

Мозаичность интимы аорты по митохондриальным мутациям G15059A и G14846A гена цитохрома В при атеросклеротических поражениях у человека*

Сазонова М.А.^{1,2}, Синёв В.В.², Баринаева В.А.², Рыжкова А.И.³, Желанкин А.В.², Митрофанов К.Ю.¹, Постнов А.Ю.², Собенин И.А.^{1,2}, Орехов А.Н.^{1,4}

¹ — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д.8, e-mail: niioip@mail.ru

² — Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения Российской Федерации», 121552, Москва, Черепковская 3-я ул., 15-а, e-mail: info@cardioweb.ru; margaritaasazonova@gmail.com

³ — Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», 121552, Москва, ул. Академика Скрябина, д.23, e-mail: rector@mgavm.ru; ryzhkovaai@gmail.com

⁴ — Научно-исследовательский институт атеросклероза Инновационного центра Сколково, Московская обл., Сколково, ул. Новая, д.100, e-mail: office@inat.ru; a.h.opexob@gmail.com

Атеросклероз магистральных сосудов человека, в подавляющем большинстве случаев, является морфологической основой смертности от сердечно-сосудистых патологий. В XXI столетии заболевание атеросклерозом стало носить эпидемический характер. Помочь ранней диагностике данной патологии могут молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с атеросклерозом. Исследования зарубежных и отечественных исследователей посвящены, в основном, аутомным мутациям, ассоциированным с атеросклерозом. Молекулярно-генетическим дефектам митохондриального генома, ассоциированным с атеросклеротическими поражениями, посвящено всего несколько работ. В настоящей работе была проанализирована ассоциация уровня гетероплазмии митохондриальных мутаций G15059A и G14846A гена цитохрома В с атеросклерозом индивидов, интима аорт которых была морфологически разделена на участки с атеросклеротическими поражениями различной степени тяжести.

Ключевые слова: митохондриальный геном, мутация, ген, уровень гетероплазмии, цитохром В, интима аорты, липофиброзная, бляшка, начальное атеросклеротическое поражение, фиброзная бляшка, атеросклероз

Введение

В XXI столетии заболевание атеросклерозом стало носить эпидемический характер [9, 24, 28—30, 34, 36, 37, 54, 55]. Если раньше данная патология была характерна для пожилых людей, то сейчас она поражает даже молодых индивидов. Актуальность и своевременность изучения данной патологии представляется очевидной.

Особенностью атеросклероза является сложность распознавания данного заболевания на начальных стадиях. Помочь ранней диагностике данной патологии могут молекулярно-генетические маркеры, ассоциированные с атеросклерозом.

Согласно данным литературы, различные патологии ассоциированы с определенными митохондриальными мутациями. Мутации митохондриального генома коррелируют с различными заболеваниями, такими, как диабет, некоторые формы глухоты, миопатии, стеноз коронарных сосудов, предрасположенность к острому инфаркту миокарда, кардиомиопатии. Данные патологии часто встречаются совместно с атеросклерозом [2—4, 6—8, 10].

Исследования зарубежных и отечественных исследователей посвящены, в основном, аутомным мутациям, ассоциированным с атеросклерозом [7, 19, 20, 27, 40, 52, 53, 56]. Молекулярно-генетическим дефектам митохондриального генома, ассоциированным с атеросклеротическими поражениями, посвящено всего несколько работ [5, 12—18, 25, 26, 38, 41—51, 53].

В большинстве таких исследований анализировались обширные делеции, приводящие к полной дисфункции митохондриального генома [25, 26, 53].

Следует отметить, что из-за нестабильности митохондриального генома в нем нередко возникают соматические мутации. При анализе ассоциации митохондриальных мутаций с патологиями необходима количественная оценка уровня гетероплазмии митохондриального генома [11, 41—43, 45].

