

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии  
имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
«Научно-исследовательский институт морфологии человека имени  
академика А.П. Авцына» Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения "Российский научный центр  
хирургии имени академика Б.В. Петровского"

*На правах рукописи*

**СИНЁВ  
ВАСИЛИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ**

**КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ  
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

1.5.22. – Клеточная биология

1.5.7. – Генетика

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители  
доктор медицинских наук  
А.Ю. Постнов  
кандидат биологических наук  
М.А. Сазонова

Москва – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>11</b>
1.1 ЦИБРИДЫ КАК КЛЕТОЧНЫЕ МОДЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	12
1.2 СОЗДАНИЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ (ЦИБРИДОВ) .....	13
1.3 МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА.....	14
1.4 АССОЦИАЦИЯ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЧЕЛОВЕКА.....	16
1.4.1 Классификация патогенных мутаций в митохондриальном геноме ...	17
1.4.2 Ассоциация мутаций митохондриального генома с атеросклерозом .	18
1.5 ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МУТАЦИЙ МТДНК В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ТКАНЕЙ.....	20
1.6 ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ МУТАЦИЙ МТДНК В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ТКАНЕЙ ОТ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ .....	24
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>30</b>
2.1 ХАРАКТЕРИСТИКА МАТЕРИАЛА.....	30
2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	33
2.2.1 Создание цитоплазматических гибридов (цибридов).....	33
2.2.1.1 Создание безмитохондриальных ( <i>rho0</i> ) клеток .....	34
2.2.1.2 Выделение тромбоцитов из крови.....	35
2.2.1.3 Получение гибридных культур .....	35
2.2.1.4 Проверка безмитохондриальных ( <i>rho0</i> ) клеток и гибридных культур .....	37
2.2.2 Измерение мембранного потенциала и совокупной массы митохондрий с помощью конфокальной микроскопии .....	38
2.2.2.1 Прикрепление клеток к покровным стеклам для микроскопии .....	38
2.2.2.2 Проведение измерения на конфокальном микроскопе .....	38
2.2.3 Измерение клеточного дыхания.....	39

2.2.4 Выделения различных фракций клеток крови на двойном градиенте плотности фиколла-урографина .....	43
2.2.5 Разделение фракции моноцитов/лимфоцитов с использованием магнитных наночастиц высокой аффинности .....	45
2.2.6 Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции.....	45
2.2.6.1 Метод выделения ДНК.....	45
2.2.6.2 Методика измерения концентрации ДНК на наноспектрофотометре .....	47
2.2.7 Метод полимеразной цепной реакции .....	47
2.2.7.1 Использование полимеразной цепной реакции как промежуточного этапа подготовки к пиросеквенированию .....	47
2.2.7.2 Метод лонг-полимеразной цепной реакции.....	49
2.2.8 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле .....	50
2.2.9 Пиросеквенирование .....	51
2.2.9.1 Проведение реакции пиросеквенирования .....	51
2.2.9.2 Количественное определение уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома .....	55
2.2.10 Методы статистического анализа данных.....	59
3.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА НА МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ДИСФУНКЦИЮ В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ.....	60
3.1.1 Создание безмитохондриальной клеточной линии на основе культуры ТНР-1 .....	60
3.1.2 Создание цитоплазматических гибридов на основе безмитохондриальной клеточной линии .....	62
3.1.3 Уровень мембранного потенциала.....	65
3.1.4 Оценка митохондриальной дисфункции.....	72

3.2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ПО МУТАЦИЯМ м.12315G>А, м.13513G>А, м.1555А>G, м.3256С>Т И м.3336Т>С В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА .....	74
3.2.1 <i>Определение уровня гетероплазмии по мутациям т.12315G&gt;А, т.13513G&gt;А, т.1555А&gt;G, т.3256С&gt;Т и т.3336Т&gt;С в лейкоцитах крови человека (нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах) .....</i>	75
3.2.2 <i>Определение уровня гетероплазмии митохондриального генома по мутациям т.12315G&gt;А, т.13513G&gt;А, т.1555А&gt;G, т.3256С&gt;Т и т.3336Т&gt;С в цельной крови и буккальном эпителии .....</i>	77
3.2.3 <i>Определение уровня гетероплазмии по мутациям т.12315G&gt;А, т.13513G&gt;А, т.1555А&gt;G, т.3256С&gt;Т и т.3336Т&gt;С в интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре .....</i>	79
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>84</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>92</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>93</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>94</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>96</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

Атеросклероз и связанные с ним поражения внутренних органов (ИБС, инфаркт миокарда, нарушения кровообращения мозга, нижних конечностей, органов брюшной полости и т.п.) занимают первое место как причина заболеваемости, потери трудоспособности, инвалидности и смертности населения большинства экономически развитых стран мира, в том числе и России [1–5].

