

## Методика

© Коллектив авторов, 2020

УДК 616-092.18, 616-092.4, 575.155

Сазонова М.А.<sup>1,2,4</sup>, Синёв В.В.<sup>1,2</sup>, Рыжкова А.И.<sup>1</sup>, Сазонова М.Д.<sup>1</sup>, Дорошук Н.А.<sup>2</sup>, Кириченко Т.В.<sup>5</sup>, Карагодин В.П.<sup>1,4</sup>, Орехов А.Н.<sup>1,3,5</sup>, Собенин И.А.<sup>1,2</sup>

# Создание цибридных клеточных культур, содержащих однонуклеотидную замену в гене MT-TL2, ассоциированную с атеросклерозом

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,

125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России,

121552, Москва, Россия, 3-я Черепковская ул., д. 15а;

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково,

121609, Московская обл., Сколково, Россия, ул. Новая, д. 100;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова»,

117997, Москва, Россия, Стремянный переулок, д. 36;

<sup>5</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»,

117418, Москва, Россия ул. Цюрупы, д. 3

**Введение.** Цибридные клеточные модели наиболее перспективны для изучения патогенеза различных заболеваний. Авторами статьи впервые были созданы такие модели для изучения митохондриальной дисфункции и патологических процессов, развивающихся при атеросклерозе.

**Цель работы** – создание цибридных культур с высоким уровнем гетероплазии по мутации митохондриального генома m.12315G>A. В предварительных исследованиях авторами статьи было установлено, что пороговый уровень гетероплазии мутации m.12315G>A ассоциирован с атеросклерозом.

**Методика.** Цибридные культуры создавали путем слияния безмитохондриальных клеток (rho0) и митохондрий из тромбоцитов участников исследования с высоким уровнем гетероплазии исследуемых мутаций. Для создания rho0-клеток была взята культура монохлорного происхождения ТНР-1. Безмитохондриальные клетки были получены с помощью метода М. Кинга и Г. Аттарди. Тромбоциты выделяли из цельной крови участников исследования. Для этого был применен метод центрифугирования в градиенте плотности фикола-урографина. Для получения цибридных культур клеток была использована методика «ПЭГ-слияния». В созданных безмитохондриальных и цибридных клеточных культурах был проведен количественный анализ копий митохондриального генома. Согласно результатам данного анализа было подтверждено либо отсутствие митохондрий (rho0-клетки), либо их наличие (цибриды). Количество копий мтДНК детектировалось с помощью реал-тайм ПЦР в присутствии красителя SYBR Green I.

**Результаты.** Получены 4 цибридные клеточные линии, содержащие мутацию m.12315G>A с уровнем гетероплазии выше порогового значения.

**Заключение.** Созданы 4 цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазии по мутации митохондриального генома m.12315G>A. Полученные цибридные клеточные линии могут служить моделями для изучения молекулярно-клеточных механизмов митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и других сердечно-сосудистых заболеваниях. Цибридные культуры можно использовать для моделирования атерогенеза, а также для подбора патогенетически обоснованной лекарственной терапии при атеросклерозе.

**Ключевые слова:** цитоплазматические гибриды; митохондриальный геном; цибриды; мутация; ген MT-TL2; мтДНК; цибридная модель; метод создания цибридов

**Для цитирования:** Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А., Кириченко Т.В., Карагодин В.П., Орехов А.Н., Собенин И.А. Создание цибридных клеточных культур, содержащих однонуклеотидную замену в гене MT-TL2, ассоциированную с атеросклерозом. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(4): 140-147.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.140-147

**Для корреспонденции:** Сазонова Маргарита Александровна, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Сазонова М.А.; методология – Сазонова М.А.; сбор и обработка материала – Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А, Кириченко Т.В.; написание текста – Сазонова М.А.; редактирование – Карагодин В.П., Орехов А.Н., Собенин И.А.

