

МЕТОДИКА

© Коллектив авторов, 2021

УДК 616-092.18, 616-092.4, 575.155.

Сазонова М.А.^{1,2}, Синёв В.В.^{1,2}, Рыжкова А.И.¹, Сазонова М.Д.¹, Дорошук Н.А.², Кириченко Т.В.⁴, Орехов А.Н.^{1,3,4}, Собенин И.А.^{1,2}

Создание цибридных культур, содержащих мутацию митохондриального генома m.1555A>G (ген *MT-RNR1*), имеющую протективный эффект при атеросклерозе

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, 121552, Москва, Россия, ул. 3-я Черепковская ул., д.15а;

³Научно-исследовательский институт атеросклероза, Инновационный центр Сколково, 121609, Московская обл., Сколково, Россия, ул. Новая, д.100;

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, Москва, Россия, ул. Цюрупы, д. 3

Введение. В настоящее время все больший интерес ученых мира вызывают цибридные клеточные модели, которые являются одним из лучших объектов для изучения патологических процессов в организме человека. Например, сотрудниками нашей лаборатории были впервые созданы подобные модели для изучения протективного эффекта некоторых мутаций митохондриального генома, защищающих организм человека от дисфункции митохондрий и атеросклеротических поражений. **Цель:** исследования – создание цибридных культур с высоким уровнем гетероплазии по мутации митохондриального генома m.1555A>G, локализованной в кодирующем регионе митохондриального генома человека в гене *MT-RNR1*. В наших предварительных исследованиях было установлено, что пороговый уровень гетероплазии мутации m.1555A>G имеет при атеросклерозе протективный эффект.

Методика. Цибридные культуры были созданы путем слияния rho0(безмитохондриальных)-клеток и митохондрий из тромбоцитов с высоким уровнем гетероплазии исследуемых мутаций. Для получения безмитохондриальных клеток была использована культура моноцитарного происхождения ТНР-1.

Результаты. Получены 4 цибридные клеточные линии, содержащие мутацию m.1555A>G с уровнем гетероплазии выше порогового значения.

Заключение. В данной работе были созданы 4 цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазии по мутации мтДНК m.1555A>G, имеющей при атеросклерозе протективный эффект. Полученные цибридные клеточные линии могут служить моделями для отработки методов генотерапии у пациентов с атеросклерозом. Кроме того, с помощью данных цибридных клеточных моделей можно будет изучать молекулярно-клеточные механизмы, защищающие клетки от митохондриальной дисфункции.

Ключевые слова: цитоплазматические гибриды; митохондриальный геном; цибриды; мутация; m.1555A>G; ген *MT-RNR1*; мтДНК; цибридная клеточная модель

Для цитирования: Сазонова М.А., Синёв В.В., Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорошук Н.А., Кириченко Т.В., Орехов А.Н., Собенин И.А. Создание цибридных культур, содержащих мутацию митохондриального генома m.1555A>G (ген *MT-RNR1*), имеющую протективный эффект при атеросклерозе. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2021; 65(4): 121-127. DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.121-127

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 – 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 08.04.2021

Принята к печати 02.11.2021

Опубликована 20.12.2021

Sazonova M.A.^{1,2}, Sinyov V.V.^{1,2}, Ryzhkova A.I.¹, Sazonova M.D.¹, Doroschuk N.A.², Kirichenko T.V.^{1,4}, Orekhov A.N.^{1,3,4}, Sobenin I.A.^{1,2}**Creation of cybrid cultures containing the mitochondrial genome mutation m.1555A>G (*MT-RNR1* gene), which has a protective effect in atherosclerosis**¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiyskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation²National Medical Research Center of Cardiology, 3rd Cherepkovskaya St. 15a, Moscow 121552, Russian Federation;³Research Institute for Atherosclerosis, Skolkovo Innovative Centre, Novaya St., Moscow Region, Moscow 121609, Russian Federation⁴Institute of Human Morphology, Tsurupa St. 3, Moscow 117418, Russian Federation

Introduction. Cybrid cell models are one of the best objects for studying pathological processes in the human body, and they are of increasing interest to scientists worldwide. Our laboratory was the first to create such models for studying the protective effect of mutations in the mitochondrial genome that protect the human body from mitochondrial dysfunction and atherosclerotic lesions. **Aim:** To create cybrid cultures with a high heteroplasmy level for the mitochondrial genome mutation m.1555A>G localized within the coding region of the human mitochondrial genome in the *MT-RNR1* gene. Preliminary studies showed that the threshold heteroplasmy level for the m.1555A>G mutation has a protective effect in atherosclerosis.

