

Обычно малат и глутамат в условиях гипоксии, при достаточной восстановленности пиридиннуклосотидов превращаются в сукцинат. Однако через 2 ч после кровопотери этого не произошло, по-видимому, вследствие использования этих кислот в других реакциях метаболизма. Так, показано, что при 2-х часовой адаптации к кровопотере происходит накопление глутамина, а при суточной - его дезаминирование с образованием глутаминовой кислоты [2].

Таким образом, через 2 ч после кровопотери в костном мозге определяется отчетливый дефицит очень важных метаболитов - глутамата и сукцината, дефицит которых определяет снижение сукцинат-оксидазного звена окисления.

При суточной адаптации к острой кровопотере наблюдается прирост глутамата и малата соответственно с 74 до 130% ($p < 0.01$) и со 109 до 171% ($p < 0.01$). Накопление глутамата, по-видимому, имеет важное значение [2] и связано со стрессовым катаболизмом белков, реакциями переаминирования и дезаминирования аминокислот и глутамина. Суточная анемия, в сравнении с 2-х часовой, приводит к ещё большему приросту оксалоацетата со 131 до 197% ($p < 0.05$), однако это не сопровождается дополнительным ингибированием СДГ. Наоборот, активность фермента повышается с 64 до 115% ($p < 0.01$). Это связано с увеличением содержания янтарной кислоты с 76 до 171% ($p < 0.01$). Такое увеличение концентрации этой кислоты, по-видимому, снимает конкурентное торможение оксалоацетата с СДГ, механизм же увеличения янтарной кислоты является давно известным сукциногенный эффект глутамата. Содержание α -кетоглутарата снижается со 125 до 64% ($p < 0.05$), что также уменьшает ингибирующий эффект этой кетоислоты на СДГ и повышает стимулирующий эффект на этот фермент путём её превращения в реакциях переаминирования в глутамат и в цикле Кребса в сукцинат. При суточной анемии обнаружено достоверное снижение общего пула пиридиннуклеотидов в 2 раза, и это, по-видимому, явилось причиной снижения активности митохондриальной НАД-МДГ в сторону восстановления оксалоацетата в малат со 170 до 62% ($p < 0.01$), накопления ЦУК и ограничения более мощной активации СДГ в этот период адаптации к кровопотере.

В начальном и терминальном звене редокс-цепи окислительного фосфорилирования через 2 ч после кровопотери существенных изменений не обнаружено - активность НАДН:цитохром С-оксидоредуктазы (НАДН:ДГ) и цитохром С-оксидазы (ЦХО) находится на уровне 118 ($p > 0.05$) и 116% ($p > 0.05$) соответственно. Однако через 24 ч после кровопотери обнаруживается снижение активности ЦХО со 116 до 70% ($p < 0.05$) в сравнении с 2-х часовой анемией и интактными животными ($p < 0.05$). Вероятно, это связано с включением резервного зритропоза и выходом из ядер гистоновых белков, которые способны ингибировать ЦХО [3].

Таким образом, при суточной адаптации к острой кровопотере происходят метаболические перестройки, которые приводят к активации СДГ главным образом за счёт повышения концентрации активаторов фермента - глутамата и сукцината.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. - Л.: Ленинградский университет. 1982. - 271с.
2. Павлов В.А. Влияние глутамата на содержание аминокислот костного мозга при острой кровопотере / В сб.: Биохимическая экология. Экспериментальная и клиническая биохимия. - Свердловск, 1986. - С.99-102.
3. Рисин С.А. Влияние гистонов на активность цитохромсидазы митохондрий печени мышей // Вопросы медицинской химии. - 1981. - Т.2. - С.201-202.

