

# СВЯЗЬ МИТОФАГИИ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА МАКРОФАГОВ С МИТОХОНДРИАЛЬНЫМИ МУТАЦИЯМИ

## THE RELATIONSHIP OF MITOPHAGY AND THE PROINFLAMMATORY RESPONSE OF MACROPHAGES WITH MITOCHONDRIAL MUTATIONS

 <b>Верхова Светлана Сергеевна</b>	 <b>Verkhova Svetlana Sergeevna</b>
 <b>Никифоров Никита Геннадиевич</b>	 <b>Nikiforov Nikita Gennadievich</b>
 <b>Журавлев Александр Дмитриевич</b>	 <b>Zhuravlev Alexander Dmitrievich</b>
 <b>Омельченко Андрей Владимирович</b>	 <b>Omelchenko Andrey Vladimirovich</b>
 <b>Синёв Василий Владимирович</b>	 <b>Sinev Vasily Vladimirovich</b>
 <b>Собенин Игорь Александрович</b>	 <b>Sobenin Igor Alexandrovich</b>
 <b>Винокуров Андрей Юрьевич</b>	 <b>Vinokurov Andrey Yurievich</b>
 <b>Орехов Александр Николаевич</b>  Российский научный центр хирургии им. Академика Б.В. Петровского	 <b>Orekhov Alexander Nikolaevich</b>  Russian Scientific Center of Surgery named after V.I. Academician B. V. Petrovsky
 <b>Институт биологии гена Российской академии наук</b>	 <b>Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences</b>
 <b>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии</b>	 <b>Research Institute of General Pathology and Pathophysiology</b>
 <b>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии</b>	 <b>National Medical Research Center for Cardiology</b>
 <b>Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева</b>	 <b>Orel State University named after I.S. Turgenev</b>
 <b>Научно-исследовательский институт атеросклероза</b>	 <b>Research Institute of Atherosclerosis</b>

E-mail: [verhova.svetlana@gmail.com](mailto:verhova.svetlana@gmail.com)

## Резюме

Функциональная активность клеток, участвующих в иммунном ответе, зависит от корректной работы митохондрий. Нарушение функционирования митохондрий может привести к различным сердечно-сосудистым заболеваниям воспалительного генеза, включая атеросклероз [1]. В данной работе мы проверяли гипотезу, что митохондриальная дисфункция, вызванная мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК), может быть одной из причин, ведущих к хронизации воспаления при атеросклерозе. Мы исследовали клетки цибридных линий, созданные на основе клеточной линии ТНР-1. Цибридные линии различались между собой только профилем гетероплазмии. В результате изучения провоспалительного ответа иммунокомпетентными клетками установили, что клетки демонстрируют три типа провоспалительной активности: нон-респондеры, толерантные и нетолерантные. В рамках исследования мы выявили комбинации мутаций мтДНК ассоциированные с провоспалительным ответом и дальнейшим формированием иммунной толерантности: комбинация m.c3256t, m.del652g и m.g13513a была связана с нетолерантными, комбинация m.g15059a, m.g12315a и m.c5178a была связана с нон-респондерами. Причиной накопления митохондриальных мутаций могут служить нарушения в контроле качества митохондрий, митофагии. Мы выявили, что мутация m.g14846a связана с дефектной митофагией. Таким образом, мы установили, что мутации мтДНК были связаны с провоспалительным ответом клеток, формированием иммунной толерантности и митофагией.

**Ключевые слова:** хроническое воспаление, врожденный иммунитет, иммунная толерантность, митохондриальные мутации, цибридные линии, митофагия, гетероплазмия.

The functional activity of cells involved in the immune response depends on the correct functioning of mitochondria. Mitochondrial dysfunction can lead to various inflammatory cardiovascular diseases, including atherosclerosis [1]. In this work, we tested the hypothesis that mitochondrial dysfunction caused by mitochondrial DNA (mtDNA) mutations may be one of the causes leading to chronic inflammation in atherosclerosis. We have studied cybrid cell lines based on the THP-1 cell line. The cybrid lines differed from each other only in the profile of heteroplasmy. As a result of studying the pro-inflammatory response by inflammatory cells, it was found that the cells demonstrate three types of pro-inflammatory activity: non-responders, tolerant and intolerant. As part of the study, we identified combinations of mtDNA mutations associated with a pro-inflammatory response and further formation of immune tolerance: the combination of m.c3256t, m.del652g and m.g13513a was associated with intolerant ones, the combination of m.g15059a, m.g12315a and m.c5178a was associated with non-responders. The reason for the accumulation of mitochondrial mutations may be disturbances in the quality control of mitochondria and mitophagy. We found that the m.g14846a mutation is associated with defective mitophagy. Thus, we found that mtDNA mutations were associated with the pro-inflammatory response of cells, the formation of immune tolerance, and mitophagy.