**Финансирование.** Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (грант №19-015-00479).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.09.2020

Принята в печать 16.10.2020

Опубликована 26.11.2020

Sazonova M.A.<sup>1,2,4</sup>, Sinyov V.V.<sup>1,2</sup>, Ryzhkova A.I.<sup>1</sup>, Sazonova M.D.<sup>1</sup>, Doroshchuk N.A.<sup>2</sup>, Kirichenko T.V.<sup>1,5</sup>, Karagodin V.P.<sup>1,4</sup>, Orekhov A.N.<sup>1,3,5</sup>, Sobenin I.A.<sup>1,2</sup>

## Creation of cybrid cell cultures containing a single-nucleotide substitution associated with atherosclerosis in the MT-TL2 gene

<sup>1</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia;

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Cardiology,  
3rd Cherepkovskaya Str. 15a, Moscow 121552, Russia;

<sup>3</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Centre,  
Novaya Str. 100, Skolkovo, 121609, Moscow Region, Russia;

<sup>4</sup> G.V. Plekhanov Russian University of Economics,  
Stremyanny Pereulok 36, Moscow 117997, Russia;

<sup>5</sup> Institute of Human Morphology,  
Tsyurupy Str. 3, Moscow. 117418, Russia

**Introduction.** Cybrid cell models are most promising for studying pathological mechanisms in different diseases. The authors for the first time created such models for studying mitochondrial dysfunction and pathological processes underlying atherosclerosis.

**Aim.** Creation of cybrid cultures with a high heteroplasmy level for mitochondrial genome mutation m.12315G>A. A preliminary study by the authors showed that the heteroplasmy level of mutation m.12315G>A was associated with atherosclerosis.

**Methods.** Cybrid cultures were created by fusing non-mitochondrial cells (rho0) and mitochondria from platelets of study participants with a high heteroplasmy level of the mutations under study. A THP-1 culture of monocytic origin was used to create rho0 cells. Non-mitochondrial cells were obtained using the M. King and G. Attardi method. Platelets were extracted from whole blood of study participants with Ficoll-Urografin density gradient centrifugation. Cybrid cell cultures were obtained by the PEG-mediated fusion method. In the created non-mitochondrial and cybrid cell cultures, quantitative analysis of mitochondrial genome copies was performed. This analysis confirmed either the absence of mitochondria (rho0-cells) or their presence (cybrids). The mtDNA copies were quantified using real-time PCR in the presence of the SYBR Green I stain.

**Results.** Four cybrid cell lines were obtained, which contained the m.12315G>A mutation with heteroplasmy levels higher than the threshold level.

**Conclusion.** Four cybrid cultures were created with a high heteroplasmy level for the mitochondrial genome mutation m.12315G>A. The obtained cell lines can be used as models for studying molecular cellular mechanisms of mitochondrial dysfunction in atherosclerosis and cardiovascular diseases. In addition, they may be useful for modeling atherogenesis in cells and for selecting therapy for patients with atherosclerosis.

**Keywords:** cytoplasmic hybrids; mitochondrial genome; cybrids; mutation; gene MT-TL2; mtDNA; cybrid model; cybrids creation method

**For citation:** Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroshchuk N.A., Kirichenko T.V., Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of cybrid cell cultures containing a single-nucleotide substitution associated with atherosclerosis in the MT-TL2 gene. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(4): 140-147. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.04.140-147

**For correspondence:** Sazonova Margarita Alexandrovna, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

**Contribution.** research concept and design – Sazonova M.A.; methodology – Sazonova M.A.; material collecting and processing Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroshchuk N.A., Kirichenko T.V.; writing text – Sazonova M.A.; text editing – Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A.

**Acknowledgment.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant # 19-015-00479)

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Information about the authors:**

Сазонова М.А., <http://orcid.org/0000-0002-8610-4593>

Синёв В.В., <https://orcid.org/0000-0001-5105-5763>

Рыжкова А.И., <https://orcid.org/0000-0002-8838-7750>  
Сазонова М.Д., <https://orcid.org/0000-0002-9452-1282>  
Дорошук Н.А., <https://orcid.org/0000-0003-2258-6463>  
Кириченко Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-2899-9202>  
Карагодин В.П., <https://orcid.org/0000-0003-0501-8499>  
Орехов А.Н., <https://orcid.org/0000-0002-6495-1628>  
Собенин И.А., <https://orcid.org/0000-0003-0978-6444>

Received 05.09.2020

Accepted 16.10.2020

Published 26.11.2020

## Введение

Актуальной задачей медицины является создание клеточных моделей, содержащих патогенные мутации, с целью изучения патогенеза и разработки лекарственной терапии различных патологий [1-5]. Например, такие гибридные модели были созданы для исследования патогенеза атрофии зрительных нервов Лебера, болезни Паркинсона, синдрома MELAS, болезни Альцгеймера, ВИЧ, синдрома Ли [1-5]. Однако до сих пор не было создано гибридных клеточных моделей для изучения патогенеза атеросклероза.