В настоящей работе была проанализирована ассоциация уровня гетероплазмии митохондриальных мутаций G15059A и G14846A гена цитохрома В с атеросклерозом индивидов, интима аорт которых была морфологически разделена на участки с атеросклеротическими поражениями различной степени тяжести. Согласно данным литературы, цитохром В (субъединица III комплекса III) представляет собой гидрофобный белок с молекулярной массой 44 кДа. Цитохром В (MT-CYB) является центральной окислительно-восстановительной каталитической субъединицей гидрохинона: цитохрома С или пластоцианина оксиредуктазы. Он вовлечен в связывание хинона с субстратом и несет ответственность за передачу трансмембран-

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

ных электронов, с помощью которых окислительно-восстановительная энергия преобразуется в протондвижущую силу [32]. Ген МТ-СУВ включает 1141 п.н. и локализуется в позиции от 14747 до 15887 нуклеотида митохондриального генома [35].

Материалы и методы

Материалы

В качестве материала для исследования были использованы 265 нормальных и пораженных атеросклерозом различной степени тяжести участков морфологически картированной стенки аорт от 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 [28].

Внешне неизменные участки аорты имели гладкую люминальную поверхность. На вертикальных срезах в интима 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. Наблюдалось небольшие накопления внеклеточных липидных капель в соединительнотканном 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 соединительнотканном 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-ткан-

ная покрышка. 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 нормальной сосудистой ткани.

Методы

1. Выделение ДНК

Тотальную ДНК из образцов ткани аорты (10 мкг) выделяли с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К.

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

2. ПЦР

Данные о последовательности праймеров и условиях реакций ПЦР были найдены в статьях, посвященных митохондриальным мутациям-кандидатам для исследования их ассоциации с атеросклерозом [21—23].

Для ПЦР 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 (табл. 2) [48, 49—58]:

- MQ (H₂O) — 4,6 мкл;
- Смесь dNTPs 10x: 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP — 4 мкл;
- 10x буфер для ПЦР (16,6 M (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8) — 4 мкл;
- MgCl₂:
 - 25 mM — 4 мкл (при необходимой концентрации 2,5 mM);
 - 2,4 мкл (при необходимой концентрации 1,5 mM);
- Taq-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.

3. 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) [96, 454]. 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://rus-sia.sibenzyme.com/info231.php>)

Примеры геле/электрофорезов ПЦР-фрагментов исследованных митохондриальных мутаций представлены на рис. 1.

Последовательности праймеров для ПЦР [21–23]:

1) прямой праймер bio-CATTATTCTCGCACGGACT (14671 — 14689);

2) обратный праймер GCTATAGTTGCAAGCAGGAG (15120 — 15100).

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

Условия для ПЦР представлены в табл. 1.

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

4. Пиросеквенирование

После проведения ПЦР амплификаты были пиросеквенированы для выявления точечных замен или микроделений митохондриального генома человека. Исследования проводили на автоматическом пиросеквенаторе PSQTMHS96MA. При постановке эксперимента была реализована схема приготовления проб, описанная в прилагающемся к пиросеквенатору методическом пособии (использовались сефарозные частицы). Последовательности праймеров для сиквенса указаны в табл. 2. Подбор праймеров осуществлялся с помощью компьютерной программы Primer3 [31].

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

5. Статистический анализ

Статистическая оценка результатов была проведена с помощью бутстрэп-анализа [1, 39] и программы IBM SPSS 21,0 (<http://spss.ru>).

Результаты

1. Морфологическое и мутационное картирование аорты

Для оценки взаимосвязи двух 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 индивидов, погибших в результате несчастного случая или внезапной смерти).

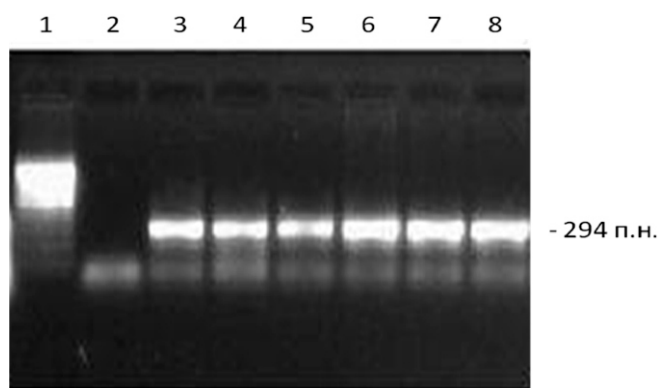


Рис. 1. Гель/электрофорез ПЦР-фрагментов, содержащих область мутаций G14846A и G15059A:

1 — ДНК-маркер 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.); 2 — отрицательный контроль; 3–8 — ПЦР-фрагменты, содержащие область мутаций G14846A и G15059A.