Methods. Cybrid cultures were created by fusion of rho0 (mtDNA-depleted) cells and mitochondria from platelets with a high heteroplasmy level for the studied mutations. To obtain mtDNA-free cells, a culture of monocytic origin, THP-1, was used.

Results. We obtained four cybrid cell lines containing the m.1555A>G mutation with a heteroplasmy level above the threshold value.

Conclusion. Four cybrid cultures with a high heteroplasmy level for the mtDNA mutation m.1555A>G were created. These cybrid cell lines can serve as models for developing methods of gene therapy for patients with atherosclerosis. In addition, using these cybrid cell models, it will be possible to study molecular and cellular mechanisms that protect cells from mitochondrial dysfunction.

Keywords: cytoplasmic hybrids; mitochondrial genome; cybrids; mutation; m.1555A>G; gene *MT-RNR1*; mtDNA; cybrid cell model

For citation: Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroschuk N.A., Kirichenko T.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of cybrid cultures containing the mitochondrial genome mutation m.1555A>G (*MT-RNR1* gene), which has a protective effect in atherosclerosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2021; 65(4): 121-127. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2021.04.121-127

For correspondence: Sazonova Margarita Alexandrovna, Ph.D., Lead Researcher, «Federal State Budgetary Scientific Institution «Institute of General Pathology and Pathophysiology»; e-mail: margaritaasazonova@gmail.com

Contribution: research concept and design — Sazonova M.A.; methodology — Sazonova M.A.; collection and processing of material — Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroshchuk N.A., Kirichenko T.V.; writing the text — Sazonova M.A.; editing — Orekhov A.N., Sobenin I.A.

Funding. This work 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 authors:Sazonova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8610-4593>Sinyov V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5105-5763>Ryzhkova A.I., <https://orcid.org/0000-0002-8838-7750>Doroschuk N.A., <https://orcid.org/0000-0003-2258-6463>Orekhov A.N., <https://orcid.org/0000-0002-6495-1628>Sobenin I.A., <https://orcid.org/0000-0003-0978-6444>

Received 08.04.2021

Accepted 02.11.2021

Published 20.12.2021

Список сокращений:

мтДНК — митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота

MT-RNR1 — митохондриальный ген рибосомальной рибонуклеиновой кислоты малой субъединицы рибосомы (12S)

ДМСО — диметилсульфоксид

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Введение

В настоящее время все больший интерес ученых мира вызывают цибридные клеточные модели, которые являются одним из лучших объектов для изучения патологических процессов в организме человека [1-5]. Однако особенно актуальным представляется создание цибридов с мутациями, имеющими протективный (защитный эффект), т.к. данные клеточные модели могут быть весьма перспективными для отработки методов генотерапии при различных заболеваниях человека.

Например, авторами данной статьи были впервые созданы цибридные клеточные модели для изучения протективного эффекта некоторых мутаций митохондриального генома, защищающих организм человека от дисфункции митохондрий и атеросклеротических поражений. Атеросклероз является тяжелым заболеванием 21 века [6-10]. По сравнению с другими заболеваниями человека для атеросклероза характерен один из самых высоких процентов смертельных исходов [11-15]. Митохондриальная дисфункция может быть одной из причин атеросклеротических поражений человека [16-20]. Она может быть причиной митофагии [21-23], укорочения теломер [13, 24-26], повреждения митохондриальной мембраны [27-29]. Эти процессы могут быть причиной дисфункции митохондрий, ведущей к окислительному стрессу, следствием которого может быть возникновение и развитие атеросклеротических поражений сосудов [30-34].