Следует отметить, что одним из самых тяжелых заболеваний 21 века является атеросклероз [6–10]. Данное заболевание является одной из важнейших причин развития сосудистых катастроф (инфаркт, ишемический инсульт), причиной смерти большого количества людей [11-15]. Одной из причин атерогенеза считается митохондриальная дисфункция [16–20]. Установлена ассоциация атеросклеротических поражений артерий с митофагией [16–18]. Выявлены сигнальные пути, с помощью которых дисфункция митохондрий связана с окислительным стрессом, а также с уменьшением длины теломер и атеросклерозом [18–21]. Обнаружено, что метаболические заболевания могут привести к повреждению мембраны митохондрий. Эти повреждения могут быть причиной митохондриальной дисфункции, которая сопровождается окислительным стрессом, приводящим к возникновению атеросклеротических поражений сосудов [22–26].

В настоящей работе была предпринята попытка создания гибридных моделей, содержащих атерогенную мутацию митохондриального генома. Созданы четыре гибридные культуры с высоким уровнем гетероплазмии по мутации  $m.12315G>A$ , которая локализована в гене *MT-TL2* кодирующего региона митохондриального генома. Результатом данной мутации может быть дисфункция транспортной РНК-Лейцин (кодон узнавания CUN). При этом снижается уровень синтеза митохондриальных белков на рибосоме.

## Методика

*Метод создания безмитохондриальных (rho0) культур.* При получении безмитохондриальных клеток использовался метод М. Кинга и Г. Аттарди [16]. Последовательность создания безмитохондриальных клеток была следующей:

1. На первом этапе проверялась возможность создания rho0-клеток (клетки, которые потеряли митохондрии в результате химического воздействия). Культуру моноцитарного происхождения ТНР-1 культивировали в ростовой среде. Было использовано 2 варианта:

1) культивирование с добавлением уридина и бромистого этидия.

2) культивирование с добавлением только бромистого этидия.

Среда для роста клеток содержала пируват и глюкозу в концентрации, указанной для полной среды DMEM. Авторами статьи были определены следующие условия для культивирования ТНР-1, с целью создания rho0-клеток:

1) определено время культивирования клеток ТНР-1.

2) определена концентрация добавок к среде для культивирования клеток ТНР-1.

2. На втором этапе проводилось непосредственно создание rho0-клеточной линии. Клетки нативной культуры ТНР-1 были помещены в ростовую среду с добавлением уридина и бромистого этидия. При этом бромистый этидий блокировал мтДНК. Возникла митохондриальная дисфункция. Затем данная линия клеток была помещена в среду только с уридином (бромистый этидий в среде отсутствовал). В процессе культивирования на такой среде клетки теряли все функционирующие митохондрии — они становились безмитохондриальными (rho0).

После этого проводилась проверка, является ли данная rho0-клеточная линия устойчивой и долгоживущей в подобранных нами условиях. Затем проводился анализ количества копий митохондриального генома в rho0-культуре. Если количество копий мтДНК в

безмитохондриальной культуре было значительно меньше, чем в нативной культуре ТНР-1, или они вообще отсутствовали, то считалось, что безмитохондриальная культура получена.

В процессе создания  $\rho$ ho0-клеток и цибридных культур были использованы для приготовления ростовой среды следующие реактивы: эмбриональная бычья сыворотка (10% от общего объема); RPMI-1640; бета-меркаптоэтанол ( $2 \times 10^{-5}$  М); 100-кратный пенициллин-стрептомицин (пенициллин – 50 ед/мл, стрептомицин – 50 мкг/мл); d-глюкоза (2500 мг/л); L-глутамин (300 мг/л); пируват натрия (110 мкг/л).