Каждый образец представлял собой участок сосудистой стенки размером приблизительно 7 x 9 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. Всего было проанализировано 265 участков интимы аорт (табл. 3).

Составлены морфологические карты для каждого образца аорты, на которых отмечалось взаимное расположение идентифицированных зон. Пример морфологической карты исследованных аорт представлен на рис. 2.

2. Анализ митохондриальных мутаций G15059A и G14846A гена цитохрома B в морфологически картированной интиме аорты человека

При анализе всех участков нормальной и пораженной атеросклерозом интимы пяти образцов аорт посредством бутстрэп-анализа выявлено, что с суммарным атеросклеротическим поражением картированных аорт положительно ассоциирована мутация митохондриального генома G15059A — высокодостоверно (табл. 4).

Согласно критерию сдвига Уилкоксона для зависимых выборок (на усредненных данных — для всех аорт одновременно), выявлено (табл. 5), что с суммарным начальным атеросклеротическим поражением (жировыми точками и жировыми полосами) и суммой всех участков липофиброзных бляшек также ассоциирована, на том же уровне значимости, мутация митохондриального генома G15059A. Также при анализе суммы участков липофиб-

Таблица 1

Условия для ПЦР фрагментов мутаций G14846A и G15059A

Размер ПЦР-фрагмента	Концентрация MgCl ₂ в буфере для ПЦР	Денатурация	Отжиг	Синтез
450 п.н.	1,5 мМ	94°C	55°C	72°C

Таблица 2

Праймеры для пиросиквенса

Мутация	Праймер для пиросиквенса
G14846A	GCGCCAAGGAGTGA
G15059A	TTTCTGAGTAGAGAAATGAT

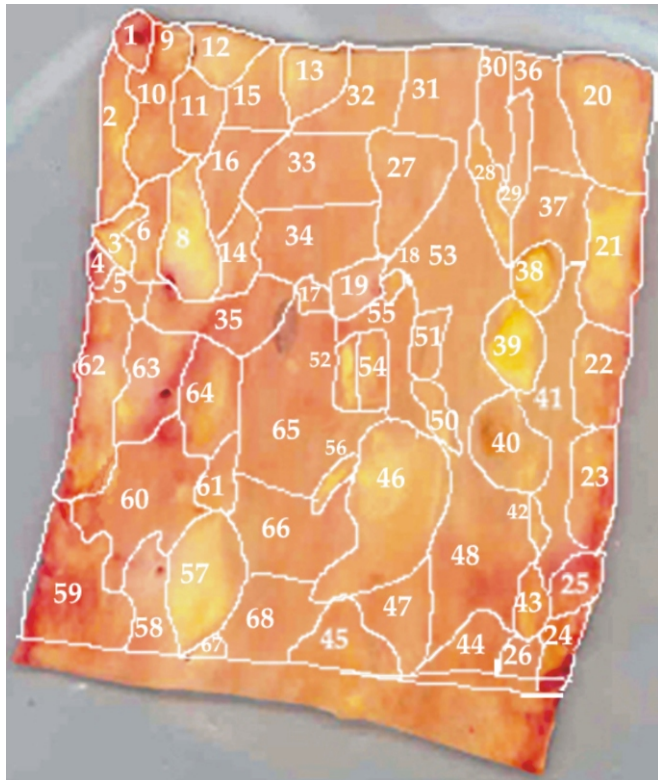


Рис. 2. Морфологическая карта аорты №1

розных бляшек выявлена высокодостоверно отрицательная корреляция мутации G14846A с данным типом поражения.

Обсуждение результатов

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 содержащие их мутантные моноциты приобретают склонность к липоидозу. То есть, итогом патофизиологических процессов, запускаемых мутациями митохондриального генома, является превращение мутантных моноцитов в пенные клетки.