Цель работы — создание цибридных культур с высоким уровнем гетероплазмии по мутации митохондриального генома *m.1555A>G*, локализованной в кодирующем регионе митохондриального генома человека в гене *MT-RNR1*. Результатом данной мутации может быть дисфункция малой субъединицы рибосомы (12S). Это приводит к уменьшению нормально функционирующих рибосом в митохондриях и снижению уровня синтеза белков на митохондриальной рибосоме.

В наших предварительных исследованиях было установлено, что пороговый уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* имеет при атеросклерозе протективный эффект [35-39]. В результате проведенной работы авторами статьи были созданы четыре цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазмии по мутации митохондриального генома *m.1555A>G*.

Методика

Создание безмитохондриальных (rho0) культур

Для создания rho0-клеток была применена методика, разработанная авторами статьи на базе метода М. Кинга и Г. Аттарди в [40]. Алгоритм создания rho0-кле-

ток был следующим: Клетки нативной культуры ТНР-1 помещали в ростовую среду с добавлением уридина и этидиум бромид. При этом происходило блокирование ДНК клетки этидиум бромидом. В результате ДНК переставала нормально функционировать и возникла митохондриальная дисфункция. После этого данная клеточная линия помещалась в среду, содержащую только уридин (этидиум бромид в ней отсутствовал). В процессе культивирования на этой среде клетки при каждом пересевании постепенно теряли все функционирующие митохондрии. Они становились безмитохондриальными (rho0). После этого анализировалось количество копий митохондриального генома в rho0-культуре. Если количество копий мтДНК в rho0-культуре было значительно меньше, чем в нативной культуре ТНР-1, или они вообще отсутствовали, то устанавливалось, что rho0-культура создана.

В процессе создания безмитохондриальных клеток и цибридов использовались для приготовления ростовой среды такие реактивы: RPMI-1640; пируват натрия (110 мкг/л); эмбриональная бычья сыворотка (10% от общего объема); 100-кратный пенициллин-стрептомицин (пенициллин — 50 ед/мл, стрептомицин — 50 мкг/мл); бета-меркаптоэтанол (2×10^{-5} М); d-глюкоза (2500 мг/л); L-глутамин (300 мг/л). Для приготовления 10-кратного цитрата натрия были использованы: полиэтиленгликоль 1500 (42% от общего объема); ПЭГ раствор; физиологический раствор (0,15M NaCl); диметилсульфоксид (ДМСО) (2 мл); цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) тринатриевой соли, дигидрат); DMEM [-Ca²⁺] (9,5 мл). Кроме того, использовались готовые среды и растворы: фиколл-урографин (плотность 1,077); ДМСО, уридин (раствор 50 мг/мл); физиологический раствор DMEM [-Ca²⁺] (0,15M NaCl); бромистый этидий (1% раствор). Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I использовался для того, чтобы установить количество копий митохондриального генома в нативной, цибридной и rho0 культурах клеток.

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

С помощью слияния безмитохондриальных клеток с тромбоцитами, выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий, были получены цибридные клетки. Тромбоциты участников исследования были выделены из цельной крови. Для этого применялся метод центрифугирования в градиенте плотности фиколла-урографина.

Метод создания цибридных культур клеток. Основное условие проникновения митохондрий в $\rho\text{ho}0$ -клетки — образование пор в цитоплазматических мембранах. Поры могут возникнуть при воздействии на $\rho\text{ho}0$ -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 авторами статьи данные цибридные культуры были созданы впервые. Нами была использована методика «ПЭГ-слияния». Эта методика позволяет создавать цибриды с помощью слияния $\rho\text{ho}0$ -клеток с тромбоцитами, использующихся в качестве клеток-доноров митохондрий. 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.

Суспензию с тромбоцитами центрифугировали в течение 15 мин при 1500g при температуре 15 °С. Из пробирки был отобран супернатант.

Суспензию безмитохондриальных клеток центрифугировали в течение 5 мин при 180g при температуре 25 °С. Безмитохондриальные клетки ресуспендировали в среде ДМЕМ [-Ca²⁺] в концентрации 5x10⁵ клеток/мл.

Затем $\rho\text{ho}0$ -клетки добавляли к осадку тромбоцитов. Центрифугировали в течение 10 мин при 180 g при температуре 25 °С. Затем отбирали супернатант. После этого к осадку тромбоцитов с безмитохондриальными клетками было добавлено 100 мкл 42% ПЭГ. Было проведено ресуспендирование. По истечении 1 мин, было проведено повторное ресуспендирование в течение 30 с. После этого было проведено культивирование полученной суспензии клеток в ростовой среде в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С.