Для приготовления 10-кратного цитрата натрия использовались: физиологический раствор (0,15M NaCl); цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) тринатриевой соли, дигидрат); полиэтиленгликоль 1500 (42% от общего объема); DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] (9,5 мл); диметилсульфоксид (ДМСО) (2 мл); ПЭГ раствор. Кроме того, использовались готовые среды и растворы: уридин (раствор 50 мг/мл); фиколл-урографин (плотность 1,077); бромистый этидий (1% раствор); физиологический раствор DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] (0,15M NaCl); ДМСО.

Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I был использован для определения количества копий митохондриальной ДНК в нативной, цибридной и  $\rho$ ho0 культурах клеток.

*Выделение тромбоцитов из крови.* Настоящее исследование было выполнено в соответствии с Хельсинской декларацией. Все участники исследования дали письменное информированное согласие на участие в данном исследовании.

С помощью слияния  $\rho$ ho0-клеток с тромбоцитами, выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий, были получены цибридные клетки.

Тромбоциты пациентов выделялись из цельной крови. Для этого был применен метод центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина. Метод выделения тромбоцитов из крови состоял из трех этапов:

1. На первом этапе была проведена подготовка образцов крови.

К образцам крови участников исследования-доноров тромбоцитов, добавляли 10-кратный раствор цитрата натрия в физиологическом растворе в соотношении 1:1. Полученную смесь центрифугировали 20 мин при 200 g при температуре 12 °С.

2. На втором этапе проводилось выделение тромбоцитов.

Отбирали три четверти супернатанта (плазмы) и центрифугировали 20 мин при 1500 g при температуре 15 °С. Отбирали супернатант. К оставшемуся осадку добавляли 11 мл физиологического раствора.

3. На третьем этапе выделенные тромбоциты подготавливались к криохранению: к 11 мл суспензии тромбоцитов в физрастворе добавляли 1,5 мл стерильного ДМСО и 3 мл FBS. Криовials помещали в штатив для контролируемого замораживания клеток (1°C/мин) на 8 часов при температуре -80 °С. Полученные образцы хранили в жидком азоте.

*Метод создания цибридных культур клеток.* Основным условием проникновения митохондрий в безмитохондриальные клетки является образование пор в цитоплазматических мембранах клеток. Поры могут образовываться при воздействии на  $\rho$ ho0-клетки определенных физических или химических факторов. Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о создании цибридных клеточных культур на основе клеточной культуры моноцитарного происхождения ТНР-1. Поэтому в настоящей работе данные цибридные культуры были созданы впервые.

Нашей исследовательской группой была использована методика «ПЭГ-слияния». Данная методика позволяет создавать цибриды с помощью слияния безмитохондриальных клеток с тромбоцитами, которые используются в качестве клеток-доноров митохондрий. Следует подчеркнуть, что в тромбоцитах отсутствует ядерный геном. Они содержат только митохондриальную ДНК. Поэтому использование тромбоцитов в качестве доноров митохондрий (в том числе, митохондриального генома) значительно упрощает протокол получения цибридных линий.

*Этапы создания цибридов:* 1. На первом этапе проводилась подготовка клеток перед слиянием. В том случае, если тромбоциты были заморожены, то вначале они подвергались разморозке и удалению криопротектора. Суспензию с тромбоцитами добавляли к 14 мл подогретого до температуры 37 °С физиологического раствора. Предварительный подогрев криопробирки с тромбоцитами до данной температуры осуществлялся на водяной бане. Затем было проведено центрифугирование в течение 15 мин при 1500 g при температуре 15 °С. Из пробирки был отобран супернатант.

2. На втором этапе была проведена подготовка безмитохондриальных клеток. Для этого центрифугировали суспензию  $\rho$ ho0-клеток в течение 5 мин при 180 g при температуре 25 °С. Безмитохондриальные клетки ресуспендировали в среде DMEM [-Ca<sup>2+</sup>] в концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл.

3. На третьем этапе проводилось слияние  $\rho$ ho0-клеток с тромбоцитами.

Безмитохондриальные клетки добавляли к осадку тромбоцитов. Центрифугировали в течение 10 мин при 180 g при температуре 25 °С. Был отобран супернатант.