О.Г. Макеев, И.Х. Измайлов, А.А. Тарасевич,
С.В. Костокова, П.С. Зубанов, А.И. Ульбин

ВЗГЛЯД НА ИСТОРИЮ ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уральская государственная медицинская академия.
Лаборатория молекулярных медицинских технологий
СрУрНЦ Российской академии медицинских наук
и Правительства Свердловской области

Исполнилось 12 лет с тех пор, как было официально вскрыто групповое захоронение на Старой Коптяковской дороге под Екатеринбургом, ранее обнаруженное группой А.Н. Авдонина. Изначально происхождение захоронения связывалось с семьей последнего русского императора, расстрелянной в ночь с 16 на 17 июля 1918 года, а все последующие усилия были направлены на поиск соответствующих доказательств.

Первый этап исследований включал краниофациальную идентификацию, медико-антропологическую, судебно-стоматологическую экспертизы и судебно-медицинскую оценку повреждений костей. Кроме этого этап включал генетическую экспертизу в Алдермастонском Криминалистическом центре МВД Великобритании, завершённую в 1993 году. Генетическое исследование основывалось на анализе последовательности D-петли митохондриальной ДНК (мтДНК), экстрагированной из костных останков. Одновременно была предпринята попытка воссоздания Гессенской родословной линии, к которой относится Николай Романов (Рис. 1). Для этого была изучена последовательность фрагментов мтДНК образцов крови прямых потомков ветви - герцога Джеймса Георга Александра Карнеги, пожелавшего сохранить инкогнито под псевдонимом «герцог Файф» (пра-правнук Луизы Гессен-Кассель, дистанция 4 поколения), и графини Ксении Шереметевой Сфири (пра-правнучка Луизы Гессен-Кассель, дистанция 5 поколений) в сравнении с последовательностью мтДНК фрагментов скелета №4, предположительно Николая Романова (внук Луизы Гессен-Кассель, дистанция 2 поколения). С целью идентификации женских останков, найденных в захоронении, исследовалась мтДНК образца крови мужа здравствующей королевы Великобритании Елизаветы II принца - консорта Филиппа герцога Эдинбургского (внучатый племянник супруги Николая II Романова императрицы Александры Федоровны и пра-правнук императора Николая I Романова).

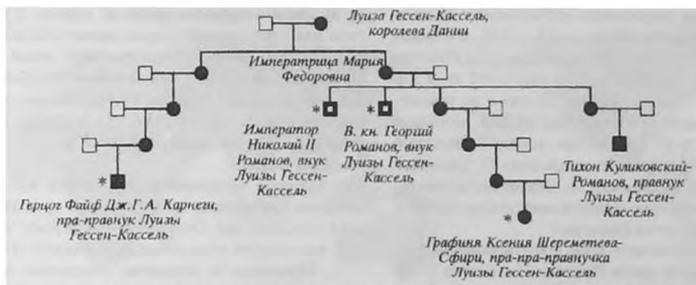


Рис. 1. Материнская генеалогическая ветвь потомков Луизы Гессен-Кассель.

В каждой ветви линия родственников, предположительно имеющая мутацию в положении 16169 мтДНК, выделена затусованными квадратами и кружочками.

Звездочками отмечены случаи выявления признаков мутации (по данным Правительственной комиссии [1]).

Так как для идентификации останков использовалась мтДНК, наследуемая исключительно по материнской линии, в исследовании мтДНК Елизаветы II не было необходимости несмотря на то, что она является прямой наследницей Романовых по мужской линии (внучатая племянница императора Николая II и пра-правнучка Луизы Гессен-Кассель).¹

Итогом исследования, имеющим важнейшее значение для дальнейшей идентификации останков Николая Романова, было выявление несоответствия последовательности нуклеотидов цепи мтДНК в положении 16.169 между ныне живущими потомками и фрагментом скелета №4. Одновременно в мтДНК скелета №4 была выявлена, как тогда считали, редчайшая «гетероплазмия» – присутствие у одного объекта как мутантного генома (мутантный нуклеотид тимин – Т в положении 16.169), так и генома «дикого» или естественного типа, присущего остальному населению (цитозин – С).

Заключение об уникальности гетероплазмии было сделано на основании сравнения с данными о 4.950 разновидностях участка D-петли мтДНК, имевшихся на тот период в базе данных центра.