Количественный анализ копий митохондриального генома в $\rho\text{ho}0$ -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 митохондри-

альной ДНК в концентрациях 10³, 10⁴, 10⁵ и 10⁶. Была построена калибровочная кривая на основе данных Ст-величины 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 очень маленьким 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 этидиум бромид) митохондриями способности к делению. Поэтому полученная культура считалась безмитохондриальной ($\rho\text{ho}0$).

Уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* 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 10³ копии мтДНК. В то же время образец из нативной культуры ТНР-1 содержал более 10⁶ копий митохондриального генома. После получения цибридных культур, содержащих мутацию *m.1555A>G* уровень гетероплазмии этой однонуклеотидной замены в цибридных клетках оказался примерно таким же, как в тромбоцитах доноров-носителей исследуемой мутации.

Определение уровня гетероплазмии мутации митохондриального генома *m.1555A>G*. С помощью безмитохондриальных клеточных линий были созданы цибридные клеточные культуры, содержащие высокий уровень гетероплазмии мутации митохондриального генома. Уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* был определен с помощью оригинального метода количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома, разработанного авторами статьи на основе технологии пиросеквенирования [34-36, 41, 42].

Амплификаты ДНК доноров тромбоцитов, содержащие область исследованных мутаций, были пиросеквенированы. Затем в них был определен уровень гетероплазмии мутации *m.1555A>G* на основании формулы, разработанной авторами статьи [34-36, 41, 42].

Использовались следующие праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР) [34-36, 41, 42]:

R: bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTG
GG(1704-1684);

F: TAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGC
AA(1326-1355).

Для проведения ПЦР использовался стандартный буфер с сульфатом аммония. Концентрация хлорида маг-

ния в буфере была 2,5 мМ. Размер амплификата составлял 379 п.н. [34-36, 41, 42].

В качестве праймера для пиросеквенирования был использован [34-36, 41, 42]: ACGCATTTATATAGAGGA (1537-1554).

Результаты и обсуждение

Посредством ПЭГ-слияния безмитохондриальных клеток и митохондрий из тромбоцитов пациентов была получена цибридная клеточная культура, содержащая мутацию митохондриального генома *m.1555A>G*. Пороговый уровень гетероплазмы мутации мтДНК *m.1555A>G* использовался в качестве критерия для отбора доноров тромбоцитов [34]. Согласно результатам предварительных исследований авторов статьи, мутация митохондриального генома *m.1555A>G* имеет протективный эффект при атеросклерозе человека. [34-36, 41-45].

Было проведено сравнение количества копий митохондриального генома в полученных цибридных культурах и rho0-культуре ТНР-1. Количество копий мтДНК в цибридной культуре клеток оказалось значительно большим, чем в безмитохондриальной культуре (10^6 копий митохондриального генома, по сравнению с 10^3 копиями мтДНК, соответственно). На основе проведенного анализа был сделан вывод о том, что цибридные культуры, содержащие мутацию мтДНК *m.1555A>G*, созданы.

Таким образом, в настоящей работе были получены 4 цибридные клеточные культуры, в которых уровень гетероплазмы мутации митохондриального генома *m.1555A>G* превышал пороговое значение в атеросклеротических бляшках (17,5%) и утолщенном интимо-медиальном слое сонных артерий (19,5%) [34]. В первой цибридной линии уровень гетероплазмы мутации *m.1555A>G* составил 11%, во второй – 27%, в третьей – 14%, а в четвертой – 23%.

Следует отметить, что одна из цибридных клеточных линий, несущая мутацию митохондриального генома *m.1555A>G*, была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с атеросклеротической бляшкой в сонных артериях, а другая – от участника исследования, не имевшего атеросклеротических бляшек в сонных артериях. При этом, третья цибридная культура была создана с помощью тромбоцитов, полученных от пациента с утолщенным интимо-медиальным слоем сонных артерий, а четвертая – от участника исследования с нормальным интимо-медиальным слоем.