После этого к осадку тромбоцитов с  $\rho\text{ho}0$ -клетками было добавлено 100 мкл 42% ПЭГ. Было проведено ресуспендирование. По истечении 1 мин, было проведено повторное ресуспендирование в течение 30 с, после чего было проведено культивирование полученной суспензии клеток в ростовой среде в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре 37 °С.

*Количественный анализ копий митохондриального генома в безмитохондриальных клеточных культурах и цибридах.* В созданных безмитохондриальных и цибридных клеточных культурах был проведен количественный анализ копий митохондриального генома. Согласно результатам данного анализа было подтверждено либо отсутствие митохондрий ( $\rho\text{ho}0$ -клетки), либо их наличие (цибриды). Количество копий мтДНК детектировалось с помощью реал-тайм ПЦР в присутствии красителя SYBR Green I. Контролем служила нативная культура клеток моноцитарного происхождения ТНР-1.

Определение количества копий митохондриального генома проводилось с использованием контрольных синтетических матриц на основе участка митохондриальной ДНК в концентрациях  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  и  $10^6$ . Была построена калибровочная кривая на основе данных Ствеличины матриц. Ее использовали для определения количества копий мтДНК в исследуемых образцах безмитохондриальной, цибридной и нативной культур клеток. Если количество копий митохондриального генома в исследуемой культуре было малочисленным или мтДНК вообще отсутствовала, в отличие от нативной ТНР-1, то принято было считать, что митохондрии в данной культуре отсутствуют или вскоре, после нескольких пассажей, исчезнут из клеток, вследствие утраты погибшими (из-за бромистого этидия) митохондриями способности к делению. Поэтому полученная культура считалась безмитохондриальной ( $\rho\text{ho}0$ ).

Уровень гетероплазмии мутации 12315G>A в безмитохондриальных клетках оказался чрезвычайно низким. Это было связано с тем, что количество копий митохондриального генома в клетках  $\rho\text{ho}0$  было очень мало по сравнению с данным параметром в нативной культуре ТНР-1. Например, в исследуемом образце общей ДНК (30 нг/мкл) из культуры  $\rho\text{ho}0$  было приблизительно  $10^3$  копии мтДНК. В то же время образец из нативной культуры ТНР-1 содержал более  $10^6$  копий митохондриального генома. После получения цибридных культур, содержащих мутацию 12315G>A уровень гетероплазмии этой однонуклеотидной замены в цибридных клетках оказался примерно таким же, как в тромбоцитах доноров-носителей исследуемой мутации.

*Определение уровня гетероплазмии мутации мтДНК m. 12315G>A.* С помощью  $\rho\text{ho}0$ -клеточных линий были

созданы цибридные клеточные культуры, содержащие высокий уровень гетероплазмии мутации митохондриального генома. Уровень гетероплазмии мутации m.12315G>A был определен с помощью оригинального метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанного авторами статьи на основе технологии пиросеквенирования [11-15].

Амплификаты ДНК доноров тромбоцитов, содержащие область исследованных мутаций, были пиросеквенированы. Затем в них был определен уровень гетероплазмии мутации m.12315G>A на основании формулы, разработанной авторами статьи [11-15].

Были использованы следующие праймеры для ПЦР [11-15]:

R: TТАСТТТТАТТТGGAGTTGCAC(12337-12317);

F: bio-СТCATGCCCCCATGTCTAA(12230-12249).

Для проведения ПЦР использовался стандартный буфер с сульфатом аммония. Концентрация хлорида магния в буфере была 2,5 mM. Размер амплификата для мутации m.12315G>A составлял 108 bp [11-15].

В качестве праймера для пиросеквенирования был использован [11-15]: TTTGGAGTTGCAC (12328-12316).

## Результаты и обсуждение

Нашей исследовательской группе не удалось обнаружить в литературе методов создания  $\rho\text{ho}0$ -клеток на основе культуры моноцитарного происхождения ТНР-1, поэтому такой метод был создан нами впервые.