Вместе с тем, факт мутационного изменения мтДНК в Гессенской родословной линии к концу I этапа экспертизы окончательно не был установлен, а вероятность принадлежности костного образца скелета №4 Николаю Романову, по мнению экспертов, составила 70:1

¹ После смерти Королевы-Матери Елизаветы I (30.03.02) королева Великобритании Елизавета II по праву первой крови стала первой прямой наследницей всех активов семьи Романовых, хранящихся в зарубежных банках (оценочно более 30 млрд. долл. США). Столь значительная сумма (эквивалентна трети всех современных золото-валютных резервов ЦБ Российской Федерации) будет выплачена королевской семье по истечении трех лет после получения справок о смерти семьи Романовых.

Оригиналы таких документов, составленных на основании заключения Правительственной комиссии, уже более двух лет располагают в архивах Леониды Романовой и ее внук – саморозглашенный наследник Российского престола Георгий Романов-Готенцолдерн, проживающие в Париже. Этот искусственно созданный прецедент придает последним известный вес в отстаивании своих сомнительных прав на престолонаследие. Поэтому интрига вокруг останков, найденных под Екатеринбургом, и в настоящее время приобрела не только исторический, но и обостренные политический и меркантильный контексты (по крайней мере для сторонников позитивности идентификации Романовых).

(неопределенная модель). Поэтому, с точки зрения современной криминалистики «...результат нельзя было считать достаточно доказательным для такого экстраординарного случая» [1].

Следует отметить, что неопределенность идентификации явилась следствием впервые зарегистрированного феномена гетероплазмии и невозможностью апеллировать к другим базам данных, содержащих сведения о распространенности выявленной мутации.

Для подтверждения мутационной природы гетероплазмии, в 1995 г. исследования были продолжены в Военно-медицинском институте Министерства обороны США. Проводился сравнительный анализ образцов мтДНК из фрагментов скелета №4 и мтДНК из костной ткани младшего брата Николая Романова – Георгия, умершего в 1898 году и похороненного в Петропавловском соборе Санкт-Петербурга (Рис. 1). К сожалению, в США не исследовались остальные объекты, ранее изучавшиеся в Великобритании.

В процессе анализа мтДНК Георгия Романова присутствия гетероплазмии в положении 16.169 было подтверждено с несколько иным соотношением, чем у фрагмента скелета № 4 (у Георгия отношение цитозин/тимин (С/Т) – 40/60; у скелета №4 С/Т – 70/30).

На основании II этапа исследований был сделан вывод о том, что в Гессенской ветви Романовых произошла мутация мтДНК, проявившаяся у обследованных объектов в виде гетероплазмии. Последняя явилась результатом дифференциальной сегрегации общего пула материнской мтДНК, который, предположительно, также был гетероплазмичным. В свете этих данных гомоплазмичное состояние мутации у обследованных представителей потомков Луизы Гессен-Кассель четвертого и пятого поколений, по мнению исследователей, должно свидетельствовать о фиксации мутации, указывающей на мутационную природу выявленных различий. Полученные результаты позволили перейти к определенно-мутационной модели с вероятностью позитивности идентификации скелета №4 как принадлежащего Николаю Романову 1:84.800.

На сделанное заключение никак не повлиял ряд несоответствий, в частности крайне высокие темпы (в 2 раза за три года) сегрегации мутантной мтДНК у матери Николая (родился в 1868 г., доля мутантного тимина

30%) и Георгия (родился в 1871 г., доля мутантного т-м-ина 60%), а так же результаты тестирования образца крови родного племянника Николая II – Т.Н. Куликовского-Романова (сын сестры Николая и Георгия Романовых – Ольги; Рис. 1), выполненные в 1995-1997 гг. в Канаде и Японии (Е.И. Рогаев, Татсуо Нагаи) и не совпавшие с ранее выявленной особенностью мтДНК потомков Луизы Гессен-Кассель (у Т.Н. Куликовского-Романова в положении 16.169 определена гомоплазма С, характерная для большинства населения). Японские исследователи так же не подтвердили присутствие гетероплазмы 16169 С/Т в мтДНК Георгия Романова.

