	0,113
C3256T	0,353**	0,050**
T3336C	0,439**	0,023**
C5178A	0,357**	0,047**
G12315A	0,403**	0,045**
G13513A	-0,456**	0,035**
G14459A	0,453**	0,036**
G14846A	-0,297	0,129
G15059A	0,451**	0,037**

**Таблица 30. Преобладающие мутации митохондриального генома в различных типах суммарного атеросклеротического поражения (АТП) морфологически картированных аорт**

<b>Мутации</b>	<b>Начальное АТП</b>	<b>Липофиброзные бляшки</b>	<b>Фиброзные бляшки</b>

	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость
652delG	0,093	0,146	0,308*	0,091*	0,323*	0,071*
652insG	- 0,075	0,186	- 0,095	0,125	- 0,058	0,232
A1555G	-0,359**	0,048**	-0,401**	0,039**	- 0,084	0,195
C3256T	0,368**	0,045**	0,407**	0,045**	0,352**	0,050**
T3336C	0,426**	0,034**	0,437**	0,025**	0,103	0,119
C5178A	0,365**	0,046**	0,439**	0,023**	0,356**	0,048**
G12315A	0,353**	0,050**	0,409**	0,041**	-0,367**	0,046**
G13513A	-0,423**	0,035**	-0,437**	0,021**	0,095	0,143
G14459A	0,403**	0,042**	0,463**	0,026**	0,073	0,191
G14846A	-0,107	0,117	-0,351**	0,050**	0,052	0,214
G15059A	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  $p \leq 0,1$ .

### **3.6.3. Совокупная мутационная нагрузка 11 мутаций в морфологически картированных аортах**

Для того, чтобы определить наличие взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклеротического поражения, проведен линейный регрессионный анализ, 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 гетероплазмии, определены межквартильные границы. Индивидуальные скалярные показатели гетероплазмии были трансформированы в ординарные величины 1,2,3 или 4, характеризующие принадлежность показателя к определенной квартили в пределах данного аутопсийного образца. Результаты представлены в таблицах 31 и 32.

**Таблица 31. Сводка модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклероза в аортах**

Модель	R	R <sup>2</sup>	Скорректированный R <sup>2</sup>	Стандартная ошибка оценки
1	0,945	0,894	0,886	0,278

*Примечание:* предикторами модели являлись константа, квартили G14846A, квартили 625delG, квартили T3336C, квартили C5178A, квартили A1555G, квартили G14459A, квартили G15059A, квартили 625insG, квартили G12315A, квартили G13513A, квартили C3256T

**Таблица 32. Дисперсионный анализ модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки со степенью атеросклероза**

Модель		Сумма квадратов	Степени свободы	Средний квадрат	F	Значимость
1	Перпес-сия	93,8	11	8,53	110,0	<0,001

	Остаток	11,2	144	0,08		
	Итого	104,9	155			

**Примечание:** предикторами модели являлись константа, квартили G14846A, квартили 625delG, квартили T3336C, квартили C5178A, квартили A1555G, квартили G14459A, квартили G15059A, квартили 625insG, квартили G12315A, квартили G13513A, квартили C3256T. Зависимой переменной была «степень поражения».

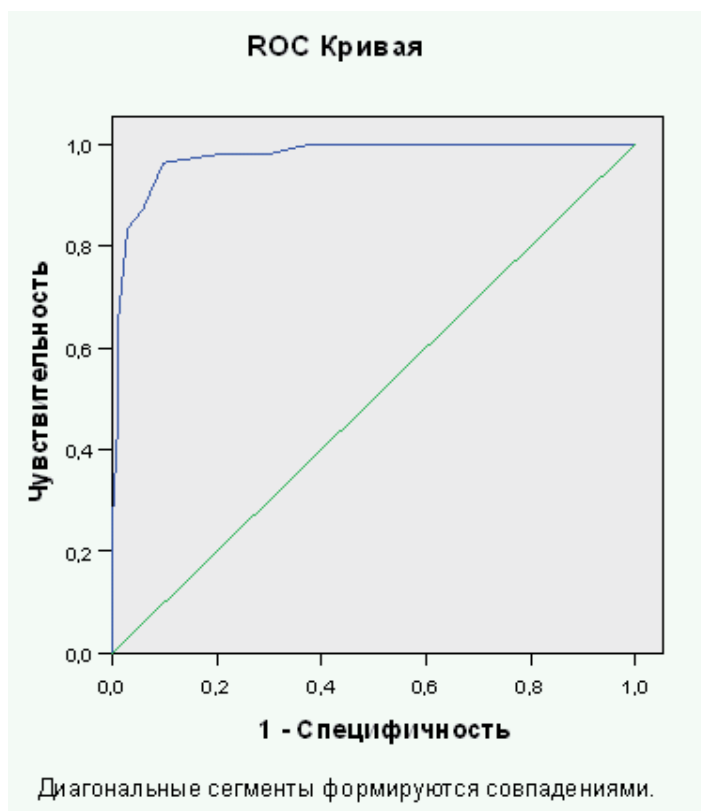
Таким образом, при оценке совокупной нагрузки по 11 мутациям модель линейной регрессии достигла статистической значимости при  $p < 0,001$ . Учитывая достаточное количество степеней свободы (11), можно утверждать, что степень атеросклеротического поражения ассоциирована с совокупной нагрузкой по данным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

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

Для данного анализа ранговые значения (номера квартилей) гетероплазии были просуммированы в зависимости от знака бета-коэффициента, полученного в регрессионном анализе (при положительном значении коэффициента – сложение, при отрицательном – вычитание). Полученный параметр получил название «мутационная нагрузка».

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).



***Рисунок 44. 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 ( $p < 0,001$ )***

Таким образом, совокупная мутационная нагрузка по 11 исследованным мутациям митохондриального генома

ассоциирована с 88,2% случаев атеросклеротических поражений морфологически картированных аорт.

### **3.7. Преобладающие мутации в атеросклеротических поражениях аорт**

Обобщив данные анализа уровня гетероплазии в интима отдельных участков, суммарных гомогенатов и участков морфологически картированных аорт, как нормальных, так и пораженных атеросклерозом, можно сделать вывод о том, что:

1. Для различных типов атеросклеротического поражения интимы аорт характерен определенный спектр про- и антиатерогенных мутаций митохондриального генома.
2. Для суммарного атеросклеротического поражения (всех типов), липофиброзных бляшек и начального атеросклеротического поражения интимы аорт проатерогенными мутациями являются С3256Т, Т3336С, С5178А, G12315А, G14459А и G15059А, антиатерогенной - G13513А.
3. Однонуклеотидная замена А1555G является антиатерогенной для начального атеросклеротического поражения и липофиброзных бляшек.
4. В липофиброзных бляшках антиатерогенной является мутация G14846А.
5. Для фиброзных бляшек проатерогенными мутациями являются С5178А и С3256Т, антиатерогенной мутацией - G12315А.

### **3.8. Анализ уровня гетероплазии 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.

### **3.8.1. Принцип исследования атеросклеротических поражений интимы сонных артерий**

#### **3.8.1.1. Оценка размера атеросклеротической бляшки**

При ультразвукографическом обследовании сонных артерий наличие атеросклеротических бляшек (АСБ), оценивали по 4-бальной системе: 0 — отсутствие возвышенных атеросклеротических поражений; 1 - стабильные атеросклеротические бляшки со стенозом просвета сосуда до 20%; 2 - стабильные атеросклеротические бляшки со стенозом просвета сосуда от 20% до 50%; 3 — гемодинамически значимые атеросклеротические бляшки со стенозированием более 50% (таблица 33).

**Таблица 33. 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%)
-------	-----------	-----------	-----------	---------

### 3.8.1.2. Оценка толщины интимы-меди (ТИМ)

Так как абсолютной нормы по толщине интимо-медиального слоя сонных артерий у человека не существует, для каждой отдельной популяции они устанавливаются путем проведения эпидемиологических исследований по распределению данного признака. В рамках работы в лаборатории такое предварительное исследование было проведено в Москве, среди условно здоровых мужчин и женщин, не имеющих клинических проявлений атеросклероза. Определено, какие распределения средней и максимальной толщины интимо-медиального слоя имеются в разных возрастных группах. Пограничные (межквартильные) значения ТИМ для жителей Московского региона представлены в таблице 34.

**Таблица 34. Средние значения толщины интимо-медиального слоя сонных артерий для жителей Московского региона**

	Толщина интимо-медиального слоя сонных артерий, мкм			
	<50 лет	51-60 лет	61-70 лет	>70 лет
Мужчины, медиана	750	810	900	930
<i>Предрасположенные к атеросклерозу</i>	>800	>910	>995	>1070
<i>Не</i>	<660	<740	<830	<850

<i>предрасположенные к атеросклерозу</i>				
Женщины, медиана	680	740	835	910
<i>Предрасположенные к атеросклерозу</i>	>740	>820	>930	>1015
<i>Не предрасположенные к атеросклерозу</i>	<610	<670	<775	<845

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. Таким людям присваивали значение уровня атеросклеротической нагрузки равное 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 ТИМ по выделенным группам имели следующий вид (таблица 35).

**Таблица 35. Значения толщины интимо-медиального слоя сонных артерий для участников исследования с различной степенью атеросклеротической нагрузки**

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

В результате проведенной работы были получены рабочие данные в формате таблицы 10?700, где был приведен процент гетероплазии каждой мутации для каждого пациента.

Статистическую оценку результатов проводили с использованием пакета SPSS версии 21.0 (SPSS Inc., США). Данная обработка проведена с использованием U-теста для независимых выборок по Манну-Уитни и теста для зависимых выборок по Уилкоксоу. Достоверными считали различия при 95% вероятности безошибочного прогноза. Для определения коэффициента корреляции проводили анализ таблиц сопряженности по Спирмену и бутстрэп-анализ. Для интерпретации направления связи между стадией атеросклеротического поражения и процентом гетероплазии использовали метод линейной регрессии. Для оценки степени



ассоциации атеросклеротических поражений со значением процента гетероплазии по ряду мутаций использовали факториальную регрессию. Для количественной оценки мутационной нагрузки был рассчитан мутационный эксцесс. Межквартильные границы в распределениях процента гетероплазии по отдельным мутациям определяли с помощью анализа частот. В конце исследования производился подсчет его статистической мощности.

### **3.8.2. Ассоциация уровня гетероплазии мутаций с возрастом**

Согласно бутстрэп-анализу (таблица 36), обнаружена высокодостоверно положительная корреляция возраста участников исследования с уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома G12315A, G14459A и G15059A ( $p \leq 0,05$ ). Отрицательная корреляция с возрастом для мутаций A1555G и G14846A была высокодостоверной ( $p \leq 0,05$ ), а для 652insG и G13513A – значимой на уровне  $p \leq 0,1$ .

**Таблица 36. Корреляция возраста индивидов с уровнем гетероплазии митохондриальных мутаций в лейкоцитах крови**

<b>Мутация</b>	<b>Коэффициент корреляции</b>	<b>Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)</b>
652delG	0,102	0,201
652insG	-0,129	0,104*
A1555G	-0,174	0,027**

C3256T	0,062	0,439
T3336C	0,104	0,192
C5178A	0,015	0,863
G12315A	0,277	0,001**
G13513A	-0,128	0,103*
G14459A	0,161	0,042**
G14846A	-0,171	0,031**
G15059A	0,185	0,019**

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

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

### **3.8.3. Ассоциация мутаций митохондриального генома**

#### **с атеросклеротическими бляшками сонных артерий**

##### **3.8.3.1. Анализ 11 мутаций**

Согласно статистическим данным (таблица 37), критический уровень гетероплазии в клетках крови коррелирует с наличием атеросклеротической бляшки сонных артерий высокодостоверно положительно - по мутациям 652delG, T3336C, G12315A, G14459A ( $p \leq 0,01$ ), и значимо на уровне  $p \leq 0,1$  - по C3256T, C5178A.

В то же время корреляция атеросклеротических бляшек в сонных артериях является отрицательной для мутаций G14846A ( $p \leq 0,001$ ) и 652insG ( $p \leq 0,1$ ).

**Таблица 37. Корреляция атеросклеротических бляшек индивидов с уровнем гетероплазии митохондриальных мутаций**

Мутация	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
652delG	0,124**	0,010**
652insG	-0,090*	0,060*
A1555G	-0,063	0,247
C3256T	0,074*	0,101*
T3336C	0,143**	0,002**
C5178A	0,095*	0,064*
G12315A	0,275**	0,001**
G13513A	0,061	0,187
G14459A	0,158**	0,001**
G14846A	-0,128**	0,010**
G15059A	-0,006	0,912

**Примечание:**

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

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

### 3.8.3.2. Уровень гетероплазии мутации G13513A

Особое положение занимает мутация митохондриального генома G13513A. Антиатерогенный эффект аллеля А в позиции 13513 проявляется при уровне гетероплазии в атеросклеротических бляшках выше 65% (таблица 38).

Таким образом, 65% уровень гетероплазии мутации митохондриального генома G13513A высокодостоверно отрицательно коррелирует с наличием атеросклеротической

бляшки у участников исследования на уровне значимости  $p \leq 0,05$ .

### **3.8.3. Совокупная мутационная нагрузка при атеросклеротических бляшках в сонных артериях**

Так как влияние различных мутаций разнонаправленное, необходимо рассматривать совокупное влияние 11 исследованных мутаций, или суммарную мутационную нагрузку. Для этого на предварительном этапе была построена модель логистической регрессии (таблицы 39-41). 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 42).

**Таблица 38. Ассоциация 65% уровня гетероплазии аллеля 13513A с атеросклеротическими бляшками**

Корреляция Спирмена		65% уровень гетероплазии G13513A	Атеросклеротическая бляшка
65% уровень гетероплазии и G13513A	Коэффициент корреляции	1,000	-0,204
	Значимость (двух-сторонняя)	-	0,054

	Количество валидных случаев	90	90
Атеросклеротическая бляшка	Коэффициент корреляции	-0,204	1,000
	Значимость (двух-сторонняя)	0,054	-
	Количество валидных случаев	90	502

### 3.8.3.1. Логистическая регрессия

**Таблица 39. Сводка модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки с атеросклеротической бляшкой в сонных артериях**

Модель	Удвоенный логарифм функции правдоподобия со знаком минус	R <sup>2</sup> Кокса и Снелла	R <sup>2</sup> Нагелькерка
1	147,273	0,358	0,481*

**Таблица 40. Классификация случаев ассоциации атеросклеротических бляшек с совокупной нагрузкой 11 мутаций**

Модель	Обнаруженные	Предсказанные случаи
--------	--------------	----------------------

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

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

**Таблица 41. Анализ включенных переменных и коэффициента силы и направления связи**

Анализируемые переменные							
	Мутации	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
<b>Модель 1</b>	A1555G	-0,163	0,042	14,952	1	0,000**	0,850
	C3256T	0,033	0,051	0,417	1	0,519	1,033
	G14846A	-0,026	0,029	0,845	1	0,358	0,974
	C5178A	0,034	0,045	0,560	1	0,454	1,034
	652delG	0,052	0,022	5,761	1	0,016**	1,054
	G12315A	0,122	0,027	20,958	1	0,000**	1,130
	G13513A	-0,046	0,017	6,951	1	0,008**	1,047
	G14459A	0,030	0,015	3,971	1	0,046**	0,970
	G15059A	0,052	0,020	6,836	1	0,009**	1,054

	652insG	0,077	0,081	0,901	1	0,343	1,080
	T3336C	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) \*\* - высокодоверительная корреляция мутаций с атеросклеротическими бляшками ( $p \leq 0,05$ );

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

### 3.8.3.2. ROC-анализ

На основании значений включенных переменных модель оценила для каждого участника исследования вероятность принадлежности к категориям 0 или 1. Полученные данные по вероятности, которые можно рассматривать как меру относительного риска, были использованы для ROC-анализа (рисунок 45, таблица 42).

**Таблица 42. ROC-анализ взаимосвязи мутационной нагрузки с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях**

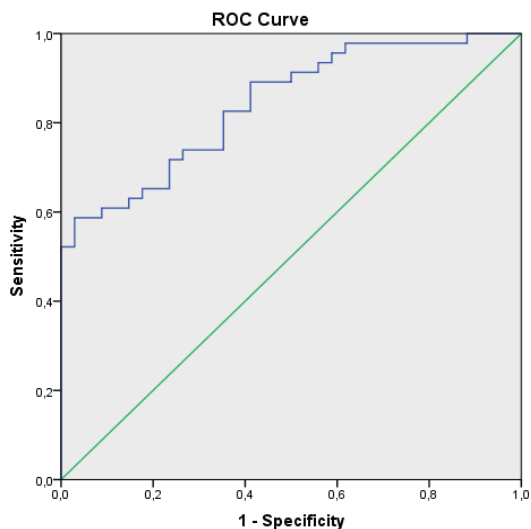
Вероятность безошибочного прогноза				
Площадь под кривой	Стандартная ошибка	Асимптотическая значимость	Асимптоматический доверительный интервал 95%	
			Ниже 95%	Выше 95%
0,842	0,030	0,001	0,784	0,900

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

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.

### **3.8.4. Ассоциация мутаций с толщиной интимо-медиального слоя сонных артерий**

#### **3.8.4.1. Анализ 11 мутаций митохондриального генома**



**Рисунок 45. ROC-кривая для анализа суммарной мутационной нагрузки 11 мутаций митохондриального**



## **генома как генетических маркеров наличия атеросклеротических бляшек в сонных артериях**

Как видно из данных статистики (таблица 43), критический уровень гетероплазмии в клетках крови положительно коррелирует с патологическим увеличением толщины интимы-медии сонных артерий по мутациям G12315A и G15059A – высокодостоверно ( $p \leq 0,05$ ), а по однонуклеотидным заменам C3256T и C5178A – значимо на уровне  $p \leq 0,1$ .

Высокодостоверно отрицательная корреляция с данным параметром обнаружена по мутациям G13513A и G14846A ( $p \leq 0,05$ ).

**Таблица 43. Корреляция мутаций митохондриального генома с толщиной интимы-медии сонных артерий**

<b>Мутация</b>	<b>Коэффициент корреляции</b>	<b>Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)</b>
652delG	0,061	0,206
652insG	0,017	0,722
A1555G	0,009	0,865
C3256T	0,079*	0,091*
T3336C	0,041	0,383
C5178A	0,074*	0,103*
G12315A	0,219**	0,001**
G13513A	-0,105*	0,050**
G14459A	0,057	0,236
G14846A	-0,100**	0,045**
G15059A	0,109**	0,028**

**Примечание:**

*\*\* - высокодостоверная корреляция мутаций с толщиной интимы-медии ( $p \leq 0,05$ );*

*\* - корреляция мутаций с толщиной интимы-медии значима на уровне  $p \leq 0,1$ .*

### **3.8.4.2. Совокупная мутационная нагрузка при патологическом утолщении интимо-медиаляльного слоя сонных артерий**

Аналогично п.7.3.3. из-за того, что влияние разных мутаций на изменение толщины интимы-медии разнонаправленное, необходимо рассматривать совокупное влияние 11 исследованных мутаций, или совокупную мутационную нагрузку. На предварительном этапе была построена бинарная модель логистической регрессии (таблицы 44-46). Вероятность принадлежности к той или иной категории (0 (нет патологического утолщения интимо-медиаляльного слоя) или 1 (наличие патологического утолщения интимы-медии)) выступила в качестве предиктора при анализе ROC-кривых (таблица 47, рисунок 47).

#### **3.8.4.2.1. Логистическая регрессия**

**Таблица 44. Сводка модели линейной регрессии взаимосвязи мутационной нагрузки с ТИМ в сонных артериях**

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

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

**Таблица 45. Классификация случаев ассоциации ТИМ с совокупной нагрузкой 11 мутаций**

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

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

**Таблица 46. Анализ включенных переменных, коэффициента силы и направления связи**

Анализируемые переменные							
	Мутации	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Модель 1	A1555G	-0,177	0,079	5,017	1	0,025**	0,838
	C3256T	0,098	0,071	1,916	1	0,166	1,103
	G14846A	-0,108	0,051	4,483	1	0,034**	0,898
	C5178A	0,079	0,078	1,024	1	0,312	0,924
	652delG	0,006	0,036	0,032	1	0,857	0,994
	G12315A	0,027	0,030	0,806	1	0,369	1,028
	G13513A	-0,023	0,023	1,001	1	0,317	1,023
	G14459A	0,018	0,026	0,463	1	0,496	0,982
	G15059A	0,026	0,023	1,273	1	0,259	1,027
	652insG	-0,187	0,156	1,439	1	0,230	1,205
	T3336C	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 ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.8.4.2.2. ROC-анализ

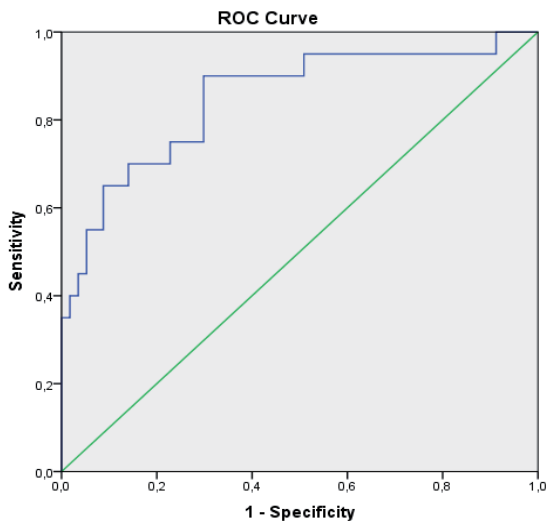
На основании значений включенных переменных модель оценила для каждого участника исследования вероятность принадлежности к категориям 0 или 1. Полученные данные по вероятности, которые можно рассматривать как меру относительного риска, были использованы для ROC-анализа (рисунок 46, таблица 47).

**Таблица 47. ROC-анализ взаимосвязи мутационной нагрузки с толщиной интимы-медии в сонных артериях**

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 патологическом 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 патологического утолщения интимы-медии в сонных артериях человека.



**Рисунок 46. ROC-кривая для анализа суммарной мутационной нагрузки 11 мутаций митохондриального генома как генетических маркеров наличия патологического утолщения интимы-медии в сонных артериях**

### **3.8.5. Генодиагностика атеросклероза**

#### **3.8.5.1. Пороговое значение процента гетероплазии отдельных мутаций, ассоциированное с образованием атеросклеротических бляшек в сонных артериях**

На основании полученных данных по анализу уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома в клетках крови участников исследования было определено пороговое значение процента гетероплазии каждой мутации, после которого у индивида начинается образование атеросклеротических бляшек или (для антиатерогенных мутаций) – начинает проявляться антиатерогенный эффект (таблица 48). Выбор оптимального порогового значения базировался на одновременной максимизации значений чувствительности и специфичности. Значения данных параметров не должны были быть меньше 0,5.

**Таблица 48. Пороговое значение процента гетероплазии мутаций митохондриального генома, ассоциированное с атеросклеротическими бляшками в сонных артериях**

Мутация	Пороговое значение гетероплазии (%)
---------	-------------------------------------

652delG	20,5
652insG <sup>a</sup>	20,0
A1555G	17,5
C3256T	15,5
T3336C	6,5
C5178A	6,5
G12315A	7,5
G13513A <sup>a</sup>	32,5
G14459A	4,5
G14846A <sup>a</sup>	17,5
G15059A	24,5

**Примечание:** <sup>a</sup> – мутации, обладающие антиатерогенным эффектом.

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

Аналогично пункту 3.8.5.1 было определено пороговое значение процента гетероплазии каждой мутации, после которого у индивида начинается патологическое утолщение интимо-медиального слоя сонных артерий или (для антиатерогенных мутаций) – начинает проявляться антиатерогенный эффект (таблица 49).

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

**Таблица 49. Пороговое значение процента гетероплазмии мутаций митохондриального генома, ассоциированное с патологическим утолщением интимы-медии сонных артерий**

<b>Мутация</b>	<b>Пороговое значение гетероплазмии (%)</b>
652delG	21,5
652insG <sup>a</sup>	20,0
A1555G	19,5
C3256T	16,5
T3336C	7,5
C5178A	6,5
G12315A	10,5
G13513A <sup>a</sup>	33,5
G14459A	4,5
G14846A <sup>a</sup>	17,5
G15059A	26,5

**Примечание:** <sup>a</sup> – мутации, обладающие антиатерогенным эффектом.

### **3.8.6. Ассоциация мутаций с факторами риска атеросклероза**

Для оценки ассоциации уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома с факторами риска развития атеросклероза было проведен корреляционный анализ по Спирмену. Полученные корреляционные коэффициенты, а также уровни значимости представлены в таблице 50.



**Таблица 50. Корреляция мутаций митохондриального генома с факторами риска атеросклероза**

Мутация	Фактор риска атеросклероза	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)
A1555G	Гипертрофия левого желудочка	0,097	0,066*
T3336C	Гипертрофия левого желудочка	-0,127	0,013**
C5178A	Инфаркт миокарда	0,107	0,046**
	Боль за грудиной	0,089	0,073*
	Гипертрофия левого желудочка	0,115	0,039**
G12315A	Инфаркт миокарда	-0,090	0,070*
	Гипертрофия левого желудочка	-0,123	0,019**
G14459A	Боль за грудиной	0,112	0,041**
	Гипертрофия левого желудочка	-0,083	0,081*
G14846A	Инфаркт миокарда	-0,121	0,002**
G15059A	Боль за грудиной	-0,116	0,039**

**Примечание:**

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

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

Согласно таблице 50, с инфарктом миокарда (ИМ) высокодостоверно коррелировали мутации G14846A (отрицательно) и C5178A (положительно). ( $p \leq 0,05$ ).

Коррелировала с ИМ, более чем на 93%, мутация G12315A (отрицательно).

С болью за грудиной (БЗГ) высокодостоверно ( $p \leq 0,05$ ) коррелировали однонуклеотидные замены G14459A (положительно) и G15059A (отрицательно). Более чем на 92%, коррелировала с БЗГ мутация C5178A (положительно).

В то же время, с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ) высокодостоверно ( $p \leq 0,05$ ) коррелировали мутации митохондриального генома C5178A (положительно), G12315A и T3336C (отрицательно). Коррелировали с ГЛЖ более чем на 91% мутации A1555G (положительно) и G14459A (отрицательно).

Следует отметить положительную корреляцию мутации C5178A со всеми тремя представленными факторами риска атеросклероза, и отрицательную корреляцию G12315A - с двумя из них.

При этом с болью за грудиной положительно значимо коррелировала однонуклеотидная замена гена субъединицы NADH-дегидрогеназы, и отрицательно – гена цитохрома В.

### **3.9. Ассоциация гаплогрупп митохондриального генома с атеросклеротическими поражениями**

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

В нашей выборке количество участников исследования, имеющих атеросклеротическую бляшку любого размера,

равнялось 413. У остальных 287 индивидов бляшки отсутствовали.

### 3.9.1. Анализ ассоциации гаплогрупп с атеросклеротическими бляшками

#### 3.9.1.1. Гаплогруппа М у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы М с атеросклеротическими бляшками приведен в таблицах 51-55.

