

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА:
АССОЦИАЦИЯ ВАРИАНТОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА
С ПЕРВИЧНО-ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ ФОРМОЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ

© 2020 г. М. С. Козин^{a, b, *}, О. Г. Кулакова^a, И. С. Киселёв^a, А. Н. Бойко^{a, b}, О. О. Фаворова^a

^aРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 117997 Россия

^bФедеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, 117342 Россия

*e-mail: kozintax1992@gmail.com

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 05.03.2020 г.

Принята к публикации 16.03.2020 г.

Нарушение правильного функционирования митохондрий, как установлено недавно, является важным компонентом молекулярных механизмов развития многих нейродегенеративных заболеваний. Одно из таких заболеваний, рассеянный склероз – хроническое аутоиммунное и нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, характеризуется клинической гетерогенностью. Роль генетической вариативности митохондриальной ДНК в развитии различных клинических форм рассеянного склероза малоизучена. В настоящей работе проведен анализ ассоциации с тяжелой и относительно редкой первично-прогрессирующей формой рассеянного склероза 10 однонуклеотидных полиморфизмов митохондриального генома и девяти наиболее распространенных в Европе гаплогрупп мтДНК (H, J, K, U, T, I, V, W и X). Исследование проведено на выборке из 110 больных первично-прогрессирующим рассеянным склерозом и 406 здоровых индивидов, русских по этнической принадлежности. Впервые показана ассоциация варианта m.12308*G (rs2853498) ($P = 0.024$) и гаплогруппы U с первично-прогрессирующим рассеянным склерозом ($P = 0.0004$ и выдерживает поправку на множественность сравнений, $P_{\text{corr}} = 0.0076$). Сравнение этих данных с результатами нашего предшествующего исследования [1], направленного на изучение роли вариативности митохондриального генома в предрасположенности к основной, ремиттирующей, форме рассеянного склероза приводит к принципиально новому выводу, что в развитие двух разных клинических форм рассеянного склероза вовлечены разные гаплогруппы митохондриального генома, J и U. Полученные результаты могут привести к выявлению новых мишеней для лечения первично-прогрессирующего рассеянного склероза, эффективное патогенетическое лечение которого на данный момент практически отсутствует.

Ключевые слова: рассеянный склероз, первично-прогрессирующий рассеянный склероз, митохондриальная ДНК, гаплогруппа, однонуклеотидный полиморфизм

DOI: 10.31857/S0026898420040084

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое хроническое заболевание центральной нервной системы, характеризующееся аутоиммунным воспалением, демиелинизацией и нейродегенерацией [2]. РС встречается практически во всех странах, но его распространенность в разных популяциях сильно варьирует; в большинстве российских регионов она составляет от 30 до 70 случаев на 100 000 населения [3]. Хотя этиология РС до кон-

ца не изучена, установлено, что РС является комплексным заболеванием с полигенным типом наследования, которое развивается под воздействием факторов внешней среды у лиц с генетической предрасположенностью [4].

Течение РС характеризуется выраженной клинической гетерогенностью. В большинстве случаев наблюдается ремиттирующая форма РС (РРС), при которой периоды обострения (нарастание степени неврологического дефицита) чередуются с периодами ремиссии (снижение или исчезновение нев-

Сокращения: ДИ – доверительный интервал; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-ПДРФ – ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; ОШ – отношение шансов; РС – рассеянный склероз; ПРРС – первично-прогрессирующий РС; РРС – ремиттирующий РС; GWAS – полногеномный поиск ассоциации (Genome Wide Association Study); SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism).

рологической симптоматики) [5]. Однако у 10–15% пациентов непрерывное нарастание неврологического дефицита наблюдается с самого начала болезни, и такая тяжелая форма РС получила название первично-прогрессирующего РС (ППРС) [6].