С целью проверки данного предположения было принято решение о сравнительном анализе уровня гетероплазмы в нормальной и пораженной атеросклерозом интими артерий людей.

Таблица 3

Степень атеросклеротического поражения морфологически картированных образцов аорт

№ образца 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

**Бутстрэп-анализ коэффициента корреляции
между уровнем гетероплазмии митохондриальных мутаций G14846A и G15059A
и наличием суммарного атеросклеротического поражения картированных образцов аорт**

Мутация	Значение коэффициента корреляции	Асимптотическая значимость (двусторонняя)
G14846A	0,297	0,129
G15059A	0,451*	0,037*

Примечание. * — достоверная корреляция мутаций с атеросклеротическим поражением ($p \leq 0,05$)

**Мутации митохондриального генома G14846A и G15059A
в различных типах суммарного атеросклеротического поражения (АТП)
морфологически картированных образцов аорт**

Мутации	Начальное АТП		Липофиброзные бляшки		Фиброзные бляшки	
	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость	Коэффициент корреляции	Асимптоматическая значимость
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. * — достоверная корреляция мутаций с атеросклеротическим поражением ($p \leq 0,05$)

Данные о патологиях, вызываемых мутациями G14846A и G15059A гена цитохрома В [21—23]

Мутация	Патология
G14846A (замена глицина на серин в позиции 34 (G34S))	Митохондриальные миопатии
G15059A (нонсенс-мутация, в результате которой аминокислота 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)	Митохондриальные миопатии, миоглобинурия, непереносимость физических нагрузок

Для определения процента гетероплазмии в исследуемых образцах автором с сотрудниками был разработан новый оригинальный метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома [11, 41—43, 45], основанный на технологии пиросеквенирования [19, 20, 27, 40]. Данный метод оказался пригоден для исследования любых биологических образцов. С его помощью можно определять уровень гетероплазмии 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 развитии онкологических процессов.

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. Согласно данным литературы, исследованные мутации ассоциированы с различными патологиями (табл. 6).

Большинство типов атеросклеротических поражений аорт оказалось ассоциировано с мутацией G15059A, что может говорить о том, что ключевым моментом в запуске патофизиологических механизмов, в результате которых формируются атеросклеротические поражения в артериях человека, являются дефекты цитохрома В.

Мутация G14846A проявила антиатерогенный эффект в липофиброзных бляшках. Вероятно, данная мутация способствует стабилизации комплекса III дыхательной цепи митохондрии.

Возможным объяснением того, что уровень гетероплазмии исследуемых мутаций митохондриального генома в фиброзных бляшках снижается, по сравнению с другими типами атеросклеротического поражения, может быть гибель мутантных клеток интимы в фиброзных бляшках.

Заключение

В настоящей работе подтверждена фокальность атеросклеротических поражений в интима аорты человека. Основанием для данного подтверждения явились отличия в уровне гетероплазмии мутаций митохондриального генома G15059A и G14846A между участками нормальной и пораженной атеросклерозом морфологически картированной интимы аорт человека.

В суммарном атеросклеротическом поражении выявлена проатерогенная мутация — G15059A. В липофиброзных бляшках антиатерогенной является мутация G14846A.

Результаты могут быть использованы практическими врачами и медицинскими генетиками для ранней диагностики и семейного анализа атеросклероза, а также оценки предрасположенности к данному заболеванию.