**Таблица 51. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих АТ бляшки, с гаплогруппой М**

	Количество участников исследования, имеющих АТ бляшки					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		$\Sigma$	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
<b>Ассоциация АТ бляшки с гаплогруппой М</b>	384	92,9%	29	7,1%	413	100,0%

**Таблица 52. Сопряженность гаплогруппы М с АТ бляшкой**

Сопряженность	
Атеросклеротическая бляшка	Количество валидных случаев

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

**Таблица 53. Оценка ассоциации гаплогруппы М с АТ бляшкой методом Хи-квадрат**

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

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

**Таблица 54. Отношение шансов гаплогруппы М быть атерогенной или антиатерогенной**

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы М быть атерогенной/ антиатерогенной (0,00/1,00)	0,197	0,042	0,916

Для валидных случаев с АТ бляшками, не ассоциированным и с гаплогруппой М (0,00)	0,596	0,451	0,787
Для валидных случаев с АТ бляшками, ассоциированным и с гаплогруппой М (1,00)	3,021*	0,848	10,760
Количество валидных случаев	384		

В таблице 54 отношение шансов приведено для  $\frac{\text{не М}}{\text{М}}$ . Согласно полученным данным, вероятность появления атеросклеротической бляшки у носителей других гаплогрупп (не М) в 3 раза выше, чем у носителей гаплогруппы М (и, наоборот, у представителей гаплогруппы М вероятность возникновения бляшки в 3 раза ниже по сравнению со всей совокупностью). Поскольку значение статистики Хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым. Это подтверждается таблицей 55 по корреляции Спирмена.

**Таблица 55. Корреляция Спирмена для АТ бляшки и гаплогруппы М**

Корреляция		
	АТ бляшка	Гаплогруппа М

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена	АТ бляшка	Коэффициент корреляции	1,000	-0,137**
		Значимость (двух-сторонняя)	0,000	0,018**
		Количество валидных случаев	384	384
	Гаплогруппа М	Коэффициент корреляции	-0,137**	1,000
		Значимость (двух-сторонняя)	0,018**	0.000
		Количество валидных случаев	384	413

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

### 3.9.1.2. Гаплогруппа Т у индивидов с атеросклеротическими бляшками

Анализ ассоциации гаплогруппы Т с атеросклеротическими бляшками приведен в таблицах 56-60.

**Таблица 56. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих АТ бляшки, с гаплогруппой Т**

	Количество участников исследования, имеющих АТ бляшки		
	Валидные случаи	Невалидные случаи	$\Sigma$

	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация АТ бляшки с гаплогруппой Т	384	92,9%	29	7,1%	413	100,0%

**Таблица 57. Сопряженность гаплогруппы Т с АТ бляшкой**

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

**Таблица 58. Оценка ассоциации гаплогруппы Т с АТ бляшкой методом Хи-квадрат**

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

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

**Таблица 59. Отношение шансов гаплогруппы Т быть атерогенной или антиатерогенной**

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы Т быть атерогенной/ антиатерогенной (0,00/1,00)	0,257	0,113	0,585
Для валидных случаев с АТ бляшками, не ассоциированными с гаплогруппой Т (0,00)	0,609	0,490	0,756
Для валидных случаев с АТ бляшками, ассоциированными с гаплогруппой Т (1,00)	2,369*	1,272	4,412
Количество валидных случаев	384		

Согласно таблице 59, вероятность появления бляшки у носителей других гаплогрупп (не Т) выше в 2,4 раза, чем у носителей гаплогруппы Т (и, наоборот, у представителей гаплогруппы Т вероятность возникновения бляшки в 2,4 раза ниже по сравнению с представителями других гаплогрупп). Поскольку значение статистики хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов



является значимым. Это подтверждается таблицей 60 по корреляции Спирмена.

**Таблица 60. Корреляция Спирмена для АТ бляшки и гаплогруппы Т**

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

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

### **3.9.1.3. Гаплогруппа U у индивидов с атеросклеротическими бляшками**

Анализ ассоциации гаплогруппы U с атеросклеротическими бляшками приведен в таблицах 61-65.

**Таблица 61. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих АТ бляшки, с гаплогруппой U**

	Количество участников исследования, имеющих АТ бляшки					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		$\Sigma$	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация АТ бляшки с гаплогруппой U	384	92,9%	29	7,1%	413	100,0%

**Таблица 62. Сопряженность гаплогруппы U с АТ бляшкой**

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

**Таблица 63. Оценка ассоциации гаплогруппы U с АТ  
бляшкой методом Хи-квадрат**

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

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

**Таблица 64. Отношение шансов гаплогруппы U быть  
атерогенной или антиатерогенной**

Оценка риска			
	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы U быть атерогенной/ антиатерогенной (0,00/1,00)	0,521	0,327	0,830
Для валидных случаев с АТ бляшками, не ассоциированными с гаплогруппой U (0,00)	0,720	0,563	0,919

Для валидных случаев с АТ бляшками, ассоциированными с гаплогруппой U (1,00)	1,381*	1,101	1,734
Количество валидных случаев	384		

**Примечание:** \* - участвует перекодированная переменная U (смена категорий – отношение  $\frac{\text{не}}{\text{не}}$ ).

Согласно таблице 64, вероятность появления атеросклеротической бляшки у носителей гаплогруппы U в 1,4 раза выше, чем у совокупности в целом. Поскольку значение статистики Хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым. Это подтверждается таблицей по корреляции Спирмена (таблица 65).

**Таблица 65. Корреляция Спирмена для АТ бляшки и гаплогруппы U**

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

	Гаплогруппа U	Коэффициент корреляции	0,211**	1,000
		Значимость (двух-сторонняя)	0,000**	0,000
		Количество валидных случаев	384	413

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

### **3.9.2. Анализ ассоциации гаплогрупп с факторами риска атеросклероза**

#### **3.9.2.1. Гаплогруппа U у индивидов с гипертонией**

Анализ ассоциации гаплогруппы U с гипертонией приведен в таблицах 66-69.

**Таблица 66. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих гипертонию, с гаплогруппой U**

	Суммарное количество случаев					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		$\Sigma$	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация гипертонии с гаплогруппой U	413	100,0%	0	0,0%	413	100,0%

**Таблица 67. Сопряженность гаплогруппы U с гипертонией**

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

**Таблица 68. Оценка ассоциации гаплогруппы U с гипертонией методом Хи-квадрат**

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

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

**Таблица 69. Отношение шансов гаплогруппы U быть гипертензивной или антигипертензивной\***

Оценка риска
--------------

	Значение	95% доверительный интервал	
		Ниже 95%	Выше 95%
Отношение шансов для гаплогруппы U быть гипертензивной/ антигипертензивной (0,00/1,00)	0,547	0,342	0,877
Для валидных случаев с гипертонией, не ассоциированными с гаплогруппой U (0,00)	0,679	0,497	0,927
Для валидных случаев с гипертонией, ассоциированными с гаплогруппой U (1,00)	1,241*	1,053	1,462
Количество валидных случаев	413		

**Примечание:** \* - участвует перекодированная переменная *U* (смена категорий – отношение  $\frac{\text{---}}{\text{не}}$ ).

Согласно данным, приведенным в таблице 69, вероятность возникновения гипертонии у представителей гаплогруппы U в 1,24 раз выше, чем у совокупности в целом.

Поскольку значение статистики хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым.

### **3.9.2.2. Гаплогруппа U у индивидов с наличием гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ)**

Анализ ассоциации гаплогруппы U с гипертрофией левого желудочка приведен в таблицах 70-73.

**Таблица 70. Обработанные наблюдения по ассоциации участников исследования, имеющих гипертрофию левого желудочка, с гаплогруппой U**

	Суммарное количество случаев					
	Валидные случаи		Невалидные случаи		$\Sigma$	
	Количество	Процент	Количество	Процент	Количество	Процент
Ассоциация гипертрофии левого желудочка с гаплогруппой U	413	100,0%	0	0,0%	413	100,0%



**Таблица 71. Сопряженность гаплогруппы U с гипертрофией левого желудочка**

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

**Таблица 72. Оценка ассоциации гаплогруппы U с гипертрофией левого желудочка методом Хи-квадрат**

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

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

**Таблица 73. Отношение шансов гаплогруппы U быть ассоциированной с гипертрофией левого желудочка \***

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

**Примечание:** \* - участвует перекодированная переменная U (смена категорий – отношение  $\frac{\text{---}}{\text{не}}$ ).

Согласно таблице 73, вероятность возникновения гипертрофии левого желудочка у представителей гаплогруппы U в 1,47 раз выше, чем у совокупности в целом. Поскольку значение статистики хи-квадрат указывает на наличие статистической связи, то данное отношение шансов является значимым.

### **3.10. Ассоциация популяционных гаплогрупп с мутациями митохондриального генома**

Дальнейшие наши исследования были посвящены анализу корреляции популяционных гаплогрупп митохондриального генома с выявленными мутациями.

#### **3.10.1. Гаплогруппа U и митохондриальные мутации**

**Таблица 74. Корреляция гаплогруппы U с уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций**

<b>Мутация</b>	<b>Коэффициент корреляции</b>	<b>Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)</b>
652delG	2,730	0,006**
652insG	0,000	1,000
A1555G	1,555	0,101*
C3256T	1,323	0,186
T3336C	0,419	0,675
C5178A	1,379	0,168
G12315A	1,681	0,093*
G13513A	0,062	0,950

G14459A	0,585	0,559
G14846A	0,709	0,478
G15059A	2,630	0,009**

**Примечание:** \*\* - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ( $p \leq 0,05$ );

\* - корреляция гаплогрупп с мутациями значима на уровне  $p \leq 0,1$ .

Согласно данным таблицы 74, с гаплогруппой U высокодостоверно ассоциированы мутации митохондриального генома 652delG и G15059A, и значимо на уровне  $p \leq 0,1$  – однонуклеотидные замены G12315A и A1555G.

### **3.10.2. Гаплогруппа H и митохондриальные мутации**

**Таблица 75. Корреляция гаплогруппы H с уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций**

<b>Мутация</b>	<b>Коэффициент корреляции</b>	<b>Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)</b>
652delG	0,377	0,706
652insG	0,000	1,000
A1555G	0,293	0,769
C3256T	1,419	0,156
T3336C	0,415	0,815
C5178A	2,249	0,024**
G12315A	0,523	0,601
G13513A	0,232	0,816
G14459A	0,213	0,861
G14846A	0,257	0,797

G15059A	0,378	0,706
---------	-------	-------

**Примечание:**

\*\* - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ( $p \leq 0,05$ ).

Согласно данным таблицы 75, с гаплогруппой Н высокодостоверно ассоциирована мутация митохондриального генома C5178A.

### **3.10.3. Гаплогруппа Т и митохондриальные мутации**

**Таблица 76. Корреляция гаплогруппы Т с уровнем гетероплазии митохондриальных мутаций**

<b>Мутация</b>	<b>Коэффициент корреляции</b>	<b>Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)</b>
652delG	0,649	0,103*
652insG	0,000	1,000
A1555G	1,296	0,195
C3256T	2,237	0,010**
T3336C	2,395	0,001**
C5178A	1,364	0,173
G12315A	1,448	0,148
G13513A	1,944	0,050**
G14459A	0,984	0,325
G14846A	1,653	0,098*
G15059A	2,557	0,007**

**Примечание:**

\*\* - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ( $p \leq 0,05$ );

\* - корреляция гаплогрупп с мутациями значима на уровне  $p \leq 0,1$ .

Согласно данным таблицы 76, с гаплогруппой Т высокодостоверно ассоциированы мутации митохондриального генома C3256T, T3336C, G13513A и G15059A ( $p \leq 0,05$ ), и значимо на уровне  $p \leq 0,1$  – однонуклеотидные замены 652delG и G14846A.

#### **3.10.4. Гаплогруппа М и митохондриальные мутации**

**Таблица 77. Корреляция гаплогруппы М с уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций**

<b>Мутация</b>	<b>Коэффициент корреляции</b>	<b>Асимптоматическая значимость (двухсторонняя)</b>
652delG	1,246	0,213
652insG	0,000	1,000
A1555G	1,794	0,073*
C3256T	0,057	0,954
T3336C	1,651	0,103*
C5178A	3,329	0,001**
G12315A	0,223	0,824
G13513A	1,000	0,317
G14459A	0,402	0,687
G14846A	0,066	0,947
G15059A	0,773	0,440

**Примечание:**

*\*\* - высокодостоверная корреляция гаплогрупп с мутациями ( $p \leq 0,05$ );*

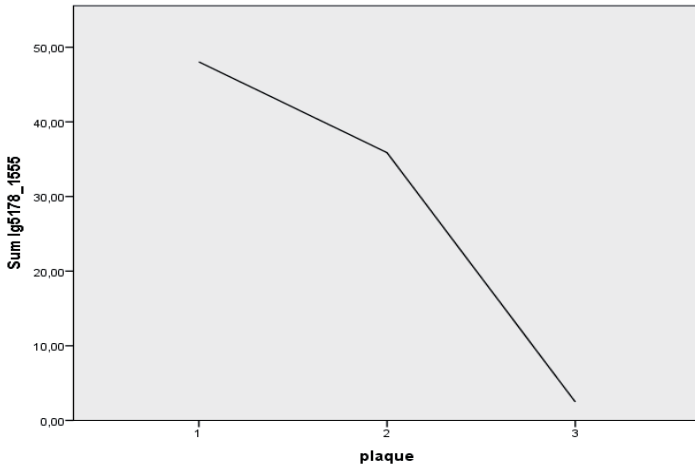
*\* - корреляция гаплогрупп с мутациями значима на уровне  $p \leq 0,1$ .*

Согласно данным таблицы 77, с гаплогруппой М высокодостоверно ассоциирована мутация митохондриального генома C5178A, и значимо на уровне  $p \leq 0,1$  – однонуклеотидные замены A1555G и T3336C.

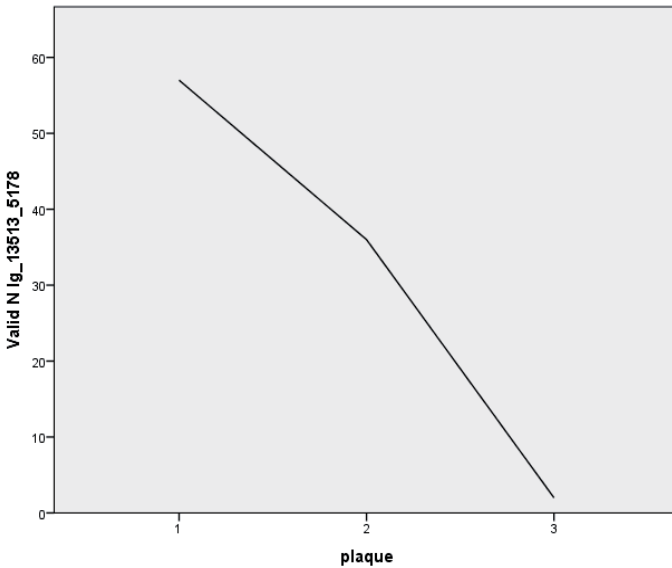
## **11. Гаплотипы мутаций митохондриального генома и атеросклероз**

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 гетероплазмии мутаций одного гаплотипа с одним направлением связи. Распределение исходных значений было лог-преобразовано для того, чтобы исключить возможность смещений. Полученная шкала является относительной. На графиках представлено относительное изменение совместного распределения мутаций по категориям атеросклеротического поражения (рисунки 47-50).

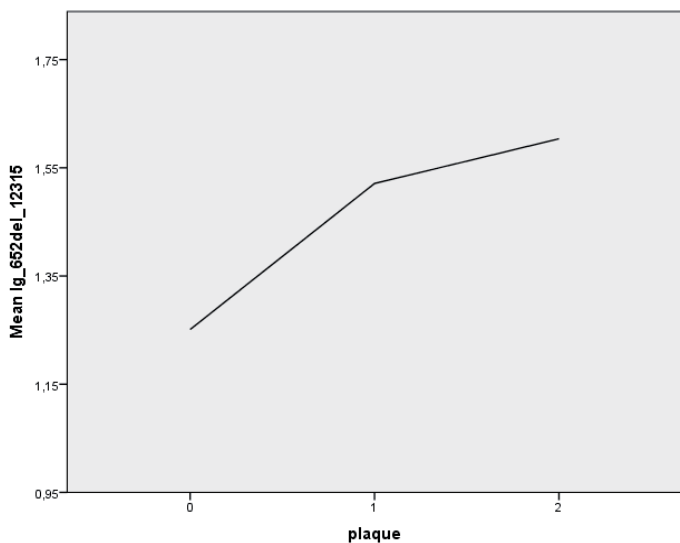


**Рисунок 47. Относительное изменение совместного распределения мутаций A1555G и C5178A по категориям атеросклеротического поражения**

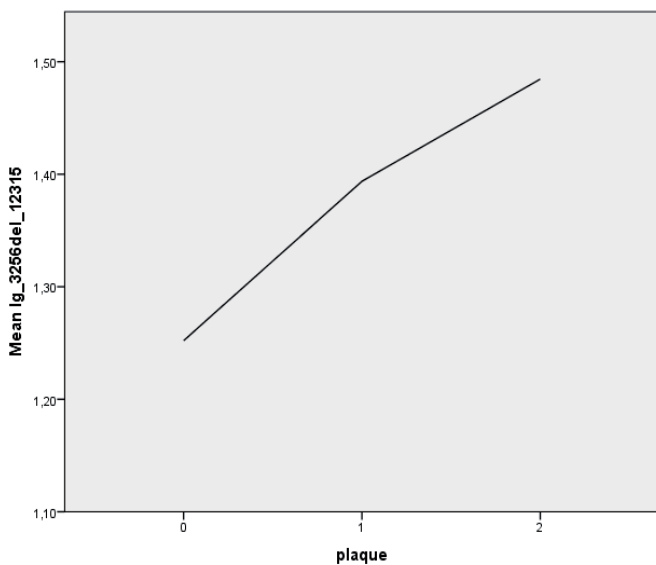


**Рисунок 48. Относительное изменение совместного распределения мутаций C5178A и G13513A по категориям атеросклеротического поражения**





**Рисунок 49. Относительное изменение совместного распределения мутаций 652delG и G12315A по категориям атеросклеротического поражения**



***Рисунок 50. Относительное изменение совместного распределения мутаций C3256T и G12315A по категориям атеросклеротического поражения***

Таким образом, выявлены два преобладающих при атеросклерозе трехмаркерных гаплотипа A1555G-C5178A-G13513A и 652delG-G12315A-C3256T, обусловленные сочетанием пороговых значений уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома.

## ГЛАВА 4. Обсуждение

В возникновении и развитии атеросклеротических поражений интимы артерий большую роль играют клетки крови. При атерогенезе они мигрируют через эндотелий в интимо-медиальный слой сосудов. При этом лимфоциты выполняют сигнальную роль в формировании иммунного и воспалительного ответа, а моноциты формируют макрофагальные клетки, призванные удалять избыток холестерина, накапливающегося в очаге атеросклеротических поражений. Возможная роль мутаций митохондриального генома в возникновении и развитии атеросклероза может заключаться в том, что данные мутации приводят к дефектам белковых цепей ферментов дыхательной цепи митохондрий или транспортных РНК. При этом уровень метаболизма дефектных митохондрий понижается, в результате содержащиеся их мутантные моноциты приобретают склонность к липоидозу. Т.е. итогом патофизиологических процессов, запускаемых мутациями митохондриального генома, является превращение мутантных моноцитов в пенистые клетки.

С целью проверки данного предположения было принято решение о сравнительном анализе уровня гетероплазии в нормальной и пораженной атеросклерозом интиме артерий людей.

Для определения процента гетероплазии в исследуемых образцах автором с сотрудниками был разработан новый оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, основанный на технологии пиросеквенирования. Данный метод оказался пригоден для исследования любых биологических образцов. С помощью него

можно определять уровень гетероплазии как наследственных, так и соматических мутаций митохондриального генома, возникающих в течение жизни индивида или при патологических процессах. Кроме того, оказалось возможным определять процент соматических мутаций ядерного генома, возникающих, например, при возникновении и развитии онкологических процессов.

Схема анализа процента гетероплазии представлена на рисунке 51.

Метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанный автором с сотрудниками на основе технологии пиросеквенирования [82, 88, 96, 97, 104, 105, 453-455] обладает рядом существенных преимуществ по сравнению с другими количественными методами: инвазивного расщепления олигонуклеотидного зонда (Invader), РТ ПАСА-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 [130, 134, 154, 177, 189, 204, 211, 243, 265, 272, 279, 335, 347, 351, 354, 362, 363, 398, 400, 401, 409, 428, 478, 487, 496, 507, 522], применяемыми для анализа мутаций (таблица 78). Как видно из таблицы 78, пиросеквенс обладает наименьшим количеством недостатков и наибольшим количеством достоинств, по сравнению с другими методами измерения процента гетероплазии митохондриального генома. Он предоставляет уникальнейшую возможность анализа очень короткого фрагмента ДНК, содержащего область анализируемой мутации.

**Схема анализа процента гетероплазии  
мутантного аллеля митохондриального генома**



**Рисунок 51. Анализ процента гетероплазии мутаций митохондриального генома с помощью разработанного метода [82, 88, 96, 97, 104, 105, 453-455]**

**Таблица 78. Сравнение методов количественного анализа ДНК**

<b>Метод</b>	<b>Преимущества</b>	<b>Недостатки</b>
Метод пиросеквени-	1. Уникальная возможность анализа	1. Необходимо специальное

<p>рования</p>	<p>очень короткого фрагмента ДНК, в среднем - 5-10 п.н.</p> <p>2. Известна точная природа изменения нуклеотидов</p> <p>3. Можно автоматизировать</p> <p>4. Быстрота</p> <p>5. Можно использовать для SNP-анализа</p> <p>6. Можно анализировать сложные вторичные структуры</p> <p>7. Относительная дешевизна анализа мутаций в одном образце.</p>	<p>оборудование</p> <p>2. Эффективность всех четырех ферментов является критическим моментом для точности процесса</p>
<p>Метод инвазивного расщепления олигонуклеотидного зонда (Invader)</p>	<p>1. Позволяет проводить SNP-анализ в одной реакционной пробирке</p> <p>2. Позволяет использовать автоматическую настройку реакции</p>	<p>1. Требуется длительное время инкубации (3-4 ч)</p> <p>2. Большое количество геномной ДНК (20-100 нг) на одну реакцию</p> <p>3. Трудоемкий процесс подбора</p>

		аллель-специфичных зондов
РТ ПАСА-кПЦР (количественной рефракторной аллель-специфической амплификации в реальном времени)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Простой</li> <li>2. Одноступенчатый</li> <li>3. Быстрый</li> <li>4. Нерадиоактивный</li> <li>5. Чувствительный</li> <li>6. Специфичный</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Сложно подобрать оптимальные аллель-специфические праймеры.</li> <li>2. Сложно подобрать оптимальный режим для РТ ПЦР, так чтобы аллель-специфические праймеры садились именно на нужную последовательность.</li> </ol>
454/Roche	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Высокая длина прочтений</li> <li>2. Для GS Junior – невысокая стоимость прибора и эксперимента</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Высокая стоимость прибора для GS FLX+</li> <li>2. Высокая стоимость эксперимента для GS FLX+</li> </ol>

		<p>3.Высокая стоимость за 1 Мб</p> <p>4.Большой расход растворов, пропускаемых через проточную ячейку</p>
<p><u>Illumina</u> Illumina MiSeq</p>	<p>1.Невысокая стоимость инструмента и эксперимента</p> <p>2.Самая низкая стоимость за 1 Мб среди малых платформ</p> <p>3.Самое быстрое время запуска</p>	<p>1.Относительно короткие прочтения и количество прочтений меньше чем у других продуктов Illumina</p> <p>2.Завышенная стоимость за 1 Мб среди других продуктов Illumina</p>
<p>Illumina HiScanSQ</p>	<p>Разносторонние геномные исследования и прогноз на масштабирование характеристик</p>	<p>Для больших объемов данных – стоимость за 1Гб больше, чем у HiSeq</p>



Illumina GAIIx	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Стоимость прибора ниже, чем у HiSeq</li> <li>2. Большое количество публикаций с использованием этого прибора</li> </ol>	Стоимость за 1Гб больше, чем у HiSeq
Illumina HiSeq 1000 и 2000	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.Наибольшее количество прочтений</li> <li>2.Максимальный выход секвенирования в день и за 1 запуск</li> <li>3.Самая низкая стоимость за 1 Гб среди всех платформ</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.Высокая стоимость прибора</li> <li>2.Повышенные требования к платформам анализа полученного материала</li> </ol>
Applied Biosystems SOLiD	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.Каждый канал проточной пластины может быть проанализирован независимо</li> <li>2.Высочайшая точность секвенирования</li> <li>3.Возможность возобновления неудачных циклов секвенирования</li> <li>4. 96 различных адаптеров для каждого</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.Высокоэффективные приборы стали доступными лишь с середины 2011</li> <li>2.Относительно короткие прочтения</li> <li>3.Большее количество пробелов при сборке</li> </ol>

	<p>канала</p> <p>5.Пропускная способность 10–15 Гб ? день для SOLiD-5500 и 20–30 Гб/день для SOLiD 5500XL</p>	<p>геномов</p> <p>4.Высокая стоимость прибора для SOLiD-5500XL</p>
<p>Метод HRM анализа</p>	<p>1.Низкое потребление реагентов с незначительными потерями: требуется всего лишь 20 мкл ПЦР-смеси для анализа каждого образца, исключая потребность в HPLC- растворителях или DGGE-гелях</p> <p>2.Этап высокочувствительного анализа кривых плавления может быть просто добавлен в конце ПЦР для немедленного анализа</p> <p>3.В отличие от DHPLC, не требуется термическая оптимизация</p> <p>4.Низкое потребление</p>	<p>Метод не адаптирован для количественного анализа процента гетероплазмии митохондриальных мутаций</p>

	<p>образцов: после проведения HRM-анализа продукты ПЦР могут быть использованы в реакции секвенирования по Сенгеру</p> <p>5.Высокое разрешение для точных и воспроизводимых результатов</p>	
Метод TGGE	<p>1.Не требует денатурирующих агентов</p> <p>2.Большая воспроизводимость</p> <p>3.Анализировать фрагменты с размером до 1 000 п. н.</p>	<p>Точная природа нуклеотидного изменения неизвестна</p>
Метод HPLC	<p>1.Высокая точность</p> <p>2.Возможность определения малых количеств веществ</p> <p>3.Высокая эффективность разделения</p> <p>4.Гибкость изменения условий разделения</p> <p>5.Экспрессность</p>	<p>1.Высокая стоимость колонок</p> <p>2.Точная природа нуклеотидного изменения не известна</p> <p>3.Необходимо секвенирование</p>

	<p>анализа</p> <p>6.Сравнительная простота аппаратного оформления</p> <p>7.Возможность автоматизации</p>	<p>для определения природы мутации</p> <p>4.Трудно идентифицировать гетерозиготы</p>
<p>Метод определения гетероплазмии с использованием Surveyor nuclease</p>	<p>1.Прост в применении</p> <p>2.Наличие специализированных наборов для сканирования мутаций</p>	<p>Качественный метод</p>
<p>Метод плюс-минус секвенирования по Сенгеру</p>	<p>1.Использование дидезоксинуклеотидов с флуоресцентными метками с разными длинами волн испускания позволяет проводить реакцию в одной пробирке.</p> <p>2.Секвенаторы такого типа могут проанализировать за один раз последовательности длиной 500—1000</p>	<p>1.Использование радиоактивной метки</p> <p>2.Сложность разделения фрагментов в электрофорезе</p> <p>3.Усложнение за счет использования фага</p> <p>4.Потеря точности при прочтении</p>

	нуклеотидов.	больших фрагментов
Метод SNaPshot	1. Достоверный метод идентификации неохарактеризованных нуклеотидных нарушений, позволяющий впоследствии определить несвоевременные стоп- кодона, миссенс- или молчащие мутации 2. Можно использовать для SNP анализа 3. Возможность автоматизации	1. Результаты относительны 2. Малая точность данных 3. Требуется нормирование результатов

Размер такого фрагмента ДНК, в среднем, составляет 5-10 п.н., что существенно уменьшает вероятность допущенных при анализе ошибок. Вследствие этого метод, разработанный автором с коллегами на основе технологии пиросеквенирования [82, 88, 96, 97, 104, 105, 453-455], 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.