Определяющим звеном всей идентификации может стать ДНК-анализ пятен крови Николая II с платки и подушки, которые с 1891 г. сохраняются в музее г. Отцу (Япония), а так же изучение мтДНК матери Николая и Георгия Романовых – императрицы Марии Федоровны (до принятия православия – датская принцесса Дагмара, дочь Луизы Гессен-Кассель, дистанция I поколение; Рис. 1), тело которой в 1928 г. было помещено в королевскую усыпальницу в Дании (в сентябре 2004 г. ее останки будут доставлены в Россию и по завещанию перезахоронены рядом с гробом супруга – императора Александра III Романова в Петропавловском соборе Санкт-Петербурга, что открывает возможности для решающего исследования).

Для идентификации принадлежности женских скелетов, обнаруженных в захоронении, значительный интерес представлял анализ мтДНК родной сестры супруги Николая II императрицы Александры Федоровны – Елизаветы Федоровны (ее останки были вывезены из Алапаевска и через Шанхай доставлены в Иерусалим, где сохранились с 1920 г. у). Историческое значение могло представлять сравнительное изучение последовательности мтДНК останков лейб-медика Е.С. Боткина, расстрелянного вместе с императорской семьей, и его отца – знаменитого русского терапевта С.П. Боткина.

Однако на тот момент результаты исследований были признаны недостаточными, а их продолжение нецелесообразным, тем более, что приближались «круглые» даты – связываемый с именем Б.Н. Ельцина снос дома Ипатьева (1977 г.) и, наконец, июль 1998 года. Поэтому дополнительные исследования, а значит сомнения в уже сделанных выводах, могли помешать процедуре публичного покаяния.

Между тем сомнения остались, чему способствуют воспоминания участников тех событий, в частности Анатолия Ивановича Парамонова, демонстрировавшего захоронение гостям города, в том числе поэту В.В. Маяковскому (в 1928 г.).

Член городского совета, а затем его председатель в личной беседе с автором рассказывал, что в одно время с царской семьей была расстреляна еще одна – местного кулака, обвиненного в противодействии властям, но о ней вспомнили только после первичного захоронения останков царской семьи в шахте. Заметив свидетеля этого события, исполнители решили перезахоронить в шахте ос-

танки купеческой семьи, а царской – сжечь. Однако ввиду высокой влажности дрова не горели, а керосина хватило для уничтожения только двоих (Алексея и его сестры). Поэтому части трупов из одной семьи были перезахоронены с другими с целью помешать поискам, тем более, что пересовые отряды Колчака были уже на подступах к городу. В связи с этим из могилы на Коптяковской дороге не делали секрета – потому, что... «Николашка там и не бывало».

Второе захоронение(ия), скорее всего, было произведено поблизости, но был ли там труп Николая Романова – неизвестно. Отсюда, по-видимому, уверенность в том, что «мир об этом никогда не узнает» (П.Л. Войков).

Принимая во внимание возможное присутствие в захоронении местных геномов, важным фактором, способным внести дополнительную неопределенность, является генетический полиморфизм генофонда жителей Уральского региона.

В последние годы получены данные исследования мтДНК жителей соседних регионов, которые подтверждают, что к западу и востоку от Урала обитают разные расы – европеоиды и монголоиды, а генофонд местного населения вобрал в себя все разнообразие известных в мире геномов. Формирование уникального генофонда с исторической точки зрения происходило в три этапа:

1. Первичная миграция людей 60-70 тыс. лет назад – перенос через Урал монголоидных и европеоидных геномов (Рис. 2).

2. Велико переселение кочевых народов из Сибирских «ядер» расообразования менее 10 тыс. лет назад – обратный перенос геномов, сформировавших современное население Европы. Войны, уничтожившие целые народы, и связанные с изменчивым плодородием южноуральских степей большие и малые миграции, оставили на Урале свой след. Спасительная миграция кочевых племен была направлена не только на запад, но и на север, где в суровых климатических условиях Уральских гор до сих пор сохранился уникальный генофонд.