Список литературы

1. Вейр Б. Анализ генетических данных / Пер. с англ. — М.: Мир., 1995. — 400 с., ил.
2. Желанкин А.В., Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома человека с хроническими заболеваниями невоспалительного генеза: сахарным диабетом 2 типа, артериальной гипертензией и различными видами кардиомиопатии // Пат. физиол. и эксп. тер. — 2012. — №3. — С. 124–129.
3. Иванова М.М., Бородачёв Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома // Пат. физиол. и эксп. тер. — 2012. — №3. — С. 115–122.
4. Иванова М.М., Сазонова М.А., Орехов А.Н., Собенин И.А. Некоторые мутации митохондриального генома человека, ассоциированные с цитопатиями // Биомед. журн. Medline.ru. — 2012. — Т. 13, Ст. 26. — С. 309–330.
5. Косогорова С.А., Сазонова М.А., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Коробов Г.А., Собенин И.А. Анализ гетероплазмы митохондриальной мутации C5178A гена субъединицы 2 NADH дегидрогеназы в гомогенатах поражённой интимы аорты // Биомед. журн. Medline.ru. — 2012. — Т. 13, Ст. 26. — С. 895–899.
6. 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.
7. Митрофанов К.Ю., М.А. Сазонова. Ассоциация точковых мутаций ядерного и митохондриального геномов человека с ишемической болезнью сердца // Пат. физиол. и эксп. тер. — 2012. — №2. — С. 51–56.
8. Митрофанов К.Ю., А.В. Желанкин, М.А. Сазонова, И.А. Собенин, А.Ю. Постнов. Хронические заболевания невоспалительного генеза и мутации митохондриального генома человека // Кардиол. вестн. — 2012. — Т. 7 (19), №1. — С. 57–61.
9. Орехов А.Н. Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия. — Palmarium Academic Publishing, 2013. — 536 с. ISBN: 978-3-659-98213-2.
10. Сазонова М., Орехов А., Собенин И. Дефекты митохондриального генома и атеросклероз. Роль патологии митохондриального генома в формировании атеросклеротических поражений артериальной стенки. — Palmarium Academic Publishing, 2014. — 354 с. ISBN: 978-3-639-88097-7.
11. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома // Пат. физиол. и эксп. тер. — 2011. — №4. — С. 81–84.
12. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М., Орехов А.Н., Постнов А.Ю. Анализ митохондриальной мутации A1555G в тотальных гомогенатах атеросклеротических поражений // Вестн. уральской мед. академ. науки. — 2012. — Т. 2(39). — С. 72–73.
13. Сазонова М.А., Желанкин А.В., Иванова М.М. Уровень гетероплазмы митохондриальной мутации C5178A в тотальных гомогенатах поражённой атеросклерозом интимы аорты // Вестн. уральской мед. академ. науки. — 2012. — Т.2(39). — С. 73–74.
14. 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 // Пат. физиол. и эксп. тер. — 2012. — №4. — С. 71–74.
15. 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 поражённой атеросклерозом интимы аорты // Пат. физиол. и эксп. тер. — 2012. №4. — С. 67–70.
16. 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 гетероплазмы мутации митохондриального генома G14459A в гомогенатах интимы аорты человека // Атеросклероз и дислипидемии. — 2013. — №1. — С. 40–44.
17. Сазонова М.А., Нурбаев С.Д., Желанкин А.В., Иванова М.М., Митрофанов К.Ю., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Ассоциация мутаций митохондриальных генов субъединиц 1, 2, 5 и 6 NADH-дегидрогеназы с липофиброзными бляшками аорты человека // Кардиол. вестн. — 2013. — Т. 8 (20), №1. — С. 32–35.
18. Синёв В.В., Сазонова М.А., Чичёва М.М., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Собенин И.А., Постнов А.Ю. Изучение гетероплазмы мутации митохондриального генома A1555G в гомогенатах поражённой атеросклерозом интимы аорты // Атеросклероз и дислипидемии. — 2013. — №3. — С. 45–48.
19. Agaton C., Unneberg P., Sievertzon M. et al. Gene expression analysis by signature pyrosequencing // Gene. — 2002. — Vol. 289, №1–2. — P. 31–39.
20. Alderborn A., Kristofferson A., Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing // Genome Res. — 2000. — №10. — P. 1249–1258.
21. Andreu A.L., Bruno C., Dunne T.C., Tanji K., Shanske S., Sue C.M., Krishna S., Hadjigeorgiou G.M., Shtilbans A., Bonilla E., DiMauro S. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria // Ann. Neurol. — 1999. — Jan. — Vol. 45, №1. — P. 127–130.
22. 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. — Vol. 51, №5. — P. 1444–1447.
23. Andreu A.L., Hanna M.G., Reichmann H. et al. Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome b gene of mitochondrial DNA // N. Engl. J. Med. — 1999. — Sep. — Vol. 341, №14. — P. 1037–1044.
24. Baev V.M., Sharapova N.V., Shmeleva S.A. [Restoration of the blood rheological patients with cap on the background of arterial hypertension in the process of hospital treatment] // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. — 2013. — Apr. — Jun. — №2. — P. 23–25. Russian. PubMed PMID: 24000709.
25. 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.
26. 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.
27. Chen D.C., Saarela J., Nuotio I. et al. Comparison of GenFlex Tag array and Pyrosequencing in SNP genotyping // J. Mol. Diagn. — 2003. — №5. — P. 243–249.
28. 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.
29. Gusev E., Chereshev V.A. [Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 2. Evolution aspects] // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. — 2013. — Jan. — Mar. — №1. — P. 3–14. Russian. PubMed PMID: 23805708.
30. Gusev E.Y., Chereshev V.A. [Systemic inflammation: theoretical and methodological approaches to description of general pathological process model. Part 3. Background for nonsyndromic approach] // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. — 2013. — Jul.—Sep. — №3. — P. 3–14. Russian. PubMed PMID: 24340611
31. <http://simgene.com/Primer3>
32. Esposti M.D., De Vries S., Crimi M., Ghelli A., Patarnello T., Meyer A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein // Biochim. Biophys. Acta. — 1993. — Jul. 26. — Vol. 1143, №3. — P. 243–271. Review.
33. European cardiovascular disease statistics, 2012 edition // European Heart Network and European Society of Cardiology. — 2012. — 127 p.
34. Lebedeva M.A., Bogachev V.Yu., Ternovoi K.S., Nikushkina N.E., Karganov M.Yu. [Cardiac pathology and autonomic dysfunction in patients with vertebral and spinal cord injury] // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. — 2012. — Jul.—Sep., №3. — P. 94–98. Russian. PubMed PMID: 23072119.
35. MT-CYB mitochondrially encoded cytochrome b [Homo sapiens (human)] Gene ID: 4519, updated on 16-Oct-2014.