Следует подчеркнуть, что при изучении роли мутаций митохондриального генома в патологии человека имеет смысл

оценивать те из них, которые могут приводить к фенотипическим изменениям. К таким изменениям можно отнести проявления различных заболеваний у человека, в том числе полигенных мультифакториальных патологий, к которым относится атеросклероз.

Разработанный оригинальный метод изучения мутаций митохондриального генома позволил обнаружить три новые мутации - 652delG, 961delC и 5132insAA, ранее не описанные в литературе [454]. Две из них принадлежат гену 12 субъединицы рибосомальной РНК, а последняя – гену субъединицы 2 NADH дегидрогеназы.

В настоящем исследовании впервые были получены данные о том, что различные участки интимы аорты, как нормальной, так и имеющей атеросклеротические поражения различной степени тяжести, могут различаться между собой по уровню гетероплазмии мутантного аллеля митохондриального генома. Из 42 исследованных мутаций сорок оказались гетероплазмичными (652delG, T716G, A750G, 961delC, A1555G, C3256T, T3258C, T3271C, A3280G, C3285T, G3316A, T3336C, 5132insAA, C5178A, G5540A, T5692C, T5814C, C6489A, T8993G, T8993C, G9379A, 9480del15, 9537delC, G12315A, G13513A, G14459A, C14482A, C14482G, T14484C, T14487C, T14709C, G14846A, G15059A, 652insG, 961insC, G15084A, 5132delAA, del15498 to 15521, C15452A, G15762A, а две (T8362G и G8363A) – гомоплазмичными по отсутствию мутантного аллеля при атеросклерозе.

В настоящем исследовании выявлено, что преобладающими мутациями в большинстве атеросклеротических поражений являются 652delG, A1555G, C3256T, T3336C, C5178A, G12315A, G13513A, G14459A,

652insG, G14846A, G15059A. Одни из них являются атерогенными, другие – проявляют антиатерогенный эффект. Согласно данным литературы, данные мутации ассоциированы с различными патологиями (таблица 79). Следует подчеркнуть, что в нашем исследовании выявлена ассоциация ранее нигде не описанной мутации 652delG с атеросклерозом.

**Таблица 79. Данные о патологиях, вызываемых исследованными мутациями [110, 158, 174, 182, 224, 241, 259, 261, 262, 266, 300, 336, 368, 389, 443]**

Ген	Мутация	Патология
Ген 12S рРНК	652insG	Митохондриальные миопатии
	A1555G	Тугоухость, индуцированная аминогликозидами и беспричинная потеря слуха, чувствительность к аминогликозидным антибиотикам; глухота
Ген тРНК - Leu (кодон узнавания UUR)	C3256T	MELAS , энцефалопатия, лактоцидоз, миопатия, кардиомиопатия, инсультподобный удар в правом париетоокципитальном районе головного мозга, окислительный дефект мышечного метаболизма

Ген субъединицы 1 NADH дегидрогеназы	T3336C - молчащая мутация, аминокисло- та остается прежней	Сахарный диабет типа 2
Ген субъединицы 2 NADH дегидрогеназы	C5178A (вызывает замену лейцина на метионин)	Острый инфаркт миокарда, сахарный диабет типа 2
Ген тРНК-Leu (кодон узнавания CUN)	G12315A	Прогрессирующая хроническая внешняя офтальмоплегия (паралич мышцы глаза); блефароптоз (опущение верхнего века, обусловленное нарушением функции мышцы, поднимающей его); слабость конечностей; нейросенсорная потеря слуха и пигментная ретинопатия
Ген субъединицы 5 NADH дегидрогеназы	G13513A	Синдром Ли (наследственная энцефаломиопатия); синдром Вольфа -



		Паркинсона –Уайта (синдром преждевременного возбуждения желудочков) и кардиомиопатия
Ген субъединицы 6 NADH дегидрогеназы	G14459A (замена аланина на валин в 72-ой аминокислотной позиции, находящейся в наиболее консервативном районе белка ND6)	Наследственная невропатия глаза (атрофия зрительного нерва, LHON - наследственная зрительная невропатия Лебера) Ассоциирована с дисфункцией базальных ганглиев, мышечной спастичностью и энцефалопатией
цитохрома B	G14846A (замена глицина на серин в позиции 34 (G34S), что ослабляет ферментную функцию цитохрома B)	Митохондриальные миопатии
	G15059A	Митохондриальные

	(нонсенс- мутация, в результате которой амино- кислота глицин в позиции 190 заменяется на стоп-кодон, вызывающий остановку трансляции, уменьшение размера белка и потерю 244 аминокислот С-конца белка. Ослабляет ферментную функцию цитохрома В)	миопатии
--	---	----------

Делеция гуанина в позиции 652 митохондриального генома приводит к дефекту малой субъединицы (12S) рибосомальной РНК. С большой вероятностью, функция мутантных рибосом становится угнетенной либо происходит их

полная дисфункция. В митохондриях уменьшается экспрессия белковых субъединиц ферментов дыхательной цепи, следствием которой является уменьшение количества данных ферментов. Конечным итогом данного патофизиологического процесса может быть возникновение и развитие атеросклеротических поражений.

В то же время инсерция гуанина в позиции 652 митохондриального генома, по всей видимости, стабилизирует субъединицу 12S рибосомальной РНК и, следовательно, рибосому. Это приводит к увеличению экспрессии белковых цепей ферментов дыхательной цепи митохондрий, увеличению количества данных ферментов и запуску физиологических процессов в клетках, которые, в конечном результате, защищают организм от атеросклероза.

Однонуклеотидная замена A1555G также локализована в гене рибосомальной РНК 12S. Данная мутация, вероятно, стабилизирует рибосому, аналогично 652insG, следствием чего является ее антиатерогенный эффект.

Мутация C3256T локализована в 25 нуклеотиде тРНК-Leu (кодон узнавания UUR), который является последним нуклеотидом в области терминации транскрипции. Терминация (окончание синтеза белка) осуществляется, когда в А-сайте митохондриальной рибосомы оказывается один из стоп-кодонов - UAG, UAA, UGA. Из-за отсутствия тРНК, соответствующих этим кодонам, пептидил-тРНК остается связанной с Р-сайтом рибосомы. Здесь в действие вступают специфические белки RF1 или RF2 (узнают разные кодоны), которые катализируют отсоединение полипептидной цепи от мРНК, а также RF3, вызывающий диссоциацию мРНК из рибосомы. В случае, если лейцин является последней

аминокислотой в белке, а терминация транскрипции нарушена, итоговый полипептид не отделяется от рибосомы, что ведет за собой целый ряд негативных для клетки последствий: субъединицы рибосом, связанные с полипептидами, не могут использоваться для дальнейшего синтеза, равно как и полипептиды, связанные с рибосомой, не могут использоваться по назначению. В связи с этим правильно функционирующих белков дыхательной цепи становится меньше нормы, что приводит к падению интенсивности синтеза АТФ.

Мутация Т3336С (ген первой субъединицы NADH-дегидрогеназы) вызывает замену последовательности АТТ на АТС, не приводящую к изменению аминокислотной последовательности белка (молчащая мутация). Возможно, ассоциация гетероплазмии этой мутации с атеросклерозом объясняется тем, что данная мутация входит в состав гаплотипа, ассоциированного с митохондриальной дисфункцией.

При однонуклеотидной замене С5178А, локализованной в гене второй субъединицы NADH-дегидрогеназы, происходит замена лейцина на метионин. Данная мутация, вероятно, приводит к дисфункции фермента, способствующей возникновению атеросклеротических поражений. Некоторые исследователи предполагают, что мутация С5178А защищает интиму от атеросклероза [368]. Однако полученные нами данные не подтверждают это предположение, т.к. процент мутации С5178А в атеросклеротических поражениях различной степени тяжести оказался значительно выше, чем в нормальной интиме. В частности, он оказался выше в пораженных атеросклерозом участках начального поражения интимы (жировых точках и жировых полосах), липофиброзных и

фиброзных бляшках, суммарном атеросклеротическом поражении морфологически картированных аорт и гомогенатов. Это подтверждается данными литературы [389]. Что касается данных пилотного исследования на 7 аортах, где был обнаружен антиатерогенный эффект данной мутации, то там могла сыграть роль недостаточность выборки, что подтвердилось нашими дальнейшими исследованиями.

Следует отметить, что при мутации G12315A изменяется нуклеотид 52 транспортной РНК-Leu (кодон узнавания CUN), входящий в состав стебелька Т-петли. Общие принципы складывания цепей тРНК в компактную третичную структуру (L-форму) универсальны. При этом D- и Т-петли оказываются сближенными и скрепляются между собой путем образования дополнительных связей между основаниями (трехнуклеотидная структура). В образовании этих связей, как правило, принимают участие консервативные или полуконсервативные остатки. Одним из них для тРНК-Leu и является нуклеотид 52 (гуанин, функциональная группа, присоединенная к пуриновому кольцу =O). При замене гуанина на аденин (функциональная группа, присоединенная в том же месте к пуриновому кольцу - NH<sub>2</sub>) третичная структура тРНК нарушается, что ведет к ее нефункциональности. Итогом такого развития событий является меньшая интенсивность формирования комплексов тРНК-Leu и, как следствие, понижение вероятности корректного включения данной аминокислоты в полипептидные цепи. Следствием критического уровня гетероплазии по мутации G12315A, по всей видимости, является снижение количества ферментов дыхательной цепи в митохондриях, ведущее к падению уровня выработки энергии в клетке.

При мутации G13513A происходит замена аспарагиновой кислоты на аспарагин в позиции 393 пятой белковой субъединицы NADH-дегидрогеназы, в области, функцией которой является перенос электрона с NADH на убихинон в дыхательном комплексе 1. В результате мутирования аспарагиновая кислота, обладающая дополнительной кислотной группой, которая несет отрицательный заряд, заменяется на аспарагин - аминокислоту, не несущую дополнительного заряда, так как в ее структуру входят 2 радикала, компенсирующие заряды друг друга. В связи с этим в регионе "Oxidored\_q1" изменяется уровень заряда, и, вероятно, такое событие ведет за собой увеличение эффективности переноса электрона с NADH на убихинон. Комплекс 1 дыхательной цепи начинает работать в измененном режиме. Вследствие этого в клетке может возрасти продукция энергии. Обращает на себя внимание то, что однонуклеотидная замена гуанина на аденин в позиции митохондриального генома 13513 начинает проявлять антиатерогенный эффект по отношению к атеросклеротическим бляшкам сонных артерий на уровне гетероплазии 65%. В то же время по отношению к утолщению интимо-медиального слоя сонных артерий антиатерогенный эффект начинает проявляться уже на уровне 34%. Это позволяет предположить, что аллель 13513A включается в патофизиологический механизм, препятствующий образованию модифицированных липопротеидов, играющих ключевую роль в формировании атеросклеротических бляшек в интима артерий, когда процент гетероплазии данного аллеля составит более 65. Т.е. мутантных геномов в митохондриях будет более двух третей. В таком случае мы начинаем иметь дело не с дефектной NADH-дегидрогеназой, а, если можно так

сказать, усовершенствованным ферментом с антиатеросклеротическим эффектом.

Однонуклеотидная замена G14459A, принадлежащая гену шестой субъединицы NADH-дегидрогеназы, ведет к замене аланина на валин в 72-ой аминокислотной позиции наиболее консервативного региона шестой белковой цепи фермента. Мутация приводит к дисфункции NADH-дегидрогеназы, что является, по-видимому, пусковым механизмом патофизиологического процесса, приводящего к атеросклерозу.

Мутация G14846A ведет к изменению аминокислотного состава цитохрома В, который является частью комплекса III дыхательной цепи. N-терминальный конец цитохрома В отвечает за заякоривание белка в мембране. При мутировании меняется аминокислота глицин на серин, что создает дополнительный сайт фосфорилирования белковой цепи. По всей видимости, высокий уровень гетероплазмии по данной мутации приводит к конкурентному преимуществу клетки и препятствует образованию атеросклеротических поражений.

Нонсенс-мутация G15059A приводит к замене глицина в позиции 190 в цитохроме В на стоп-кодон, вызывающий остановку трансляции, уменьшение размера белка и потерю 244 аминокислот С-конца белка. Цитохром В является частью комплекса III дыхательной цепи, функцией которого является перенос электронов на цитохром С и параллельный выброс четырех протонов в межмембранное пространство митохондрий. Результатом гетероплазмии по данной мутации является ослабление ферментной функции цитохрома В, приводящее к митохондриальной дисфункции.

Большинство типов атеросклеротических поражений аорт оказалось ассоциировано с мутациями C3256T, T3336C,

C5178A, G12315A, G14459A и G15059A, что может говорить о том, что ключевым моментом в запуске патофизиологических механизмов, результатом которых является формирование атеросклеротических поражений в аортах человека, являются дефекты транспортных РНК-Leu (кодоны узнавания UUR и CUN) , а также 1, 2 и 6 субъединиц NADH-дегидрогеназы и цитохрома В.

Обращает на себя внимание тот факт, что спектр мутаций при различных типах атеросклеротического поражения интимы аорты может несколько отличаться. Например, мутация A1555G проявила антиатерогенный эффект в начальном атеросклеротическом поражении (жировых точках и жировых полосах) и липофиброзных бляшках. В то же время антиатерогенная мутация G14846A оказалась характерной только для липофиброзных бляшек.

В фиброзных бляшках спектр мутаций значительно отличался от других типов атеросклеротических поражений. Проатерогенными мутациями оказались C5178A и C3256T, антиатерогенной мутацией - G12315A. По-видимому, дефектные по G12315A транспортные РНК-Leu (кодон узнавания CUN) играют существенную роль в патофизиологическом процессе возникновения и развития атеросклеротических поражений до тех пор, пока не начинается стадия фиброзной бляшки, где процент гетероплазии по данной мутации падает до такой степени, что в нормальной интима он оказывается выше, чем в данном типе атеросклеротического поражения. Уровень гетероплазии некоторых других мутаций митохондриального генома, по-видимому, в фиброзных бляшках снижается и перестает отличаться от данного параметра в нормальной интима аорт.



Интересно, что шесть преобладающих в разных типах атеросклеротических поражений мутаций С3256Т, Т3336С, С5178А, G12315А, G14459А и G15059А оказались также ассоциированы с атеросклерозом как в суммарных гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорт, так и в суммарном атеросклеротическом поражении участков морфологически картированных аорт.

При исследовании клеток крови участников исследования, у которых наличие атеросклероза было определено с помощью ультразвукографии, оказалось, что преобладающей проатерогенной мутацией как в атеросклеротических бляшках, так и в патологическом утолщении интимы-медии является G12315А. Антиатерогенными мутациями оказались G13513А и G14846А. Аналогичная корреляция характерна и для атеросклеротического поражения интимы аорт.

В то же время мутации 652delG, Т3336С и G14459А 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.

Обращает на себя внимание мутация G15059А, преобладающая при патологическом утолщении интимы сонных артерий. Данная замена гуанина на аденин в позиции 15059 гена цитохрома В, по всей видимости, играет существенную роль в патофизиологическом механизме утолщения сосудистой стенки сонной артерии.

Мутации G13513А и G14846А как в суммарном атеросклеротическом поражении интимы аорт, так и в атеросклеротических бляшках и патологическом утолщении интимы-медии сонных артерий проявляют антиатерогенный

эффект. Можно предположить, что данные мутации генов 5 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.

В целях последующей молекулярно-генетической диагностики атеросклероза в клетках крови участников исследования была проведена детекция порогового значения процента гетероплазии каждой мутации, после которого у индивида начинается возникновение и развитие атеросклеротических поражений, а для антиатерогенных мутаций – начинает проявляться антипатологический эффект. Следует подчеркнуть, что выбор оптимального порогового значения базировался на одновременной максимизации значений чувствительности и специфичности. Выявленное хорошее совпадение порогового значения процента гетероплазии исследованных 11 мутаций митохондриального генома для атеросклеротических бляшек и патологического утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий может свидетельствовать об общих патофизиологических механизмах образования данных поражений интимы сонных артерий человека.

Согласно результатам, полученным в настоящей работе, накопление митохондриальных дефектов происходит с возрастом, т.к. между старением индивида и увеличением уровня гетероплазии мутаций имеется высокодостоверная положительная корреляция для G12315A, G14459A и G15059A.

Эти данные свидетельствуют о накоплении копий мутантного митохондриального генома в течение жизни индивида. В то же время значимая отрицательная корреляция с возрастом критического уровня гетероплазмы антиатерогенных однонуклеотидных замен G13513A и G14846A говорит о том, что генетическая защита против атеросклероза (а, возможно, и от других патологий) с увеличением возраста индивида ослабевает.

Накопление мутантных копий митохондриальной ДНК с возрастом может иметь несколько причин. Во-первых, возможно, мутации являются соматическими и происходят в наиболее подверженных мутированию областях митохондриального генома. Эта теория подтверждается тем фактом, что митохондриальная ДНК обладает высокой мутабельностью за счет повышенной концентрации активных форм кислорода в митохондриях, а также отсутствием у мтДНК гистонов и малой эффективности системы репарации. Но, тем не менее, соматические митохондриальные мутации являются весьма маловероятными событиями в течение жизни одного индивида. Другим объяснением накопления мутантной мтДНК может быть избыточная пролиферация клеток или митохондрий, содержащих мутантный аллель, передавшийся по наследству по материнской линии. Вполне вероятно, что накопление мутантных молекул мтДНК и увеличение уровня гетероплазмы митохондриальных мутаций происходит под влиянием совокупности обоих приведенных факторов. Полученные данные доказывают, что наличие гетероплазмы мутаций мтДНК в клетках крови может не приводить к развитию патологий, связанных с полным нарушением функций продукта гена, в котором происходит мутация. Такая картина вполне

соответствует данным ряда исследований, показавших, что для проявления у индивида клинических признаков митохондриальных заболеваний уровень гетероплазии мтДНК обычно должен превысить некий порог, выше которого влияние дефектов генов митохондриального генома становится фенотипически значимым [378, 469]. Кроме того, эксперименты по слиянию митохондрий с наличием и отсутствием мутации показали, что функции клеток, связанные с работой дыхательной цепи, могут оставаться в норме при сосуществовании внутри клетки нормальных и дефектных мтДНК [408]. Напомним, что основными продуктами кодирования мтДНК являются компоненты дыхательной цепи митохондрий. Наличие мутации мтДНК в состоянии гетероплазии может не приводить к полному блокированию дыхательной цепи в митохондриях, но следствием мутации является частичное нарушение дыхательной функции клетки за счет изменения структуры продуктов, кодируемых мтДНК. Это, в свою очередь, приводит к митохондриальной дисфункции, что может стать причиной патологических процессов в тканях, содержащих клетки с повышенным уровнем мутантной мтДНК.

Снижение эффективности функционирования дыхательной цепи, наблюдающееся при ряде мутаций митохондриального генома, может играть роль в формировании атеросклеротической бляшки в том случае, если мутация локализована в митохондриальном геноме макрофагальных клеток, механизм влияния которых на атерогенез был описан ранее. При недостаточном уровне выработки АТФ, который необходим для всех метаболических процессов, макрофаги в очаге формирования АСБ не могут синтезировать достаточное количество ферментов-липаз, работающих в лизосомах,

которые призваны перерабатывать модифицированные липопропротеиды, узнаваемые скэвенджер-рецепторами. Таким образом, клетки склонны накапливать избытки эфиров холестерина и усугублять патологический процесс, оставаясь в стенке сосуда и превращаясь в пенистые клетки. К вышесказанному стоит добавить, что в результате мутирования не только может падать уровень выработки энергии в клетке, но и накапливаются дефектные продукты синтеза, на утилизацию которых клеткам приходится тратить энергию, которой и так меньше, чем необходимо.

Следует отметить, что совокупная мутационная нагрузка по исследованным одиннадцати митохондриальным мутациям ассоциирована более, чем с 84% случаев возникновения атеросклеротических бляшек и патологического утолщения интимо-медиального слоя сонных артерий, что говорит о высокой диагностической ценности комплексного анализа данных мутаций при атеросклерозе.

В настоящей работе была выявлена ассоциация мутаций митохондриального генома с инфарктом миокарда, болью за грудиной и гипертрофией левого желудочка. Обращает на себя внимание положительная корреляция мутации C5178A со всеми тремя представленными факторами риска атеросклероза, и отрицательная корреляция мутации G12315A (ген тРНК-Leu) - с двумя из них (ИМ и ГЛЖ). Можно предположить, что однонуклеотидная замена C5178A, приводящая к дефекту фермента NADH-дегидрогеназы, усугубляет не только течение атеросклероза, но и развитие таких патологий, как ИМ, БЗГ и ГЛЖ. В то же время G12315A, повреждающая тРНК-Leu и ассоциированная с большинством атеросклеротических поражений, имеет антипатологический

эффект при инфаркте миокарда, боли за грудиной и гипертрофии левого желудочка. Так как данная мутация отрицательно коррелирует с возникновением фиброзных бляшек в интима аорты, можно предположить общность антипатологических механизмов при развитии ИМ, БЗГ, ГЛЖ и фиброзных бляшек.

Мутация G14846A проявила антипатологический эффект не только при атеросклерозе, но и при инфаркте миокарда, что также может свидетельствовать о том, что данная мутация гена фермента дыхательной цепи цитохрома В включается в защитные физиологические механизмы при данных заболеваниях.

Как с болью за грудиной, так и с атеросклерозом положительно коррелировала однонуклеотидная замена G14459A гена 6 субъединицы NADH-дегидрогеназы, что говорит об общности патофизиологических механизмов этих болезней. Однако отрицательная корреляция с БЗГ мутации G15059A гена цитохрома В, ассоциированной с атеросклерозом, говорит о том, что данная мутация включена в патогенез атеросклероза, но для БЗГ имеет антипатологический эффект.

На различие патофизиологических процессов возникновения БЗГ и ГЛЖ указывает отрицательная корреляция мутации G14459A с гипертрофией левого желудочка, в то время как при БЗГ наблюдается положительная корреляция с данной мутацией.

Молчащая мутация T3336C, и, по всей видимости, сцепленный с ней гаплотип, имеют антипатологический эффект по отношению к ГЛЖ, в то время, как данная мутация ассоциирована с атеросклерозом. Это может служить

подтверждением различия патофизиологических механизмов при гипертрофии левого желудочка и атеросклерозе.

Таким образом, выявленные общие для атеросклеротических поражений, ИМ, БЗГ и ГЛЖ мутации митохондриального генома могут служить доказательством общности патофизиологических процессов при данных заболеваниях. Например, общим пусковым механизмом для развития данных патологий может быть дефект фермента дыхательной цепи митохондрий. В то же время мутации, выявленные при одних патологиях, и отсутствующие при других, показывают, дефекты каких ферментов или транспортных РНК могут направить патофизиологический процесс в том или ином направлении.

Не только мутации, но и популяционные гаплогруппы митохондриального генома оказались ассоциированными с атеросклерозом и его факторами риска. Например, гаплогруппа U является атерогенной, а гаплогруппы M и T имеют антиатерогенный эффект. Кроме того, гаплогруппа U ассоциирована с факторами риска атеросклероза – гипертонией и гипертрофией левого желудочка. Это позволяет предположить, что совокупность полиморфных сайтов популяционной гаплогруппы U способствует возникновению атеросклероза и его факторов риска или «утяжеляет» течение данных патологий. В то же время, вполне возможно, что набор полиморфизмов, характерных для гаплогрупп M и T, препятствует возникновению атеросклеротических поражений или облегчает течение атеросклероза.

Интересно, что популяционная гаплогруппа U оказалась ассоциирована как с атеросклерозом, так и с выявленными атерогенными мутациями 652delG, G12315A и G15059A, что

может свидетельствовать о том, что данные мутации могут иметь не только соматическую, но и наследственную природу, и сцеплены с данной гаплогруппой. В то же время можно предположить, что именно на данной гаплогруппе более легко происходит соматическое мутирование в позициях 652, 12315 и 15059 митохондриального генома человека.

Обращает на себя внимание ассоциация антиатерогенной гаплогруппы Т с мутациями G13513A и G14846A, отрицательно коррелировавшими с атеросклеротическими поражениями. Кроме того, антиатерогенная популяционная гаплогруппа М оказалась ассоциированной с однонуклеотидной заменой A1555G, также отрицательно коррелировавшей с атеросклерозом. Это позволяет предположить, что данные мутации возникли соматически именно на гаплогруппах Т и М в позициях 14846 и 1555 (соответственно), либо были наследственно на них закреплены.

Выявленные в нашем исследовании преобладающие при атеросклеротических поражениях сонных артерий гаплотипы, основанные значения критического уровня гетероплазии мутантных аллелей однонуклеотидных замен митохондриального генома A1555G-C5178A-G13513A и 652delG-G12315A-C3256T, 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 патофизиологических механизмов их одновременного возникновения при соматическом мутировании, наличии в митохондриальном геноме «горячих



точек», в которых мутации происходят с повышенной вероятностью.

Следует отметить, что детализация представлений о механизмах влияния митохондриальных мутаций на атерогенез является приоритетной задачей дальнейшей работы в лаборатории, так как понимание процессов, посредством которых исследованные в данной работе мутации влияют на атерогенез, может внести существенный вклад в расширение знаний о патогенетических механизмах формирования атеросклеротических поражений на молекулярном уровне.

К сожалению, проведенное исследование имеет некоторые ограничения.

По данным литературы, существуют ядерные копии более 600 различных участков митохондриального генома [314, 526]. Более 100 из них даже содержат полноразмерные копии генов. Была проведена проверка вероятности отжига праймеров на митохондриальных псевдогенах в составе ядерного генома, т.к. изначально последовательности праймеров для данной работы были взяты из статей, описывающих ассоциацию различных цитопатий с мутациями митохондриального генома. Результаты поиска с использованием ресурса BLAST [280] показали, что для каждого исследованного ПЦР-фрагмента (за исключением двух: первого, включавшего мутации С8362А и Т8363С, а также второго, содержащего мутации G14459А, С14482G/А, Т14484С и Т14487С) существует от одной до пяти копий фрагментов в ядерном геноме. Отжиг использованных праймеров на ядерном геноме был теоретически возможен. В то же время параллельный митохондриальному синтез ПЦР-фрагментов с использованием матрицы ядерного генома мог всего лишь уменьшить значение процента гетероплазии исследуемых

мутаций, так как в ядерных копиях, как правило, содержится нормальный вариант нуклеиновой кислоты в исследованном локусе [21]. Вероятность того, что в ядро клетки была перенесена мутантная копия митохондриального генома, весьма незначительна. Скорее всего, мутация эволюционно произошла гораздо позднее, чем данная копия попала в ядерный геном.

В настоящее время в нашей лаборатории ведется исследование данной проблемы. Для нуклеотидной последовательности каждого ПЦР-фрагмента и всех его ядерных гомологов проведен поиск сайтов рестрикции. Выбраны сайты, присущие ядерному гомологу, но не присущие фрагменту митохондриального генома. В качестве контроля прохождения рестрикции параллельно для каждого амплификата была поставлена рестрикция ферментами, имеющими сайты лишь для митохондриальной копии фрагмента. Для всех найденных сайтов проведен рестрикционный анализ соответствующими ферментами. Предварительные результаты показали, что отжиг праймеров на ядерном геноме не наблюдался, а, следовательно, ошибок при определении уровня мутантного аллеля митохондриального генома не происходило.

Объяснить отсутствие комплементарности использованных в работе праймеров ядерным копиям митохондриального генома можно объяснить тем, что копияность митохондриального генома многократно превышает таковую для ядерного генома, так как в каждой митохондрии может присутствовать несколько кольцевых молекул ДНК, а клетка может содержать от одной до нескольких сотен митохондрий. В связи с этим количество использованной

матрицы могло быть достаточным для прохождения ПЦР на матрице митохондриального генома, и недостаточным - для наработки ядерного амплификата..