Мутация митохондриального генома *m.1555A>G* локализована в кодирующем регионе митохондриального генома человека в гене *MT-RNR1*. В наших пред-

варительных исследованиях было установлено, что пороговый уровень гетероплазмы мутации *m.1555A>G* имеет при атеросклерозе протективный эффект [35-39].

Полученные цибридные клеточные модели могут быть полезны для отработки методов генотерапии атеросклероза. Кроме того, при сравнении цибридных клеточных линий, имеющих высокий уровень гетероплазмы по одной и той же мутации, можно будет выявить молекулярно-клеточные механизмы митохондриальной дисфункции при атеросклеротических поражениях человека.

Заключение

Созданы четыре цибридные культуры с высоким уровнем гетероплазмы по мутации митохондриального генома *m.1555A>G*. Полученные цибридные клеточные модели могут быть полезны для отработки методов генотерапии атеросклероза. Кроме того, при сравнении цибридных клеточных линий, имеющих высокий уровень гетероплазмы по одной и той же мутации, можно будет выявить молекулярно-клеточные механизмы митохондриальной дисфункции при атеросклеротических поражениях человека.

Литература

(п.п. 1-22; 24-40; 43-45 см. References)

23. 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.
41. Сазонова М.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А. Новый метод количественной оценки мутантного аллеля митохондриального генома. *Пат. физиол. и Экспер. тер.* 2011; (4): 81-4.
42. Сазонова М.А. Ассоциация мутаций митохондриального генома с липофиброзными бляшками интимы аорты человека. *Пат. физиол. и Экспер. тер.* 2015; (1): 17-32.

References

1. Miranda S., Correia M., Dias A.G., Pestana A., Soares P., Nunes J., et al. Evaluation of the role of mitochondria in the non-targeted effects of ionizing radiation using cybrid cellular models. *Sci Rep*. 2020; Apr 9; 10(1): 6131. doi: 10.1038/s41598-020-63011-w
2. Hu S.Y., Zhuang Q.Q., Qiu Y., Zhu X.F., Yan Q.F. Cell models and drug discovery for mitochondrial diseases. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2019; May; 20(5): 449-56. doi: 10.1631/jzus.B1900196
3. Aryaman J., Johnston I.G., Jones N.S. Mitochondrial DNA density homeostasis accounts for a threshold effect in a cybrid model of a human mitochondrial disease. *Biochem J*. 2017; Nov 24; 474(23): 4019-34. doi: 10.1042/BCJ20170651
4. Dolinko A.H., Chwa M., Atilano S.R., Kenney M.C. African and Asian Mitochondrial DNA Haplogroups Confer Resistance Against Diabetic Stresses on Retinal Pigment Epithelial Cybrid Cells In Vitro. *Mol Neurobiol*. 2020; Mar; 57(3): 1636-55. doi: 10.1007/s12035-019-01834-z