Различные заболевания человека, в том числе и атеросклероз, ассоциированы с некоторыми мутациями митохондриального генома [16]. Мутации митохондриальной ДНК, чаще всего однонуклеотидные полиморфизмы, могут быть как гомо- так и гетероплазмичными, поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями важна не только качественная (наличие/отсутствие мутации), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома [1–3].

Митохондриальные дисфункции, предикторами которых могут являться митохондриальные мутации, приводят к развитию различных заболеваний у человека. Однонуклеотидные полиморфизмы митохондриального генома могут быть распределены в тканях и органах неравномерно [6–8].

Для изучения функционирования митохондрий могут быть использованы цитоплазматические гибриды в качестве клеточной модели [9–15]. Основой для изучения атеросклероза на клеточной модели может быть моноцитоподобная клеточная линия, так как моноциты являются одним из ключевых участников процесса атерогенеза [1-3, 47]. Использование митохондрий с различным уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом, для создания цитоплазматических гибридов может явиться наглядной клеточной моделью изучения связи мутаций митохондриального генома и процессов атерогенеза.

## **Степень разработанности темы исследования**

Мутации митохондриального генома, как врождённые, так и накопленные в течение онтогенеза, ассоциированы с рядом заболеваний и могут являться их предикторами [1,2,7,16,21,22].

В различных органах и тканях одного и того же человека уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома может существенно различаться. Для определения уровня гетероплазмии применяются различные молекулярно-генетические методы, такие как ПЦР-РВ, пиросеквенирование и «секвенирование нового поколения». Согласно литературным данным, в клетках крови человека уровень гетероплазмии митохондриальных мутаций значительно ниже, по сравнению с другими типами клеток и, в частности, с буккальным эпителием [23,24]. Ряд исследователей отмечают наибольший уровень гетероплазмии мутаций мтДНК в мышцах, несколько меньший, но также достаточно высокий - в печени и клетках буккального эпителия, значительно ниже - в сердце и крови человека [23–28].

Митохондриальные дисфункции и их ассоциации с различными заболеваниями человека, такими как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, ВИЧ, вирус герпеса человека 8 типа, синдром MELAS, атрофия зрительных нервов Лебера, синдром Ли, могут изучаться на цитоплазматических гибридах (цибридах) [9–15]. Значительную часть публикаций по изучению цибридов составляют работы, в которых на данных клеточных моделях изучается связь точечных мутаций митохондриального генома с развитием патологий и их клинических проявлений. Результаты данных исследований указывают на снижение деятельности комплексов дыхательной цепи и потребления кислорода, а также уменьшение синтеза АТФ [10,11,17–20].

## **Цель исследования**

Создать клеточную модель митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и изучить особенности распределения и variability мутантных аллелей митохондриального генома в различных тканях и клетках человека.

## **Задачи исследования**

1. Создать цибридную клеточную модель с высоким и низким уровнем гетероплазмии по двум мутациям, ассоциированным с атеросклерозом.
2. Оценить функциональное состояние митохондрий в полученных клеточных моделях с высоким и низким уровнем гетероплазмии.
3. Определить степень гетероплазмии митохондриального генома по пяти мутациям, ассоциированным с атеросклерозом и провести сравнительную оценку variability митохондриального генома в клетках крови и тканях человека (интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки, скелетной мускулатуре).

## **Научная новизна**

1. Созданы две цибридные линии с высоким и низким уровнем гетероплазмии.
2. Определено функциональное состояние митохондрий на цибридной клеточной модели.
3. Впервые определена степень гетероплазмии мутаций митохондриального генома m.13513G>A, m.3256C>T, m.3336T>C, m.12315G>A и m.1555A>G в различных клетках и тканях человека.
4. Впервые определен уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома m.13513G>A, m.3256C>T, m.3336T>C, m.12315G>A и m.1555A>G в различных типах клеток крови человека.