**Key words:** chronic inflammation, innate immunity, immune tolerance, mitochondrial mutations, cybrid lines, mitophagy, heteroplasmy.

## Библиографическая ссылка на статью

Верхова С.С., Никифоров Н.Г., Журавлев А.Д., Омельченко А.В., Синева В.В., Собенин И.А., Винокуров А.Ю., Орехов А.Н.  
Связь митофагии и провоспалительного ответа макрофагов с митохондриальными мутациями // Innova. - 2023. - Т. 9 № 1. - С.6-15.

## References to the article

Verkhova S.S., Nikiforov N.G., Zhuravlev A.D., Omelchenko A.V., Sineva V.V., Sobenin I.A., Vinokurov A.Yu., Orekhov A.N.  
Association of mitophagy and pro-inflammatory response of macrophages with mitochondrial mutations // Innova. - 2023. - V. 9 No. 1. - P.6-15

## DOI:

Атеросклероз является одним из наиболее распространенных заболеваний, связанных с хроническим воспалением, на долю которого приходится большое количество смертей из-за вызываемых им сердечно-сосудистых нарушений [1]. Хроническое воспаление играет важную роль на всех стадиях прогрессирования атеросклероза: от ранних проявлений до образования и разрыва бляшек [2]. В настоящее время причины, по которым воспаление не может разрешиться и переходит в хроническую форму, не ясны. Важной стадией разрешения воспаления является толерантность врожденного иммунитета. Под толерантностью понимают десенсибилизацию клеток при повторной стимуляции эндотоксином ЛПС. Хорошо известно, что митохондрии играют значимую роль в правильном функционировании

клеток врожденного иммунитета. Клетка может содержать от десятков до сотен митохондрий, каждая из которых содержит несколько копий своего генома. Сосуществование в одной клетке различных вариантов мтДНК называется гетероплазмией. Предполагается, что митохондриальные мутации могут быть связаны с нарушением в формировании иммунной толерантности клеткой-хозяином. При накоплении мутаций в митохондриальной ДНК происходит снижение функциональности органелл. Эффективным путём устранения дисфункциональных митохондрий является митофагия. Одной из причин, по которым в клетке накапливаются дисфункциональные митохондрии, может быть дефектная митофагия. Дефектная митофагия может влиять на иммунный ответ на уровне секреции

воспалительных цитокинов, что приводит к нарушению нормального функционирования иммунных клеток и способствует развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний [3]. Мы решили выявить мутации и комбинации мутаций мтДНК, связанные с нарушениями в провоспалительной активности и митофагии.

#### **Материалы и методы:**

##### **Культура клеток.**

Ранее нам удалось получить цибридные линии на основе моноцитарной клеточной линии THP-1. Цибриды получали путём слияния безмитохондриальных клеток THP-1 с тромбоцитами пациентов, различающихся по профилю гетероплазмии клеток крови. Каждая из цибридных линий содержала ядерный геном THP-1 и митохондриальный геном отдельного пациента [4].

##### **Оценка провоспалительной активности клеток.**

В культуру клеток, культивируемых в среде RPMI-1640 с L-глутамином 10% FBS, добавляли LPS в концентрации 1000 нг/мл. Клетки культивировали в течение 24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. После чего клетки промывали PBS и меняли культуральную среду. Затем в культуру повторно добавляли LPS в концентрации 1000 нг/мл ещё на 4 ч. После каждой стимуляции LPS отбирали супернатант для оценки содержания провоспалительных цитокинов. Наконец, в образцах культуральной жидкости оценивали секрецию цитокинов TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 и CCL2 с помощью ИФА.