5. Wilkins H.M., Carl S.M., Swerdlow R.H. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrialriopathies. *Redox Biol.* 2014; 2: 619-31. doi: 10.1016/j.redox.2014.03.006. Review
6. Zhu Y., Xian X., Wang Z., Bi Y., Chen Q., Han X., et al. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules.* 2018; Aug 23; 8(3): 80. doi: 10.3390/biom8030080
7. Poznyak A., Grechko A.V., Poggio P., Myasoedova V.A., Alfieri V., Orekhov A.N. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020; Mar 6; 21(5): 1835. doi: 10.3390/ijms21051835.
8. 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), pii: e006636. doi: 10.1161/JAHA.117.006636
9. Pedro-Botet J., Climent E., Benaiges D. Atherosclerosis and inflammation. New therapeutic approaches. *Med Clin (Barc).* 2020; Sep 25; 155(6): 256-62. doi: 10.1016/j.medcli.2020.04.024
10. 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), p.160. doi: 10.1186/s12872-017-0591-5
11. Sazonova M.A.; Sinyov V.V.; Ryzhkova A.I.; Sazonova, M.D.; Kirichenko T.V.; Khotina V.A.; et al. Some Molecular and Cellular Stress Mechanisms Associated with Neurodegenerative Diseases and Atherosclerosis. *Int J Mol Sci.* 2021; 22, 699. <https://doi.org/10.3390/ijms2202069>
12. 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
13. Natalya A. Doroschuk, Anton Yu Postnov, Alexander D. Doroschuk, Anastasia I. Ryzhkova, Vasily V. Sinyov, et al. An original biomarker for the risk of developing cardiovascular diseases and their complications: Telomere length. *Toxicology Reports* 8. 2021; 499–504.
14. 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), pii: e003796. doi: 10.1161/JAHA.116.003796
15. 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. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2017; 2017: 6934394, 7 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/6934394>
16. Sorrentino V., Menzies K.J., Auwerx J. Repairing Mitochondrial Dysfunction in Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018; Jan 6; 58: 353-89. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104908
17. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Khasanova Z.B., Sobenin I.A. MtDNA mutations linked with left ventricular hypertrophy. *Vessel Plus.* 2019; 3:5 doi: 10.20517/2574-1209.2018.56
18. West A.P. Mitochondrial dysfunction as a trigger of innate immune responses and inflammation. *Toxicology.* 2017; Nov 1; 391: 54-63. doi: 10.1016/j.tox.2017.07.016
19. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Nikitina N.A., Shkurat T.P., . Mitochondrial mutations associated with cardiac angina. *Vessel Plus.* 2019; 3: 8. doi: 10.20517/2574-1209.2019.01
20. Wang L., Wu Q., Fan Z., Xie R., Wang Z., Lu Y. Platelet mitochondrial dysfunction and the correlation with human diseases. *Biochem Soc Trans.* 2017; Dec 15; 45(6): 1213-23. doi: 10.1042/BST20170291
21. Malpartida A.B., Williamson M., Narendra D.P., Wade-Martins R., Ryan B.J. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. *Trends Biochem Sci.* 2021; Apr; 46(4): 329-43. doi: 10.1016/j.tibs.2020.11.007
22. Chistiakov D.A., Shkurat T.P., Melnichenko A.A., Grechko A.V., Orekhov A.N. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Ann Med.* 2018; Mar; 50(2): 121-7. doi: 10.1080/07853890.2017.1417631
23. Sazonova M.A., Sinev V.V., Karagodin V.P., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Barinova V.A., et al. Influence of autophagy on the genesis and development of atherosclerosis and its risk factors. *Angiol Sosud Khir.* 2017; 23(4): 20-8. English, Russian.
24. Wu N.N., Zhang Y., Ren J. Mitophagy, Mitochondrial Dynamics, and Homeostasis in Cardiovascular Aging. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; Nov 4;2019:9825061. doi: 10.1155/2019/9825061
25. Shin W.H., Chung K.C. Human telomerase reverse transcriptase positively regulates mitophagy by inhibiting the processing and cytoplasmic release of mitochondrial PINK1. *Cell Death Dis.* 2020; Jun 8; 11(6): 425. doi: 10.1038/s41419-020-2641-7
26. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Kirichenko T.V., Doroschuk N.A., et al . Mutations of mtDNA in some vascular and metabolic diseases. *Curr Pharm Des.* 2020; Aug 20. 26:1-10. doi: 10.2174/1381612826999200820162154
27. Tagaya M., Arasaki K. Regulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy by the Mitochondria-Associated Membrane. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 997: 33-47. doi: 10.1007/978-981-10-4567-7_3
28. Wei Y., Chiang W.C., Sumpter R. Jr., Mishra P., Levine B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell.* 2017; Jan 12; 168(1-2): 224-38.e10. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.042
29. Kirichenko T.V., Ryzhkova A.I., Sinyov V.V., Sazonova M.D., Orekhova V.A., Karagodin V.P., et al. Impact of mitochondrial DNA mutations of carotid intima-media thickness in the Novosibirsk region. *Life (Basel).* 2020; 10(9): 160. doi: 10.3390/life10090160
30. Peng W., Cai G., Xia Y., Chen J., Wu P., Wang Z., et al. Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *DNA Cell Biol.* 2019 Jul; 38(7): 597-606. doi: 10.1089/dna.2018.4552
31. McCully K.S. Environmental Pollution, Oxidative Stress and Thioretinaco Ozonide: Effects of Glyphosate, Fluoride and Electromagnetic Fields on Mitochondrial Dysfunction in Carcinogenesis, Atherogenesis and Aging. *Ann Clin Lab Sci.* 2020; May; 50(3): 408-11.
32. Dubois-Deruy E., Peugnet V., Turkieh A., Pinet F. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants (Basel).* 2020; Sep 14; 9(9): 864. doi: 10.3390/antiox9090864
33. Kirichenko T.V., Ragino Y.I., Voevoda M.I., Urazalina S.J., Khasanova Z.B., Orekhova V.A., Sinyov V.V., Sazonova M.A., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Data on association of mitochondrial heteroplasmy with carotid intima-media thickness in subjects from Russian and Kazakh populations. *Data Brief.* 2020; Jan 14; 29: 105136. doi: 10.1016/j.dib.2020.105136. eCollection 2020 Apr