Генетические особенности РС в большинстве случаев изучают на больных РРС из-за его существенно более высокой распространенности или вообще не разделяя больных с разными формами заболевания. В последнем случае выявляются полиморфные варианты, предрасполагающие, в первую очередь, к РРС. Серия исследований по полногеномному поиску ассоциаций (Genome Wide Association Study, GWAS) позволила выявить более 200 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) ядерного генома, ассоциированных с РС на полногеномном уровне значимости ($P < 5 \times 10^{-8}$) [7]. Отдельно проведено всего два GWAS, в которых больных ППРС сравнивали со здоровыми контрольными индивидами: в одном [8] не выявлено полиморфных вариантов, значимо ассоциированных с ППРС; в другом [9] обнаружена единственная значимая ассоциация на полногеномном уровне с аллелем *HLA-DRB1*15* – главным маркером предрасположенности к РРС.

Относительная малочисленность пациентов с ППРС делает актуальным поиск генетических детерминант этой формы РС с использованием подхода “ген-кандидат”. С использованием этого подхода у этнических русских нами выявлены ассоциированные с ППРС варианты генов иммунного ответа, среди которых присутствовали как варианты, общие для двух форм РС, так и ППРС-специфические [10].

Во всех перечисленных работах исследовали ассоциацию РС с вариантами ядерного генома. Хотя решающую роль митохондриальной дисфункции в нейродегенерации при РС можно считать доказанной [11], влияние вариабельности митохондриального генома на предрасположенность к РС нуждается в дальнейшем изучении. Действительно, ассоциация вариантов мтДНК с РРС была проанализирована в ряде работ (см. обзор [12] и ссылки в нем), однако их результаты противоречивы. Два из этих исследований [13, 14] проведены на полногеномном уровне с использованием экспериментальных данных из Multiple Sclerosis Genetics Consortium [8] и/или Wellcome Trust Case Control Consortium (<https://www.wtccc.org.uk/>). В работе [13] ассоциация отдельных SNP мтДНК с РРС не обнаружена. Ассоциацию гаплогрупп J и T мтДНК с РРС наблюдали при анализе данных, полученных на объединенных группах больных РРС из США и шести европейских стран [13], но эти результаты не воспроизведены на независимой выборке из США. Опубликованы данные об

ассоциации 16 SNP митохондриального генома с РС [14]. Однако ассоциации отдельных вариантов мтДНК, описанные в [13, 14], не достигали полногеномного уровня значимости.

Данные о вовлеченности митохондриального генома в формирование предрасположенности к ППРС еще более ограничены и сводятся фактически к тому же исследованию [13]. Ассоциаций ППРС с отдельными SNP не наблюдали, а выявленный на номинальном уровне повышенный риск ППРС у носителей гаплогруппы J из трех европейских популяций не был воспроизведен на независимой выборке из США.

Весьма вероятно, что невозпроизводимость описанных результатов связана со значительной вариабельностью митохондриального генома в различных популяциях даже в пределах Европы, что обуславливает необходимость тщательного подбора гомогенных по этническому составу групп больных и контрольных групп.

Ранее мы провели у этнических русских анализ ассоциации с РРС четырех гаплогрупп и пяти отдельных SNP митохондриального генома [1]. Значимую ассоциацию с РРС показала гаплогруппа J. В настоящей работе проведен поиск ассоциаций вариантов митохондриального генома с развитием ППРС у русских. Идентификация полиморфных вариантов митохондриального генома, ассоциированных с риском развития различных форм РС, может пролить свет на особенности патогенеза этих форм, которые, по многим данным, различаются по степени выраженности воспалительных и нейродегенеративных механизмов [15].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика индивидов, вошедших в исследование. В исследование вошли 110 неродственных больных ППРС (50 женщин и 60 мужчин), образцы крови которых собирали в различных Российских региональных центрах и отделениях РС. Диагноз ставили согласно международным критериям Макдональда (версия 2010 года) [16]. Средний возраст больных на момент забора крови составил 47.5 ± 10.7 лет. Контрольная группа состояла из 406 здоровых индивидов (266 женщин и 140 мужчин; средний возраст 43.5 ± 16.2) без симптомов неврологических заболеваний. По данным анкетирования все индивиды, вошедшие в исследование, по этнической принадлежности были русскими в двух поколениях. От всех участников получено информированное согласие, исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Выделение ДНК и генотипирование полиморфных участков мтДНК. Периферическую кровь индивидов, вошедших в исследование, собирали в вакуумные пробирки, содержащие EDTA. Сум-