Следует отметить, что в настоящей работе разработаны подходы к генетической диагностике предрасположенности к атеросклерозу у людей. Используя относительно малое количество генетических маркеров, оказалось возможным объяснить 84% вариабельности атеросклеротических поражений, что значительно превышает диагностические характеристики любого из традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний. Результаты исследования подтверждают наши предположения о том, что мутации митохондриального генома играют значительную роль в возникновении и развитии атеросклероза. Практическим результатом данного исследования может стать разработка диагностической тест-системы для выявления генетической предрасположенности к атеросклерозу. Дальнейшие исследования могут быть направлены на поиски новых генетических маркеров - мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклеротическими поражениями, а также на проведение проспективных эпидемиологических исследований для оценки сердечно-сосудистого риска, обусловленного данными мутациями. Среди приоритетных направлений дальнейшей работы следует указать детализацию молекулярных механизмов влияния мутаций митохондриального генома на атерогенез.

## **Глава 5. Заключение**

Генетические подходы к улучшению здоровья населения становятся все более универсальными. Новые генетические технологии и методы диагностики требуют пересмотра стратегии профилактики и лечения полигенных мультифакториальных заболеваний, что может дать для Российской Федерации значительный материальный эффект.

Следует подчеркнуть, что исследование, проводившееся в рамках данной работы, носит пионерский характер. Метод оценки процента гетероплазмии мутаций митохондриального генома, разработанный в нашей лаборатории на основе метода пиросеквенирования, ранее ни кем, кроме автора с коллегами, не применялся, и впоследствии может найти широкое применение как в медицинских учреждениях, так и в коммерческих диагностических центрах.

## Список литературы

1. Автандилов Г.Г. Динамика атеросклеротического процесса у человека. // М.: Мед.,1970.
2. Авцын А. П. Ведение в географическую патологию. // М. Мед. 1972.
3. Анастеади В.Х., Нагорнев В.А. Морфогенез атеросклероза. // Кишинев: Штиинца,1982.
4. Анастеади В.Х., Нагорнев В.А. Ультраструктурные основы атеросклероза артерий. // Кишинев: Штиинца,1983.
5. Анастеади В.Х., Нагорнев В.А. О пато- и морфогенезе атеросклероза (клинико-экспериментальные аспекты). // Арх. пат – 1984. – Т.46., №3. –С. 10-13.
6. Аничков Н.Н. О начальных стадиях развития атеросклероза артерий. // Современные проблемы кардиологии. М.: Мед., 1960.- С. 7-18.
7. Аничков Н.Н. Основные теоретические положения к дальнейшему изучению проблемы атеросклероза. // Атеросклероз. Л.: Мед., 1965. - С. 14-21.
8. Аничков Н.Н. Сосуды. В кн: Частная патологическая анатомия. // М.: Мед.,1947. - С. 262-557.
9. Аничков Н.Н. Цинзерлинг В.Д. Современное состояние проблемы атеросклероза. // Атеросклероз. М.: Мед.,1953. - С. 7-18.
10. Бабаев В.Р. Изменение фенотипа гладкомышечных клеток артерий человека при атеросклерозе: Автореферат дис. докт. мед. наук - Москва,1992.
11. Бабаев В.Р., Сухова Г.К., Бобрышев Ю.В. Сироткин В.Н., Тарарак Э.М. Моноцитарно-макрофагальная инфильтрация в

участках ранних атеросклеротических поражений аорты человека. // Арх. пат. – 1991. – Т.10.–С. 48-53.

12. Бабаев В.Р., Бобрышев Ю.В., Стенина О.И., Тарарак Э.М. Фенотипические варианты гладкомышечных клеток в атероматозных бляшках человеческой аорты. // Арх. пат.– 1990. – Т.52., №5. –С. 16-21.

13. Бобрышев Ю., Орехов А. Клеточные механизмы атеросклероза. Архитектоника поражений и роль дендритных клеток. // LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH, 2012.- 172 с. ISBN: 978-3-8465-0426-0

14. Бобрышев Ю.В., Карагодин В.П., Ковалевская Ж.И., Шапырина Е.В., Каргаполова Ю.М., Галактионова Д.Ю., Саламов В.И., Орехов А.Н. Пролиферация клеток при различных типах поражения сонных и коронарных артерий. // Проблемы и перспективы современной науки. - 2011.- Т.3, №1. - С.80-83

15. Букринский М.И., Свиридов Д.Д., Карагодин В.П., Собенин И.А., Сазонова М.А., Коренная В.В., Орехова В.А., Иванова М.И., Мясоедова В.А., Мельниченко А.А., Савинкова И.Г., Орехов А.Н. Повреждение механизма обратного транспорта холестерина, вызванное вирусом иммунодефицита человека: роль ABCA1-зависимого пути. // Бюллетень московского общества испытателей природы, отдел биологический. - 2009. - Т. 114 - Вып. 3, Прил. 1, Ч. 3. - С. 297-301.

16. Вихерт А.М., Жданов В.С. Атеросклероз при различных заболеваниях. // М.: Мед.,1976 - С. 208-210.

17. Вихерт А.М., Жданов В.С. Роль возрастных и приспособительных изменений сосудистой стенки в атерогенезе в свете учения академика И.В.Давыдовского об атеросклерозе. // Арх. пат.– 1988. – Т.50. , №3. –С. 8-16.

18. Вихерт А. М. Ритмические структуры аорты у детей и лиц молодого возраста. // Арх. пат. – 1987. – Т.5–С. 16-21.
19. Вихерт А.М., Розина В.Н. Морфогенез ранних долипидных стадий атеросклероза. // Арх. пат. – 1983. – Т.45., №6. –С. 3-12.
20. Вихерт А.М., Розина В.Н. Эндотелий артерий при атеросклерозе у человека. // Бюлл. ВКНЦ АМН СССР. – 1981. – Т.4., №1. –С. 9-14.
21. Газиев А.И., Шайхаев Г.О. Ядерно-митохондриальные псевдогены. // Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44, № 3. – С.405-417.
22. Денисенко А.Д., Виноградов А.Г., Нагорнев В.А. и др. Взаимодействие макрофагов с аутоиммунным комплексом липопротеид-антитело. // Иммунология. – 1989. – Т.2.– С. 32-35.
23. Жданов В.С. Морфологические особенности развития и течения коронарного атеросклероза. // Кардиология.– 1989. – Т.11.–С. 43-46.
24. 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. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2012. -№3. - С.124-129.
25. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Роль мутаций митохондриального генома человека в развитии сахарного диабета 2 типа, артериальной гипертонии и различных видов кардиомиопатии. // Проблемы и перспективы современной науки, 2011. - Т.3, №1. - С.85-87.
26. Желанкин А.В., Сазонова М.А., Коробов Г.А., Хасанова З.Б., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Детекция

замены тимина на цитозин в позиции 3336 митохондриального генома при атеросклеротических поражениях человека. // Современный мир, природа и человек, 2011. - Т.2 , №1. -С.59-61.

27. Иванова М.М., Бородачев Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2012. – Т.3 - С.115-122.

28. Иванова М.М., Сазонова М.А., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Мутации митохондриального генома в патологии человека. // Фундаментальные науки и практика, 2010. - Т.1, №4. - С.164-167.

29. Иванова М.М., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Генетические детерминанты атеросклероза, локализованные в первой хромосоме человека. // Актуальные проблемы современной науки, 2012.-Т.1, №2. - С.47-53.

30. 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.

31. Игамбердиев А.У. Уникальная генетическая система митохондрий. // Соросовский образовательный журнал – 2000. – Т.6, № 1. – С.34.

32. Иоффе В.И., Зубжицкий Ю.Н., Нагорнев В.А., Климов А.Н. Иммунологическое исследование экспериментального атеросклероза. // Бюлл. экспер. биол. – 1973. - Т. 6. - С.72-76.

33. Климов А.Н. Причины и условия развития атеросклероза. // В кн.: Биохимические основы патогенеза атеросклероза. Л., 1980. - С.3-45.



34. Климов А.Н. Предпосылки аутоиммунной теории патогенеза атеросклероза. // Иммунореактивность и атеросклероз. Л.: Мед.,1986.
35. Климов А.Н. Иммунореактивность и атеросклероз. // Л.: Мед., 1986 - С. 192.
36. Климов А.Н. Аутоиммунная теория атерогенеза и концепция модифицированных липопротеидов. // Вестн. АМН СССР. – 1990. – Т.11.–С.30-36.
37. Климов А.Н., Нагорнев В.А. Методические аспекты этиологии и патогенеза атеросклероза. // Кардиология. – 1993. – Т.3.– С. 5-10.
38. Климов А.Н., Нагорнев В.А., Денисенко А.Д. Изучение иммунологических механизмов развития атеросклероза и новые методы его диагностики и лечения. // Мед. академ. ж. – Т.5, №2. – С. 18-32.
39. Климов А.Н, Нагорнев В.А, Денисенко А.Д., Константинов В.О. Аутоиммунная теория патогенеза атеросклероза и новые пути его лечения. // Вестник РАМН. – 2003. – Т.12. – С. 29-34.
40. Климов А.В., Никуличева Н.Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. // Л.: Мед.,1984.
41. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. // СПб.: Питер. Ком., 1999.
42. Косицкий Г.И. (ред.) Превентивная кардиология. // Москва: Медицина, 1987 -С. 239-316.
43. Коробов Г.А., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Регуляторное действие интерлейкинов при атеросклерозе. // Актуальные проблемы современной науки. - 2012. – Т.1, №2. – С.29-31.
44. 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 C5178A гена субъединицы 2 NADH дегидрогеназы в гомогенатах пораженной интимы аорты. // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2012. -Т. 13, Ст. 75. -С. 895-899.

45. Ланкин В.3., Закирова А.Н., Касаткина Л.В., Котелевцева Н.В., Титов В.Н. Перекиси липидов и атеросклероз. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в крови больных ишемической болезнью сердца. // Кардиология. – 1980. - №7. - С. 69-72.

46. Митрофанов, А.В Желанкин, М.А. Сазонова, И.А. Собенин, А.Ю. Постнов. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека. // Кардиологический вестник. - 2012. Т.7 (19) , № 1.- С.57-61.

47. Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Сазонова М.А., Собенин И.А., Постнов А.Ю.. Ассоциация мутаций митохондриального генома с развитием инфаркта миокарда. // Атеросклероз и дислипидемии. - 2013. - № 2. –С.56-61.

48. 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.

49. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А. Связь мутаций митохондриального генома человека с клиническими проявлениями ишемической болезни сердца. // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011. – Т.3, №1. –С.92-96.

50. Митрофанов К.Ю., Сазонова М.А., Собенин И.А., Орехов А.Н. Ядерные мутации, вызывающие развитие инфаркта миокарда у человека. // Актуальные проблемы современной науки. – 2012. – Т.1, №2. – С.36-39.

51. Мясоедова ВА. Гендерные различия в развитии субклинического атеросклероза при начальных проявлениях недостаточности мозгового кровообращения: Автореф. дис. канд. мед. наук. - Москва, 2011.- 24 с.
52. Мясников А.Л. Гипертоническая болезнь и атеросклероз. // М.: Медицина. – 1965.
53. Нагорнев В.А. Атерогенез и иммунное воспаление. // Бюл. exper. биол. – 1996. – Т.7.–С. 4-6.
54. Нагорнев В.А. Кинетика клеточных элементов сосудистой стенки при атеросклерозе. // Арх. пат.– 1988. – Т.10. –С. 89-95.
55. Нагорнев В.А. Кинетика клеток сосудистой стенки и атерогенез. // Арх. пат.– 1998. – Т.1.–С. 39-43.
56. Нагорнев В.А. Методология в изучении проблемы атеросклероза. // Мед. acad. ж.– 2005. – Т.5., №3. – С. 121-133.
57. Нагорнев В.А. Патогенез атеросклероза. // СПб.: ЗАО Хромис - 2006.
58. Нагорнев В.А., Анестиади В.Х., Зота Е.Г. Атерогенез. // Кишинев - СПб, 2001. - 330 с.
59. Нагорнев В.А., Бобрышев Ю.В, Ивановский Ю.В., Богачев Ю.В. Роль моноцитов-макрофагов в атерогенезе. // Арх. пат. – 1991. – Т.53., №3. – С. 23-29.
60. Нагорнев В.А., Бобрышев Ю.В., Ивановский Ю.В., Кузнецов А.С. Роль моноцитов в развитии атеросклеротических поражений аорты у кроликов. // Арх. пат. – 1983. – Т.45, №6. – С. 19-26.
61. Нагорнев В.А., Бобрышев Ю.В., Попов А.В., Виноградов А.Г. Транспорт бета-липопротеидов через эндотелий при экспериментальной гиперхолестеринемии (электронно-радиоавтографическое исследование). // Арх. пат. – 1982. – Т.44, №1. – С. 10-17.

62. Нагорнев В.А., Восканьяни А.Н. Атерогенез как иммуновоспалительный процесс. // Вестник РАМН. – 2004. – Т.7. – С. 3-11.
63. Нагорнев В.А., Восканьянц А.Н., Виноградов А.Г. и др. // Цитотоксический эффект липопротеидов низкой плотности. // Бюлл. exper. биол. – 2003. – Т.135, №1. – С. 107-109.
64. Нагорнев В.А., Журавлева Т.Б., Бобрышев Ю.В. Структурно-функциональная характеристика внутренней поверхности коронарных артерий сердца человека при атеросклерозе. // Арх. пат. – 1989. – Т.51.– С. 15-23.
65. Нагорнев В.А., Ивановский Ю.В, Бобрышев Ю.В. и др. Современные представления о морфогенезе атеросклероза и развитие идей Н.Н. Аничкова. // Актуальные проблемы патогенеза атеросклероза. Л., 1985. - С. 3-25.
66. Нагорнев В.А., Зота Е.Г. Цитокины, иммунное воспаление и атеросклероз. // Успехи соврем, биологии. - 1996. Т. II 6, №3 - С. 320-331.
67. Нагорнев В.А., Кетлинский С.А. Клеточно-молекулярные механизмы становления и развития атерогенеза (СО40-СО40L-иммунорегуляторный сигнал). // Бюлл. exper. биол. – 1999. – Т.10 – С. 364-371.
68. Нагорнев В.А., Мальцева С.В. Аутоиммунные и воспалительные механизмы развития атеросклероза. // Арх. пат. – 2005. – Т.5. – С. 6-15.
69. Нагорнев В.А., Мальцева С.В. Роль инфекции в развитии иммунного воспаления и патогенезе атеросклероза. // Арх. пат. – 2000. – Т.6. – С. 53-59.
70. Нагорнев В.А., Мальцева С.В., Восканьяни А.Н. Эволюция взглядов на роль макрофагов в атерогенезе от Н.Н.

Аничкова до наших дней. // Арх. пат.. – 2003. – Т.65., №2. – С. 8-12.

71. Нагорнев В.А., Мальцева С.В., Пигаревский П.В и др.//Роль *Chlamydia pneumoniae* в патогенезе атеросклероза. // Мед. академ. ж. – 2002. – Т.2, №3. – С. 18-28.

72. Нагорнев В.А., Мальцева С.В., Селиверстова В.Г. и др. *Chlamydia pneumoniae* как патогенетический фактор риска в развитии атеросклероза и его осложнений. // Арх. пат. – 2004. – Т.66, №2. – С. 52-59.

73. Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., Восканьянц А.Н., Яковлева О.А. Современные взгляды на проблему патогенеза атеросклероза с позиций инфекционной патологии. // Вестник РАМН. – 2002. – Т.12.– С. 9-15.

74. Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., Огурцов Р.Г., Денисенко А.Д. Атеросклероз и система иммунитета. // Арх. пат. – 1985. – Т.47, №4. – С. 15-22.

75. Нагорнев В.А., Попов А.В, Плесков В.М, Бобрышев Ю.В. Ультраструктурные особенности трансформации макрофагов в пенистые клетки в опытах *in vitro*. // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 1985. – Т.99, №5. – С. 617-619.

76. Нагорнев В.А., Яковлева О.А., Рабинович В С. Атерогенез и воспаление. // Мед. академ. ж. – 2001. – Т.1, №1. – С. 139-150.

77. Орехов А.Н. Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия. // Palmarium Academic Publishing GmbH, 2013. - 536 с. ISBN: 978-3-659-98213-2.

78. Орехов А.Н., Тертов В.В., Собенин И.А. Модифицированные липопротеиды и атеросклероз. Обнаружение, характеристика, механизмы модификации,

атерогенность. // LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH, 2012. - 295 с. ISBN: 978-3-8433-8798-9.

79. Попов А.В. Превращения плазменных липопротеидов в артериальной стенке: Автореферат дис. докт. мед наук. – Л., 1983.

80. Постнов А. Ю., Сазонова М.А., Собенин И.А. Прямая количественная оценка аллеля митохондриального генома, первые результаты: ассоциация с атеросклерозом. // Молекулярная диагностика-2010: Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Москва. - 2010. - Том III. -С.109-112.

81. Руденская Г.Е., Захарова Е.Ю., Адарчева Л.С., Михайлова Е.Н., Карлова И.З. Наследственная атрофия зрительных нервов Лебера: неврологические и другие внеглазные проявления. // Журнал неврологии и психиатрии. – 2004. – Т.2, №40.

82. Сазонова М.А., Андрианова И.В., Будников Е.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома. // XV Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докладов (Москва. 14-18 апреля 2008). – Москва, 2008. - С. 414.

83. 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 G14459A в гомогенатах имтимы аорты человека. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2013. - №1. – С.40-44.

84. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М. Уровень гетероплазмии митохондриальной мутации C5178A в

тотальных гомогенатах пораженной атеросклерозом интимы аорты. // Вестник уральской медицинской академической науки. - 2012. – Т.2, №39. – С.73-74.

85. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М., Митрофанов К.Ю., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Анализ мутации митохондриального генома A1555G при атеросклерозе интимы аорты человека. // Современный мир, природа и человек. – 2011. - Т.2, №1. –С.67-69.

86. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М., Орехов А.Н., Постнов А.Ю. Анализ митохондриальной мутации A1555Gв тотальных гомогенатах атеросклеротических поражений.// Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. – Т. 2, №39. – С.72-73.

87. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Коробов Г.А., Иванова М.М., Постнов А.Ю., Собенин И.А. Мутации митохондриального гена 12S рРНК при атеросклерозе. // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии, фармакологии и медицине. – 2011. – № 2. – С.283-284.

88. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Прямая количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома. // Фундаментальные науки и практика. - 2010. – Т.1, №2. – С.19-21.

89. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Ассоциация мутации митохондриального генома 652insG с атеросклеротическими

поражениями человека. // *Фундаментальные науки и практика.* – 2010. – Т.1, №4. – С.168-171.

90. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Коробов Г.А., Мясоедова В.А., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Детекция митохондриальной делеции гуанина в позиции 652 при атеросклеротических поражениях человека. // *Проблемы и перспективы современной науки.* – 2011. – Т.3, №1. – С.105-107.

91. Сазонова М.А., Иванова М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Хасанова З.Б., Собенин И.А., Мясоедова В.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Детекция мутации митохондриального генома человека 652insG при атеросклеротических поражениях сосудов человека. // *Молекулярная диагностика-2010: Сборник трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием.* Москва. - 2010. - Том V. – С.109-112.

92. Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Желанкин А.В., Иванова М.М., Митрофанов К.Ю., Собенин И.А., Постнов А.Ю.. Ассоциация мутаций митохондриальных генов субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH-дегидрогеназы с липофиброзными бляшками аорты человека. // *Кардиологический вестник.* - 2013. – Т.8 (20), № 1. – С. 32-35.

93. Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Чичёва М.М, Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Постнов А.Ю., Собенин И.А.. Детекция митохондриальных мутаций генов цитохромов В и С в липофиброзных бляшках интимы аорты человека. // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* - 2012. - № 4. – С.62-66.



94. Сазонова М.А., Синёв В.В., Чичёва М.М., Желанкин А.В., Митрофанов К.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.. Анализ гетероплазмы некоторых генов субъединиц NADH дегидрогеназы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорты. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2012. - № 4. – С.71-74.
95. Сазонова М.А. , Синёв В.В., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Орехов А.Н., Собенин И.А.. Ассоциация гетероплазмы мутаций митохондриальных генов РНК с гомогенатами пораженной атеросклерозом интимы аорты. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2012. - № 4. – С.67-70.
96. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А.. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2011.- №4. – С.81-84.
97. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Орехов А.Н. «Способ количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома в лейкоцитах крови человека». // Патентная заявка от 14.12.2009. Входящий № 065647, регистрационный № 2009146012.
98. Саркисов Д.С., Колокольчикова Е.Г, Варава Б.Н., Принцева О.Ю., Тюрин А.В. К вопросу о морфогенезе утолщения интимы, наблюдаемых при неспецифическом аортоартериите. // Бюлл. экспер. биол. мед. – 1986. – Т.8. – С. 233-235.
99. Саркисов Д.С., Пожарисский К.М., Аничков Н.М.. Н.Н. Аничков. // М.: Мед., 1989. - 81с.
100. 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.

101. Собенин И.А., Мясоедова В.А., Сазонова М.А., Кириченко Т.В., Чупракова О.В., Кожевникова Ю.А., Орехова В.А., Рудимов Е.Г., Орехова Е.А., Савинкова И.Г., Неробов П.Л., Орехов А.Н. Разработка метода комплексной оценки риска развития сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений на основе анализа генотипа и фенотипа: Сборник тезисов. Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2009 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы». (Москва, 25-27 ноября 2009 г.). – Москва, 2009. – С.134-135.

102. Собенин И., Орехов А. Принципы патогенетической терапии атеросклероза. Использование клеточных моделей. // LAPLAMBERT Academic Publishing GmbH, 2012. - 254 с. ISBN: 978-3-8473-7691-0.

103. Собенин И.А., Сазонова М.А., Мясоедова В.А., Кириченко Т.В., Иванова М.М., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Полиморфизм 3256С/Т митохондриальной ДНК как маркер ишемической болезни сердца и атеросклероза. // Проблемы и перспективы современной науки. – 2011 – Т.3, №1. -С. 108-110.

104. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н. Способ генетической диагностики предрасположенности к атеросклерозу. // Патентная заявка от 10.08.2010, регистрационный № 2010133468.

105. Собенин И.А., Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Романенко Е.Б., Орехов А.Н. Способ генодиагностики сердечно-

сосудистых заболеваний. // Патентная заявка от 11.10.2010, регистрационный № 2010141594.

106. Струков А.И. Некоторые вопросы изучения об ишемической болезни сердца. // Кардиология. – 1973. – Т.10. – С. 5-17.

107. Султаналиев А.Н., Жданов В.С. Липоидоз интимы коронарных артерий сердца у новорожденных и детей первого года жизни. // Арх. пат. – 1985. – Т.47, №10. – С. 36-42.

108. Сумароков АБ, Панкратова ВН, Лякишев АА, Авдеева ИЮ. Изучение Chlamydia pneumoniae при атеросклерозе. // Клини. Мед. – 1999. - №10 - С.4-7.

109. Сухоруков В.С. Нарушения клеточной энергетики // Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава РФ, 2002.

110. Andreu A.L., Bruno C., Shanske S., Shtilbans A., Hirano M., Krishna S., Hayward L., Systrom D.S., Brown R.H. Jr., DiMauro S. Missense mutation in the mtDNA cytochrome b gene in a patient with myopathy. // Neurology. 1998, 51 (5), P.1444-1447.

111. Agaton C., Unneberg P., Sievertzon M. et al. Gene expression analysis by signature pyrosequencing. // Gene. –2002.Vol.289, №1 (2). - P. 31-39.

112. Al-Fakhri N., Wilhelm J., Hahn M., Heidt M., Hehrlein F.W., Endisch A.M., Hupp T., Cherian S.M., Bobryshev Y.V., Lord R.S., Katz N. Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM-15 and ADAM-9 following upregulation of integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 in atherosclerosis. // J. Cell. Biochem. -2003.Vol.89, №4. - P. 808-823.

113. Alizadeh Dehnavi R., de Roos A., Rabelink T.J., van Pelt J., Wensink M.J., Romijn J.A., Tamsma J.T. Elevated CRP levels are associated with increased carotid atherosclerosis independent of

visceral obesity. // *Atherosclerosis*.– 2008.Vol.200, №2. - P. 417-423.

114. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Futcher A.B., Greider C.W., Harley C.B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992.Vol.89. - P.10114-10118.

115. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J., Staden R., Young I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. // *Nature*.– 1981. Vol.290, №5806. - P.457-465.

116. Andreassi M.G. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. // *Mutat. Res*. – 2003. Jan.V.543, №1 - P. 67-86. Review.

117. Abd El-Aziz T.A., Hussein Y.M., Mohamed R.H., Shalaby S.M. Renin-angiotensin system genes polymorphism in Egyptians with premature coronary artery disease. // *Gene*. – 2012. Vol.498, №2. - P. 270-275.

118. Andreassi M.G., Botto N., Colombo M.G., Biagini A., Clerico A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? // *Environ. Mol. Mutagen*. – 2000. V.35, №4. - P.265-269. Review

119. Aschoff L. Atherosclerosis, in lectures on pathology. // Hoeber. N.Y., - 1924.-P.131-153.

120. Arai H., Hiro T., Kimura T., Morimoto T., Miyauchi K., Nakagawa Y., Yamagishi M., Ozaki Y., Kimura K., Saito S., Yamaguchi T., Daida H., Matsuzaki M. More intensive lipid lowering is associated with regression of coronary atherosclerosis in diabetic patients with acute coronary syndrome-sub-analysis of

JAPAN-ACS study. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2010. Vol.17, №10. - P. 1096-1107.

121. Araujo V.P., Aguiar-Oliveira M.H., Oliveira J.L., Rocha H.M., Oliveira C.R., Rodrigues T.M., Nunes M.A., Britto I.M., Ximenes R., Barreto-Filho J.A., Meneguz-Moreno R.A., Pereira R.M., Valenca E.H., Oliveira-Neto L.A., Vicente T.A., Blackford A., Salvatori R. Arrest of atherosclerosis progression after interruption of GH replacement in adults with congenital isolated GH deficiency. // *Eur. J. Endocrinol.* – 2012. Vol.166, №6. - P. 977-982.

122. Arbustini E., Fasani R., Morbini P., Diegoli M., Grasso M., Dal Bello B., Marangoni E., Banfi P., Banchieri N., Bellini O., Comi G., Narula J., Campana C., Gavazzi A., Danesino C., Viganò M. Coexistence of mitochondrial DNA and beta myosin heavy chain mutations in hypertrophic cardiomyopathy with late congestive heart failure. // *Heart.* – 1998. Vol.80, №6. - P. 548-558.

123. Arvanitis D.A., Flouris G.A., Spandidos D.A. Genomic rearrangements on VCAM1, SELE, APEG1 and AIF1 loci in atherosclerosis // *J. Cell. Mol. Med.* - 2005. Vol.9, №1. - P. 153-159.

124. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. // *Science.* 1997. Vol.275, №5302. -P. 964-967.

125. Asif A.R., Hecker M., Cattaruzza M.. Disinhibition of SOD-2 expression to compensate for a genetically determined NO deficit in endothelial cells-brief report. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. Vol.29, №11. -P. 1890-1893.

126. Aviv A., Chen W., Gardner J.P., Kimura M, Brimacombe M., Cao X., Srinivasan S.R., Berenson G.S. Leukocyte telomere

dynamics: longitudinal findings among young adults in the Bogalusa Heart Study. // *Am. J. Epidemiol.* -2009. Vol.169. - P. 323-329.