34. 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; 1:182-91. doi: 10.20517/2574-1209.2017.16
35. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Barinova V.A., Ryzhkova A.I., Zhelankin A.V., Postnov A.Y., et al. Mosaicism of Mitochondrial Genetic Variation in Atherosclerotic Lesions of the Human Aorta. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:825468. doi:10.1155/2015/825468
36. 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
37. Sazonova M.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N., Budnikov Ye.Yu., Khasanova Z.B., Postnov A.Yu. Corrigendum to “studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome” [atherosclerosis 204 (2009) 184-190] (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.001) *Atherosclerosis*. 2010. 209(1):306.
38. Postnov A.Y., Sazonova M.A., Budnikov Y.Y., Khasanova Z.B., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Association of somatic mitochondrial mutations with atherosclerosis. *Atherosclerosis Suppl*. 2007; 8(1):46. doi: [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(07\)71126-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(07)71126-1).
39. Sazonova M., Andrianova I., Khasanova Z., Sobenin I., Postnov A. Quantitative mitochondrial genome mutation investigation and possible role of the somatic mutations in development of atherosclerotic lesion of human aorta. *Atherosclerosis Suppl*. 2008; 9(1): 113. doi: [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(08\)70454-9](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(08)70454-9)
40. 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
41. Sazonova M.A., Postnov A.Iu., Orekhov A.N., Sobenin I.A. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2011; (4): 81-4. (in Russian). PMID: 22359940
42. Sazonova M.A. Association of mitochondrial genome mutations with lipofibrous plaques in human aortic intima. *Patol Fiziol Eksp Ter*. 2015; 59(1): 17-28. PMID: 26226685
43. Sazonova M.A., Sinyov V.V., Ryzhkova A.I.; Sazonova M.D., Kirichenko T.V., Khotina V.A., et al. Some Molecular and Cellular Stress Mechanisms Associated with Neurodegenerative Diseases and Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22, 699. <https://doi.org/10.3390/ijms22020699>
44. Poznyak A.V., Bharadwaj D., Prasad G., Grechko A.V., Sazonova M.A., Orekhov A.N. Anti-Inflammatory Therapy for Atherosclerosis: Focusing on Cytokines. *Int J Mol Sci*. 2021; Jun 30; 22(13): 7061. doi: 10.3390/ijms22137061
45. Poznyak A.V., Bharadwaj D., Prasad G., Grechko A.V., Sazonova M.A., Orekhov A.N. Renin-Angiotensin System in Pathogenesis of Atherosclerosis and Treatment of CVD. *Int J Mol Sci*. 2021; Jun 22; 22(13): 6702. doi: 10.3390/ijms22136702

Сведения об авторах:

Сазонова Маргарита Александровна, канд. биол. наук вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, ст. науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, 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;

Рыжкова Анастасия Игоревна, мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Сазонова Марина Дмитриевна, ст. лаборант с в/о лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП;

Дорожук Наталья Александровна, науч. сотр. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России; мл. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП, канд. мед. наук;

Кириченко Татьяна Валерьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы сотр. ФГБНУ «НИИ морфологии человека»;

Орехов Александр Николаевич, доктор биол. наук, 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;

Собенин Игорь Александрович, доктор мед. наук, зав. лаб. медицинской генетики ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России и вед. науч. сотр. лаб. ангиопатологии ФГБНУ НИИОПП.