марную геномную ДНК выделяли из клеток периферической крови при помощи наборов QIAamp DNA Blood Midi Kit (“QIAGEN”, Германия). Генотипирование 10 SNP мтДНК проводили методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР–ПДРФ); перечень SNP, условия проведения реакции ПЦР–ПДРФ и критерии оценки ее результатов представлены в табл. 1. Использовали праймеры компании “Евроген” (Россия) и эндонуклеаза рестрикции НПО “СибЭнзим” (Россия).

Определение принадлежности индивидов к гаплогруппам митохондриального генома. Исследованные полиморфизмы представляют собой маркерные SNP, расположенные в кодирующем районе мтДНК. По носительству их сочетаний определяли принадлежность индивида к одной из основных европейских гаплогрупп митохондриального генома – H, I, J, K, T, U, V, W и X – согласно <http://www.phyloree.org/> [17] (табл. 2).

Статистический анализ. Ассоциации с ППРС отдельных SNP мтДНК и митохондриальных гаплогрупп анализировали при помощи точного критерия Фишера. Для расчетов использовали программное обеспечение GraphPad Prism версии 7.0. Ассоциацию считали статистически значимой, если значение *P* точного критерия Фишера было менее 0.05, а 95%-ный доверительный

интервал (ДИ) отношения шансов (ОШ) не пересекал 1. В качестве поправки на множественное сравнение (multiple comparisons problem) использовали поправку Бонферрони. Скорректированные значения *P* рассчитывали при помощи стандартных средств языка R.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У больных ППРС и индивидов контрольной группы, русских по этнической принадлежности, проведен анализ частот вариантов митохондриального генома m.1719G>A, m.4216T>C, m.4580G>A, m.4917A>G, m.7028C>T, m.9055G>A, m.10398A>G, m.12308A>G, m.13368G>A и m.13708G>A. Сравнение частот исследованных вариантов представлено в табл. 3. Наблюдали ассоциацию носительства аллеля m.12308*G с ППРС (*P* = 0.024 и ОШ = 1.62 [95% ДИ 1.02–2.55]), но эта ассоциация не выдерживала поправки на множественные сравнения.

Принадлежность к наиболее распространенным в Европе гаплогруппам митохондриального генома (H, J, K, U, T, I, V, W и X) определяли на основании результатов генотипирования перечисленных маркерных SNP исходя из сочетанного носительства определенных вариантов (табл. 2). Частоты гаплогрупп у больных ППРС и индивидов

Таблица 1. Полиморфизмы мтДНК и условия проведения реакции ПЦР–ПДРФ для их генотипирования