3. Современные миграции и переселения, связанные с открытием и освоением новых земель – последние 500 лет. Вероятно поэтому у 17% этнических русских – коренных уральцев встречаются уникальные ДНК-мутации, имеющиеся в мире только у бурят, татар, мордвы, якутов (до 80%) и более чем у 20% современных финнов (замена Т на С и сходные микросателлитные наборы в У-хромосоме). В свою очередь, у уральских монголоидов присутствуют маркеры, характерные для типичных современных европеоидов (например, в положении 10.394, но не 10.397 мтДНК).

В связи с возможным присутствием в костных останках следов уральских геномов и сомнениями в результатах генетических тестов, высказанных в личной беседе Александром Николаевичем Авдонниковым, был предпринят анализ основных доказательных элементов:

– исследование возможности присутствия мутации в положении 16.169 мтДНК в геномах лиц, не имеющих очевидных родственных связей с потомками Луизы Гессен-Кассель;

– с позиции современных данных оценить частоту встречаемости гетероплазмы среди известных мутаций мтДНК.

² Исследование мтДНК Елизаветы Федоровны было выполнено в США в двух независимых лабораториях (Станфордский университет и Лос-Альмос) в 2003 г. проф. Л.А. Животовским. Результаты выявили расхождение с ранее опубликованной последовательностью мтДНК Александры Федоровны сразу по многим позициям (16.111 Т(С); 16.129 G(A); 16.327 C(T)). Это ставит под сомнение принадлежность образцов близким родственникам [7].

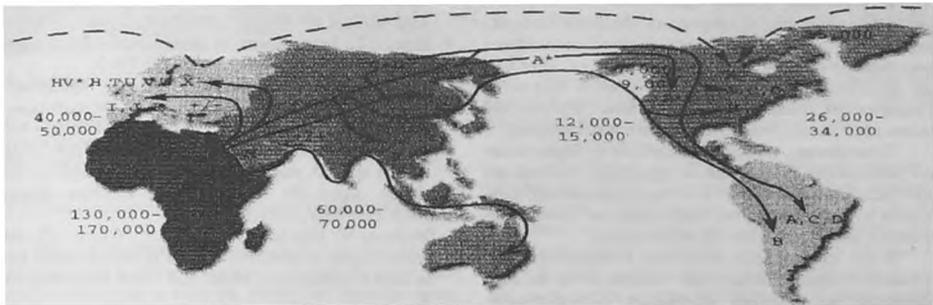


Рис. 2. Ветви трансконтинентальной миграции по данным анализа мтДНК <http://www.gen.emory.edu/MITOMAP/WorldMigration.pdf> и другие)

L – родоначальные негроидные ветви (130-170 тыс. лет назад).
 M – ветви миграции типично монголоидных групп (A, B, C, D, G, F) 60-70 тыс. лет назад (++) – мутации как в положении 10394, так и в положении 10397), а так же A* (дополнительная мутация в положении 16329 мтДНК).
 N – ветви миграции типично европеоидных групп 40-50 тыс. лет назад: HV*.
 H, T, U, V, W, X – северная ветвь миграции через Урал предков современных скандинавов, исландцев и викингов – «первооткрывателей» Америки (X – 15 тыс. лет назад), в мтДНК которых отсутствуют мутации в обоих положениях (-/-); I, J, K – ветвь миграции, отличающаяся присутствием мутации в положении 10394, но не 10397 (+/-) и давшая начало современным британцам (иберийцы, галы, бритты, белты).
 A, B, C, D, X – редуцированные ветви миграции предков аборигенов Америки (5 линий – основательниц) 7-9, 12-15 и 26-34 тыс. лет назад.