36. Pokhachevskii A.L. [The time analysis of distribution cardio intervals at loading testing] // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* — 2011. — Apr. — Jun., №2. — P. 34–40. Russian. PubMed PMID: 21846059.
37. Poliakova M.A., Gavrilova N.A. [The current conception about the pathogenic mechanisms of the diabetic optical neuropathy development] // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* — 2012. — Jul. — Sep. — №3. — P. 129–132. Review. Russian. PubMed PMID: 23072125.
38. Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y. et al. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis // *Atherosclerosis Suppl.* — 2007. — Vol. 8, №1. — P. 46.
39. Quenouille M. Notes on bias in estimation // *Biometrika.* — 1956. — Vol. 43. — P. 253–260.
40. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing // *Genome Reseach.* — 2001. — №11. — P. 3–11.
41. Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta // *Atherosclerosis Suppl.* — 2008. — Vol. 9, №1. — P. 113.
42. 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.
43. Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khasanova 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.
44. 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.
45. Sobenin I.A., Mitrofanov K.Y., Zhelankin A.V., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Revin V.V., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Quantitative assessment of heteroplasmy of mitochondrial genome: perspectives in diagnostics and methodological pitfalls // *Biomed. Res. Int.* — 2014; 2014:292017. doi: 10.1155/2014/292017. Epub 2014 Apr 10.33.
46. Sobenin Igor A., Sazonova Margarita A., Postnov Anton Y., Bobryshev Yuri V., and Orekhov Alexander N. Mitochondrial Mutations are Associated with Atherosclerotic Lesions in the Human Aorta // *Clin. Dev. Immunol.* — 2012; 2012:832464. Epub 2012 Sep 11.
47. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Ivanova M.M., Zhelankin A.V., Myasoedova V.A., Postnov A.Y., Nurbaev S.D., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Mutation C3256T of Mitochondrial Genome in White Blood Cells: Novel Genetic Marker of Atherosclerosis and Coronary Heart Disease // *PLoS One.* — 2012. — Vol. 7, №10:e46573. doi: 10.1371/journal.pone.0046573. Epub 2012 Oct 2.
48. 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. — Jan 25. doi:pii: S0021-9150(13)00041-5. 10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.006. [Epub ahead of print].
49. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Salonen J.T., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mitochondrial genetic variation with carotid atherosclerosis // *PLoS One.* — 2013. — Jul 9, Vol.8, №7: e68070. doi: 10.1371/journal.pone.0068070. Print 2013.
50. Sobenin I.A., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. An association of mutations of mitochondrial DNA with aortic atherosclerotic lesions // *Atherosclerosis Suppl.* — 2011. — Vol. 12, №1. — P. 68.
51. Sobenin I.A., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Sinyov V.V., Sazonova M.A., Postnov A.Y., Orekhov A.N. Mutations of Mitochondrial DNA in Atherosclerosis and Atherosclerosis-Related Diseases // *Curr. Pharm. Des.* — 2014. — Oct 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25312735.
52. Sinclair A., Arnold C., Woodford N. Rapid detection and estimation by pyrosequencing of 23S rRNA genes with a single nucleotide polymorphism conferring linezolid resistance in Enterococci // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2003. — Vol. 47. — P. 3620–3622.
53. 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.
54. Titov V.N. [Theory humoral pathology K. Rokitansky, cellular pathology R Virchow and new phylogenetic theory disease development. Ethiology and pathogenesis of metabolic pandemics] // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* — 2013. — Apr.—Jun. — №2. — P. 3–12. Russian. PubMed PMID: 24000706.
55. Turenkov I.N., Voronkov A.V., Slietsans A.A. [Role of endothelial dysfunction in the development of vascular complications of diabetes] // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* — 2013. — Apr. — Jun., №2. — P. 80–84. Review. Russian. PubMed PMID: 24000720.
56. Wasson J., Scolnick G., Love-Gregory L. et al. Assessing allele frequencies of single nucleotide polymorphisms in DNA pools by pyrosequencing technology // *BioTechniques.* — 2002. — Vol. 32. — P. 1144–1452.