SNP мтДНК, (rs ID)	ПЦР-праймеры, прямой и обратный	Температура отжига, °C	Эндонуклеаза рестрикции	Размер фрагментов, п.н.
m.1719 G>A (rs3928305)	TCACCCTCCTCAAGTATACTTCA/ ATTTGGGTAAATGGTTTGGC	56	BstDEI	G: 148 + 79 + 23 A: 148 + 102
m.4216 T>C (rs1599988)	ACCTCTGATTACTCCTGCCA/ TAGGTTTGAGGGGGAATGCT	60	FatI	C: 400 + 45 T: 445
m.4580 A>G (rs28357975)	ACCTATCACACCCCATCCTAAA/ AGGATTATGGATGCGGTT	60	BmtI	G: 200 + 100 A: 300
m.4917 G>A (rs28357980)	CAGAGGTTACCCAAGGCACC/ AGTAGTAGGGTCGTGGTGCTG	58	SspMI	G: 243 + 61 + 39 A: 243 + 100
m.7028 C>T (rs2015062)	AATGATCTGCTGCAGTGCTC/ TCCGGATAGGCCGAGAA	56	AluI	C: 152 + 156 T: 152 + 130 + 26
m.9055 G>A (rs193303045)	TTAAGGCGACAGCGATTTCT/ TACTGCAGGCCACCTACTCA	56	AspLEI	G: 96 + 38 A: 134
m.10398 G>A (rs2853826)	AGCCCTACAACAACCTAAGCTGC/ AGTAGGGAGGATATGAGGTGTGAG	60	BstDEI	G: 167 + 68 + 38 A: 205 + 68
m.12308 A>G (rs2853498)	ATTTACCGAGAAAGCTCACAAG/ TTTTATTTGGAGTTGCACCACGAT	58	HinfI	G: 109 + 25 A: 134
m.13368 G>A (rs3899498)	TAGCCTTCTCCACTTCAAGTC/ AGAAACCTGTAGGAAAGGTATT	58	AspS9I	G: 137 + 127 A: 264
m.13708 G>A (rs28359178)	CCTCACAGGTTTCTACTCCAAA/ CCTCACAGGTTTCTACTCCAAA	60	Fsp4HI	G: 197 + 121 A: 318

контрольной группы представлены в табл. 4. Частота гаплогруппы U у больных ППРС (31.8%) почти в 2 раза превышает частоту этой гаплогруппы у индивидов контрольной группы (16.3%) и значимо ассоциирована с риском развития ППРС ($P = 0.0004$ и ОШ = 2.40 [95% ДИ 1.50–3.84]). При введении поправки на множественное сравнение ассоциация носительства гаплогруппы U с ППРС остается значимой ($P_{\text{corr}} = 0.0076$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью работы был поиск полиморфных вариантов митохондриального генома, ассоциированных с ППРС – тяжелой и относительно редкой формой РС. Нами впервые проведен анализ ассоциации 10 SNP митохондриального генома и наиболее распространенных европейских гаплогрупп

мтДНК (H, J, K, U, T, I, V, W и X) с ППРС у этнических русских. Показано, что митохондриальная гаплогруппа U и ее маркерный вариант, минорный аллель G SNP m.12308 A>G (rs2853498) (см. табл. 2), значимо ассоциированы с риском развития ППРС, по меньшей мере, у русских.

SNP m.12308 A>G находится в гене *MT-TL2*, локализованном в высококонсервативной области мтДНК и кодирующем митохондриальную лейцин-специфичную тРНК^{Leu (CUN)}. Этот SNP расположен в варибельной петле тРНК^{Leu (CUN)} [18]. Лейцин – наиболее распространенная в белках аминокислота (<https://www.uniprot.org/statistics/Swiss-Prot>) [19], доля которой составляет 17% всех аминокислот, в частности, в белках, кодируемых митохондриальными генами человека. 86% остатков лейцина в этих белках кодируются кодонами CUA, CUU, CUG, CUC, которые распознаются

Таблица 2. Маркерные SNP для определения принадлежности индивидов к основным европейским гаплогруппам митохондриального генома (согласно <http://www.phylotree.org/>)

Гаплогруппа	m.1719	m.4216	m.4580	m.4917	m.7028	m.9055	m.10398	m.12308	m.13368	m.13708
H	G	T	G	A	C	G	A	A	G	G
J	G	C	G	A	T	G	G	A	G	A
T	G	C	G	G	T	G	A	A	A	G
U	G	T	G	A	T	G	A	G	G	G
K	G	T	G	A	T	A	G	G	G	G
I	A	T	G	A	T	G	G	A	G	G
W	G	T	G	A	T	G	A	A	G	G
X	A	T	G	A	T	G	A	A	G	G
V	G	T	A	A	T	G	A	A	G	G

Примечание. Нуклеотиды, выделенные жирным, представляют собой варианты SNP, на которых основано определение гаплогруппы.