5. Полученные данные о вариабельности мутаций митохондриального генома в различных клетках и тканях человека позволят судить о распределении нормального и мутантного аллеля митохондриального генома в онтогенезе.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Создана клеточная модель для изучения функционирования митохондрий. Создана модель изучения генетических aberrаций в митохондриальном геноме на клеточных линиях. По результатам исследования получены новые знания о гетероплазии митохондриального генома, а именно её вариабельности по различным типам клеток и тканей человека.

### **Методология и методы исследования**

В данной работе использовались культуральные методы, которые позволили создать цитоплазматические гибриды: ПЭГ-слияние, выделение тромбоцитов, культивирование клеток в контролируемых условиях среды; цитологические методы, использованные для изучения клеточной модели: измерение мембранного потенциала и совокупной массы митохондрий с помощью конфокальной микроскопии; и биохимические методы, позволившие провести сравнительный анализ клеточного дыхания.

Также использовались генетические методы, которые позволили определить уровень мутационной нагрузки митохондриального генома в различных типах клеток и тканей человека: выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции, метод полимеразной цепной реакции, количественное определение уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома с помощью пиросеквенирования.

Объективность полученных данных была подтверждена статистическим анализом результатов данных.



### **Положения, выносимые на защиту**

- 1) Обнаружены отличия в уровнях клеточного дыхания и мембранного потенциала и митохондриальной массы в цитоплазматических гибридах (цибридах) с разным уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома.
- 2) Клетки могут адаптировать процессы дыхания для поддержания общей митохондриальной эффективности.
- 3) Уровень мутаций митохондриального генома в целом сопоставим в клетках и тканях человека.
- 4) Обнаружены отличия в уровне гетероплазмии мутации m.13513G>A между паренхимой селезенки, скелетной мускулатурой и сосочковыми мышцами миокарда.
- 5) Обнаружены отличия в уровне гетероплазмии между буккальным эпителием и цельной крови по мутациям m.12315G>A, m.3256C>T и m.3336T>C.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством исследованных образцов ткани; воспроизводимостью результатов; использованием современных, адекватных поставленным задачам, методов; применением статистических методов анализа полученных данных; критическим анализом собственных результатов и сопоставлением их с данными других исследователей.

**Материалы диссертации представлены** на научных конференциях «Вопросы неотложной кардиологии 2014: от науки к практике» (Москва, 2014 г), «Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 2017 г), научной конференции с международным участием «Конгресс Европейского общества атеросклероза» (2014, 2015, 2017, 2018, 2019, 2020гг.).

### **Личный вклад автора**

Автором был проведён анализ литературы, написан обзор, осуществлено планирование и проведение экспериментов, проведены цитологические, биохимические и генетические исследования, систематизация и статистический анализ полученных результатов, написание статей.

**Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. – Клеточная биология и 1.5.7 – Генетика.**

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе в лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына».

### **Публикации результатов работы**

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 научных работ, в том числе 5 оригинальные и 3 обзорные статьи в журналах, входящих в «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук».

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, включающий 92 источника, из них 17 российских и 75 зарубежных. Работа иллюстрирована 22 рисунками, данные представлены в 17 таблицах.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Нарушения в функционировании митохондрии, в том числе в работе дыхательной цепи, может приводить к развитию различных заболеваний человека [78-81]. Для оценки клеточного дыхания могут применяться методы по определению биоэнергетического профиля клеток [76-77]. Причиной дисфункции митохондрий могут являться митохондриальные мутации [1,3,4]. Митохондриальные болезни (цитопатии) - гетерогенная группа системных расстройств, которые поражают преимущественно мышечную и нервную системы [57]. Помимо специфических митохондриальных заболеваний, мутации митохондриального генома также могут являться предикторами и других заболеваний человека, например, атеросклероза и связанных с ним поражений внутренних органов (ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, нарушений кровообращения мозга, нижних конечностей, органов брюшной полости и т. п.) [16,21,57].

Мутации митохондриальной ДНК, чаще всего однонуклеотидные полиморфизмы, могут быть как гомо-, так и гетероплазмичными, поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями важна не только качественная (наличие/отсутствие мутации), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома [1-3].

Для изучения функционирования митохондрий могут быть использованы цитоплазматические гибриды в качестве клеточной модели [9-15].