127. Babaya N., Ikegami H., Fujisawa T., Nojima K., Itoi-Babaya M., Inoue K., Nakura J., Abe M., Yamamoto M., Jin J.J., Wu Z., Miki T., Fukuda M., Ogihara T. Association of I27L polymorphism of hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene with high-density lipoprotein cholesterol level. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003.Vol. 88, №6. - P. 2548-2551.

128. Bacci S., Rizza S., Prudente S., Spoto B., Powers C., Facciorusso A., Pacilli A., Lauro D., Testa A., Zhang Y.Y., Di Stolfo G., Mallamaci F., Tripepi G., Xu R., Mangiacotti D., Aucella F., Lauro R., Gervino E.V., Hauser T.H., Copetti M., De Cosmo S., Pellegrini F., Zoccali C., Federici M., Doria A., Trischitta V. The ENPP1 Q121 variant predicts major cardiovascular events in high-risk individuals: evidence for interaction with obesity in diabetic patients. // *Diabetes.*– 2011. Vol. 60, №3. -P. 1000-1007.

129. Bachen E.A., Muldoon M.F., Matthews K.A., Manuck S.B. Effects of hemoconcentration and sympathetic activation on serum lipid responses to brief mental stress. // *Psychosom. Med.* 2002., Vol.64, №4. -P. 587-594.

130. Bai R.K., Wong L.J. Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach. // *Clin. Chem.*-2004. Jun., Vol.50, №6. - P. 996-1001.

131. Baldassarre D., Castelnuovo S., Frigerio B., Amato M., Werba J.P., De Jong A., Ravani A.L., Tremoli E., Sirtori C.R. Effects of timing and extent of smoking, type of cigarettes, and concomitant risk factors on the association between smoking and subclinical atherosclerosis. // *Stroke.*– 2009. Vol.40, №6. - P. 1991-1998.

132. Ballinger S.W., Shoffner J.M., Hedaya E.V., Trounce I., Polak M.A., Koontz D.A., Wallace D.C. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. // *Nat. Genet.* – 1992. Vol.40, №1(1). - P. 11-15.
133. Bang O.Y., Saver J.L., Liebeskind D.S., Lee P.H., Sheen S.S., Yoon S.R., Yun S.W., Kim G.M., Chung C.S., Lee K.H., Ovbiagele B. Age-distinct predictors of symptomatic cervicocephalic atherosclerosis. // *Cerebrovasc. Dis.* -2009. Vol.27, №1. - P. 13-21.
134. Bannwarth S., Procaccio V., Paquis-Flucklinger V. Surveyort Nuclease: A New Strategy for a Rapid Identification of Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations in Patients With Respiratory Chain Defects. // *Hum. Mutat.* – 2005. Vol.25. - P. 575-582.
135. Baracca A., Barogi S., Carelli V., Lenaz G., Solaini G. (2000) Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. // *J. Biol. Chem.* - Feb 11, Vol.275, №6. - P.4177-4182.
136. Barlovic D.P., Soro-Paavonen A., Jandeleit-Dahm K.A. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. // *Clin. Sci. (Lond).* – 2011. Vol.121, №2 - P. 43-55.
137. Barton M. Obesity and aging: determinants of endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. // *Pflugers. Arch.* – 2010. Vol.460, №5. - P. 825-837.
138. Baumgart D., Haude M., Gorge G., Liu F., Ge J., Grosse-Eggebrecht C., Erbel R., Heusch G. Augmented alpha-adrenergic constriction of atherosclerotic human coronary arteries // *Circulation.* – 1999. Vol.99, №16. - P. 2090-2097.
139. Ben Assayag E., Shenhar-Tsarfaty S., Bova I., Berliner S., Usher S., Peretz H., Shapira I., Bornstein N.M. Association of the -

757T>C polymorphism in the CRP gene with circulating C-reactive protein levels and carotid atherosclerosis // *Thromb. Res.* - 2009. Vol.124, №4. - P. 458-462.

140. Benditt E.P. Implications of the monoclonal character of human atherosclerotic plaques // *Am. J. Pathol.* – 1997. Vol. 86. – P. 693-702.

141. Benditt E.P. The origin of atherosclerosis // *Sci. Am.* – 1997. Vol.236. – P. 74-85.

142. Benditt E.P., Barret T., McDougall J.T. Viruses in the aetiology of arteriosclerosis. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1983. Vol.80. - P.6386-6389.

143. Bentley D.R. Whole-genome resequencing. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* - 2006.Vol.16. - P. 545–552.

144. Berenson G.S., Srinivasan S.R., Bao W. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults // *N. Engl. J. Med.* – 1998.Vol. 338. – P.1650-1656.

145. Berg K., Svindland A., Smith A.J., Lawn R.M., Djurovic S., Alestrom A., Alestrom P., Eliassen K. Spontaneous atherosclerosis in the proximal aorta of LPA transgenic mice on a normal diet. // *Atherosclerosis.* – 2002. Vol.163, №1. - P. 99-104.

146. Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M., Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Lusis A.J. Atherosclerosis: basic mechanism oxidation, inflammation, and genetic // *Circulation.* – 1995. Vol. 91. – P.2488-2496.

147. Bhagwat A.G., Roberstson A.L. Distribution and severity of atherosclerosis in the human thoracic aorta // *Angiology.* – 1973. Vol. 24. – P. 181-190.

148. Bhat H.K., Hiatt W.R., Hoppel C.L., Brass E.P. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral



peripheral arterial disease. // *Circulation*. - 1999, Vol.99, №6. - P. 807-812.

149. Bielecka-Dabrowa A., Barylski M., Mikhailidis D.P., Rysz J., Banach M. HSP 70 and atherosclerosis--protector or activator? // *Expert. Opin. Ther. Targets*. – 2009. Vol. 13. – P. 307-317.

150. Bishop F.K., Maahs D.M., Snell-Bergeon J.K., Ogden L.G., Kinney G.L., Rewers M. Lifestyle risk factors for atherosclerosis in adults with type 1 diabetes. // *Diab. Vasc. Dis. Res*. – 2009. Vol.6, №4. -P. 269-275.

151. Bocan T.M., Guyton J.R. Human aortic fibrolipid lesions. Progenitor lesions for fibrous plaques, exhibiting early formation of the cholesterol-rich core // *Am. J. Pathol*. – 1985.Vol. 120. – P. 193-206.

152. Bocan T.M., Schifani T.A., Guyton J.R. Ultrastructure of the human aortic fibrolipid lesion. Formation of the atherosclerotic lipid-rich core // *Am. J. Pathol*. – 1986.Vol. 123. – P. 413-424.

153. Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G. Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity // *Handb. Exp. Pharmacol*. – 2005. Vol. 170. – P. 645-663.

154. Bornstein B., Mas J.A., Patrono C., Fernandez-Moreno M.A., Gonzalez-Vioque E., Campos Y., Carrozzo R., Martin M.A., del Hoyo P., Santorelli F.M., Arenas J., Garesse R. Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. // *Biochem. J*. – 2005. Vol.387, №3. - P. 773-778.

155. Botto N., Berti S., Manfredi S., Al-Jabri A., Federici C., Clerico A., Ciofini E., Biagini A., Andreassi M.G. Detection of mtDNA with 4977 bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of

patients with coronary artery disease. // *Mutat. Res.* – 2005. Vol. 570, №1. - P. 81-88.

156. Bressler J., Folsom A.R., Couper D.J., Volcik K.A., Boerwinkle E. Genetic variants identified in a European genome-wide association study that were found to predict incident coronary heart disease in the atherosclerosis risk in communities study. // *Am. J. Epidemiol.* – 2010. Vol.171, №1. - P. 14-23.

157. Brevetti G., Schiano V., Chiariello M. Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? // *Atherosclerosis.* – 2008.Vol. 197. – P. 1-11.

158. Brown M.D., Voljavec A.S., Lott M.T., Torroni A., Yang C.C., Wallace D.C. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Genetics.* - 1992. Vol.130, №1. - P. 163-173.

159. Brown X.Q., Bartolak-Suki E., Williams C., Walker M.L., Weaver V.M., Wong J.Y. Effect of substrate stiffness and PDGF on the behavior of vascular smooth muscle cells: implications for atherosclerosis. // *J. Cell. Physiol.* -2010.Vol.225, №1, -P. 115-122.

160. Burchard H.U., Tischendorf F.W. The effects of the intake of cod liver oil on the blood lipid level, the lipoprotein profile and bleeding time. // *Z. Ernährungswiss.* – 1989. Vol.28, №1. -P. 84-91.

161. Caesar R., Fak F., Backhed F. Effects of gut microbiota on obesity and atherosclerosis via modulation of inflammation and lipid metabolism. // *J. Intern. Med.*- 2010. Vol.268, №4. -P. 320-328.

162. Campbell G.R., Campbell J.H., Manderson J.A., Horrigan S., Rennick R.E. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 1988.Vol. 112. – P. 977-986.

163. Campbell L.A., Kuo C.C. Chlamydia pneumoniae - an infectious risk factor for atherosclerosis? // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. Vol. 2. – P. 23-32.
164. Campbell G.R., Campbell J.H. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis // Exp. Mol. Pathol. – 1985.Vol. 42. – P. 139-162.
165. Castillo-Diaz S.A., Garay-Sevilla M.E., Hernandez-Gonzalez M.A., Solis-Martinez M.O., Zaina S. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries. // Int. J. Mol. Med.- 2010. Vol.26, №5. -P. 691-700.
166. Castro E., Edland S.D., Lee L., Ogburn C.E., Deeb S.S., Brown G., Panduro A., Riestra R., Tilvis R., Louhija J., Penttinen R., Erkkola R., Wang L., Martin G.M., Oshima J. Polymorphisms at the Werner locus: II. 1074Leu/Phe, 1367Cys/Arg, longevity, and atherosclerosis. // Am. J. Med. Genet. -2000. Vol.95, №4. -P. 374-380.
167. Cutler R. G. Cross-linkage hypothesis of aging: DNA adducts in chromatin as a primary aging process. // In: Aging, carcinogenesis and radiation biology. New York, 1976. - P. 443-492.
168. Chai S., Chai Q., Danielsen C.C., Hjorth P., Nyengaard J.R., Ledet T., Yamaguchi Y., Rasmussen L.M., Wogensen L. Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis. // Circ. Res. – 2005. Vol.96, №5. - P. 583-591.
169. Chamkha I., Mkaouar-Rebai E., Aloulou H., Chabchoub I., Kifagi C., Fendri-Kriaa N., Kammoun T., Hachicha M., Fakhfakh F. A novel m.3395A>G missense mutation in the mitochondrial ND1

gene associated with the new tRNA(Ile) m.4316A>G mutation in a patient with hypertrophic cardiomyopathy and profound hearing loss. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol.404, №1. - P. 504-510.

170. Chamley-Campbell J.H., Campbell G.R. What controls smooth muscle phenotype? // *Atherosclerosis*. – 1981.Vol. 40. – P. 347-357.

171. Chazov E.I., Repin V.S., Orekhov A.N., Antonov A.S., Preobrazhensky S.N., Soboleva E.L., Smirnov V.N. Atherosclerosis: what has been learned studying human arteries. // *Atherosclerosis Reviews*. – 1987. - Vol.14. -P. 7-60.

172. Chen F.L., Liu Y., Song X.Y., Hu H.Y., Xu H.B., Zhang X.M., Shi J.H., Hu J., Shen Y., Lu B., Wang X.C., Hu R.M. A novel mitochondrial DNA missense mutation at G3421A in a family with maternally inherited diabetes and deafness. // *Mutat. Res.* – 2006. Vol.602, №1-2. - P. 26-33.

173. Chen H., Yu M., Li M., Zhao R., Zhu Q., Zhou W., Lu M., Lu Y., Zheng T., Jiang J., Zhao W., Xiang K., Jia W., Liu L. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. // *Mol. Cell. Biochem.* - 2012.Vol.363, №1-2. -P. 85-91.

174. Chen H., Zheng J., Xue L., Meng Y., Wang Y., Zheng B., Fang F., Shi S., Qiu Q., Jiang P., Lu Z., Mo J.Q., Lu J., Guan M.X. The 12S rRNA A1555G mutation in the mitochondrial haplogroup D5a is responsible for maternally inherited hypertension and hearing loss in two Chinese pedigrees. // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2012. Vol.20, №6. -P. 607-612.

175. Chen Q., Reis S.E., Kammerer C., Craig W., McNamara D.M., Holubkov R., Sharaf B.L., Sopko G., Pauly D.F., Merz C.N., Kamboh M.I.; WISE study group Association of anti-oxidized LDL and candidate genes with severity of coronary stenosis in the Women's Ischemia Syndrome Evaluation study. // *J. Lipid. Res.* 2011. Vol.52, №4. -P. 801-807.
176. Chen S.N., Cilingiroglu M., Todd J., Lombardi R., Willerson J.T., Gotto A.M. Jr, Ballantyne C.M., Marian A.J. Candidate genetic analysis of plasma high-density lipoprotein cholesterol and severity of coronary atherosclerosis // *BMC Med. Genet.* - 2009. Vol.10. - P. 111-114.
177. Chen T.J., Boles R.G., Wong L.J. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. // *Clin Chem.*– 1999. Aug., Vol.45, №8 (Pt 1). – P.1162-1167.
178. Chien K.L., Hsu H.C., Chen Y.C., Su T.C., Lee Y.T., Chen M.F. Association between sequence variant of c.553 G > T in the apolipoprotein A5 gene and metabolic syndrome, insulin resistance, and carotid atherosclerosis. // *Transl. Res.* - 2009. Vol.154, №3. -P. 133-141.
179. Chironi G., Walch L., Pernollet M.G., Gariepy J., Levenson J., Rendu F., Simon A. Decreased number of circulating CD34+KDR+ cells in asymptomatic subjects with preclinical atherosclerosis. // *Atherosclerosis.* - 2007.Vol.191, №1. -P. 115-120.
180. Chiu C., Ingles J., Lind J.M., Semsarian C. Mutation analysis of the natriuretic peptide precursor B (NPPB) gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy. // *DNA Seq.*– 2006. Vol.17, №5. -P. 392-395.
181. Choi S.W., Kim H.Y., Lee Y.H., Ryu S.Y., Kweon S.S., Rhee J.A., Choi J.S., Shin M.H. eGFR is associated with subclinical

atherosclerosis independent of albuminuria: the Dong-gu Study. // *Atherosclerosis*. – 2010. Vol.212, №2. - P.661-667.

182. Chol M., Lebon S., Benit P., Chretien D., de Lonlay P., Goldenberg A., Odent S., Hertz-Pannier L., Vincent-Delorme C., Cormier-Daire V., Rustin P., Rotig A., Munnich A. The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. // *J. Med. Genet.* – 2003. Vol.40, №3. - P. 188-191.

183. Chu N.F., Lin F.H., Chin H.C., Hong Y.J. Association between interleukin-6 receptor gene variations and atherosclerotic lipid profiles among young adolescents in Taiwan. // *Lipids. Health Dis.* – 2011. Vol.12, №10. - P.136-140.

184. Chui B., Vira E., Tucker W., Fong I.W. Chlamidia pneumoniae, cytomegaloviruses and herpes simplex virus in atherosclerosis of the carotid artery. // *Circulation.* – 1997. Vol.96. -P. 2144-2148.

185. Chumaeva N., Hintsanen M., Hintsu T., Ravaja N., Juonala M., Raitakari O.T., Keltikangas-Jarvinen L. Early atherosclerosis and cardiac autonomic responses to mental stress: a population-based study of the moderating influence of impaired endothelial function. // *BMC Cardiovasc. Disord.* - 2010. Vol.10. - P.16-21.

186. Clark K.M., Taylor R.W., Johnson M.A., Chinnery P.F., Chrzanowska-Lightowlers Z.M., Andrews R.M., Nelson I.P., Wood N.W., Lamont P.J., Hanna M.G., Lightowlers R.N., Turnbull D.M. An mtDNA mutation in the initiation codon of the cytochrome C oxidase subunit II gene results in lower levels of the protein and a mitochondrial encephalomyopathy. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. Vol.64, №5. - P. 1330-1339.

187. Clarke M., Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability. // *Am. J. Nephrol.* – 2006. Vol. 26. – P. 531-535.
188. Clement CM, Thomas LK, Mou Y, Croslan DR, Gibbons GH, Ford BD. Neuregulin-1 attenuates neointimal formation following vascular injury and inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells. // *J. Vasc. Res.* - 2007. Vol.44, №4. -P. 303-312.
189. Conley Y.P., Brockway H., Beatty M., Kerr M.E. Qualitative and quantitative detection of mitochondrial heteroplasmy in cerebrospinal fluid using denaturing high-performance liquid chromatography. // *Brain Res. Protocol.* – 2003. № 12. -P.99–103.
190. Constantinides P. The morphological basis for altered endothelial permeability in arteriosclerosis // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1997. Vol. 82. – P. 969-974.
191. Constantinides P. The role of arterial wall injury in atherogenesis and arterial thrombogenesis // *Zentralbl. Allg. Pathol.* – 1989.Vol. 135. – P. 517-530.
192. Cornhill J.F., Herderick E.E., Stary H.C. Topography of human aortic sudanophilic lesions // *Monograph. Atherosclerosis.* Karger. – 1990. Vol. 15. – P. 13-19 (athol. – 1986. Vol. 123. – P. 413-424).
193. Cornhill J.F., Roach M.R. A quantitative study of the localization of atherosclerotic lesions in the rabbit aorta // *Atherosclerosis.* – 1976.Vol. 23. – P. 489-501.
194. Cornhill J.F., Roach M.R. Quantitative method for the evaluation of atherosclerotic lesions // *Atherosclerosis.* – 1974. Vol. 20. – P. 131-136.
195. Damani S.B., Topol E.J. Future use of genomics in coronary artery disease // *J. Am Coll Cardiol.* – 2007. Vol.50, №20. – P.1933-40.

196. Danesh J., Collins R., Peto R.. Chronic infection and coronary heart disease. Is there a link? // *Lancet*. – 1997. Vol.350. - P. 430-436.
197. Davies M.J. : A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. // *Circulation*.– 1990. Vol.82 (II). - P. 38-46.
198. Davies P.F. Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis. // *Lab. Invest*. – 1986.Vol. 55. – P. 5-24.
199. Davies P.F., Robotewskyj A., Griem M.L., Dull R.O., Polacek D.C. Hemodynamic forces and vascular cell communication in arteries. // *Arch. Pathol. Lab. Med*. – 1992. Vol. 116. – P. 1301-1306.
200. Delgado-Lista J., Garcia-Rios A., Perez-Martinez P., Solivera J., Yubero-Serrano E.M., Fuentes F., Parnell L.D., Shen J., Gomez P., Jimenez-Gomez Y., Gomez-Luna M.J., Marin C., Belisle S.E., Rodriguez-Cantalejo F., Meydani S.N., Ordovas J.M., Perez-Jimenez F., Lopez-Miranda J. Interleukin 1B variant -1473G/C (rs1143623) influences triglyceride and interleukin 6 metabolism. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. – 2011. Vol.96, №5. - P. 816-820.
201. Dempsey R.J., Moore R.W. Amount of smoking independently predicts carotid artery atherosclerosis severity. // *Stroke*. - 1992.Vol.23, №5. -P. 693-696.
202. Dhillon V.S., Shahid M., Husain S.A. Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. // *Mol. Hum. Reprod*. – 2007. Vol.13, №4. - P. 213-222.
203. DiMauro S., Hirano M., Kaufmann P., Tanji K., Sano M., Shungu D.C., Bonilla E., DeVivo D.C. Clinical features and genetics



- of myoclonic epilepsy with ragged red fibers. // *Adv. Neurol.* - 2002.Vol.89. - P. 217-229.
204. Dobrowolski S.F., Hendrickx A.T., van den Bosch B.J., Smeets H.J., Gray J., Miller T., Sears M. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high-resolution melt (HRM) profiling. // *Hum Mutat.* – 2009. Jun., Vol.30, №6. – P.891-898. doi: 10.1002/humu.21003.
205. Dong C., Yoon W., Goldschmidt-Clermont P.J. DNA methylation and atherosclerosis. // *J. Nutr.* – 2002.Vol.132. -P. 2406-2409.
206. Doran A.C., Meller N., McNamara C.A. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008.Vol. 28. – P. 812-819.
207. Down R.H., Whiting M.J., Watts J.M., Jones W. Effect of synthetic oestrogens and progestagens in oral contraceptives on bile lipid composition. // *Gut.* – 1983. Vol.24, №3. -P.253-259.
208. Drager L.F., Bortolotto L.A., Krieger E.M., Lorenzi-Filho G. Additive effects of obstructive sleep apnea and hypertension on early markers of carotid atherosclerosis. // *Hypertension.* – 2009. Vol.53, №1. - P. 64-69.
209. Elosua R., Ordovas J.M., Cupples L.A., Lai C.Q., Demissie S., Fox C.S., Polak J.F., Wolf P.A., D'Agostino R.B. Sr, O'Donnell C.J. Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. // *J. Lipid. Res.* - 2006. Vol.47, №5. - P. 990-996.
210. Elovainio M., Puttonen S., Heponiemi T., Reuter M., Kivimaki M., Viikari J., Keltikangas-Jarvinen L. Relationship between DRD4 polymorphism and lipid metabolism: what is the role of novelty seeking? // *Neuropsychobiology.*– 2005. Vol.51, №1. -P. 53-58.

211. Elphinstone M.S., Baverstock P.R. Detecting mitochondrial genotypes by temperature gradient gel electrophoresis and heteroduplex analysis. // *BioTechniques*. - 1997.Vol. 23. - P.982-986.
212. Engel D., Beckers L., Wijnands E., Seijkens T., Lievens D., Drechsler M., Gerdes N., Soehnlein O., Daemen M.J., Stan R.V., Biessen E.A., Lutgens E. Caveolin-1 deficiency decreases atherosclerosis by hampering leukocyte influx into the arterial wall and generating a regulatory T-cell response. // *FASEB J*. -2011. Vol.25, №11. -P. 3838-3848.
213. Enquobahrie D.A., Rice K., Williams O.D., Williams M.A., Gross M.D., Lewis C.E., Schwartz S.M., Siscovick D.S. IL1B genetic variation and plasma C-reactive protein level among young adults: the CARDIA study. // *Atherosclerosis*. – 2009. Vol.202, №2. -P. 513-520.
214. Erbay E., Babaev V.R., Mayers J.R., Makowski L., Charles K.N., Snitow M.E., Fazio S., Wiest M.M., Watkins S.M., Linton M.F., Hotamisligil G..S. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. // *Nat. Med*. – 2009. Vol.15, №12. - P. 1383-1391.
215. Evans D., Bode A., von der Lippe G., Beil F.U., Mann W.A. Cerebrovascular atherosclerosis in type III hyperlipidemia is modulated by variation in the apolipoprotein A5 gene // *Eur. J. Med. Res*. - 2011. - Vol.16, №2. - P. 79-84.
216. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition. // European Heart Network and European Society of Cardiology. – 2012. – 127 P.
217. Fabricant C.G., Fabricant J., Minick C.R., Literna M.M. Herpes virus induced atherosclerosis in chicken. // *Fed. Proc*. – 1983. Vol.42. - P. 2467-2469.

218. Fadini G.P., Coracina A., Baesso I., Agostini C., Tiengo A., Avogaro A., de Kreutzenberg S.V. Peripheral blood CD34+KDR+ endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. // *Stroke*. – 2006. Vol.37, №9. – P.2277-2282.
219. Faggiotto A., Ross R. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque.// *Arteriosclerosis*. – 1984. Vol. 4. – P. 341-356.
220. Feng X., Pu W., Gao D. Diagnostic and differential diagnostic potential of mitochondrial DNA assessment in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Zhonghua. Yan. Ke. Za. Zhi*. - 2001.Vol.37, №3. - P. 174-177.
221. Fernandez-Hernando C., Yu J., Suarez Y., Rahner C., Davalos A., Lasuncion M.A., Sessa W.C. Genetic evidence supporting a critical role of endothelial caveolin-1 during the progression of atherosclerosis. // *Cell. Metab.* -2009. Vol.10, №1. - P. 48-54.
222. Fingert J.H., Grassi M.A., Janutka J.C., East J.S., Howard J.G., Sheffield V.C., Jacobson D.M., Hayreh S.S., Stone E.M. Mitochondrial variant G4132A is associated with familial non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy in one large pedigree. // *Ophthalmic. Genet.* - 2007. Vol.28, №1.-P. 1-7.
223. Finsterer J. Is atherosclerosis a mitochondrial disorder? // *Vasa*. – 2007.Vol.36, №4. - P. 229-240.
224. Fu K., Hartlen R., Johns T., Genge A., Karpati G., Shoubridge E.A. A novel heteroplasmic tRNA<sup>Leu</sup>(CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. // *Hum. Mol. Genet.* – 1996. Vol.5,№11. - P. 1835-1840.

225. Fujiwara T., Chiba S. Alterations of vascular alpha 1-adrenergic contractile responses in hypercholesterolemic rabbit common carotid arteries. // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1993. Vol.22, №1. -P. 58-64.
226. Galle J., Heermeier K. Angiotensin II and oxidized LDL: an unholy alliance creating oxidative stress. // Nephrol. Dial. Transplant. – 1999. Vol.14. – P.2585–2589.
227. Garcia-Bermudez M., Gonzalez-Juanatey C., Rodriguez-Rodriguez L., Vazquez-Rodriguez T.R., Miranda-Fillooy J.A., Fernandez-Gutierrez B., Llorca J., Martin J., Gonzalez-Gay M.A. Lack of association between LEP rs2167270 (19 G>A) polymorphism and disease susceptibility and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. // Clin. Exp. Rheumatol. – 2011. Vol.29, №2. -P. 293-298.
228. Gardener H., Beecham A., Cabral D., Yanuck D., Slifer S., Wang L., Blanton S.H., Sacco R.L., Juo S.H., Rundek T. Carotid plaque and candidate genes related to inflammation and endothelial function in Hispanics from northern Manhattan. // Stroke.– 2011. Vol.42, №4. -P. 889-896.
229. Gattermann N., Wulfert M., Junge B., Germing U., Haas R., Hofhaus G. Ineffective hematopoiesis linked with a mitochondrial tRNA mutation (G3242A) in a patient with myelodysplastic syndrome. // Blood. – 2004. Vol.103, №4. - P.1499-1502.
230. Gaukrodger N., Mayosi B.M., Imrie H., Avery P., Baker M., Connell J.M., Watkins H., Farrall M., Keavney B. A rare variant of the leptin gene has large effects on blood pressure and carotid intima-medial thickness: a study of 1428 individuals in 248 families. // J. Med. Genet. – 2005. Vol.42, №6. -P. 474-478.

231. Gauvreau D., Villeneuve N., Deshaies Y., Cianflone K. Novel adipokines: links between obesity and atherosclerosis. //Ann. Endocrinol. (Paris). – 2011. Vol.72, №3. -P. 224-231.
232. Geer J.C., Catsulis C., McGill H.C Jr., Stron J.P. Fine structure of the baboon aortic fatty streak. // Am. J. Pathol. – 1968. Vol. 52. – P. 265-286.
233. Geer J.C., Haust M.D. Smooth muscle cells in atherosclerosis. // Basel. Karger. – 1972.
234. Geerts C.C., Bots M.L., Grobbee D.E., Uiterwaal C.S. Parental smoking and vascular damage in young adult offspring: is early life exposure critical? The atherosclerosis risk in young adults study. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.– 2008. Vol.28, №12. - P. 2296-2302.
235. George S.J., Williams A., Newby A.C. An essential role for platelet-derived growth factor in neointima formation in human saphenous vein in vitro. // Atherosclerosis. - 1996. Vol.120, №1-2. - P. 227-240.
236. Gerrity R.G. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. // Am. J. Pathol. – 1981.Vol.103. – P. 191-200.
237. Gerrity R.G. The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. // Am. J. Pathol. – 1981.Vol. 103. – P. 181-190.
238. Giaginis C., Klonaris C., Katsargyris A., Kouraklis G., Spiliopoulou C., Theocharis S.. Correlation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma (PPAR-gamma) and Retinoid X Receptor-alpha (RXR-alpha) expression with clinical risk factors in patients with advanced carotid atherosclerosis. // Med. Sci. Monit. - 2011. Vol.17, №7. - P. 381-391.