Таблица 3. Анализ ассоциации минорных аллелей SNP в генах мтДНК с ППРС

Аллель	Носители, N (%)		Значение P	Значение P_{corr}	ОШ [95% ДИ]
	Больные ППРС ($N = 110$)	Здоровый контроль ($N = 406$)			
m.1719*A	5 (4.5)	18 (4.4)	0.57	Н.з.	1.03 [0.41–2.73]
m.4216*C	20 (18.2)	66 (16.3)	0.36	Н.з.	1.15 [0.67–1.97]
m.4580*A	3 (2.7)	10 (2.5)	0.55	Н.з.	1.11 [0.32–3.85]
m.4917*G	10 (9.1)	38 (9.4)	0.55	Н.з.	0.97 [0.48–1.98]
m.7028*C	39 (35.5)	167 (4.1)	0.22	Н.з.	1.23 [0.79–1.91]
m.9055*A	7 (6.4)	42 (10.3)	0.14	Н.з.	0.59 [0.25–1.29]
m.10398*G	20 (18.2)	90 (22.2)	0.22	Н.з.	0.78 [0.44–1.35]
m.12308*G	40 (36.4)	106 (26.1)	0.024	Н.з.	1.62 [1.02–2.55]
m.13368*A	10 (9.1)	37 (9.1)	0.58	Н.з.	0.99 [0.49–2.05]
m.13708*A	12 (10.9)	35 (8.6)	0.28	Н.з.	1.30 [0.67–2.53]

Примечание. P_{corr} – значение P с поправкой Бонферрони; ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

тРНК^{Leu} (CUN) (Расчет сделан с использованием “Homo sapiens mitochondrion, complete genome”, NCBI Reference Sequence: NC_012920.1). В свете этих данных естественно предположить, что мутация m.12308 A>G вовлечена в дисфункцию митохондрий. С этим предположением согласуются не только полученные нами данные, но и исследования, в которых показана ассоциация аллеля 12308*G с риском инсульта [20], шизофрении, биполярного расстройства [21] и некоторых онкологических заболеваний [22].

В ряде работ показано, что носительство гаплогруппы U ассоциировано с риском развития или клиническими характеристиками некоторых нейродегенеративных, психических [23, 24], а также аутоиммунных заболеваний [18]. В единственной обнаруженной нами публикация, в которой высказано предположение о связи гаплогруппы U с РС, приведены результаты, полученные на выборке из жителей Великобритании [25]. В этой работе пишут о тренде перепредставленности гаплогруппы U в группе РС в сравнении со здоровыми контрольными индивидами.

По нашим данным, значимость ассоциации с ППРС гаплогруппы U оказалась существенно более высокой ($P = 0.0004$, $P_{\text{corr}} = 0.0076$), чем варианта m.12308*G ($P = 0.024$) (табл. 3 и 4). Можно предположить, что в основе этого феномена лежат синергические взаимодействия между полиморфными участками, входящими в состав гаплогруппы U, включая как варианты, присущие только U, так и остальные. Эта интерпретация лежит в русле современных представлений о гаплогруппах не только как о группах сходных гаплотипов мтДНК, восходящих к общему предку по материнской линии, но и как об устоявшихся функциональных единицах, оказывающих влияние на фенотип [26]. В этом случае ассоциация гаплогруппы

U с ППРС объясняется либо функциональным эффектом этой гаплогруппы в целом, либо носительством какого-то сочетания, характерного только для нее, возможно, включающего m.12308*G.