Признание мутантного происхождения мутации мтДНК в положении 16169 обусловило поиск подобной мутации у контингента жителей территории Восточно-Уральского радиационного следа Свердловской области, первое поколение которых проживало в зоне максимального загрязнения. Именно у этой группы зафиксированы наибольшие темпы накопления мутаций в митохондриальном геноме [2]. В лаборатории молекулярных медицинских технологий УГМА в течение ряда лет проводится отбор и исследование ДНК жителей Уральского региона, часть которой пополняет внутривлабораторный банк ДНК. Исследовалась нуклеотидная последовательность фрагмента D-петли мтДНК 120 человек – современных жителей Каменского района Свердловской области. Выполнение задачи было значительно облегчено целевым поиском мутации в положении 16.169 из более чем тысячи нуклеотидных пар D-петли мтДНК.

Для решения задачи применяли секвенирование с использованием меченых дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов (Amersham) по методу Ф. Сэнгера [17], блокирующих

3'-конец – дидезоксиаденозина (для выявления комплементарного тимина) и дидезоксигуанозина (для выявления цитозина) в избранном коротком участке D-петли мтДНК, располагающегося рядом с участком связывания праймера.

Оказалось, что у одной жительницы Каменского района, чьи родители были отселены после аварии 1957 года на ПО «Маяк» вследствие высокого радиационного загрязнения, в положении 16.169 выявлена транзигия нуклеотида, качественно совпадающая с классической Гессенской мутацией. Интересно, что аналогичная мутация определена и у её сына. Это подтверждает «неслучайность» данного отклонения, переданного ребенку от матери.

Последовательности участков D-петли мтДНК из фрагментов костей скелетов № 4 и Георгия Романова, крови Ксении Шереметевой-Сфири [1] и последовательности D-петли матери и сына Н., представлены на рисунке 3 (стрелкой отмечено положение 16.169).

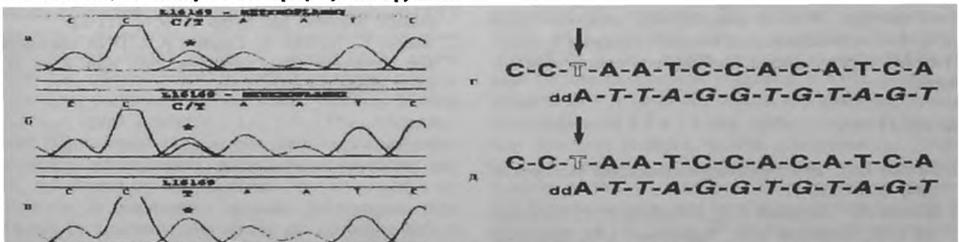


Рис. 3. Фрагменты последовательностей мтДНК скелета 4 (а), В. кн. Георгия Александровича Романова (б), графини Ксении Шереметевой-Сфири (в) и последовательностей мтДНК матери Н. (г) и ее сына (д). Звездочкой и стрелкой отмечено положение 16.169.

К сожалению, использованная методика не позволила дифференцировать данную мутацию по признаку плазмиды. Так же не дифференцировалась возможная принадлежность семьи Н. к Гессенской ветви, хотя уже само предположение о проживании потомков этой ветви по материнской линии в одной из деревень Свердловской области вряд ли заслуживает серьезного исследования.

По-видимому, появление подобной мутации могло быть обусловлено либо краевым характером данной мутации (распространенностью в местной популяции), либо высоким мутагенным фоном территории (не только техногенного, но и природного происхождения).

В том случае, если допустить возможность присутствия в захоронении местных гномов, а так же если дальнейшие исследования подтвердят распространенность данной мутации в генофонде уральских жителей, тогда вероятность позитивности идентификации скелета №4 как останков Николая Романова резко снизится.

Ключевым положением официальной экспертизы скелета №4, позволившим сменить неопределенную модель на определенную, стала впервые выявленная гетероплазмия.