##### **Оценка эффективности митофагии при помощи конфокальной микроскопии.**

Для этого клетки инкубировали в присутствии митохондриального и лизосомального зондов (MitoTracker Green FM (200 нМ) и LysoTracker Red DND-99 (50 нМ) соответственно). Митофагию стимулировали при помощи трифторметоксикарбонилцианид фенилгидразон (FCCP) (2 мкМ) или пирувата натрия (20 мМ). Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа Zeiss 900. Использовали масляный иммерсионный объектив 63x. Флуоресценция MitoTracker Green была индуцирована при 488 нм и эмиссионным фильтром 500-530 нм. Флуоресценция LysoTracker Red была индуцирована при 561 нм и эмиссионным фильтром 566-700 нм. За митофагию принимали колокализацию

митохондрий и лизосом после инкубации в течение 12 часов. Колокализация была рассчитана с помощью программного обеспечения ZEISS ZEN 3.1 как отношение количества пикселей MitoTracker Green, попавших в LysoTracker Red по отношению к общему количеству пикселей MitoTracker Green, которые были выше порогового значения.

##### **Статистический анализ.**

Для выявления связи между мутациями мтДНК и провоспалительной активностью клеток рассчитывали отношение рисков. Отношение рисков рассчитали для каждой отдельной мутации, а также для всех их возможных комбинаций. Отношение рисков отражало, во сколько раз выше вероятность обнаружения конкретной мутации или сочетания мутаций в рассматриваемой группе клеток по сравнению с вероятностью их обнаружения в двух других группах.

Различия между группами в исследованиях "случай-контроль" были выявлены с помощью Т-критерия парной выборки с использованием статистики 21.0 IBM SPSS.

##### **Результаты и обсуждение.**

Для того, чтобы исследовать митохондриальные аспекты воспаления, были использованы цибридные линии клеток на основе THP1, различающиеся по профилю гетероплазмии митохондриальной ДНК, которую мы оценили ранее [5]. Поэтому в десяти цибридных линиях была проведена оценка провоспалительного ответа и дальнейшей способности формировать иммунную толерантность к эндотоксину ЛПС. Оказалось, что цибриды демонстрировали три типа провоспалительной активности (таблица 1):

- 1) Нон-респондеры. Клетки демонстрировали низкий провоспалительный ответ на обе стимуляции ЛПС;
- 2) Толерантные. Клетки демонстрировали высокий провоспалительный ответ на первичную стимуляцию и низкий на вторичную, что указывает на способность клеток формировать иммунную толерантность;
- 3) Нетолерантные. Клетки проявляли высокий провоспалительный ответ на обе стимуляции ЛПС.

**Таблица 1. Типы провоспалительного ответа цибридных**

**клеточных линий на основе THP1.**

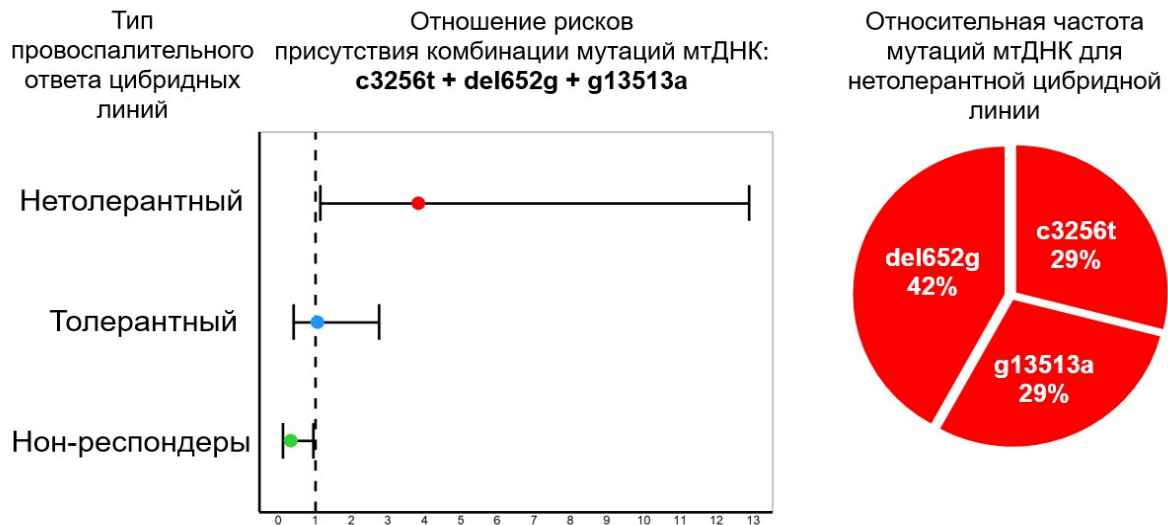


В левой части таблицы представлены уровень секреции цитокинов гибридных линий в ответ на стимуляции ЛПС. «Низкий» уровень секреции означает, что секреция не отличается от базальной, «высокий» уровень секреции означает, что секреция значимо выше, чем базальная секреция. В зависимости от интенсивности провоспалительного ответа клеток при первой и второй стимуляциях наблюдались три типа иммунного ответа, указанные в правой части таблицы. В случае низкого ответа на обе стимуляции клеточную линию считали «нон-респондером». В случае высокого уровня ответа на первую стимуляцию и низкого на вторую клеточные линии считали «толерантной». В случае высокого ответа на обе стимуляции клеточную линию считали «нетолерантной». В исследование вошли 10 гибридных линий. N – количество линий, демонстрирующих данный тип провоспалительного ответа.