Альтернативным объяснением может быть влияние на развитие ППРС вариантов мтДНК, характерных только для гаплогруппы U, но не других исследованных гаплогрупп. Влияние гаплогруппы U в целом на функционирование клеток изучали с использованием цитоплазматических гибридов (цибридов) – клеток, содержащих одинаковые ядра, но разные митохондрии. Цибриды, содержащие мтДНК гаплогруппы U, сравнивали с цибридами, содержащими наиболее распространенную в Европе гаплогруппу H [27]. Оказалось, что U-цибриды содержат меньшее количество мтДНК, в них снижена экспрессия митохондриальных рРНК и синтез митохондриальных белков, а также уменьшена активность комплекса IV электрон-транспортной цепи.

Ранее мы показали, что в выборке этнических русских с риском развития наиболее распространенной формы РС – РРС – ассоциирована гаплогруппа J [1]. Сравнивая результаты двух наших исследований – процитированного и настоящего, мы приходим к заключению, что в развитие двух разных клинических форм РС – РРС и ППРС – вовлечены разные гаплогруппы митохондриального генома, J и U соответственно. Таким образом, нами получены принципиально новые результаты, которые могут привести к выявлению новых мишеней для лечения больных РС, в том числе ППРС, а также к разработке диагностических тестов для оценки эффективности терапевтического подхода, направленного на митохондрии. Эффективное патогенетическое лечение ППРС на данный момент практически отсутствует [28].

Таблица 4. Анализ ассоциации наиболее распространенных в Европе гаплогрупп мтДНК с ППРС

Аллель	Носители, N (%)		Значение P	Значение P_{corr}	ОШ [95% ДИ]
	Больные ППРС (N = 110)	Здоровый контроль (N = 406)			
H	39 (35.5)	157 (38.7)	0.31	Н.з.	0.87 [0.56–1.35]
J	9 (8.2)	28 (6.9)	0.39	Н.з.	1.20 [0.54–2.58]
K	4 (3.6)	28 (6.9)	0.15	Н.з.	0.51 [0.19–1.36]
U	35 (31.8)	66 (16.3)	0.0004	0.0076	2.40 [1.50–3.84]
T	8 (7.3)	33 (8.1)	0.47	Н.з.	0.89 [0.42–1.92]
I	2 (1.8)	12 (3.0)	0.40	Н.з.	0.61 [0.13–2.44]
V	3 (2.7)	10 (2.5)	0.55	Н.з.	1.11 [0.32–3.85]
W	2 (1.8)	23 (5.7)	0.063	Н.з.	0.30 [0.07–1.13]
X	0 (0.0)	2 (0.5)	0.62	Н.з.	0 [0.0–7.97]

Примечание. P_{corr} – значение P с поправкой Бонферрони, Н.з. – не значимо, ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Авторы выражают глубокую благодарность врачам-неврологам Н.Н. Бабичевой, Л.И. Волковой, А.В. Караевой, Д.С. Касаткину, Д.С. Коробко, Н.А. Малковой, С.А. Сиверцевой, Н.Н. Спириной, Н.Н. Спиринову, Е.Л. Туровой и Ф.А. Хабирову за участие в формировании группы больных ППРС.

Работа подготовлена в рамках государственного задания АААА-А19-119042590026-5.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех участников получено информированное письменное согласие на участие в экспериментах.