Метод создания безмитохондриальной культуры на основе ТНР-1 описан в разделе «Методика». Отметим, что для создания устойчивых к многократному пересеванию и морфологически однородных цибридных линий, исследователи разных стран, в основном, использовали постоянные клеточные линии, т.е. клетки, уже прошедшие этап дедифференцировки. В своих экспериментах мы выбрали размер полного периода получения безмитохондриальной культуры ТНР-1. Он составил 18 нед. Результаты анализа количества копий митохондриального генома подтвердили отсутствие митохондрий в безмитохондриальной культуре. Контролем служила нативная культура клеток ТНР-1. Если количество копий митохондриального генома в исследуемой культуре было незначительным или мтДНК вообще отсутствовала, в отличие от нативной ТНР-1, то принято было считать, что  $\rho\text{ho}0$ -культура ТНР-1 создана.

Посредством ПЭГ-слияния безмитохондриальных клеток и митохондрий из тромбоцитов пациентов были получены цибридные культуры. Пороговый уровень гетероплазмии мутации мтДНК m.12315G>A использовался в качестве критерия для отбора доноров тром-

боцитов [14]. Согласно результатам предварительных исследований авторов статьи, мутация митохондриального генома m.12315G>A ассоциирована с атеросклеротическими поражениями интимы артерий человека [11–15].

Было проведено сравнение количества копий митохондриального генома в полученных гибридных культурах и rho0-культуре ТНР-1. Количество копий мтДНК в гибридных культурах клеток оказалось значительно большим, чем в безмитохондриальной культуре (10<sup>6</sup> копий митохондриального генома, по сравнению с 10<sup>3</sup> копиями мтДНК, соответственно). На основе проведенного анализа был сделан вывод о том, что гибридные культуры созданы.

Таким образом, в настоящей работе были получены 4 гибридные клеточные культуры, в которых уровень гетероплазии мутации митохондриального генома m.12315G>A превышал пороговое значение в атеросклеротических бляшках (7,5%) и утолщенном интимо-медиальном слое сонных артерий (10,5%) [14]. В первой гибридной линии уровень гетероплазии мутации m.12315G>A составил 44%, во второй – 25%, в третьей – 38%, а в четвертой – 29%.

Следует отметить, что одна из гибридных клеточных линий, несущая мутацию митохондриального генома m.12315G>A, была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с утолщенным интимо-медиальным слоем сонных артерий, а другая – от участника исследования с нормальной интимой-медицей. При этом, третья гибридная культура была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с атеросклеротической бляшкой в сонных артериях, а четвертая – от участника исследования, не имевшего атеросклеротических бляшек в сонных артериях.

Созданные гибридные культуры несут мутацию, локализованную в кодирующем регионе митохондриального генома [11, 27–30]. Мутация m.12315G>A локализована в гене MT-TL2. В результате данной мутации может произойти дисфункция транспортной РНК-Лейцин (кодон узнавания CUN), с последующим снижением уровня синтеза митохондриальных белков на рибосоме [11–15]. Парное сравнение гибридных клеточных линий, имеющих высокий уровень гетероплазии по одной и той же мутации, может помочь исследовать молекулярно-клеточные механизмы митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и сердечно-сосудистых заболеваниях.

### Заключение

В настоящей работе были созданы четыре гибридные культуры с высоким уровнем гетероплазии по

мутации митохондриального генома m.12315G>A. Полученные гибридные клеточные линии могут служить моделями для изучения молекулярно-клеточных механизмов митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и сердечно-сосудистых заболеваниях. Кроме того, их можно использовать для моделирования атерогенеза, а также подбора лекарственной терапии для пациентов с атеросклерозом.

### Литература

(п.п. 1-14; 16; 18-28 см. References)

15. 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;4:81-4. PMID: 22359940
17. Сазонова М.А., Синёв В.В., Карагодин В.П., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Баринаева В.А. и др. Влияние аутофагии на возникновение и развитие атеросклероза и его факторов риска. *Ангиология и сосудистая хирургия.* 2017; 23(4): 20-2. PMID: 29240051.
29. 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 экпер. тер.* 2012; 3: 124-9. PMID: 23072124.
30. Иванова М.М., Бородачёв Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома. *Пат. физиол. и экпер. тер.* 2012; 3: 115-22. PMID: 23072123.