Мы решили выяснить, существуют ли мутации мтДНК или их комбинации,

ассоциированные с каждым типом провоспалительной активности клеток. Для этого мы провели исследование отношения рисков, которое отражало, во сколько раз выше вероятность обнаружения конкретной мутации или сочетания мутаций в рассматриваемой группе клеток по сравнению с вероятностью их обнаружения в двух других группах провоспалительной активности.

Было обнаружено, что ни одна индивидуальная мутация мтДНК не была связана с типом провоспалительного ответа. Однако при изучении комбинаций мутаций, были идентифицированы сочетания, связанные с определенным типом провоспалительного ответа у гибридов. В частности, комбинация мутаций m.c3256t, m.del652g и m.g13513a была ассоциирована с отсутствием толерантности к ЛПС (рисунок 1).



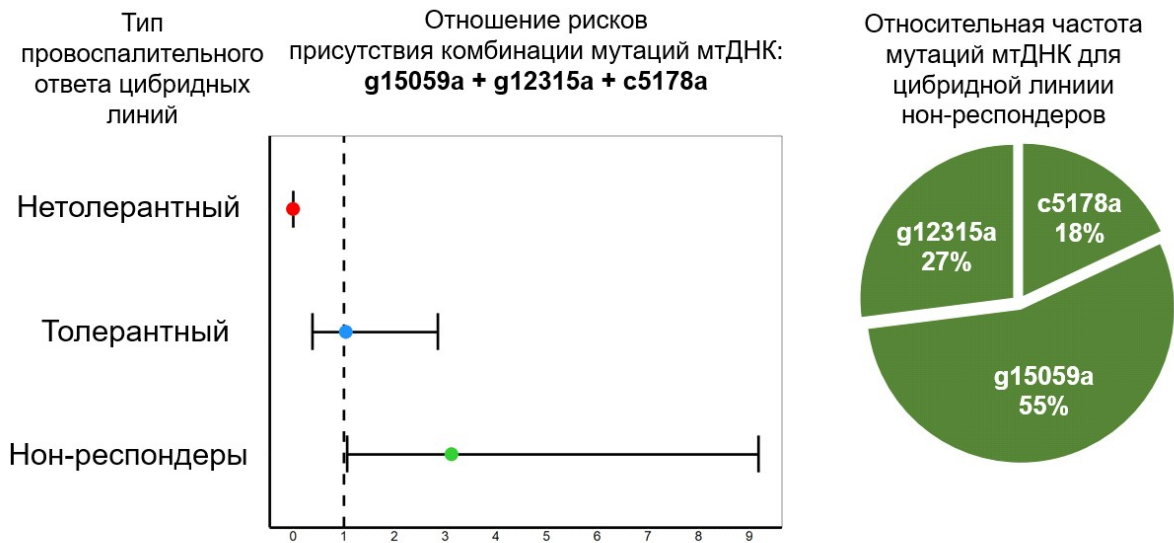
**Рисунок 1. Взаимосвязь комбинации митохондриальных мутаций m.c3256t, m.del652g, m.g13513a с типом провоспалительного ответа клеток гибридных линий.**

Слева представлен график отношения рисков присутствия комбинации мутаций мтДНК m.c3256t, m.del652g, m.g13513a в гибридных линиях, демонстрирующих каждый из трех типов провоспалительного ответа: нетолерантного, толерантного и нон-респондеров. Справа – относительная частота встречаемости индивидуальной мутации из комбинации в нетолерантных гибридных линиях.