Авторы сообщают об отсутствии потенциального конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козин М.С., Кулакова О.Г., Киселёв И.С., Балановский О.П., Бойко А.Н., Фаворова О.О. (2018) Варианты митохондриального генома и риск развития рассеянного склероза у русских. *Acta Naturae*. **10**(4), 79–86.
2. Sawcer S., Franklin R.J.M., Ban M. (2014) Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol*. **13**(7), 700–709.
3. Boyko A., Smirnova N., Petrov S., Gusev E. (2016) Epidemiology of MS in Russia, a historical review. *Mult. Scler. Demyelinating Disord*. **1**, 13.
4. Huitema M.J.D., Schenk G.J. (2018) Insights into the mechanisms that may clarify obesity as a risk factor for multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. **18**(4), 18.
5. Sand I.B.K., Lublin F.D. (2013) Diagnosis and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Continuum* (Minneapolis, Minn.). **19**(4), 922–943.
6. Koch M., Kingwell E., Rieckmann P., Tremlett H. (2009) The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*. **73**(23), 1996–2002.
7. IMSGC. (2019) Peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. **365**(6460), eaav7188.
8. IMSGC. (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. **476**(7359), 214–219.
9. Martinelli-Boneschi F., Esposito F., Brambilla P., Lindström E., Lavorgna G., Stankovich J., Rodegher M., Capra R., Ghezzi A., Coniglio G., Colombo B., Sorosina M., Martinelli V., Booth D., Oturai A.B., Stewart G., Harbo H.F., Kilpatrick T.J., Hillert J., Rubio J.P., Abderrahim H., Wojcik J., Comi G. (2012) A Genome-Wide Association Study in progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler*. **18**(10), 1384–1394.
10. Kiselev I., Bashinskaya V., Baulina N., Kozin M., Popova E., Boyko A., Favorova O., Kulakova O. (2019) Genetic differences between primary progressive and relapsing-remitting multiple sclerosis: the impact of immune-related genes variability. *Mult. Scler. Relat. Disord*. **29**, 130–136.
11. Campbell G., Mahad D.J. (2018) Mitochondrial dysfunction and axon degeneration in progressive multiple sclerosis. *FEBS Lett*. **592**(7), 1113–1121.
12. Козин М.С., Кулакова О.Г., Фаворова О.О. (2018) Участие митохондрий в развитии нейродегенерации при рассеянном склерозе. *Биохимия*. **83**(7), 1002–1021.
13. Tranah G.J., Santaniello A., Caillier S.J., D'Alfonso S., Boneschi F.M., Hauser S.L., Oksenberg J.R. (2015) Mitochondrial DNA sequence variation in multiple sclerosis. *Neurology*. **85**(4), 325–330.
14. Hudson G., Gomez-Duran A., Wilson I.J., Chinnery P.F. (2014) Recent mitochondrial DNA mutations increase the risk of developing common late-onset human diseases. *PLoS Genet*. **10**(5), e1004369.
15. Giacalone G., Clarelli F., Osiceanu A.M., Guaschino C., Brambilla P., Sorosina M., Liberatore G., Zauli A., Esposito F., Rodegher M., Ghezzi A., Galimberti D., Patti F., Barizzone N., Guerini F., Martinelli V., Leone M., Comi G., D'Alfonso S., Boneschi F.M. (2015) Analysis of genes, pathways and networks involved in disease severity and age at onset in primary-progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler*. **21**(11), 1431–1442.
16. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., Lublin F.D., Montalban X., O'Connor P., Sandberg-Wollheim M., Thompson A.J., Waubant E., Weinshenker B., Wolinsky J.S. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol*. **69**(2), 292–302.
17. van Oven M., Kayser M. (2009) Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat*. **30**(2), E386–394.
18. Zifa E., Daniil Z., Skoumi E., Stavrou M., Papadimitriou K., Terzenidou M., Kostikas K., Bagiatis V., Gourgoulis K.I., Mamuris Z. (2012) Mitochondrial genetic background plays a role in increasing risk to asthma. *Mol. Biol. Rep*. **39**(4), 4697–4708.
19. Gaur R.K. (2014) Amino acid frequency distribution among eukaryotic proteins. *IIOAB J*. **5**(2), 6–11.
20. Pulkes T., Sweeney M.G., Hanna M.G. (2000) Increased risk of stroke in patients with the A12308G polymorphism in mitochondria. *Lancet*. **356**(9247), 2068–2069.
21. Schulmann A., Ryu E., Goncalves V., Rollins B., Christiansen M., Frye M.A., Biernacka J., Vawter M.P. (2019) Novel complex interactions between mitochondrial and nuclear DNA in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol. Neuropsychiatry*. **5**(1), 13–27.
22. Covarrubias D., Bai R.K., Wong L.J.C., Leal S.M. (2008) Mitochondrial DNA variant interactions modify breast cancer risk. *J. Hum. Genet*. **53**(10), 924–928.
23. van der Walt J.M., Dementieva Y.A., Martin E.R., Scott W.K., Nicodemus K.K., Kroner C.C., Welsh-Bohmer K.A., Saunders A.M., Roses A.D., Small G.W., Schmechel D.E., Doraiswamy P.M., Gilbert J.R., Haines J.L., Vance J.M., Pericak-Vance M.A. (2004) Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neurosci. Lett*. **365**(1), 28–32.