Однонуклеотидные полиморфизмы митохондриального генома могут быть распределены в тканях и органах неравномерно [6-8]. Поэтому для понимания возможной вариабельности гетероплазмии мутаций митохондриального генома может быть проведена оценка уровня гетероплазмии в различных типах клеток и тканей человека.

## 1.1 Цибриды как клеточные модели исследований

Цибридная клетка – это экспериментально созданная клетка, которая содержит цитоплазму с митохондриями от двух клеток, а ядро - от одной.

Цибриды используются как клеточные модели для изучения митохондриальной дисфункции и их ассоциации с различными заболеваниями человека, такими как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, ВИЧ, вирус герпеса человека 8 типа, синдром MELAS, атрофия зрительных нервов Лебера, синдром Ли [9–15]. Значительную часть публикаций составляют работы, в которых изучается связь точечных мутаций митохондриального генома с развитием патологий и их клинических проявлений.

Были проведены исследования по оценке влияния точечных мутаций митохондриального генома на функционирование митохондрий в цибридных клетках. Результаты данных исследований указывают на снижение деятельности комплексов дыхательной цепи и потребления кислорода, а также уменьшение синтеза АТФ [10,11,17–20].

Так, например, была показана связь между мутацией мтДНК m.8993T>G и дисфункцией митохондрий, выделенных из лимфобластов пациентов с синдромом Ли. Данная связь характеризуется снижением процессов окислительного фосфорилирования в изучаемых клетках. Было показано снижение на 26-50% работы комплекса 3 дыхательной цепи, а также снижение соотношения АДФ/кислород на 30% [15]. В другой работе аналогичное исследование было проведено на цибридах, содержащих митохондрии с мутацией m.14459G>A. Данная мутация митохондриального генома приводит к замене аминокислотной последовательности в 72 белке ND6 (аланин на валин). Было показано уменьшение на 60% активности комплекса 1 [14]. В одном из исследований было проанализировано влияние крупной делеции митохондриального генома в цибридной культуре HeLa. Установлено, что наличие делеции в более чем 60% мтДНК приводит к ингибированию цитохром-С-оксидазы [20]. Интересна работа по созданию безмитохондриальных

клеточных линий из клеток пациентов с митохондриальной энцефалопатией и синдромом MERRF, обладающих сниженной активностью цитохром-С-оксидазы. Полученные rho0-клетки были слиты с безъядерными клетками HeLaCOT и в результате получены цибриды с восстановленной оксидазной деятельностью цитохрома С [29]. Также в ряде работ была установлена связь между мутациями митохондриального генома и дисфункцией клеток. Так, в одной из них оценивали коэффициент выживаемости клеточной линии HEK 293. Из данной культуры клеток получали цибриды, несущие в одном случае гаплогруппу Т, а в другом – гаплогруппу Н. При обработке перекисью водорода цибриды с гаплогруппой Т имели более высокий коэффициент выживаемости, по сравнению с другой клеточной линией [30]. Еще в одной работе исследовали эффективность воздействия транс-ретиноевой кислоты и триозида мышьяка на дифференцировку и выживаемость клеток в человеческих лейкозных клеточных линиях HL60 и безмитохондриальных HL60rho0. В результате клетки HL60rho0 обладали меньшей способностью к дифференцировке, но большей дыхательной активностью, чем родительские HL60 клетки. HL60rho0 клетки были также значительно более устойчивы к апоптозу [31]. Что касается возможностей терапии клеток с дисфункцией митохондриального генома, то интересной является работа, в которой создавали цибридные нейробластомы SH-SY5Y и NT2 с митохондриями от лиц с болезнью Паркинсона. Исследование данных цибридных клеток показало увеличение окислительного стресса и частоты апоптоза, по сравнению с нормальными клетками. При применении световой терапии, характерной для лечения неврологических заболеваний, наблюдалась нормализация дыхательной деятельности митохондрий в цибридных клетках SH-SY5Y и NT2 [12].

## **1.2 Создание цитоплазматических гибридов (цибридов)**

Существует две принципиально разные методики слияния безмитохондриальных линий с клетками-донорами митохондрий. Проникновение митохондрий в rho0-клетки может произойти только при

образовании пор в цитоплазматических мембранах клеток в результате воздействия на них некоторых химических или физических факторов.