Поскольку отношение рисков для группы нетолерантных клеток было больше 1 и площадь доверительного интервала не пересекала 1, можно заключить, что эта комбинация мутаций мтДНК связана с нетолерантными гибридными линиями ( $p < 0,001$ ). В то же время отношение рисков для группы нон-респондеров было меньше 1, а доверительный интервал также не пересекал

1, т.е. вероятность обнаружения комбинации мутаций m.c3256t, m.del652g и m.g13513a в этой группе была значительно ниже. Мы также решили оценить, какая из трех мутаций в комбинации обладает наибольшим вкладом. Оказалось, что мутация m.del652g встречалась чаще двух других мутаций m.c3256t и m.g13513a в группе нетолерантных гибридов.

Также аналогичным образом мы установили, что комбинация мутаций мтДНК m.g15059a, m.g12315a, m.c5178a ассоциировалась с группой гибридных линий нон-респондеров (рисунок 2). Причем, мутация m.g15059a у гибридов нон-респондеров встречалась чаще, чем две другие (m.g12315a, m.c5178a).

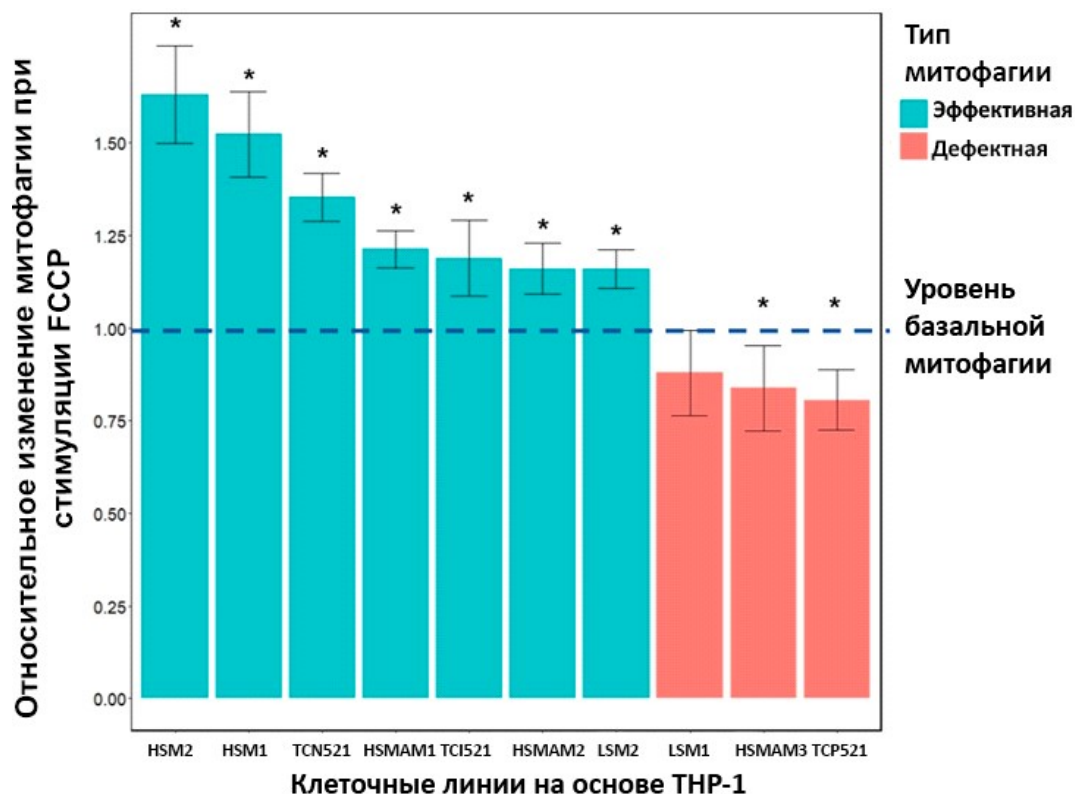


**Рисунок 2. Взаимосвязь комбинации митохондриальных мутаций m.g15059a, m.g12315a, m.c5178a с типом провоспалительного ответа клеток гибридных линий.**

Слева представлен график отношения рисков присутствия комбинации мутаций мтДНК m.g15059a, m.g12315a, m.c5178a в гибридных линиях, демонстрирующих каждый из трех типов провоспалительного ответа: нетолерантного, толерантного и нон-респондеров. Справа – относительная частота встречаемости индивидуальной мутации из комбинации в гибридных линиях нон-респондеров.