24. Rollins B., Martin M.V., Sequeira P.A., Moon E.A., Morgan L.Z., Watson S.J., Schatzberg A., Akil H., Myers R.M., Jones E.G., Wallace D.C., Bunney W.E., Vawter M.P. (2009) Mitochondrial variants in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *PLoS One*. **4**(3), e4913.
25. Ban M., Elson J., Walton A., Turnbull D., Compston A., Chinnery P., Sawcer S. (2008) Investigation of the role of mitochondrial DNA in multiple sclerosis susceptibility. *PLoS One*. **3**(8), e2891.
26. Sun D., Wei Y., Zheng H.X., Jin L., Wang J. (2019) Contribution of mitochondrial DNA variation to chronic disease in East Asian populations. *Front. Mol. Biosci.* **6**, 128.
27. Gómez-Durán A., Pacheu-Grau D., López-Gallardo E., Díez-Sánchez C., Montoya J., López-Pérez M.J., Ruiz-Pesini E. (2010) Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* **19**(17), 3343–3353.
28. Iwanowski P., Losy J. (2015) Immunological differences between classical phenotypes of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **349**(1–2), 10–14.

VARIABILITY OF THE MITOCHONDRIAL GENOME AND DEVELOPMENT OF THE PRIMARY PROGRESSING FORM OF MULTIPLE SCLEROSIS

M. S. Kozin^{1,2,*}, O. G. Kulakova¹, I. S. Kiselev¹, A. N. Boyko^{1,2}, and O. O. Favorova¹

¹*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia*

²*Federal Center of Cerebrovascular Pathology and Stroke, Moscow, 117342 Russia*

**e-mail: kozinmax1992@gmail.com*

Recently, it has been shown that dysfunction of mitochondria is an important component of the molecular mechanisms of many neurodegenerative diseases' development. One of them is multiple sclerosis, a chronic autoimmune and neurodegenerative disease of the central nervous system, which is characterized by clinical heterogeneity. The role of genetic variability of mitochondrial DNA in the development of various clinical courses of multiple sclerosis is poorly understood. The aim of present study was to analyze the association of ten single nucleotide polymorphisms of mitochondrial DNA and nine most common European mitochondrial haplogroups (H, J, K, U, T, I, V, W and X) with severe and relatively rare multiple sclerosis course – primary progressive multiple sclerosis. 110 patients with primary progressive multiple sclerosis and 406 healthy controls were enrolled in the study, all ethnic Russians. For the first time association of m.12308*G (rs2853498) variant ($P = 0.024$) and haplogroup U ($P = 0.0004$ and passes the multiple comparisons adjustment, $P_{\text{corr}} = 0.0076$) with primary progressive multiple sclerosis was shown. Comparison of these data with results of our previous study [1], that was focused on the role of mitochondrial genome variability in susceptibility to the most common multiple sclerosis course, relapsing-remitting multiple sclerosis, leads to the conclusion that two different mitochondrial haplogroups, U and J, are involved in the development of two different clinical courses of multiple sclerosis. The results may contribute to the identification of new targets for the treatment of primary progressive multiple sclerosis, for which at the moment there is no effective pathogenic treatment.

Keywords: multiple sclerosis, primary progressive multiple sclerosis, mitochondrial DNA, haplogroup, single nucleotide polymorphism, association