Одна из методик предполагает культивирование  $\rho$ 0-клеток с энуклеированными цитопластами под воздействием постоянного электрического тока (электрослияние) [14]. Авторы отмечают быстрый рост гибридных культур, наблюдаемый от 20 до 28 дней после слияния. Данная методика использовалась в работах по слиянию клеточной линии мышечных фибробластов LMEB3p0 с линиями BALB/cJ и C57BL/6J [32]; создание гибридов из лимфоцитов WAL2A- $\rho$ 0 и лейкоцитарной фракции крови человека [14]; в работах с культурами клеток остеосаркомы (143В.ТК-) [33] и фибробластами LM(ТК-) [34].

Второй метод позволяет создавать цитоплазматические гибриды путем слияния  $\rho$ 0-клеток с тромбоцитами, выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий [35,36]. Использование тромбоцитов значительно упрощает протокол получения гибридных линий, так как тромбоциты не содержат ядерного генома. Они имеют исключительно митохондриальный геном. В качестве фактора, воздействующего на цитоплазматические мембраны клеток, выступает полиэтиленгликоль 1500 (ПЭГ 1500). Подобная методика применялась в исследованиях по созданию цитоплазматических гибридов на основе тератокарциномы NT2 [37]; клеточной линии 143В ТК- остеосаркомы человека [38–40]; клеток нейробластомы SH-SY5Y [41].

### **1.3 Митохондриальный геном человека**

Митохондриальная ДНК была открыта Маргит Насс и Сильвен Насс в 1963 году в Стокгольмском университете при помощи электронной микроскопии и, независимо от них, учеными Эллен Харлсбруннер, Хансом Туппи и Готтфридом Шацем при биохимическом анализе фракций митохондрий дрожжей в Венском университете в 1964 году [42].

**Митохондриальная ДНК** человека (мтДНК) представляет собой двуцепочечную кольцевую молекулу размером 16568 п.н., в которой

расположены 37 генов, участвующих в процессе выработки энергии в дыхательной цепи митохондрий (рисунок 1). В их число входят 13 структурных генов, кодирующих субъединицы комплексов окислительного фосфорилирования, а также гены 22 тРНК и двух рРНК, принимающих участие в синтезе белка непосредственно в митохондриях. Большинство регуляторных участков находятся в некодирующем, так называемом контрольном, районе протяженностью 1122 п.н. Около 60% генов мтДНК, кодирующих белки, приходится на семь субъединиц ферментативного комплекса НАДН-дегидрогеназы, остальные гены кодируют две субъединицы АТФ-синтетазы, три субъединицы цитохромоксидазы, одну субъединицу убихинол-цитохром-с-редуктазы (цитохрома b) [4,21,43].