Поскольку накопление митохондриальных мутаций может приводить к митохондриальной дисфункции, мы решили выяснить, существуют ли у гибридных линий, различных как по профилю гетероплазии, так и по типу провоспалительной активности, изменения в эффективности удаления дисфункциональных

митохондрий. Для этого мы оценили уровень митофагии в каждой гибридной линии под влиянием протонофора FCCP, приводящего к потере митохондриальной функции и активации митофагии в клетке [3]. Для этого в 10 гибридных линиях оценивали уровень базальной и стимулированной с помощью FCCP митофагии. Оказалось, что гибриды демонстрировали разную эффективность митофагии при стимуляции FCCP (рисунок 3). Более того, уровень митофагии в трёх гибридных линиях не повышался в ответ на стимуляцию: LSM-1, HSMAM-3 и TCP-521. Более того, в линиях HSMAM-3 и TCP-521 митофагия была ниже базального уровня, то есть была дефектной.

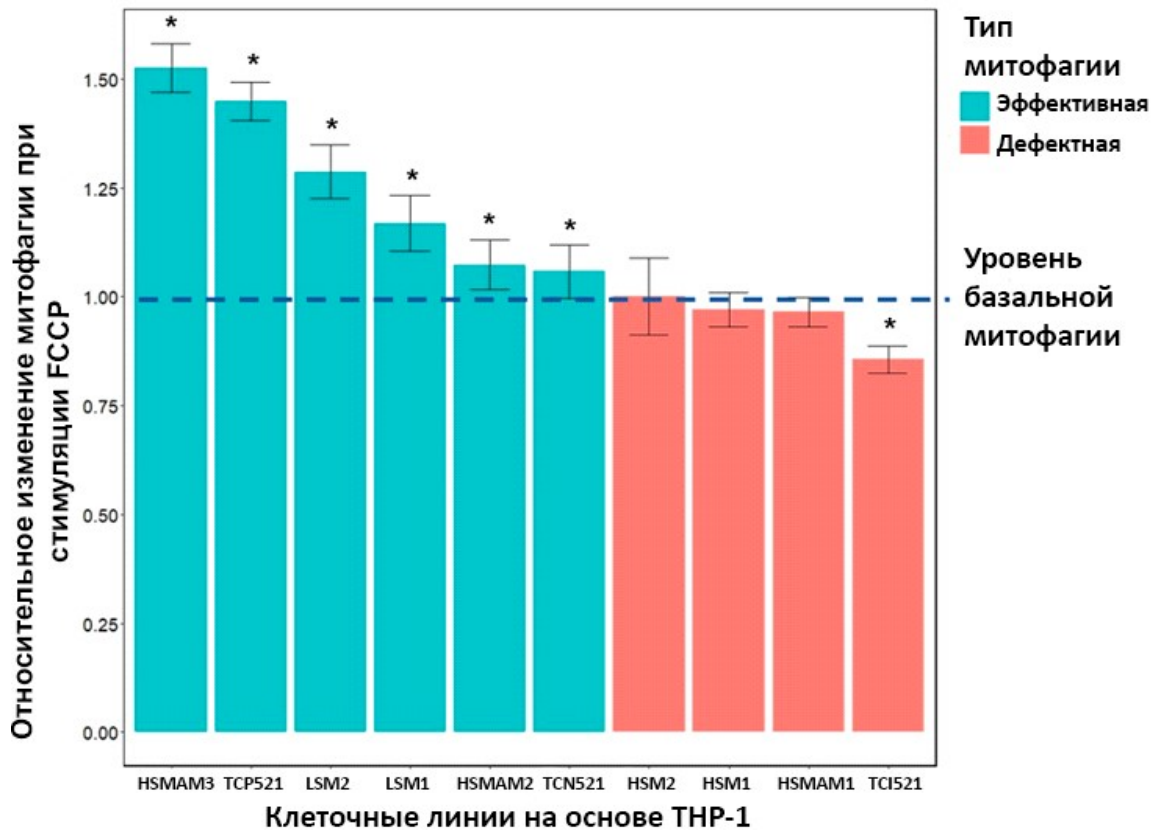


**Рисунок 3. Оценка эффективности, FCCP-индуцированной митофагии в клетках гибридных линий.**

По оси Y представлено относительное изменение уровня митофагии при стимуляции FCCP для каждой гибридной линии. За единицу был принят базальный уровень митофагии в каждой гибридной линии, этот уровень отмечен пунктирной линией. Голубым цветом представлены гибридные линии, в которых уровень митофагии, стимулированной FCCP, достоверно был выше относительно базального уровня. Красным цветом отмечены гибридные линии, в которых уровень митофагии не

отличался от базального уровня, либо достоверно был ниже базального уровня. Звездочкой отмечены достоверные различия между индуцированной митофагией и базальной митофагией,  $p < 0,05$ , по результатам непараметрического парного теста Уилкоксона.