Посмунула 16.11.2013

Mosaicism of mitochondrial mutations G15059A and G14846A of cytochrome B gene in atherosclerotic lesions of human aortic intima

Sazonova M.A.^{1,2}, Sinyov V.V.², Barinova V.A.², Ryzhkova A.I.³, Zhelankin A.V.², Mitrofanov K.Yu.¹, Postnov A.Yu.², Sobenin I.A.^{1,2}, Orekhov A.H.^{1,4}

¹ — Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, The Russian Federation, 125315, tel. +7 (499) 151-17-56, fax +7-495-601-2366, niiopp@mail.ru

² — Cardiology Research Complex MH RF, 15a, 3rd Cherepkovskaya street, Moscow, The Russian Federation, 121552, tel. +7 (499) 140-93-36, fax +7 (499) 140-93-36, info@cardioweb.ru; margaritaasazonova@gmail.com

³ — K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, 23, Academic Skryabin St., Moscow, The Russian Federation, 109472, tel. +7 (495)377-91-17, fax +7 (495)377-49-39, rector@mgavm.ru; ryzhkovaai@gmail.com

⁴ — Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre, 100, Novaya St., Moscow Region, Russian Federation; tel. +7 (495) 414-50-41, fax: +7 (495) 414-50-41, office@inat.ru; a.h.opexob@gmail.com

In most cases atherosclerosis of human great vessels is a morphological basis of mortality from cardiovascular pathologies. In the twenty-first century atherosclerosis has an epidemic character. Molecular genetic markers associated with atherosclerosis can help early diagnosis of this pathology. Studies of researchers all over the world are mainly devoted to autosomal mutations associated with atherosclerosis. Only a few studies are devoted to molecular genetic defects in the mitochondrial genome associated with atherosclerotic lesions. In this study we analyzed the association of the heteroplasmy level in mitochondrial mutation G15059A and G14846A of cytochrome B gene with atherosclerosis in individuals, the aortic intima of which was morphologically divided into segments with atherosclerotic lesions of varying severity.

Key words: mitochondrial genome, mutation, gene, heteroplasmy level, cytochrome B, aortic intima, lipofibrous, plaque, primary atherosclerotic lesion, fibrous, atherosclerosis