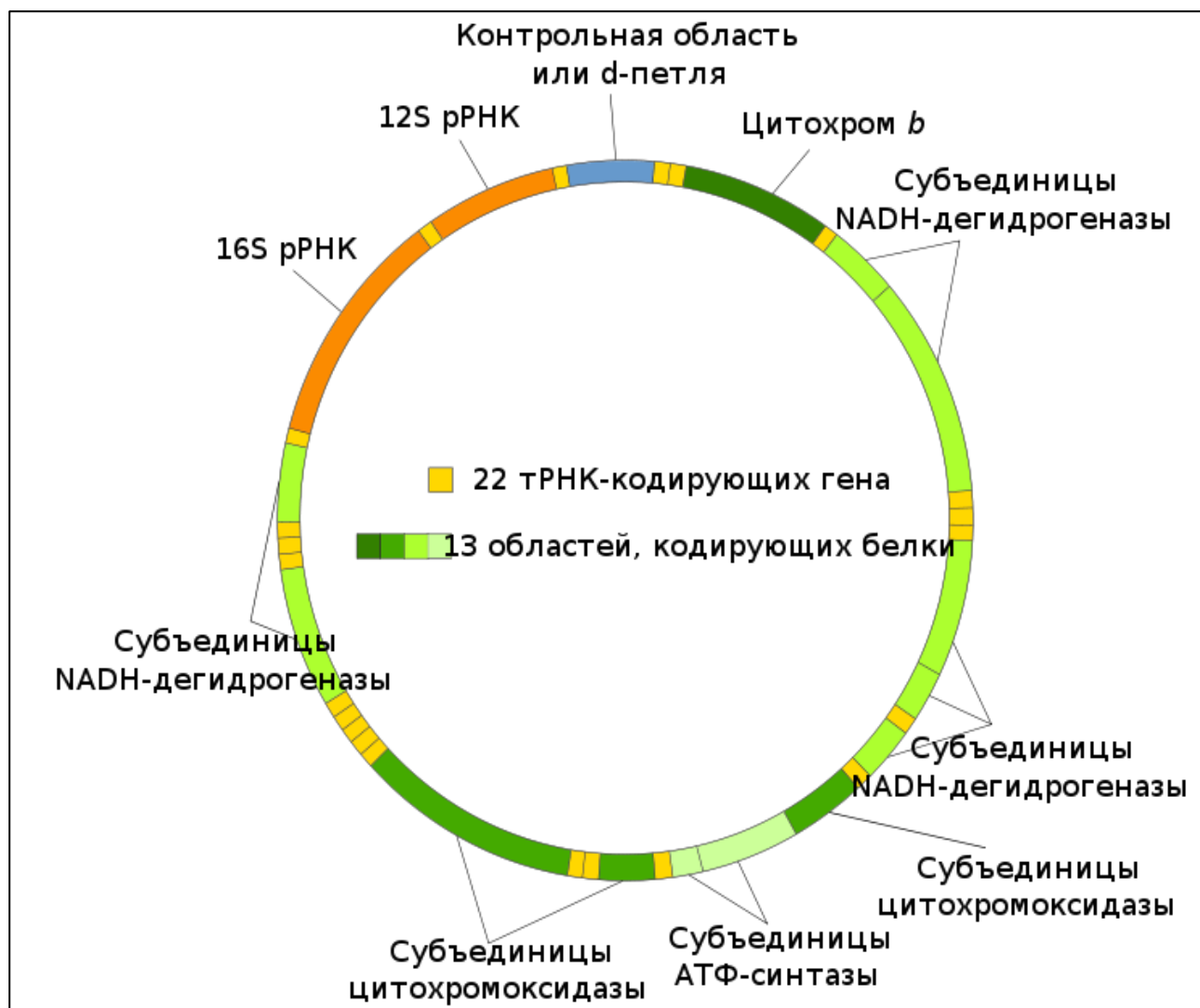


Рис. 1. Схема митохондриальной ДНК человека [44].

Митохондриальный геном, в отличие от ядерного, не имеет интронов. Смещенная петля (Д-петля) – единственная некодирующая область мтДНК человека, приблизительно 1100 пар оснований. Эта область содержит иницирующий участок (O<sub>n</sub>) для репликации мтДНК и промоторы транскрипции тяжелой (H) и легкой (L) нитей мтДНК. Все гены, закодированные в мтДНК, важны для митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, и любая мутация в мтДНК, которая ведет к нарушению экспрессии этих генов, в будущем может вызвать недостаточность энергетического метаболизма [16].

### **Гетероплазмия**

Если все копии мтДНК идентичны друг другу, то такое состояние называют гомоплазмией. Однако, очень часто в мтДНК возникают мутации вследствие не очень совершенной работы митохондриальной ДНК-полимеразы и репаративных систем. Мутации в митохондриальной ДНК возникают более, чем в 10 раз чаще, чем в ядерной. Появление мутации в одной из молекул мтДНК может привести к возникновению двух популяций мтДНК в клетке, что называют гетероплазмией. В ходе деления клеток мутантная мтДНК попадает в другие клетки, где она продолжает размножаться. Этот процесс распространения мутантной, как, впрочем, и нормальной мтДНК, называют репликативной сегрегацией. Доля мутантной мтДНК во время этого процесса может существенно меняться [45]. Таким образом, митохондриальная гетероплазмия – это сосуществование в ткани или клетке альтернативных вариантов последовательности митохондриальной ДНК, т.е. одновременное присутствие в митохондриях нормальных и мутантных молекул ДНК [46].

### **1.4 Ассоциация мутаций митохондриального генома с заболеваниями человека**

Скорость мутирования у мтДНК примерно в 17 раз выше, чем у ядерной ДНК. Это определяется совокупностью таких факторов, как особенности структурной организации митохондриального генома, функциональное



состояние рибонуклеотидредуктазы, ошибки репликации, мутации ядерных генов, кодирующих белки, действующие в митохондриях [47].