При индукции митофагии пируватом натрия дефектная митофагия наблюдалась у четырёх гибридных линий, в случае линии TCI-521 уровень митофагии снижался (рисунок 4).



**Рисунок 4. Оценка эффективности, индуцированной пируватом митофагии в клетках цибридных линий.**

По оси Y представлено относительное изменение уровня митофагии при стимуляции пируватом для каждой цибридной линии. За единицу был принят базальный уровень митофагии в каждой цибридной линии, этот уровень отмечен пунктирной линией. Голубым цветом представлены цибридные линии, в которых уровень митофагии, стимулированной пируватом, достоверно был выше относительно базального уровня. Красным цветом отмечены цибридные линии, в которых уровень митофагии не отличался от базального уровня, либо достоверно был ниже базального уровня. Звездочкой отмечены достоверные различия между индуцированной митофагией и базальной митофагией,  $p < 0,05$ , по результатам непараметрического парного теста Уилкоксона.

В результате исследования установили, что в линиях HSMAM-1, HSM-1, HSM-2 стимуляция пируватом натрия не оказывала влияния на уровень митофагии.

Биоинформатический анализ связи между профилем гетероплазмии и степенью эффективностью митофагии в каждой линии показал, что увеличение гетероплазмии мутации

m.g14846a на 1% приводило к снижению эффективности митофагии на 4%, то есть, если гетероплазмия этой мутации достигала 25%, то митофагия была дефектной.

Таким образом, в результате исследования цибридных линий, различающихся по профилю гетероплазмии, было обнаружено, что клетки демонстрировали три типа провоспалительной активности в ответ на стимуляцию ЛПС: нон-респондер, толерантный и нетолерантный. Оказалось, что ни одна мутация мтДНК индивидуально не была связана с типом провоспалительного ответа, однако были выявлены комбинации мутаций. В частности, комбинация мутаций m.c3256t, m.del652g и m.g13513a была ассоциирована с отсутствием толерантности к ЛПС. Комбинация мутаций мтДНК m.g15059a, m.g12315a и m.c5178a была связана с группой цибридных линий нон-респондеров. Затем мы изучили связь между митохондриальными мутациями и способностью цибридных клеток избавляться от дисфункциональных митохондрий путем митофагии. Оказалось, что увеличение гетероплазмии мутации m.g14846a на 1%

приводило к снижению эффективности митофагии на 4%.

Хорошо известно, что атеросклероз сопровождается хроническим воспалением. Современные исследования направлены на изучение причин, по которым воспаление не может разрешиться и переходит в вялотекущую фазу. Ранее К. Yin с соавт. установили, что постоянное введение ЛПС AroE<sup>-</sup>/Г мышам приводило к увеличению экспрессии медиаторов воспаления, таких как TNF $\alpha$ , IL-1b, IL-6, MCP-1. Причем в результате таких введений наблюдалось увеличение инфильтрации иммунокомпетентных клеток и, как следствие, ускорение развития атеросклероза [6]. Т.е. непрерывный воспалительный процесс, вызванный у мышей, способствовал атерогенезу. Существуют предпосылки считать, что одной из ключевых причин хронизации воспаления могут быть нарушения в функционировании митохондрий. Как известно, митохондрии являются участниками иммунного ответа, в том числе участвуют в экспрессии медиаторов воспаления [7]. Pissa A. с соавт. в своём обзоре описывают механизмы, которыми жизнедеятельность митохондрий связаны с воспалением. Дисфункциональные митохондрии могут запускать сигнальные пути, такие как NLRP3 и TLR9, каждый из которых приводит к выработке провоспалительных цитокинов, IL-1b, IL-18 и TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, соответственно [8]. Поэтому нарушения в правильной работе митохондрий могут быть связаны с aberrантным провоспалительным ответом. Mitrofanov K.Y. с соавт. в своём клинико-лабораторном исследовании, включающем здоровых лиц и пациентов с атеросклерозом, с использованием математической модели установили, что мутационная нагрузка m.c3256t, m.g12315a, m.g13513a и m.g15059a объясняла не менее 60% вариабельности клинических проявлений атеросклероза [9].