### References

1. Arduíno D.M., Esteves A.R., Swerdlow R.H., Cardoso S.M. A cybrid cell model for the assessment of the link between mitochondrial deficits and sporadic Parkinson's disease. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1265: 415-24. doi: 10.1007/978-1-4939-2288-8\_31
2. Garrido-Maraver J., Cordero M.D., Moñino I.D., Pereira-Arenas S., Lechuga-Vieco A.V., Cotán D. et al. Screening of effective pharmacological treatments for MELAS syndrome using yeasts, fibroblasts and cybrid models of the disease. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 167(6): 1311-28. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02086.x
3. Jiang P., Liang M., Zhang C., Zhao X., He Q., Cui L., et al. Biochemical evidence for a mitochondrial genetic modifier in the phenotypic manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy-associated mitochondrial DNA mutation. *Hum. Mol. Genet.* 2016; 25(16): 3613-25. doi: 10.1093/hmg/ddw199
4. Jeong J.H., Yum K.S., Chang J.Y., Kim M., Ahn J.Y., Kim S., et al. Dose-specific effect of simvastatin on hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  and BACE expression in Alzheimer's disease cybrid cells. *BMC Neurol.* 2015; Jul. 31; 15: 127. doi: 10.1186/s12883-015-0390-5
5. Wilkins H.M., Carl S.M., Swerdlow R.H. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrial pathologies. *Redox. Biol.* 2014; 2: 619-31. doi: 10.1016/j.redox.2014.03.006. Review.
6. van Capelleveen J.C., Bochem A.E., Boekholdt S.M., Mora S., Hoogeveen R.C., Ballantyne C.M., et al. Association of High-Density Lipoprotein-Cholesterol Versus Apolipoprotein A-I With Risk of Coronary Heart Disease: The European Prospective Investigation Into Cancer-Norfolk Prospective Population Study, the