Следует отметить, что 11 лет, прошедших с первого выявления гетероплазмид, характеризовались накоплением сведений о вариантах, качественных и количественных параметрах мутаций мтДНК. В настоящее время многие данные свидетельствуют о чрезвычайно высокой распространенности этого явления [3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Так, около 159 зарегистрированных фенотипически значимых разновидностей мутаций мтДНК 116 или 73% являются гетероплазмичными. При этом 98 или 61.6% являются абсолютно гетероплазмичными, а у носителей 18 (11,3%) мутаций у одних индивидов присутствует гетеро- у других – гомоплазмия. И лишь для 43 мутаций (27,0%) подтверждена гомоплазмия. Распространенность гетероплазмид среди мутаций мтДНК обусловлена состоянием частичной фиксации, то есть существованием короткоживущего (2-5 поколений) переходного состояния, обычно завершающегося формированием мутантного гена или возвратом к гену «дикого» типа.

Итогом выполненных исследований и современных данных о распространенности гетероплазмид может стать возврат к неопределенной модели в качестве основной. При этом вероятность доказательности идентификации останков последнего русского Императора может составить менее 70:1, что вряд ли приемлемо для данного случая.

В июле 2003 года исполнилось 85 лет, прошедших с той трагедии. На месте дома Ипатьева построен «Храм на крови», величественность которого отражает ту единственную определенность, имеющуюся пока в этом вопросе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов П.Л. Ж-л: Судебно-медицинская экспертиза, №4, 1998, С. 30-47.
2. Макеев О.Г., Ястребов А.П., Измайлов И.Х., Костюкова С.В., Лсонгъев И.Л., Тарасевич А.А., Воробьев А.В. Влияние факторов окружающей среды на процессы мутагенеза и состояние здоровья жителей г. Каменск-Уральский. Вестник Уральской медицин-

- ской академической науки. г. Екатеринбург. 2003. № 1, С. 27-33.
3. Boore J.L. Transmission of mitochondrial DNA-playing favorites? *Bioessays* 1997 Sep; 19(9):751-3.
4. Chinnery P.F., Samuels D.C. Relaxed replication of mtDNA: A model with implications for the expression of disease. *Am J. Hum. Genet.* 1999 Apr; 64(4):1158-65.
5. Cortopassi G., Wang E. Modelling the effects of age-related mtDNA mutation accumulation; complex I deficiency, superoxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995 May; 1271(1):171-6.
6. Druzhyina N., Nair R.G., LeDoux S.P., Wilson G.L. «Defective repair of oxidative damage in mitochondrial DNA in Down's syndrome». *Mutat. Res.* 1998 Nov; 409(2):81-9.
7. Knight A., Zhivotovsky L.A., Kass D.H., Litwin D.E., Green L.D., White P.Scott, Mountain J.L. Molecular, forensic and haplotypic inconsistencies regarding the identity of the Ekaterinburg remains. *Annals of Human Biology.* 2004, 1-8.
8. Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998 Aug; 1366(1-2):53-67.
9. Letellier T., Malgat M., Rossignol R., Mazat J.P. Metabolic control analysis and mitochondrial pathologies. *Mol. Cell Biochem* 1998 Jul; 184(1-2):409-17.
10. Lu C.Y., Lee H.C., Fahn H.J., Wei Y.H. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat. Res.* 1999 Jan; 423(1-2):11-21.
11. Michikawa Y., Mazzucchelli F., Bresolin N., Scarfato G., Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication [see comments]. *Science* 1999 Oct; 286(5440):774-9.
12. Miquel J. An update on the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp. Gerontol.* 1998 Jan; 33(1-2):113-26.
13. Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995 May; 1271(1):177-89.
14. Ozawa T. Mitochondrial genome mutation in cell death and aging. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1999 Aug; 31(4):377-90.
15. Robinson B.H. MtDNA and nuclear mutations affecting oxidative phosphorylation: correlating severity of clinical defect with extent of bioenergetic compromise. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994 Jun; 26(3):311-6.
16. Rothman S.M. Mutations of the mitochondrial genome: clinical overview and possible pathophysiology of cell damage. *Biochem. Soc. Symp.* 1999; 66:111-22.
17. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1977; 74:5463-5467.