Известны исследования, направленные на установление взаимосвязи между профилем гетероплазии мтДНК и жизнедеятельностью митохондрий. Например, m.del652g вовлечена в разобщение окислительного фосфорилирования, m.c3256t, m.c5178a связаны с процессом митофагии [10]. Мутации m.g13513a, m.del652g прямо коррелировали с увеличением потребления кислорода, вызываемого FCCP [7]. Также, мутация m.g14846a повлияла на промежуточный перенос электронов в

митохондриальной дыхательной цепи [11].

Таким образом, митохондриальные мутации действительно могут быть связаны с хронизацией провоспалительной активности клеток.

#### **Выводы.**

В настоящей работе были выявлены мутации и комбинации мутаций мтДНК, связанные с нарушениями в провоспалительной активности и митофагии иммунокомпетентных клеток. Мы полагаем, что гетероплазмичные мутации мтДНК могут приводить как к нарушениям в функционировании митохондрий, так и к снижению эффективности их удаления. Накопление дисфункциональных митохондрий в клетке-хозяине может приводить к аутоиммунной провоспалительной реакции, тем самым способствуя хронизации воспаления.

#### **Финансирование.**

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Проект "Исследование механизмов атерогенеза человека, разработка методов доклинической диагностики и антиатеросклеротических средств".

#### **Литература.**

1. Herrington, W.; Lacey, B.; Sherliker, P.; Armitage, J.; Lewington, S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res* 2016, 118, 535-546;
2. Geovanini, G.R.; Libby, P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci (Lond)* 2018, 132, 1243-1252;
3. Berezhnov AV, Soutar MP, Fedotova EI, Frolova MS, Plun-Favreau H, Zinchenko VP, Abramov AY. Intracellular pH Modulates Autophagy and Mitophagy. *J Biol Chem*. 2016 Apr 15;291(16):8701-8;
4. Li, H.; Shen, L.; Hu, P.; Huang, R.; Cao, Y.; Deng, J.; Yuan, W.; Liu, D.; Yang, J.; Gu, H.; Bai, Y. Aging-associated mitochondrial DNA mutations alter oxidative phosphorylation machinery and cause mitochondrial dysfunctions. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017, 1863, 2266-2273;
5. Sazonova, M.A.; Sinyov, V.V.; Ryzhkova, A.I.; Sazonova, M.D.; Khasanova, Z.B.; Shkurat, T.P.; Karagodin, V.P.; Orekhov, A.N.; Sobenin, I.A. Creation of Cybrid Cultures Containing mtDNA Mutations m.12315G>A and m.1555G>A, Associated with Atherosclerosis. *Biomolecules*. 2019, 9, 499;
6. K Yin, SL Tang, XH Yu, GH Tu, RF

He, JF Li, et al. Apolipoprotein A-I inhibits LPS-induced atherosclerosis in ApoE(-/-) mice possibly via activated STAT3-mediated upregulation of tristetraprolin *Acta Pharmacol Sin*, 34 (6) (2013), p. 83746;

7. Orekhov AN, Poznyak AV, Sobenin IA, Nikifirov NN, Ivanova EA. Mitochondrion as a Selective Target for the Treatment of Atherosclerosis: Role of Mitochondrial DNA Mutations and Defective Mitophagy in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Chronic Inflammation. *Curr Neuropharmacol*. 2020;18(11):1064-1075;

8. Picca, A., Calvani, R., Coelho-Junior, H. J., & Marzetti, E. (2021). Cell Death and Inflammation: The Role of Mitochondria in Health and Disease. *Cells*, 10 (3), 537;

9. Konstantin Y. Mitrofanov, Andrey V. Zhelankin, Gulnara M. Shiganova, Margarita A. Sazonova, Yuri V. Bobryshev, Anton Y. Postnov,

Igor A. Sobenin I.A., Alexander N. Orekhov, Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmic mutations A1555G, C3256T, T3336C, C5178A, G12315A, G13513A, G14459A, G14846A and G15059A in CHD patients with the history of myocardial infarction, *Experimental and Molecular Pathology*, Volume 100, Issue 1, 2016, Pages 87-91, ISSN 0014-4800;

10. Sobenin, I. A., Sazonova, M. A., Postnov, A. Y., Salonen, J. T., Bobryshev, Y. V., & Orekhov, A. N. (2013). Association of mitochondrial genetic variation with carotid atherosclerosis. *PLoS one*, 8(7), e68070.

11. Filosto, M.; Mancuso, M.; Vives-Bauza, C.; Vila, M.R.; Shanske, S.; Hirano, M.; Andreu, A.L.; DiMauro, S. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Annals Neurol* 2003, 54, 524-526.