- Atherosclerosis Risk in Communities Study, and the Women's Health Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2017; Aug. 3; 6(8): e006636. doi: 10.1161/JAHA.117.006636
7. Colantonio L.D., Gamboa C.M., Richman J.S., Levitan E.B., Soliman E.Z., Howard G. et al. Black-White Differences in Incident Fatal, Nonfatal, and Total Coronary Heart Disease. *Circulation.* 2017; Jul. 11; 136(2): 152-66. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025848
  8. Halcox J.P., Banegas J.R., Roy C., Dallongeville J., De Backer G., Guallar E. et al. Prevalence and treatment of atherogenic dyslipidemia in the primary prevention of cardiovascular disease in Europe: EURIKA, a cross-sectional observational study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2017; Jun. 17; 17(1): 160. doi: 10.1186/s12872-017-0591-5
  9. Kubota Y., Heiss G., MacLehose R.F., Roetker N.S., Folsom A.R. Association of Educational Attainment With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA Intern. Med.* 2017; Aug. 1; 177(8): 1165-72. doi: 10.1001/jamainternmed.2017.1877
  10. Kalbaugh C.A., Kucharska-Newton A., Wruck L., Lund J.L., Selvin E., Matsushita K. et al. Peripheral Artery Disease Prevalence and Incidence Estimated From Both Outpatient and Inpatient Settings Among Medicare Fee-for-Service Beneficiaries in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2017; May 3; 6(5):e003796. doi: 10.1161/JAHA.116.003796
  11. 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; 204(1):184-90. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001
  12. 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. 77th Congress of European Atherosclerosis Society, Istanbul, Turkey, April 26-29, 2008. *Atherosclerosis Suppl.* 2008; 9(1): 113.
  13. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Khasanova, Z.B., Postnov A.Yu., et al. Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017; 2017:6934394, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/6934394>
  14. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Galitsyna, E.V., Orekhova V.A., Melnichenko A.A., et al. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations. *Vessel Plus.* 2017; 2017 (1): 182-91. doi: 10.20517/2574-1209.2017.16
  15. Sazonova M.A., Postnov A.Iu., Orekhov A.N., Sobenin I.A. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2011; Oct.-Dec.; 4: 81-4. (in Russian). PMID: 22359940
  16. King M.P., Attardi G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 1996; 264: 304-13. doi:10.1016/S0076-6879(96)64029-4
  17. Sazonova M.A., Chicheva M.M., Zhelankin A.V., Sobenin I.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. Association of mutations in the mitochondrial genome with the subclinical carotid atherosclerosis in women. *Exp. Mol. Pathol.* 2015; Apr., 21; 99(1): 25-32. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.04.003
  18. Zhang Y., Wang C., Jin Y., Yang Q., Meng Q., Liu Q. et al. Activating the PGC-1 $\alpha$ /TERT Pathway by Catalpol Ameliorates Atherosclerosis via Modulating ROS Production, DNA Damage, and Telomere Function: Implications on Mitochondria and Telomere Link. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018; Jun. 25; 2018: 2876350. doi: 10.1155/2018/2876350
  19. Salazar G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; Apr. 29; 19(5):E1327. doi: 10.3390/ijms19051327. Review.
  20. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 2011; Oct. 1; 51(7): 1289-301. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033. Epub 2011 Jul 6. Review.
  21. McCully K.S. Communication: Melatonin, Hyperhomocysteinemia, Thioretinaco Ozonide, Adenosylmethionine and Mitochondrial Dysfunction in Aging and Dementia. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2018; Jan.; 48(1): 126-31. PMID: 29531009
  22. Docherty C.K., Carswell A., Friel E., Mercer J.R. Impaired mitochondrial respiration in human carotid plaque atherosclerosis: A potential role for Pink1 in vascular smooth muscle cell energetics. *Atherosclerosis.* 2018; Jan.; 268:1-11. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.11.009
  23. Yu E.P.K., Reinhold J., Yu H., Starks L., Uryga A.K., Foote K. et al. Mitochondrial Respiration Is Reduced in Atherosclerosis, Promoting Necrotic Core Formation and Reducing Relative Fibrous Cap Thickness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2017; Dec.; 37(12): 2322-32. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310042]
  24. Ryzhkova A.I., Sazonova M.A., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Chicheva M.M., Melnichenko A.A. et al. Mitochondrial diseases caused by mtDNA mutations: a mini-review. *Therapeutics and Clinical Risk Management.* 2018; Oct. 9; 14: 1933-42. doi: 10.2147/TCRM.S154863
  25. Sazonova M.A., Shkurat T.P., Demakova N.A., Zhelankin A.V., Barinova V.A., Sobenin I.A. et al. Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next? *Curr. Pharm. Des.* 2016; 22(3): 390-6. doi: 10.2174/1381612822666151112152335
  26. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Nikitina N.A., Shkurat T.P. et al. Mitochondrial mutations associated with cardiac angina. *Vessel Plus.* 2019; 3: 8. doi: 10.20517/2574-1209.2019.01
  27. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Galitsyna E.V., Melnichenko A.A., Demakova N.A. et al. Mitochondrial Genome Mutations Associated with Myocardial Infarction. *Dis. Markers.* 2018; Feb. 18; 2018: 9749457. doi: 10.1155/2018/9749457. eCollection 2018
  28. Zhelankin A.V., Sazonova M.A. Association of the mutations in the human mitochondrial genome with chronic non-inflammatory diseases: type 2 diabetes, hypertension and different types of cardiomyopathy. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2012; 3: 123-8. (in Russian). PMID: 23072124
  29. Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2012; 3: 115-22. (in Russian). PMID: 23072123.

**Сведения об авторах:**

**Сазонова Маргарита Александровна**, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; ст. науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, канд. биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Синёв Василий Владимирович**, мл. науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; ст. лаборант с в/о лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Рыжкова Анастасия Игоревна**, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Сазонова Марина Дмитриевна**, ст. лаборант с в/о лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Дорожук Наталья Александровна**, науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, канд. мед. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Кириченко Татьяна Валерьевна**, ст. науч. сотр. лаб. клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы сотр. ФГБНУ «НИИ морфологии человека», канд. биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Карагодин Василий Петрович**, вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», доктор биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Орехов Александр Николаевич**, зав. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП; вед. науч. сотр. лаб. клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ФГБНУ «НИИ морфологии человека», директор «НИИ атеросклероза» Инновационного центра Сколково, доктор биол. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com;

**Собенин Игорь Александрович**, зав. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России и вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, доктор мед. наук, e-mail: margaritaasazonova@gmail.com