239. Gil Borlado M.C., Moreno Lastres D., Gonzalez Hoyuela M., Moran M., Blazquez A., Pello R., Marin Buera L., Gabaldon T., Garcia Penas J.J., Martin M.A., Arenas J., Ugalde C. Impact of the mitochondrial genetic background in complex III deficiency. // *PLoS One*. – 2010. Vol.5, №9, e12801.
240. Gilardini L., Pasqualinotto L., Di Matteo S., Caffetto K., Croci M., Girola A., Invitti C. Factors associated with early atherosclerosis and arterial calcifications in young subjects with a benign phenotype of obesity. // *Obesity*. (Silver Spring). - 2011.Vol.19, №8. -P. 1684-1689.
241. Giordano C., Pallotti F., Walker W.F., Checcarelli N., Musumeci O., Santorelli F., d'Amati G., Schon E.A., DiMauro S., Hirano M., Davidson M.M. Pathogenesis of the deafness-associated A1555G mitochondrial DNA mutation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002.Vol.293, №1. - P. 521-529.
242. Glass C.K., Witztum J.L Atherosclerosis. The road ahead. // *Cell*. – 2001. Vol. 104. – P. 503-516.
243. Glenn T.C. Field guide to next-generation DNA sequencers.// *Mol. Ecol. Resour.* - 2011. Sep., Vol.11, №5. – P.759-69.
244. Gmiński J., Drózd M., Ulfig-Maślanka R., Najda J. Evaluation of elastin metabolism in children from families with high risk of atherosclerosis. // *Atherosclerosis*. - 1991.Vol.91, №3. -P. 185-189.
245. Gnasso A., Motti C., Irace C., Di Gennaro I., Pujia A., Leto E., Ciamei M., Crivaro A., Bernardini S., Federici G., Cortese C. The Arg allele in position 192 of PON1 is associated with carotid atherosclerosis in subjects with elevated HDLs. // *Atherosclerosis*. - 2002. Vol.164, №2. - P. 289-295.
246. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Franco S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A.,

Howard V.J., Huffman M.D., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Magid D., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McGuire D.K., Mohler E.R., Moy C.S., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Schreiner P.J., Sorlie P.D., Stein J., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D., Woo D., Turner M.B.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2013 update: a report from the American Heart Association. // *Circulation*. – 2013. Vol. 127, №1. – P.6-245.

247. Goldstein J.L., Brown M.S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. // *Ann. Rev. Biochem.* – 1997. Vol. 46. – P.897-930.

248. Goldstein J.L., Brown M.S. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. // *Metabolism*. – 1977. – Vol. 26. – P. 1257-1275.

249. Gomaraschi M, Sinagra G, Serdoz LV, Pitzorno C, Fonda M, Cattin L, Calabresi L, Franceschini G. The plasma concentration of Lp(a) particles as a predictor of the inflammatory response in patients with ST-elevation myocardial infarction. // *Atherosclerosis*. – 2009. Vol.202, №1. - P. 304-311.

250. Goncalves I., Edsfieldt A., Ko N.Y., Grufman H., Berg K., Bjorkbacka H., Nitulescu M., Persson A., Nilsson M., Prehn C., Adamski J., Nilsson J. Evidence supporting a key role of Lp-PLA2-generated lysophosphatidylcholine in human atherosclerotic plaque inflammation. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2012. Vol.32, №6. - P. 1505-1512.

251. Goodarzi M.O., Taylor K.D., Jones M.R., Fang B., Guo X., Xiang A.H., Buchanan T.A., Hodis H.N., Raffel L.J., Rotter J.I. Replication of calpain-10 genetic association with carotid intima-

media thickness. // *Atherosclerosis*.– 2009. Vol.205, №2. -P. 503-505.

252. Gorący J., Gorący I., Kaczmarczyk M., Parczewski M., Brykczyński M., Clark J., Safranow K., Ciechanowicz A. Low frequency haplotypes of E-selectin polymorphisms G2692A and C1901T give increased protection from coronary artery disease. // *Med. Sci. Monit.* - 2011. Vol.17, №6. - P. 334-340.

253. Gorący J., Gorący I., Safranow K., Taryma O., Adler G., Ciechanowicz A. Lack of association of interleukin-1 gene cluster polymorphisms with angiographically documented coronary artery disease: demonstration of association with hypertension in the Polish population. // *Arch. Med. Res.* – 2011. Vol.42, №5. - P. 426-432.

254. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity.// *Nat. Rev. Immunol.* – 2005.Vol. 5. – P. 953-964.

255. Gordon S. Macrophage heterogeneity and tissue lipids. // *J. Clin. Invest.* – 2007.Vol. 117. – P. 89-93.

256. Gown A.M., Tsukada T., Ross R. Human atherosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of the cellular composition of human atherosclerotic lesions. // *Am. J. Pathol.* – 1986. Vol. 125. – P. 191-207.

257. Graham I., Atar D., Borch-Johnsen K. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice).// *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* – 2007. Vol.14.,Suppl.2. – P. S1-S113.

258. Grasso M., Diegoli M., Brega A., Campana C., Tavazzi L., Arbustini E. The mitochondrial DNA mutation T12297C affects a highly conserved nucleotide of tRNA(Leu(CUN)) and is associated



- with dilated cardiomyopathy. // Eur. J. Hum. Genet. – 2001. Vol.9, №4. - P. 311-315.
259. Gropman A., Chen T.J., Perng C.L., Krasnewich D., Chernoff E., Tiftt C., Wong L.J. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. // Am. J. Med. Genet. A. – 2004. Vol.124A, №4. - P. 377-382.
260. Gu L., Johnson M.W., Lusic A.J. Quantitative trait locus analysis of plasma lipoprotein levels in an autoimmune mouse model. Interaction between lipoprotein metabolism, autoimmune disease and atherosclerosis. // Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. – 1999. Vol.19. -P. 442-453.
261. Guan M.X., Fischel-Ghodsian N., Attardi G. Molecular pathogenetic mechanism of maternally inherited deafness. // Hum. Mol. Genet. – 1996. Vol.5, №7. - P. 963-971.
262. Guo Z.F., Guo W.S., Xiao L., Gao G.Q., Lan F., Lu X.G., Li K., Liao D.F. Discrimination of A1555G and C1494T Point Mutations in the Mitochondrial 12S rRNA Gene by On/Off Switch. // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2011. Vol.166, №1. -P.234-242.
263. Gutierrez J., Ballinger S.W., Darley-Usmar V.M., Landar A. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. // Circ. Res. –2006. Vol.99. - P. 924-932.
264. Halayko A.J., Solway J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. // J. Appl. Physiol. – 2001. Vol. 90. – P. 358-368.
265. Hall J.G., Eis P.S., Law S.M. et al. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. Jul 18, Vol.97, №15. – P.8272-8277.

266. Han C.B., Ma J.M., Xin Y., Mao X.Y., Zhao Y.J., Wu D.Y., Zhang S.M., Zhang Y.K. Mutations of mitochondrial 12S rRNA in gastric carcinoma and their significance. // World J. Gastroenterol. – 2005. Vol.11, №1. - P. 31-35.
267. Horvath R, Scharfe C, Hoeltzenbein M, Do BH, Schroder C, Warzok R, Vogelgesang S, Lochmuller H, Muller-Hocker J, Gerbitz KD, Oefner PJ, Jaksch M. Childhood onset mitochondrial myopathy and lactic acidosis caused by a stop mutation in the mitochondrial cytochrome c oxidase III gene. // J. Med. Genet. 2002, 39 (11), P. 812-816.
268. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. // N. Engl. J. Med. – 2005.Vol. 352. – P. 1685-1695.
269. Hansson G.K., Libby P. The immune response in atherosclerosis: A double-edged sword. // Nat. Rev. Immunol. – 2006. Vol. 6. – P. 508-519.
270. Huijgen R, Vissers MN, Kindt I, Trip MD, de Groot E, Kastelein JJ, Hutten BA. Assessment of carotid atherosclerosis in normocholesterolemic individuals with proven mutations in the low-density lipoprotein receptor or apolipoprotein B genes. // Circ. Cardiovasc. Genet. – 2011. Vol.4, №4. - P. 413-417.
271. Hao H., Gabbiani G., Bochaton-Piallat M.L. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003.Vol. 23. – P. 1510-1520.
272. Hecker R., Wang Z., Steger G. and Riesner D. Analysis of RNA structure by temperature-gradient gel electrophoresis: viroid replication and processing. // Gene. - 1988. Vol. 72.- P. 59-74.
273. Heinonen P., Jartti L., Jarvisalo M.J., Pesonen U., Kaprio J.A., Ronnema T., Raitakari O.T., Scheinin M. Deletion polymorphism in the alpha2B-adrenergic receptor gene is associated with flow-

- mediated dilatation of the brachial arter. // Clin. Sci. (Lond). - 2002. Vol.103, №5. - P. 517-524.
274. Hinz B., Phan S.H., Thannickal V.J., Galli A., Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. // Am. J. Pathol. – 2007. Vol. 170. – P. 1807-1816.
275. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. Deletions of mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathy. // Nature. – 1988. V.331. – P.717-9501.
276. Hirai M, Suzuki S, Onoda M, Hinokio Y, Ai L, Hirai A, Ohtomo M, Komatsu K, Kasuga S, Satoh Y, Akai H, Toyota T. Mitochondrial DNA 3394 mutation in the NADH dehydrogenase subunit 1 associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. Vol.219, №3. - P.951-955.
277. Hu Q, Zhang XJ, Liu CX, Wang XP, Zhang Y. PPARgamma1-induced caveolin-1 enhances cholesterol efflux and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. // J. Vasc. Res. – 2010. Vol.47, №1. - P.69-79.
278. Hoffbuhr K.C., Davidson E., Filiano B.A., Davidson M., Kennaway N.G., King M.P. A pathogenic 15-base pair deletion in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit III results in the absence of functional cytochrome c oxidase. // J. Biol. Chem. – 2000.Vol.275, №18. -P.13994-14003.
279. Holland M.M., McQuillan M.R., O'Hanlon K.A. Second generation sequencing allows for mtDNA mixture deconvolution and high resolution detection of heteroplasmy.// Croat. Med. J. – 2011. Jun., Vol.52, №3. – P.299-313
280. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения 11..01.2012).

281. <http://www.nedug.ru/library/c/Схема-строения-стенок-артерий#.UoTE0RrIbv4> (дата обращения 17..01.2012).
282. <http://atvb.ahajournals.org> (дата обращения 09..02.2012).
283. <http://www.atherosclerosis-journal.com> (дата обращения 11..09.2012).
284. <http://cardiovascres.oxfordjournals.org> (дата обращения 11..12.2012).
- 285.<http://spss.ru/joydownload.com/&c=20?gclid=COTnxtbesLwCFaHbcgodiiMAtQ> (дата обращения 17. 03.2013).
286. <http://www.qiagen.com/products/pyromarkq96id.aspx> (дата обращения 27.05.2012).
287. Hulsmans M., De Keyzer D., Holvoet P.. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. // FASEB J. – 2011. Vol.25, №8. - P. 2515-2527.
288. Huoponen K. Leber hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic findings. // Neurogenetics. – 2001. -Vol.3, №3. - P. 119-125.
289. Hwang J.M., Chang B.L., Koh H.J., Kim J.Y., Park S.S. Leber's hereditary optic neuropathy with 3460 mitochondrial DNA mutation. // J. Korean. Med. Sci. – 2002. Vol.17, №2. - P. 283-286.
290. Igor A. Sobenin, Margarita A. Sazonova, Anton Y. Postnov, Yuri V. Bobryshev, and Alexander N. Orekhov, Mitochondrial Mutations are Associated with Atherosclerotic Lesions in the Human Aorta.// Clin. Dev. Immunol. - 2012; 2012:832464. Epub 2012 Sep 11.
291. Ihling C., Bohrmann B., Schaefer H.E., Technau-Ihling K., Loeffler B.M. Endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in human atherosclerosis--novel targets for pharmacotherapy in

atherosclerosis. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2004. Vol.2, №3. - P.249-258.

292. International Task Force for Prevention of Coronary Heart Disease. Pocket guide to prevention of coronary heart disease. // Boerm. Bruckmeier. Verlag. GmbH. – 2003. – 128 P.

293. Irvine C.D., George S.J., Sheffield E., Johnson J.L., Davies A.H., Lamont P.M. The association of platelet-derived growth factor receptor expression, plaque morphology and histological features with symptoms in carotid atherosclerosis. // *Cardiovasc. Surg.* – 2000. Vol.8, №2. - P.121-129.

294. Ishizaka Y., Ishizaka N., Tani M., Toda A., Toda E., Koike K., Yamakado M. Relationship between albuminuria, low eGFR, and carotid atherosclerosis in Japanese women. // *Kidney Blood Press. Res.* - 2008. - Vol.31, №3. - P. 164-170.

295. Ivey M.E., Osman N., Little P.J. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. // *Atherosclerosis.* - 2008. - Vol.199, №2. - P. 237-247.

296. Jakel H., Fruchart-Najib J., Fruchart J.C. Retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha as a therapeutic target in the treatment of dyslipidemia and atherosclerosis. // *Drug News Perspect.* – 2006. Vol.19, №2. - P. 91-97.

297. Jeong-Yu. S., Clayton D. Regulation and function of the mitochondrial genome. // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 1996. Vol.19. - P.443-451.

298. Jennings J.R., Kamarck T.W., Everson-Rose S.A., Kaplan G.A., Manuck S.B., Salonen J.T. Exaggerated blood pressure responses during mental stress are prospectively related to enhanced carotid atherosclerosis in middle-aged Finnish men. // *Circulation.* – 2004. Vol.110, №15. - P.2198-2203.

299. Jensen-Seaman M.I., Wildschutte J.H., Soto-Calderon I.D., Anthony N.M. A comparative approach shows differences in patterns of numt insertion during hominoid evolution. // *J. Mol. Evol.* – 2009. Vol.68 , №6. - P.688-699.
300. Jeppesen T.D., Schwartz M., Hansen K., Danielsen E.R., Wibrand F., Vissing J. Late onset of stroke-like episode associated with a 3256C-->T point mutation of mitochondrial DNA. // *J. Neurol. Sci.* – 2003. Vol.214, №1-2. - P. 17-20.
301. John P.A., Ioannidis M.D. Prediction of Cardiovascular Disease Outcomes and Established Cardiovascular Risk Factors by Genome-Wide Association Markers. // *Circ. Cardiovasc. Genet.* – 2009.Vol.2, №1. - P. 7-15.
302. Jones C.A., London N.R., Chen H., Park K.W., Sauvaget D., Stockton R.A., Wythe J.D., Suh W., Larrieu-Lahargue F., Mukoyama Y.S., Lindblom P., Seth P., Frias A., Nishiya N., Ginsberg M.H., Gerhardt H., Zhang K., Li D.Y. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability. // *Nat. Med.* – 2008. Vol.14, №4. - P. 448-453.
303. Karaflou M., Lambrinouadaki I., Christodoulakos G. Apoptosis in atherosclerosis: a mini-review. // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2008. Vol. 8. – P. 912-918.
304. Karathanasis S.K., Ferris E., Haddad I.A. DNA inversion within the apolipoproteins AI/CIII/AIV-encoding gene cluster of certain patients with premature atherosclerosis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* - 1987. Vol.84, №20. - P. 7198-7202.
305. Karnik S.K., Brooke B.S., Bayes-Genis A., Sorensen L., Wythe J.D., Schwartz R.S., Keating M.T., Li D.Y. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. // *Development.* –2003. Vol.130, №2. - P.411-423.

306. Kawamoto R., Kohara K., Tabara Y., Miki T., Doi T., Tokunaga H., Konishi I. An association of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism and common carotid atherosclerosis. // J. Hum. Genet. – 2001. Vol.46, №9. - P. 506-510.
307. Kermode A.G., Moseley I.F., Kendall B.E., Miller DH, MacManus D.G., McDonald W.I. Magnetic resonance imaging in Leber's optic neuropathy. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. – 1989. Vol.52, №5. - P. 671-674.
308. Kettunen T., Eklund C., Kahonen M., Jula A., Paiva H., Lyytikainen L.P., Hurme M., Lehtimaki T.. Polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene affects CRP levels in plasma and one early marker of atherosclerosis in men: The Health 2000 Survey. // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2011. Vol.71, №5. - P.353-361.
309. Khandoga A.L., Pandey D., Welsch U., Brandl R., Siess W. GPR92/LPA<sub>5</sub> lysophosphatidate receptor mediates megakaryocytic cell shape change induced by human atherosclerotic plaques. // Cardiovasc. Res. – 2011. Vol.90, №1. - P.157-164.
310. Kim D.-S., Jung D.-S., Park K.-H. et al. Histochemical and molecular genetic study of MELAS and MERF in Korean patients. //J. Korean Med. Scien. – 2002. Vol.17. – P.103 - 112.
311. Kjolby M., Andersen O.M., Breiderhoff T., Fjorback A.W., Pedersen K.M., Madsen P., Jansen P., Heeren J., Willnow T.E., Nykjaer A. Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. // Cell Metab. – 2010. Vol.12, №3. -P. 213-223.
312. Klimov A.N., Denisenko A.D., Popov A.V. Lipoprotein-antibody immune complexes. Their catabolism and role in foam cell formation // Atherosclerosis. – 1985. Vol. 58. – P. 1-5.

313. Klimov A.N., Denisenko A.D., Vinogradov A.G., Nagornev V.A., Pivovarova Y.I., Sitnikova O.D., Pleskov V.M. Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex // *Atherosclerosis*. – 1988. Vol. 74. – P. 41-46.
314. Kobayashi Z., Tsunemi T., Miake H., Tanaka S., Watabiki S., Morokuma Y. A mother and a child with maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) showing atrophy of the cerebrum, cerebellum and brainstem on magnetic resonance imaging (MRI). // *Intern. Med.* – 2005. Vol.44, №4. - P. 328-331.
315. Kocher O., Gabbiani G. Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells // *Human Pathol.* – 1986. Vol. 17. – P. 875-880.
316. Kockx M.M., De Meyer G.R., Muhring J., Jacob W., Bult H., Herman A.G. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques // *Circulation*. – 1998. Vol. 97. – P. 2307-2315.
317. Kolaković A., Zivković M., Radak D., Djurić T., Koncar I., Davidović L., Dincić D., Alavantić D., Stanković A. The association of ACE I/D gene polymorphism with severe carotid atherosclerosis in patients undergoing carotid endarterectomy // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* – 2012. Vol. 13, №1. – P.141-147.
318. Kong Q.P., Bandelt H.J., Sun C., Yao Y.G., Salas A., Achilli A., Wang C.Y., Zhong L., Zhu C.L., Wu S.F., Torroni A., Zhang Y.P. Updating the East Asian mtDNA phylogeny: a prerequisite for the identification of pathogenic mutations. // *Hum. Mol. Genet.* - 2006. Vol.15, №13. - P. 2076-2086.
319. Kretowski A., Hokanson J.E., McFann K., Kinney G.L., Snell-Bergeon J.K., Maahs D.M., Wadwa R.P., Eckel R.H., Ogden L.G., Garg S.K., Li J., Cheng S., Erlich H.A., Rewers M. The



apolipoprotein A-IV Gln360His polymorphism predicts progression of coronary artery calcification in patients with type 1 diabetes. // *Diabetologia*. – 2006. Vol.49, №8. - P.1946-1954.

320. Kristiansson K., Ilveskoski E., Lehtimäki T., Peltonen L., Perola M., Karhunen P.J. Association analysis of allelic variants of USF1 in coronary atherosclerosis. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. Vol.28, №5. - P.983-989.

321. Kronenberg F., Steinmetz A., Kostner G.M., Doeblinger H. Lipoprotein (a) in health and disease. // *Clin. Rev. Clin. Lab Sci.*– 1996. Vol.36. - P. 495-543.

322. Kumar R., Nejatizadeh A., Gupta M., Markan A., Tyagi S., Jain S.K., Pasha M.A.. The epistasis between vascular homeostasis genes is apparent in essential hypertension. // *Atherosclerosis*. – 2012. Vol.220, №2. - P.418-424.

323. Kuo C.-C., Grayston J.T., Campbell L.A. et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. – 1995. Vol.92. - P.6911-6914.

324. Kurabayashi M., Sakuma I., Kawamori R., Daida H., Yamazaki T., Yoshida M., Hata M., Masuda I., Kaku K., Yokoi H., Kishimoto J., Nohara R. Can intensive lipid-lowering therapy with statins ameliorate atherosclerosis in Japanese patients? Rationale and design of the JART study. // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2010. Vol.17, №4. - P.416-422.

325. Lai L.P., Tsai C.C., Su M.J., Lin J.L., Chen Y.S., Tseng Y.Z., Huang S.K. Atrial fibrillation is associated with accumulation of aging-related common type mitochondrial DNA deletion mutation in human atrial tissue. // *Chest*.– 2003. Vol.123, №2. - P. 539-544.

326. Lamina C., Coassin S., Illig T., Kronenberg F. Look beyond one's own nose: combination of information from publicly available

sources reveals an association of GATA4 polymorphisms with plasma triglycerides. // *Atherosclerosis*. – 2011. Vol.219, №2. - P.698-703.

327. Lamon-Fava S., Herrington D.M., Horvath K.V., Schaefer E.J., Asztalos B.F.. Effect of hormone replacement therapy on plasma lipoprotein levels and coronary atherosclerosis progression in postmenopausal women according to type 2 diabetes mellitus status. // *Metabolism*. – 2010. Vol.59,№12. - P.1794-1800.

328. Lane D.A., Grant P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease // *Blood*. – 2000. Vol.95, №5. – P.1517-32.

329. Lau P., Nixon S.J., Parton R.G., Muscat G.E. ROR alpha regulates the expression of genes involved in lipid homeostasis in skeletal muscle cells: caveolin-3 and CPT-1 are direct targets of ROR. // *J. Biol. Chem.* – 2004. Vol.279,№35. - P.36828-36840.

330. Laurila P.P., Naukkarinen J., Kristiansson K., Ripatti S., Kauttu T., Silander K., Salomaa V., Perola M., Karhunen P.J., Barter P.J., Ehnholm C., Peltonen L. Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*– 2010. Vol.30, №2. - P. 346-352.

331. Lee C.D., Sui X., Blair S.N. Combined effects of cardiorespiratory fitness, not smoking, and normal waist girth on morbidity and mortality in men. // *Arch. Intern. Med.* – 2009. Vol.169, №22. - P.2096-2101.

332. Lee C.R., North K.E., Bray M.S., Avery C.L., Mosher M.J., Couper D.J., Coresh J., Folsom A.R., Boerwinkle E., Heiss G., Zeldin D.C. NOS3 polymorphisms, cigarette smoking, and cardiovascular disease risk: the Atherosclerosis Risk in

Communities study. // Pharmacogenet. Genomics.– 2006. Vol.16, №12. - P.891-899.

333. Leinonen M., Saikku P. Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis // Lancet Infect. Dis. – 2002. Vol. 2. – P. 11-17.

334. Leo-Kottler B., Lubrichs J., Besch D., Christ-Adler M., Fauser S. Leber's hereditary optic neuropathy: clinical and molecular genetic results in a patient with a point mutation at np T11253C (isoleucine to threonine) in the ND4 gene and spontaneous recovery. // Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. – 2002. Vol.240, №9. - P. 758-764.

335. Li M., Schonberg A., Schaefer M., Schroeder R., Nasidze I., Stoneking M. Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. // Am. J. Hum. Genet. – 2010. - Aug 13, Vol.87, №2. – P.237-249.

336. Li R., Xing G., Yan M., Cao X., Liu X.Z., Bu X., Guan M.X. Cosegregation of C-insertion at position 961 with the A1555G mutation of the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family with maternally inherited hearing loss. // Am. J. Med. Genet. A. – 2004.Vol.124A, №2. - P. 113-117.

337. Li Z., Li R., Chen J., Liao Z., Zhu Y., Qian Y., Xiong S., Heman-Ackah S., Wu J., Choo D.I., Guan M.X. Mutational analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene in Chinese pediatric subjects with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. // Hum. Genet. – 2005.Vol.117, №1. - P. 9-15.

338. Li Z., Liu Y., Yang L., Wang S., Guan M.X. Maternally inherited hypertension is associated with the mitochondrial tRNA(Ile) A4295G mutation in a Chinese family. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008, 367 (4), P. 906-911.

339. Liang M.H., Wong L.J. Yield of mtDNA mutation analysis in 2,000 patients. // *Am. J. Med. Genet.* – 1998. Vol.77, №5. - P. 395-400.
340. Libby P. Inflammation in atherosclerosis // *Nature.* – 2002.Vol.420. – P. 868-874.
341. Lin J., Zheng D.D., Tao Q., Yang J.H., Jiang W.P., Yang X.J., Song J.P., Jiang T.B., Li X. Two novel mutations of the MYBPC3 gene identified in Chinese families with hypertrophic cardiomyopathy. // *Can. J. Cardiol.* – 2010. Vol.26, №10. - P.518-522.
342. Liu H., Peng Y., Liu F., Liu Y., Ouyang L., Xiao W., Cheng M., Chen X., Gao L. Correlation between endothelin-1 and atherosclerosis in chronic hemodialysis patients // *J. Nephrol.* - 2010. - Vol.23, №5. - P. 593-602.
343. Liu S., Song Y., Hu F.B., Niu T., Ma J., Gaziano M., Stampfer M.J. A prospective study of the APOA1 XmnI and APOC3 SstI polymorphisms in the APOA1/C3/A4 gene cluster and risk of incident myocardial infarction in men. // *Atherosclerosis.* – 2004. Vol.177, №1. -P.119-126.
344. Liu Y., Zhuang S.L., Tong Y., Qu J., Zhou X.T., Zhao F.X., Zhang J.J., Zhang Y.M., Zhang Y., Guan M.X. Leber's hereditary optic neuropathy and limbs abnormality claudication may be associated with the mitochondrial ND1 T3866C mutation. // *Yi. Chuan.* – 2010.Vol.32, №2. - P.141-147.
345. Lowik M.M., Hol F.A., Steenbergen E.J., Wetzels J.F., van den Heuvel L.P. Mitochondrial tRNA Leu (UUR) mutation in a patient with steroid-resistant nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2005. Vol.20, №2. - P. 336-341.

346. Lu Y., Feskens E.J., Boer J.M., Imholz S., Verschuren W.M., Wijmenga C., Vaarhorst A., Slagboom E., Muller M., Dolle M.E. Exploring genetic determinants of plasma total cholesterol levels and their predictive value in a longitudinal study. // *Atherosclerosis*. – 2010. Vol.213, №1. - P. 200-205.
347. Lyamichev V., Mast A.L., Hall J.G. et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. / *Nature Biotechnology*.– 1999. Vol.17.- P.292 – 296.
348. Lynch A.I., Boerwinkle E., Davis B.R., Ford C.E., Eckfeldt J.H., Leidencker-Foster C., Arnett D.K. Pharmacogenetic association of the NPPA T2238C genetic variant with cardiovascular disease outcomes in patients with hypertension. // *JAMA*. – 2008. Vol.299, №3. -P. 296-307.
349. Ma L., Wang H., Chen J., Jin W., Liu L., Ban B., Shen J., Hua Z., Chai J. Mitochondrial gene variation in type 2 diabetes mellitus: detection of a novel mutation associated with maternally inherited diabetes in a Chinese family. // *Chin. Med. J. (Engl)*. – 2000. Vol.113, №2. - P. 111-116.
350. Maahs D.M., Snell-Bergeon J.K., Hokanson J.E., Kinney G.L., Berl T., Rewers M., Ogden L.G. Relationship between cystatin C and coronary artery atherosclerosis progression differs by type 1 diabetes. // *Diabetes Technol. Ther.* -2010. Vol.12, №1. - P.25-33.
351. Machnicki M.M., Glodkowska-Mrowka E., Lewandowski T., Ploski R., Wlodarski P., Stoklosa T. ARMS-PCR for detection of BRAF V600E hotspot mutation in comparison with Real-Time PCR-based techniques. // *Acta Biochim. Pol.* – 2013. Vol.60, №1. – P.57-64.
352. Mackey D.A., Oostra R.J., Rosenberg T., Nikoskelainen E., Bronte-Stewart J., Poulton J., Harding A.E., Govan G., Bolhuis P.A.,

Norby S. Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. // Am. J. Hum. Genet. – 1996.Vol.59, №2. - P. 481-485.

353. Madjid M., Vela D., Khalili-Tabrizi H., Casscells S.W., Litovsky S. Systemic infections cause exaggerated local inflammation in atherosclerotic coronary arteries: clues to the triggering effect of acute infections on acute coronary syndromes // Tex Heart Inst. J. – 2007. Vol. 34. – P. 11-18.

354. Mahmood U., Imran M., Naik S.I., Cheema H.A., Saeed A., Arshad M., Mahmood S. Detection of common mutations in the GALT gene through ARMS.//Gene. – 2012.Nov.10, Vol.509, №2. – P.291-294. doi: 10.1016/j.gene.2012.08.010. Epub 2012 Aug

355. Magnussen C.G., Raitakari O.T., Thomson R., et al. Utility of currently recommended pediatric dyslipidemia classifications in predicting dyslipidemia in adulthood: evidence from the Childhood Determinants of Adult Health (CDAH) Study, Cardiovascular Risk in Young Finns Study, and Bogalusa Heart Study. // Circulation. – 2008. Vol.117. - P.32-42.

356. Magnussen C.G., Venn A., Thomson R. , Juonala M., Srinivasan S.R., Viikari J.S., Berenson G.S., Dwyer T., Raitakari O.T. The association of pediatric low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol dyslipidemia classifications and change in dyslipidemia status with carotid intimal-medial thickness in adulthood: evidence from the Cardiovascular Risk in Young Finns Study, the Bogalusa Heart Study, and the CDAH (Childhood Determinants of Adult Health) Study. // J. Am. Coll. Cardiol.– 2009. Vol.53.- P.860-869.

357. Man P.Y., Griffiths P.G., Brown D.T., Howell N., Turnbull D.M., Chinnery P.F.. The epidemiology of Leber hereditary optic

neuropathy in the North East of England. // Am. J. Hum. Genet. – 2003. Vol.72, №2. - P. 333-339.

358. Mancuso M., Ferraris S., Nishigaki Y., Azan G., Mauro A., Sammarco P., Krishna S., Tay S.K., Bonilla E., Romansky S.G., Hirano M., DiMauro S. Congenital or late-onset myopathy in patients with the T14709C mtDNA mutation. // J. Neurol. Sci.– 2005. - Vol.228, №1. - P.93-97.

359. Mancuso M., Vives-Bauza C., Filosto M., Marti R., Solano A., Montoya J., Gamez J., DiMauro S., Andreu A.L. A mitochondrial DNA duplication as a marker of skeletal muscle specific mutations in the mitochondrial genome. // J. Med. Genet. – 2004. Vol.41, №6. - P. 73-82.

360. Mandrup-Poulsen T., Owerbach D., Nerup J., Johansen K., Tybjaerg Hansen A. Diabetes mellitus, atherosclerosis, and the 5' flanking polymorphism of the human insulin gene. // J. Inherit. Metab.Dis.– 1986. Vol.9, №1. -P.98-110.

361. Manichaikul A., Palmas W., Rodriguez C.J., Peralta C.A., Divers J., Guo X., Chen W.M., Wong Q., Williams K., Kerr K.F., Taylor K.D., Tsai M.Y., Goodarzi M.O., Sale M.M., Diez-Roux A.V., Rich S.S., Rotter J.I., Mychaleckyj J.C. Population structure of Hispanics in the United States: the multi-ethnic study of atherosclerosis. // PLoS Genet.– 2012. Vol.8, №4, e1002640.

362. Mardis E.R. Next-generation DNA sequencing methods.// Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. – 2008. Vol.9. – P.387-402

363. Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. // Nature. 2005. Vol.437. – P.376–80

364. Martins e Silva J., Saldanha C. Diet, atherosclerosis and atherothrombotic events. // Rev. Port. Cardiol. – 2007. Vol.26,№3. - P.277-294.

365. Marzoll A., Nagy N., Wordehoff L., Dai G., Fries S., Lindner V., Grosser T., Fischer J.W. Cyclooxygenase inhibitors repress vascular hyaluronan-synthesis in murine atherosclerosis and neointimal thickening. // J. Cell. Mol. Med. – 2009. Vol.13, №9B. - P.3713-3719.
366. Mashima Y., Kigasawa K., Hasegawa H., Tani M., Oguchi Y. High incidence of pre-excitation syndrome in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. // Clin. Genet.– 1996. Vol.50, №6. - P. 535-537.
367. Mathur R.K. Role of diabetes, hypertension, and cigarette smoking on atherosclerosis. // J. Cardiovasc. Dis. Res. – 2010. Vol.1, №2. -P.64-68.
368. Matsunaga H., Tanaka Y., Tanaka M., Gong J.S., Zhang J., Nomiyama T., Ogawa O., Ogihara T., Yamada Y., Yagi K., Kawamori R. Antiatherogenic mitochondrial genotype in patients with type 2 diabetes. // Diabetes Care. – 2001. Vol.24, №3. - P. 500-503.
369. Mazzone A., De Servi S., Ricevuti G., Mazzuchelli I., Fossati G., Passoti D., Dramuchi E. Increased expression of neutrophils and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. // Circulation. – 1993. Vol.88. - P. 358-363.
370. McCaffrey T.A., Consigli S., Du B., Falcone D.J., Sanborn T.A., Spokojny A.M., Bush H.L. Jr. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. // J. Clin. Invest. – 1995. Vol.96, №6. -P. 2667-2675.
371. McGill H.C., Herderick E.E., McMahan C.A., Zieske A.W., Malcolm G.T., Tracy R.E., Strong J.P. Atherosclerosis in youth. // Minerva Pediatr. – 2002. Vol. 54, №5. – P.437-447.



372. McGill H.C., McMahan C.A., Herderick E.E., Tracy R.E., Malcom G.T., Zieske A.W., Strong J.P. Effects of coronary heart disease risk factors on atherosclerosis of selected regions of the aorta and right coronary artery. PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. Vol. 20, №3. – P.836-845.
373. McGill H.C Jr., Strong J.P. The geographic pathology of atherosclerosis. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1968. Vol. 149. – P. 923-927.
374. McMahan C.A., Gidding S.S., Fayad Z.A., Zieske A.W., Malcom G.T., Tracy R.E., Strong J.P., McGill H.C. Risk scores predict atherosclerotic lesions in young people. // *Arch. Intern. Med.* – 2005. Vol.165, №8. – P.883-890.
375. McNamara J.J., Molot M.A., Stremple J.F., Cutting R.T. Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. // *J.A.M.A.* – 1971. Vol. 216. – P.1185-1187.
376. Mehta N.N., Krishnamoorthy P., Martin S.S, St Clair C., Schwartz S., Iqbal N., Braunstein S., Schutta M., Rader D.J., Reilly M.P. Usefulness of insulin resistance estimation and the metabolic syndrome in predicting coronary atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus. // *Am. J. Cardiol.* – 2011. Vol.107, №3.-P.406-411.
377. Melchionna R., Porcelli D., Mangoni A., Carlini D., Liuzzo G., Spinetti G., Antonini A., Capogrossi M.C., Napolitano M. Laminar shear stress inhibits CXCR4 expression on endothelial cells: functional consequences for atherogenesis. // *FASEB J.* – 2005.Vol.19, №6. -P.629-631.
378. Merante F., Tein I., Benson L., Robinson B.H. Maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy due to a novel T-to-C transition at nucleotide 9997 in the mitochondrial tRNA-glycine gene. // *Am.J.Hum. Genet.* – 1994. – Vol. 55. – P. 437-446.

379. Mezghani N., Mnif M., Mkaouar-Rebai E., Kallel N., Salem I.H., Charfi N., Abid M., Fakhfakh F. The mitochondrial ND1 m.3337G>A mutation associated to multiple mitochondrial DNA deletions in a patient with Wolfram syndrome and cardiomyopathy. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2011. Vol.411, №2. -P.247-252.
380. Minick C.R. Endothelial cell abnormalities. // *Mt. Sinai. J. Med.* – 1982. Vol. 49. – P. 194-207.
381. Minick C.R., Stemerman M.B., Insull W Jr. Role of endothelium and hypercholesterolemia in intimal thickening and lipid accumulation. // *Am. J. Pathol.*– 1979. Vol. 95. – P. 131-158.
382. Mkaouar-Rebai E., Tlili A., Masmoudi S., Charfeddine I., Fakhfakh F. New polymorphic mtDNA restriction site in the 12S rRNA gene detected in Tunisian patients with non-syndromic hearing loss. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. Vol.369, №3. - P. 849-852.
383. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008.Vol. 8. – P. 958-969.
384. Morre S.A., Stoker W., Lagrand W.K. Microorganism in the aetiology of atherosclerosis. // *J. Clin. Pathol.* – 2000. Vol.53. - P.647-654.
385. Morrison A.C., Bray M.S., Folsom A.R., Boerwinkle E. ADD1 460W allele associated with cardiovascular disease in hypertensive individuals. // *Hypertension.* – 2002. Vol.39, №6. -P.1053-1057.
386. Morten K.J., Cooper J.M., Brown G.K., Lake B.D., Pike D., Poulton J. A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy. // *Hum. Mol. Genet.* - 1993.Vol.2, №12.- P. 2081-2087.

387. Mozar H.N., Bal D.G., Farag S.A. The natural history of atherosclerosis: an ecologic perspective. // *Atherosclerosis*. – 1990. Vol.82, №1-2. - P. 157-164.
388. Muendlein A., Saely C.H., Marte T., Schmid F., Koch L., Rein P., Langer P., Aczel S., Drexel H. Synergistic effects of the apolipoprotein E epsilon3/epsilon2/epsilon4, the cholesteryl ester transfer protein TaqIB, and the apolipoprotein C3 -482 C>T polymorphisms on their association with coronary artery disease. // *Atherosclerosis*. - 2008. Vol.199, №1. - P. 179-186.
389. Mukae S., Aoki S., Itoh S., Sato R., Nishio K., Iwata T., Katagiri T. Mitochondrial 5178A/C genotype is associated with acute myocardial infarction. // *Circ. J.* – 2003. Vol.67, №1. - P. 16-20.
390. Munro J.M., Cotran R.S. Biology of disease. The pathogenesis of atherosclerosis; atherogenesis and inflammation. // *Lab. Invest.* – 1988., Vol.58. -P. 249-261.
391. Munshi A., Sharma V., Kaul S., Rajeshwar K., Babu M.S., Shafi G., Anila A.N., Balakrishna N., Alladi S., Jyothy A. Association of the -344C/T aldosterone synthase (CYP11B2) gene variant with hypertension and stroke. // *J. Neurol. Sci.* – 2010. Vol.296, №1-2. -P.34-38.
392. Nagai T., Ogimoto A., Okayama H., Ohtsuka T., Shigematsu Y., Hamada M., Miki T., Higaki J. A985G polymorphism of the endothelin-2 gene and atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. // *Circ. J.* - 2007. Vol.71, №12. - P. 1932-1936.
393. Nagornev V.A., Maltseva S.V. The phenotype of macrophages which are not transformed into foam cells in atherogenesis. // *Atherosclerosis*. – 1996. Vol. 121. – P. 245-251.
394. Naini A.B., Lu J., Kaufmann P., Bernstein R.A., Mancuso M., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S. Novel mitochondrial DNA ND5

mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. // Arch. Neurol. – 2005. Vol.62, №3. - P. 473-476.

395. Nakagawa Y., Ikeda K., Akakabe Y., Koide M., Uraoka M., Yutaka K.T., Kurimoto-Nakano R., Takahashi T., Matoba S., Yamada H., Okigaki M., Matsubara H. Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2010. Vol.30, №10. – P.1908-1915.

396. Nakagawa Y., Ikegami H., Yamato E., Takekawa K., Fujisawa T., Hamada Y., Ueda H., Uchigata Y., Miki T., Kumahara Y. A new mitochondrial DNA mutation associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1995. Vol.209, №2. - P. 664-668.

397. Natori S., Lai S., Finn J.P., Gomes A.S., Hundley W.G., Jerosch-Herold M., Pearson G., Sinha S., Arai A., Lima J.A., Bluemke D.A. Cardiovascular function in multi-ethnic study of atherosclerosis: normal values by age, sex, and ethnicity. // AJR Am. J. Roentgenol. – 2006. Vol.186, №6. -P.357-365.

398. Naue J., Sanger T., Schmidt U., Klein R., Lutz-Bonengel S. Factors affecting the detection and quantification of mitochondrial point heteroplasmy using Sanger sequencing and SNaPshot minisequencing. // Int. J. Legal. Med. – 2011. Vol. 125, № 3. – P. 427-436.

399. Nemoto M., Nishimura R., Sasaki T., Hiki Y., Miyashita Y., Nishioka M., Fujimoto K., Sakuma T., Ohashi T., Fukuda K., Eto Y., Tajima N. Genetic association of glutathione peroxidase-1 with coronary artery calcification in type 2 diabetes: a case control study with multi-slice computed tomography. // Cardiovasc. Diabetol. – 2007. Vol.6. -P.23-30.

400. Newton C. R., A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith, and A. F. Markham. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). // *Nucleic. Acids Res.* – 1989. April 11, Vol.17, №7. - P.2503–2516.
401. Newton C.R., Summers C., Schwarz M.J. et al. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assesment in cystic fibrosis. // *Lancet.* – 1989. Dec 23-30, Vol.2, №8678-8679. – P.1481-1483.
402. Nikoskelainen E., Wanne O., Dahl M. Pre-excitation syndrome and Leber's hereditary optic neuroretinopathy. // *Lancet.* – 1985. Vol.1,№8430. - P.696-707.
403. Nishigaki Y., Marti R., Copeland W.C., Hirano M. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. // *J. Clin Invest.* - 2003. –Jun., Vol.111, №12. – P.1913-1921.
404. Nomiyama T., Tanaka Y., Piao L., Hattori N., Uchino H., Watada H., Kawamori R., Ohta S. Accumulation of somatic mutation in mitochondrial DNA and atherosclerosis in diabetic patients. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* –2004. Vol.1011. - P.193-204.
405. Nuntharatanapong N., Chen K., Sinhaseni P., Keaney J.F. Jr. EGF receptor-dependent JNK activation is involved in arsenite-induced p21Cip1/Waf1 upregulation and endothelial apoptosis. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*- 2005. Vol.289, №1. -P. 99-107.
406. Oeseburg H., Westenbrink B.D., de Boer R.A., van Gilst W.H., van der Harst P. Can critically short telomeres cause functional exhaustion of progenitor cells in postinfarction heart failure? // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. Vol.50. -P.1909-1913.

407. Okuda K., Bardeguéz A., Gardner J.P., Rodríguez P., Ganesh V., Kimura M., Skurnick J., Awad G., Aviv A. Telomere length in the newborn. // *Pediatr. Res.* – 2002. Vol.52. -P. 377-381.
408. Ono T., Isobe K., Nakada K., Hayashi J.I. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. // *Nature Genetics.* – 2001. – Vol. 28. – P.272-275.
409. Olivier M. The Invader® assay for SNP genotyping. / *Mutat Res.*– 2005. June 3. Vol.573, №1-2. – P.103–110.
410. Orgel L.E.Ageing of clones of mammalian cells. // *Nature.* – 1973. Jun 22, V.243, №5408. – P.441-445. Review.
411. Orlandi A., Bochaton-Piallat M.L., Gabbiani G., Spagnoli L.G. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. // *Atherosclerosis.* – 2006. Vol. 188. – P. 221-230.
412. Osborn M., Caselitz J., Puschel K., Weber K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. // *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* – 1987.Vol. 411. – P. 449-458.
413. Ota Y., Tanaka M., Sato W., Ohno K., Yamamoto T., Maehara M., Negoro T., Watanabe K., Awaya S., Ozawa T. Detection of platelet mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*– 1991.Vol.32, №10. - P. 2667-2675.
414. Owens G.K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. // *Physiol Rev.* – 1995. Vol. 75. – P. 487-517.
415. Packard R.R.,Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. // *Clin Chem.* – 2008. Vol.54, №1. – P. 24-38.
416. Pávková Goldbergová M., Spinarová L., Spinar J., Pařenica J., Šišková L., Groch L., Máchal J., Vašků A. Difference in

angiotensinogen haplotype frequencies between chronic heart failure and advanced atherosclerosis patients - new prognostic factor? // *Physiol. Res.* – 2011. Vol.60, №1. -P. 55-64.

417. Peiretti F, Canault M., Morange P., Alessi M.C., Nalbone G. The two sides of ADAM17 in inflammation: implications in atherosclerosis and obesity. // *Med. Sci. (Paris)*.– 2009. Vol.25, №1. -P.45-50.

418. Pernow J., Shemyakin A., Bohm F. New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus. // *Life Sci.* - 2012. Vol.91, №13-14. - P. 507-516.

419. Pham Y., Tu Y., Wu T., Allen T.J., Calkin A.C., Watson A.M., Li J., Jandeleit-Dahm K.A., Toh B.H., Cao Z., Cooper M.E., Chai Z. Cell division autoantigen 1 plays a profibrotic role by modulating downstream signalling of TGF-beta in a murine diabetic model of atherosclerosis. // *Diabetologia*.– 2010.Vol.53, №1. -P.170-179.

420. Pinto A., Di Raimondo D., Tuttolomondo A., Butta C., Milio G., Licata G. Effects of Physical Exercise on Inflammatory Markers of Atherosclerosis. // *Curr. Pharm. Des.* – 2012.Vol.18, №28. -P.4326-4349.

421. Pinto J.R., Siegfried J.D., Parvatiyar M.S., Li D., Norton N., Jones M.A., Liang J., Potter J.D., Hershberger R.E. Functional characterization of TNNC1 rare variants identified in dilated cardiomyopathy. // *J. Biol. Chem.* – 2011. Vol.286, №39. -P.34404-34412.

422. Piřha J., Hubáček J.A., Piřhová P. The connexin 37 (1019C>T) gene polymorphism is associated with subclinical atherosclerosis in women with type 1 and 2 diabetes and in women with central obesity. // *Physiol. Res.* – 2010. Vol.59,№6. -P.1029-1032.

423. Polgar N., Jaromi L., Csongei V., Maasz A., Sipeky C., Safrany E., Szabo M., Melegh B. Triglyceride level modifying functional variants of GALTN2 and MLXIPL in patients with ischaemic stroke. // *Eur. J. Neurol.* – 2010. Vol.17, №8. -P. 1033-1039.
424. Pollin T.I., Damcott C.M., Shen H., Ott S.H., Shelton J., Horenstein R.B., Post W., McLenithan J.C., Bielak L.F., Peyser P.A., Mitchell B.D., Miller M., O'Connell J.R., Shuldiner A.R. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. // *Science.* – 2008. Vol.322, №5908. -P.1702-1705.
425. Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis.// *Atherosclerosis Suppl.* – 2007. Vol.8, №1. – P.46.
426. Pulkes T., Siddiqui A., Morgan-Hughes J.A., Hanna M.G. A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Tyr) gene associated with exercise intolerance. // *Neurology.* – 2000. Vol.55, №8. - P. 1210-1212.
427. Puomila A., Viitanen T., Savontaus M.L., Nikoskelainen E., Huoponen K. Segregation of the ND4/11778 and the ND1/3460 mutations in four heteroplasmic LHON families. // *J. Neurol. Sci.* – 2002. Vol.205, №1. - P. 41-45.
428. Qiu P., Shandilya H., D'Alessio J.M., O'Connor K., Durocher J., Gerard G.F. Mutation detection using Surveyor nuclease. // *Biotechniques.* - 2004. Vol.36. – P.702–707.
429. Rahman S., Taanman J.W., Cooper J.M., Nelson I., Hargreaves I., Meunier B., Hanna M.G., Garcia J.J., Capaldi R.A., Lake B.D., Leonard J.V., Schapira A.H. A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and



myopathy. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1999. Vol.65, №4. - P. 1030-1039.

430. Rakesh K., Agrawal D.K. Cytokines and growth factors involved in apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. // *Int. Immunopharmacol.* – 2005. Vol. 5. – P. 1487-1506.

431. Reardon W., Ross R.J., Sweeney M.G., Luxon L.M., Pembrey M.E., Harding A.E., Trembath RC. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. // *Lancet.* – 1992. Vol.340, №8832. - P. 1376-1379.

432. Reitter A., Fischer D., Buxmann H., Nitschke Y., Rutsch F., Mottok A., Hansmann M.L., Harms E., Louwen F., Schlosser R. Fetal hydrops, hyperechogenic arteries and pathological doppler findings at 29 weeks: prenatal presentation of generalized arterial calcification of infancy - a novel mutation in ENPP1. // *Fetal. Diagn. Ther.* – 2009. Vol.25, №2. -P.264-268.

433. Riordan-Eva P., Sanders M.D., Govan G.G., Sweeney M.G., Da Costa J., Harding A.E. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. // *Brain.*– 1995. Vol.118, №2. - P. 319-337.

434. Roder C., Peters V., Kasuya H., Nishizawa T., Takehara Y., Berg D., Schulte C., Khan N., Tatagiba M., Krischek B. Common genetic polymorphisms in moyamoya and atherosclerotic disease in Europeans. // *Childs. Nerv. Syst.*– 2011. Vol.27, №2. -P.245-252.

435. Rokitansky C. von. A manual of pathological anatomy. // Sydenham, London. - 1852.Vol. 4.

436. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. // *Genome Reseach.* – 2001. Vol.11. - P. 3-11.

437. Ronghua Li, Yuqi Liu, Zongbin Li, Li Yang, Shiwen Wang, Min-Xin Guan. Failures in Mitochondrial tRNAMet and tRNAGln

Metabolism Caused by the Novel 4401A>G Mutation Are Involved in Essential Hypertension in a Han Chinese Family. // Hypertension.– 2009. Vol.54, №2. -P.329-337.

438. Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. // N. Engl. J. Med. – 1999. Vol. 340. – P. 115-126.

439. Ross R., Glomset J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. // Science. – 1973. Vol. 180. – P. 1332-1339.

440. Ross R., Glomset J.A. The pathogenesis of atherosclerosis // N Engl J Med. – 1976. Vol. 295. – P. 369-377.

441. Ross R., Glomset J., Harker L. Response to injury and atherogenesis. // Am J. Pathol. – 1997. Vol. 86. – P. 675-684.

442. Rufer N., Brummendorf T.H., Kolvraa S., Bischoff C., Christensen K., Wadsworth L., Schulzer M., Lansdorp P.M. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. // J. Exp. Med. -1999. Vol.190. -P. 157-167.

443. Ruiter E.M., Siers M.H, van den Elzen C., van Engelen B.G., Smeitink J.A., Rodenburg R.J., Hol F.A. The mitochondrial 13513G>A mutation is most frequent in Leigh syndrome combined with reduced complex I activity, optic atrophy and/or Wolff-Parkinson-White. // Eur. J. Hum. Genet.– 2007. Vol.15, №2. - P. 155-161.

444. Sawabe M., Arai T., Araki A., Hosoi T., Kuchiba A., Tanaka N., Naito T., Oda K., Ikeda S., Muramatsu M. Smoking confers a MTHFR 677C>T genotype-dependent risk for systemic atherosclerosis: results from a large number of elderly autopsy

cases that died in a community-based general geriatric hospital. // J. Atheroscler. Thromb. – 2009. Vol.16, №2. - P. 91-104.

445. Saika Y., Sakai N., Takahashi M., Maruyama T., Kihara S., Ouchi N., Ishigami M., Hiraoka H., Nakamura T., Yamashita S., Matsuzawa Y. Novel LPL mutation (L303F) found in a patient associated with coronary artery disease and severe systemic atherosclerosis. // Eur. J. Clin. Invest. – 2003. Vol.33, №3. - P.216-222.

446. Salonen R., Nyysönen K., Porkkala E., Rummukainen J., Belder R., Park J.S., Salonen J.T. Kuopio Atherosclerosis Prevention Study (KAPS). A population-based primary preventive trial of the effect of LDL lowering on atherosclerotic progression in carotid and femoral arteries. // Circulation. – 1995. Vol. 92. – P.1758-1764.

447. Samani N.J., Braund P.S., Erdmann J., Gotz A., Tomaszewski M., Linsel-Nitschke P, Hajat C, Mangino M, Hengstenberg C, Stark K, Ziegler A, Caulfield M., Burton P.R., Schunkert H., Tobin M.D. The novel genetic variant predisposing to coronary artery disease in the region of the PSRC1 and CELSR2 genes on chromosome 1 associates with serum cholesterol. // J. Mol. Med. (Berl).– 2008. Vol.86, №11. -P. 1233-1241.

448. Santorelli F.M., Mak S.C., El-Schahawi M., Casali C., Shanske S., Baram T.Z., Madrid R.E., DiMauro S. Maternally inherited cardiomyopathy and hearing loss associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene (G8363A). // Am. J. Hum. Genet. – 1996. Vol.58, №5. - P. 933-939.

449. Satomura K., Mizuno K., Shibuya T. Prevention of progression of coronary atherosclerosis by drug and diet therapy. // Nihon. Ronen. Igakkai. Zasshi. – 1990. Vol.27, №4. -P.438-441.

450. Sato W., Tanaka M., Ohno K., Yamamoto T., Takada G., Ozawa T. Multiple populations of deleted mitochondrial DNA detected by a novel gene amplification method. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. V.162, № 2, 31 July. - P.664-672.
451. Saukko M, Kesaniemi YA, Ukkola O. Leptin receptor Lys109Arg and Gln223Arg polymorphisms are associated with early atherosclerosis. // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* – 2010. Vol.8, №5. – P.425-430.
452. Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khazanova Z.B., Postnov A.Y., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Direct quantitative assessment of mutant allele in mitochondrial genome in atherosclerotic lesion of human aorta. // *Atherosclerosis Suppl.* – 2007. Vol.8, №1. – P.45-46.
453. Sazonova M.A., Andrianova I.V., Khazanova Z.B., Sobenin I.A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. // *Atherosclerosis Suppl.*– 2009. Vol.9, №1. - P.113-119.
454. 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.Vol.204, №1. – P.184-190. (Epub 2009 Sep 4).
455. Sazonova M.A., Budnikov Ye. Ye., Khazanova Z.B., Postnov A.Yu., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Possible role of somatic mitochondrial mutations in the development of atherosclerotic lesion of human aorta. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2008. - Vol. 51, №10, Suppl.A:A285.
456. Sazonova M.A., Chicheva M.M., Balanovsky O.P., Balanovska E.V., Postnov A.Y., Orekhov A.N., Sobenin I.A.. The

frequencies of mitochondrial haplogroups U, T and M are different in atherosclerotic and non-atherosclerotic subjects. // 81st Congress of the European Atherosclerosis Society, Lyon, France. – 2013, June 2-5. – Interactive poster session. – Abstr. №1226.

457. Sazonova M.A., Ivanova M.M., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Korobov G.A., Postnov A.Y., Sobenin I.A. Mutations of mitochondrial genes of subunits 1, 2, 5 and 6 of NADH dehydrogenase are associated with atherosclerotic lipofibrous plaques. // 80st Congress of the European Atherosclerosis Society, Milan, Italy. – 2012, May 25-28. – Interactive poster session. – Abstr. № 986.

458. Sazonova M.A., Zhelankin A.V., Ivanova M.M., Korobov G.A., Mitrofanov K.Y., Postnov A.Y., Sobenin I.A. Detection of mutations G14846A and G15059A of gene coding cytochrome B in lipofibrous plaques in intima of human aortas. // 80st Congress of the European Atherosclerosis Society, Milan, Italy. – 2012, May 25-28. – Interactive poster session. – Abstr. № 991.

459. Sazonova M.A., Sobenin I.A., Postnov A.Y., Ragino Y.I., Orekhov A.N. An association of mutations of mitochondrial DNA with aortic atherosclerotic lesions. // *Atherosclerosis Supplements*. – 2011. Vol.12, №1. – P.1.

460. Schafer A., Bauersachs J. Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2008. Vol. 6. – P. 52-60.

461. Scheer W.D., Boudreau DA., Hixson J.E., McGill H.C., Newman W.P. 3rd, Tracy R.E., Zieske A.W., Strong J.P. ACE insert/delete polymorphism and atherosclerosis. // *Atherosclerosis*. – 2005. Vol.178, №2. -P.241-247.

462. Shibata N., Glass C.K. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. // *J. Lipid. Res.* – 2009. Vol. 50., Suppl. – P. S277-S281.
463. Shimada K. Immune system and atherosclerotic disease. Heterogeneity of Leukocyte Subsets Participating in the Pathogenesis of Atherosclerosis. // *Circ. J.* – 2009. Vol. 73. – P. 994-1001.
464. Schollen E., Vandenberk P., Cassiman J.J., Matthijs G. Development of reverse dot-blot system for screening of mitochondrial DNA mutations associated with Leber hereditary optic atrophy. // *Clin. Chem.* – 1997. Vol.43, №1. - P. 18-23.
465. Scholte A.J., Nucifora G., Delgado V., Djaberi R., Boogers M.J., Schuijf J.D., Kharagjitsingh A.V., Jukema J.W., van der Wall E.E., Kroft L.J., de Roos A., Bax J.J. Subclinical left ventricular dysfunction and coronary atherosclerosis in asymptomatic patients with type 2 diabetes. // *Eur. J. Echocardiogr.* – 2011. Vol.12, №2. - P.148-155.
466. Schreiner P.J., Heiss G., Tyroler H.A., Morrisett J.D., Davis C.E., Smith R. Race and gender differences in the association of Lp(a) with carotid artery wall thickness. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*– 1996. Vol.16, №3. -P.471-478.
467. Scott L., Kerr A., Haydock D., Merrilees M. Subendothelial proteoglycan synthesis and transforming growth factor beta distribution correlate with susceptibility to atherosclerosis. // *J. Vasc. Res.* – 1997. Vol.34, №5. -P. 365-377.
468. Seibel P., Lauber J., Klopstock T., Marsac C., Kadenbach B., Reichmann H. Chronic progressive external ophthalmoplegia is associated with a novel mutation in the mitochondrial tRNA(Asn)

gene. // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1994. Vol.204, №2. - P.482-489.

469. Silvestri G., Santorelli F.M., Shanske S., Whitley C.B., Schimmenti L.A., Smith S.A., DiMauro S. A new mtDNA mutation in the tRNA leu(UUR) gene is associated with maternally inherited cardiomyopathy. // Hum.Mut. – 1994. Vol. 3. – P.37-43.

470. Sima A.V., Stancu C.S., Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. // Cell Tissue Res. – 2009. Vol. 335. – P. 191-203.

471. Shields K.J., Stolz D., Watkins S.C., Ahearn J.M. Complement proteins C3 and C4 bind to collagen and elastin in the vascular wall: a potential role in vascular stiffness and atherosclerosis. // Clin. Transl. Sci. – 2011. Vol.4, №3. - P. 146-152.

472. Shimoda Y., Satoh M., Nakamura M., Akatsu T., Hiramori K. Activated tumour necrosis factor-alpha shedding process is associated with in-hospital complication in patients with acute myocardial infarction. // Clin. Sci. (Lond). – 2005.Vol.108, №4. - P.339-347.

473. Shin W.S., Tanaka M., Suzuki J., Hemmi C., Toyo-oka T. A novel homoplasmic mutation in mtDNA with a single evolutionary origin as a risk factor for cardiomyopathy. // Am. J. Hum. Genet. – 2000. Vol.67, №6. - P. 1617-1620.

474. Singh R., Ellard S., Hattersley A., Harries L.W. Rapid and sensitive real-time polymerase chain reaction method for detection and quantification of 3243A>G mitochondrial point mutation. // J. Mol. Diagn.– 2006.Vol.8, №2. - P. 225-230.

475. Shirts B.H., Hasstedt S.J., Hopkins P.N., Hunt S.C. Evaluation of the gene-age interactions in HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglyceride levels: the impact of the SORT1 polymorphism on

LDL cholesterol levels is age dependent. // *Atherosclerosis*. – 2011. Vol.217, №1. -P. 139-141.

476. Shivpuri S., Gallo L.C., Crouse J.R., Allison M.A. The association between chronic stress type and C-reactive protein in the multi-ethnic study of atherosclerosis: does gender make a difference? // *J. Behav. Med.* – 2012. Vol.35,№1. -P.74-85.

477. Skoczynska A., Dobosz T., Poreba R., Turczyn B., Derkacz A., Zoledziwska M., Jonkisz A., Lebioda A. The dependence of serum interleukin-6 level on PPAR-alpha polymorphism in men with coronary atherosclerosis. // *Eur. J. Intern. Med.* – 2005. Vol.16, №7. -P.501-506.

478. Snyder L. R., Kirkland J.J. and Glajch J. L. *Practical HPLC Method Development.*//New York: John Wiley & Sons, 1997. – 747 p.

479. Sobenin I.A., Chistiakov D.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N., Postnov A.Y. Association of the level of heteroplasmy of the 15059G>A mutation in the MT-CYB mitochondrial gene with essential hypertension. // *World J. Cardiol.* – 2013. May 26, Vol.5, №5. – P.132-140. doi: 10.4330/wjc.v5.i5.132.

480. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Chicheva-Ivanova M.M., Mitrofanov K.Y., Zhelankin A.V., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. The level of heteroplasmy of mitochondrial genome is an explanatory biomarker for both subclinical and manifested atherosclerosis. // 81st Congress of the European Atherosclerosis Society, Lyon, France. – 2013, June 2-5. – Interactive poster session. – Abstr. № 416.

481. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Zhelankin A.V., Myasoedova V.A., et al. Mutation C3256T of Mitochondrial Genome in White Blood Cells: Novel Genetic Marker of Atherosclerosis and



- Coronary Heart Disease. // PLoS One. –2012. Vol.7, №10, e46573. doi: 10.1371/journal.pone.0046573. Epub 2012 Oct 2.
482. 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.,Vol.227, №2. – P.283-288.
483. 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. Jul9, Vol.8, №7:e68070. doi: 10.1371/journal.pone.0068070. Print 2013.
484. Sobue K., Hayashi K., Nishida W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. // *Mol Cell Biochem*. – 1999. Vol. 190. – P. 105-118.
485. Soemedi R., Topf A., Wilson I.J., Darlay R., Rahman T., Glen E., Hall D., Huang N., Bentham J., Bhattacharya S., Cosgrove C., Brook J.D., Granados-Riveron J., Setchfield K., Bu'lock F., Thornborough C., Devriendt K., Breckpot J., Hofbeck M., Lathrop M., Rauch A., Blue G.M., Winlaw D.S., Hurles M., Santibanez-Koref M., Cordell H.J., Goodship J.A., Keavney B.D. Phenotype-specific effect of chromosome 1q21.1 rearrangements and GJA5 duplications in 2436 congenital heart disease patients and 6760 controls. // *Hum. Mol. Genet.* -2012. Vol.21, №7. -P. 1513-1520.
486. Solano A., Roig M., Vives-Bauza C., Hernandez-Pena J., Garcia-Arumi E., Playan A., Lopez-Perez M.J., Andreu A.L., Montoya J. Bilateral striatal necrosis associated with a novel mutation in the mitochondrial ND6 gene. // *Ann. Neurol.* – 2003. Vol.54, №4.- P. 527-530.
487. Sosa M.X., Sivakumar I.K., Maragh S., Veeramachaneni V., Hariharan R., Parulekar M., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Lin J., Feldman A.B., Tata P., Ehret G.B., Chakravarti A. Next-generation

- sequencing of human mitochondrial reference genomes uncovers high heteroplasmy frequency. // *PLoS Comput Biol.* – 2012. Vol.8, №10:e1002737. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002737
488. Srivastava A., Garg N., Mittal T., Khanna R., Gupta S., Seth P.K., Mittal B. Association of 25 bp deletion in MYBPC3 gene with left ventricle dysfunction in coronary artery disease patients. // *PLoS One.* – 2011.Vol.6, №9, e24123.
489. Starr B., Hadfield S.G., Hutten B.A., Lansberg P.J., Leren T.P., Damgaard D., Neil H.A., Humphries S.E. Development of sensitive and specific age- and gender-specific low-density lipoprotein cholesterol cutoffs for diagnosis of first-degree relatives with familial hypercholesterolaemia in cascade testing. // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2008. Vol.46, №6. -P.791-803.
490. Stenqvist L., Paetau A., Valanne L., Suomalainen A., Pihko H. A juvenile case of MELAS with T3271C mitochondrial DNA mutation. // *Pediatr. Res.*– 2005. Vol.58, №2. - P. 258-262.
491. Stemerman M.B. Effects of moderate hypercholesterolemia on rabbit endothelium.// *Arteriosclerosis.* – 1981. Vol. 1. – P. 25-32.
492. Sternberg D., Danan C., Lombes A., Laforet P., Girodon E., Goossens M., Amselem S. Exhaustive scanning approach to screen all the mitochondrial tRNA genes for mutations and its application to the investigation of 35 independent patients with mitochondrial disorders. // *Hum. Mol. Genet.*– 1998. Vol.7, №1. - P. 33-42.
493. Sussmann M., Sarbia M., Meyer-Kirchrath J., Nusing R.M., Schror K., Fischer J.W. Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins. // *Circ. Res.* – 2004. Vol.94,№5. -P.592-600.
494. Suzuki Y., Suzuki S., Hinokio Y., Chiba M., Atsumi Y., Hosokawa K., Shimada A., Asahina T., Matsuoka K. Diabetes

- associated with a novel 3264 mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) mutation. // *Diabetes Care.*–1997. Vol.20, №7. - P. 1138-1140.
495. Svendsen E., Eide T.J. Distribution of atherosclerosis in human descending thoracic aorta. A morphometric study. // *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.* – 1980. Vol. 88. – P. 97-101.
496. Tang S., Huang T. Characterization of mitochondrial DNA heteroplasmy using a parallel sequencing system. // *Biotechniques.* –2010. Apr., Vol.48, №4.-P.287-296.
497. Tanimoto H., Nishio H., Matsuo M., Nibu K. A novel mitochondrial mutation, 1556C --> T, in a Japanese patient with streptomycin-induced tinnitus. // *Acta Otolaryngol.* – 2004. Apr.,Vol.124, №3. – P.258-261.
498. Tawata M., Hayashi J.I., Isobe K., Ohkubo E., Ohtaka M., Chen J., Aida K., Onaya T. A new mitochondrial DNA mutation at 14577 T/C is probably a major pathogenic mutation for maternally inherited type 2 diabetes. // *Diabetes.* – 2000.Vol.49, №7. - P. 1269-1272.
499. Tengan C.H., Kiyomoto B.H., Rocha M.S., Tavares V.L., Gabbai A.A., Moraes C.T. Mitochondrial encephalomyopathy and hypoparathyroidism associated with a duplication and a deletion of mitochondrial deoxyribonucleic acid. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1998.Vol. 83, №1. - P. 125-129.
500. Teplyakov A.I. Endothelin-1 involved in systemic cytokine network inflammatory response at atherosclerosis. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.*– 2004. Vol.44, №1. -P.274-275.
501. Terasaki F., Tanaka M., Kawamura K., Kanzaki Y, Okabe M., Hayashi T., Shimomura H., Ito T., Suwa M., Gong J.S., Zhang J., Kitaura Y. A case of cardiomyopathy showing progression from the hypertrophic to the dilated form: association of Mt8348A->G mutation in the mitochondrial tRNA(Lys) gene with severe

ultrastructural alterations of mitochondria in cardiomyocytes. // *Jpn. Circ. J.* – 2001. Vol.65, №7. - P. 691-694.

502. Thajeb P., Ma Y.S., Tzen C.Y., Chuang C.K., Wu T.Y., Chen S.C., Wei Y.H. Oculopharyngeal somatic myopathy in a patient with a novel large-scale 3,399 bp deletion and a homoplasmic T5814C transition of the mitochondrial DNA. // *Clin. Neurol. Neurosurg.* – 2006. Vol.108, №4. -P.407-410.

503. Tian C., Liu T., Fang S., Du X., Jia C. Association of C47T polymorphism in SOD2 gene with coronary artery disease: a case-control study and a meta-analysis. // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. Vol.39, №5. -P.5269-5276.

504. Timur A.A., Driscoll D.J., Wang Q. Biomedicine and diseases: the Klippel-Trenaunay syndrome, vascular anomalies and vascular morphogenesis. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. Vol.62, №13. -P.1434-1447.

505. Toikka J.O., Niemi P., Ahotura M., Nonikosti H., Viirari S.A., Ronnerna T., Hartiala J.J., Raitakari O.T. Large-artery elastic properties in young men. Relationships to serum lipoproteins and oxidized low density lipoproteins. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1999. Vol. 19. – P.436-441.

506. Tomari Y., Hino N., Nagaïke T., Suzuki T., Ueda T. Decreased CCA-addition in human mitochondrial tRNAs bearing a pathogenic A4317G or A10044G mutation. // *J. Biol. Chem.*– 2003. Vol.278, №19. - P. 16828-16833.

507. Torrente, I., Arturi, F., D'Aloiso, L., Colosimo, A., De Luca, A., Ferretti, E., Russo, D., Chiefari, E., Scarpelli, D., Bisceglia, M., Dallapiccola, B., Filetti, S. Evaluation of a DHPLC-based assay for rapid detection of RET germline mutations in Italian patients with medullary thyroid carcinoma. // *J. Endocrinol. Invest.* - 2004. Vol.27. - P.111–116.

508. Tsuji J., Frith M.C., Tomii K., Horton P. Mammalian NUMT insertion is non-random. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2012. Vol.40, №18. - P. 9073-9088.
509. Turner L.F., Kaddoura S., Harrington D., Cooper J.M., Poole-Wilson P.A., Schapira A.H. Mitochondrial DNA in idiopathic cardiomyopathy. // *Eur. Heart. J.* – 1998.Vol.19, №11. - P. 1725-1729.
510. Tuzcu E.M., Kapadia S.R., Tutar E. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. // *Circulation.* – 2001. Vol. 103. – P.2705-2710.
511. Tybjaerg-Hansen A., Gerdes L.U., Overgaard K., Ingerslev J., Faergeman O., Nerup J. Polymorphism in 5' flanking region of human insulin gene. Relationships with atherosclerosis, lipid levels, and age in three samples from Denmark. // *Arteriosclerosis.*– 1990. Vol.10, №3. -P.372-378.
512. Urbich C., Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. // *Circ. Res.* – 2004. Vol.95. -P. 343-353.
513. Uusimaa J., Finnila S., Vainionpaa L., Karppa M., Herva R., Rantala H., Hassinen I.E., Majamaa K. A mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase II gene in a child with Alpers-Huttenlocher-like disease. // *Pediatrics.*– 2003. Vol.111, №3. - P. 262-268.
514. Valentino M.L., Avoni P., Barboni P., Pallotti F., Rengo C., Torroni A., Bellan M., Baruzzi A., Carelli V. Mitochondrial DNA nucleotide changes C14482G and C14482A in the ND6 gene are pathogenic for Leber's hereditary optic neuropathy. // *Ann. Neurol.*– 2002. Vol.51, №6. -P.774-778.

515. Van Hove J.L., Freehauf C., Miyamoto S., Vladutiu G.D., Pancrudo J., Bonilla E., Lovell M.A., Mierau G.W., Thomas J.A., Shanske S. Infantile cardiomyopathy caused by the T14709C mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene. // *Eur. J. Pediatr.* – 2008. Vol.167, №7. -P.771-776.
516. Van Rijn M.J., Bos M.J., Yazdanpanah M., Isaacs A., Arias-Vasquez A., Koudstaal P.J., Hofman A., Wittteman J.C., van Duijn C.M., Breteler M.M. Alpha-adducin polymorphism, atherosclerosis, and cardiovascular and cerebrovascular risk. // *Stroke.* – 2006. Vol.37, №12. -P.2930-2934.
517. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction // *Circ. J.* – 2009. Vol. 73. – P. 595-601.
518. Varlamov D.A., Kudin A.P., Vielhaber S., Schroder R., Sassen R., Becker A., Kunz D., Haug K., Rebstock J., Heils A., Elger C.E., Kunz W.S. Metabolic consequences of a novel missense mutation of the mtDNA CO I gene. // *Hum. Mol. Genet.* – 2002.Vol.11, ,№16 - P. 1797-1805.
519. Velican C., Velican D. Progression of coronary atherosclerosis from adolescents to mature adults. // *Atherosclerosis.* – 1983. Vol. 47. – P. 131-144.
520. Velican D., Velican C. Study of fibrous plaques occurring in the coronary arteries of children. // *Atherosclerosis.* – 1979. – Vol. 33. – P. 201-205.
521. Wong L.J., Liang M.H., Kwon H., Bai R.K., Alper O., Gropman A. A cystic fibrosis patient with two novel mutations in mitochondrial DNA: mild disease led to delayed diagnosis of both disorders. // *Am. J. Med. Genet.* – 2002. V. 113, № 1. - P. 59-64.
522. Venegas V., Halberg M.C. Quantification of mtDNA mutation heteroplasmy (ARMS qPCR). // *Methods Mol. Biol.* – 2012. Vol.837. – P.313-326. doi: 10.1007/978-1-61779-504-6\_21.

523. Vibhuti N. Coronary Heart Disease. *Medicine health*. URL: [http://www.emedicinehealth.com/coronary\\_heart\\_disease/article\\_em.htm#coronary\\_heart\\_disease\\_overview](http://www.emedicinehealth.com/coronary_heart_disease/article_em.htm#coronary_heart_disease_overview) (Date accessed 3.02.2014)
524. Vindis C, Escargueil-Blanc I, Uchida K, Elbaz M, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Lipid oxidation products and oxidized low-density lipoproteins impair platelet-derived growth factor receptor activity in smooth muscle cells: implication in atherosclerosis. // *Redox. Rep.* – 2007. Vol.12, №1. - P. 96-100.
525. Von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*– 2000. Vol.908. -P. 99-110.
526. Wallace D.C., Brown M.D., Lott M.T. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. // *Gene.*– 1999. Vol.238, №1. - P. 211-230.
527. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G., Lezza A.M., Elsas L.J. 2nd, Nikoskelainen E.K. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. // *Science.*– 1988. Vol.242, №4884. - P. 1427-1430.
528. Walsh M.P. Vascular smooth muscle myosin light chain diphosphorylation: mechanism, function, and pathological implications. // *IUBMB Life.*– 2011. Vol.63, №11. -P.987-1000.
529. Wang Y., Fu W., Xie F., Wang Y., Chu X., Wang H., Shen M., Wang Y., Wang Y., Sun W., Lei R., Yang L., Wu H., Foo J., Liu J., Jin L., Huang W.. Common polymorphisms in ITGA2, PON1 and THBS2 are associated with coronary atherosclerosis in a candidate gene association study of the Chinese Han population. // *J. Hum. Genet.*– 2010. Vol.55, №8. -P.490-494.
530. Wassel C.L., Pankow J.S., Rasmussen-Torvik L.J., Li N., Taylor K.D., Guo X., Goodarzi M.O., Palmas W.R., Post W.S.

Associations of SNPs in ADIPOQ and subclinical cardiovascular disease in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). // Obesity (Silver Spring).– 2011. Vol.19, №4. -P.840-847.

531. Witte I., Foerstermann U., Devarajan A., Reddy S.T., Horke S. Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer. // J. Lipids. 2012;2012:342806. doi: 10.1155/2012/342806. Epub 2012 May 13.

532. Weber C., Kraemer S., Drechsler M., Lue H., Koenen R.R., Kapurniotu A., Zernecke A., Bernhagen J. Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. Vol.105, №42. - P. 16278-16283.

533. Werth D., Grassi G., Konjer N., Dapas B., Farra R., Giansante C., Kandolf R., Guarnieri G., Nordheim A., Heidenreich O. Proliferation of human primary vascular smooth muscle cells depends on serum response factor. // Eur. J. Cell. Biol. – 2010. Vol.89, №2-3. - P. 216-224.

534. Wick G., Knoflach M., Xu Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. // Annu Rev Immunol. – 2004. Vol. 22. – P. 361-364.

535. Williams S.L., Mash D.C., Zuchner S., Moraes C.T. Somatic mtDNA mutation spectra in the aging human putamen. // PLoS Genet. – 2013. Dec;9 (12): e1003990. doi: 10.1371/journal.pgen.1003990. Epub 2013 Dec 5.

536. Wong L.J., Chen T.J., Tan D.J. Detection of Mitochondrial DNA Mutations by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. // Electrophoresis. – 2004. Aug., Vol.25, №15. – P.2602-2610.



537. Wong L.J., Liang M.H., Kwon H., Park J., Bai R.K., Tan D.J.: Comprehensive scanning of the entire mitochondrial genome for mutations. // Clin. Chem. – 2002. Vol.48. – P.1901-1912.
538. Wong L.J., Senadheera D. Direct detection of multiple point mutations in mitochondrial DNA. // Clin. Chem. – 1997. Vol.43, №10. - P. 1857-1861.
539. Woo J., Tang N.L., Leung J., Kwok T. The Alu polymorphism of angiotensin I converting enzyme (ACE) and atherosclerosis, incident chronic diseases and mortality in an elderly Chinese population // J. Nutr. Health. Aging. - 2012. Vol.16, №3. - P. 262-268.
540. Woodward M., Lam T.H., Barzi F., Patel A., Gu D., Rodgers A., Suh I.; Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Smoking, quitting, and the risk of cardiovascular disease among women and men in the Asia-Pacific region. // Int. J. Epidemiol. – 2005. Vol.34, №5. -P. 1036-1045.
541. Wrischnik L.A., Higuchi R.G., Stoneking M., Erlich H.A., Arnheim N., Wilson A.C. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA. // Nucleic Acids Res. – 1987. Vol.15, №2. - P. 529-542.
542. Yamagata K., Muro K., Usui J., Hagiwara M., Kai H., Arakawa Y., Shimizu Y., Tomida C., Hirayama K., Kobayashi M., Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. // J. Am. Soc. Nephrol. – 2002. Vol.13, №7.- P. 1816-1823.
543. Yamori Y. Food factors for atherosclerosis prevention: Asian perspective derived from analyses of worldwide dietary biomarkers. // Exp. Clin. Cardiol. – 2006. Vol.11, №2. -P. 94-98.
544. Yan N., Cai S., Guo B., Mou Y., Zhu J., Chen J., Zhang T., Li R., Liu X. A novel mitochondrial tRNA(Val) T1658C mutation

identified in a CPEO family. // *Mol. Vis.* – 2010. Vol.16. - P. 1736-1742.

545. Yan Z.Q., Hansson G.K. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis // *Immunol Rev.* – 2007. Vol. 219. – P. 187-203.

546. Yang T., Lam C.W., Tsang M.W., Tong S.F., Kam G.Y., Chan L.Y., Poon P.M., Wu X., Pang C.P. Novel mitochondrial 16S rRNA mutation, 3200T-->C, associated with adult-onset type 2 diabetes. // *Chin. Med. J. (Engl).*– 2002. Vol.115, №5.- P. 753-758.

547. Yang Z., Huang X., Jiang H., Zhang Y., Liu H., Qin C., Eisner G.M., Jose P., Rudolph L., Ju Z. Short telomeres and prognosis of hypertension in a Chinese population. // *Hypertension.* – 2009. Vol.53. -P. 639-645.

548. Yasuda H., Kamide K., Takiuchi S., Matayoshi T., Hanada H., Kada A., Yang J., Miwa Y., Yoshii M., Horio T., Yoshihara F., Nakamura S., Nakahama H., Tei C., Miyata T., Kawano Y. Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension. // *J. Hum. Hypertens.*– 2007. Vol.21, №11. - P. 883-892.

549. Yasunari K., Kohno M., Kano H., Hanehira T., Minami M., Yoshikawa J. Anti-atherosclerotic action of vascular D1 receptors. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* – 1999. Vol.26. -P. 36-40.

550. Yasunari K., Kohno M., Kano H., Yokokawa K., Minami M., Yoshikawa J. Dopamine D1-like receptor stimulation inhibits hypertrophy induced by platelet-derived growth factor in cultured rat renal vascular smooth muscle cells. // *Hypertension.*– 1997. Vol.29, №1-2. -P. 350-355.

551. Yeung A.C., Vekshtein V.I., Krantz D.S., Vita J.A., Ryan T.J. Jr, Ganz P., Selwyn A.P. The effect of atherosclerosis on the

- vasomotor response of coronary arteries to mental stress. // N. Engl. J. Med.– 1991.Vol.325, №22. - P. 1551-1556.
552. Zhang A.M., Zou Y., Guo X., Jia X., Zhang Q., Yao Y.G. Mitochondrial DNA mutation m.3635G>A may be associated with Leber hereditary optic neuropathy in Chinese. // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2009. Vol.386, №2. -P. 392-395.
553. Zhao H., Li R., Wang Q., Yan Q., Deng J.H., Han D., Bai Y., Young W.Y., Guan M.X. Maternally inherited aminoglycoside-induced and nonsyndromic deafness is associated with the novel C1494T mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene in a large Chinese family. // Am. J. Hum. Genet. -2004. Vol.74, №1. - P. 139-152.
554. Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Nikitina N.A., Sobenin I.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. Association of human mitochondrial DNA mutations with chronic noninflammatory diseases: hypertension, type 2 diabetes, and CHD // 80st Congress of the European Atherosclerosis Society, Milan, Italy. – 2012, May 25-28. – Interactive poster session. – Abstr. № 981.
555. Zifa E., Daniil Z., Skoumi E., Stavrou M., Papadimitriou K., Terzenidou M., Kostikas K., Bagiatis V., Gourgoulialis K.I., Mamuris Z. Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma.// Mol. Biol. Rep. – 2012. Apr.39, №4. – P.4697-708. doi: 10.1007/s11033-011-1262-8. Epub 2011 Sep 24.





Люблю **КНИГИ**  
ljubljudknigi.ru



yes  
**i want morebooks!**

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн - в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! Мы используем экологически безопасную технологию "Печать-на-Заказ".

Покупайте Ваши книги на  
**www.ljubljudknigi.ru**

---

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at  
**www.get-morebooks.com**

VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8  
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174  
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de  
www.vdm-vsg.de