В патологии человека некоторые мутации митохондриального генома, как врождённые, так и накопленные в течение онтогенеза, ассоциированы с рядом заболеваний [1,2,7,16,21,22]. Связано это с тем, что в клетках определенных тканей или органов процент гетероплазмии достигает некоторого порогового уровня, при котором нормальное функционирование клетки больше невозможно. Как правило, происходит нарушение в процессах окислительного фосфорилирования в митохондриях за счет одного или нескольких белковых комплексов, приводящее к дисфункции митохондрий. Количество дефектных митохондрий может достигнуть уровня, при котором продукция энергии падает ниже порогового значения. Это зачастую вызывает компенсаторную пролиферацию митохондрий, в том числе и дефектных, что только усугубляет ситуацию [48,49].

Хотя наибольшей потребностью в митохондриальной энергии обладают нервная ткань, скелетная мускулатура, сердечная мышца и эндокринные железы, ее хроническая нехватка может привести к патологическим изменениям практически в любом органе [50].

#### **1.4.1 Классификация патогенных мутаций в митохондриальном геноме**

Особенностью митохондриальных заболеваний является уровень мутантной митохондриальной ДНК (гетероплазмия), необходимый для фенотипического проявления патологии.

Митохондриальные мутации можно условно разделить на 2 типа:

1) Крупные структурные перестройки - дупликации и делеции. Наиболее изученными являются обширные делеции.

2) Мутации в генах, кодирующих белки, тРНК, рРНК, затрагивающие один или несколько нуклеотидов. Подразделяются на микроделеции/инсерции и однонуклеотидные замены.

Второй тип мутаций находит своё фенотипическое проявление только в том случае, если затронутые ими нуклеотиды находятся в кодирующем регионе или в участке регуляции транскрипции (промоторе или операторе) митохондриального гена [51].

#### **1.4.2 Ассоциация мутаций митохондриального генома с атеросклерозом**

Мутации митохондриального генома m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T, m.3336T>C ранее показали свою ассоциацию с толщиной интимо-медиального слоя сонных артерий и наличия в них атеросклеротических бляшек [1,2]. Так, например, уровень гетероплазмии по мутации m.12315G>A в общих гомогенатах нормальной интимы аорты человека ниже, чем в гомогенатах пораженной атеросклерозом интимы [4]. Мутации m.1555A>G, m.3256C>T, m.12315G>A и m.13513G>A могут способствовать развитию ишемической болезни сердца. Была показана ассоциация между степенью гетероплазмии по полиморфизмам m.3256C>T и m.3336T>C в лейкоцитах крови и атеросклеротическим поражением сонных артерий [47]. Для клинического проявления различных патологий, в том числе и атеросклероза, отмечается важность порогового уровня гетероплазмии мутаций митохондриального генома. Пороговый уровень гетероплазмии – это значение уровня гетероплазмии, выше которого у человека начинается возникновение и развитие патологий или начинает проявлять защитный эффект, вызванный мутациями [1].

В таблице 1 представлена характеристика 5 мутаций митохондриального генома, выбранных для настоящего исследования.

Характеристика мутаций митохондриального генома *m.12315G>A*,  
*m.13513G>A*, *m.1555A>G*, *m.3256C>T*, *m.3336T>C*

Мутация	Локус	Ассоциированные заболевания
<i>m.1555A&gt;G</i>	MT-RNR1	DEAF (аминогликозидиндуцированная глухота)
<i>m.3256C&gt;T</i>	MT-TL1	MELAS (митохондриальная энцефалопатия с инсультоподобными эпизодами и лактатацидозом)
<i>m.3336T&gt;C</i>	MT-ND1	Риск атеросклероза сонной артерии
<i>m.12315G&gt;A</i>	MT-TL2	СРЕО (хроническая прогрессирующая наружная офтальмоплегия / KSS (синдром Кернса– Сейра)
<i>m.13513G&gt;A</i>	MT-ND5	Болезнь Ли/MELAS /Синдром перекрытия LHON (наследственная оптическая нейропатия (атрофия) Лебера)-MELAS

Материалы таблицы 1 взяты из специализированной базы данных для работы с митохондриальным геномом человека [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)

*m.3336T>C*, ген MT-ND1, кодирует субъединицу ND1 комплекса I (NADH-дегидрогеназы). Не изменяет аминокислоту Ile10.

*m.1555A>G*, ген MT-RNR1, кодирует 12S рибосомальной РНК.

*m.3256C>T*, ген MT-TL1, кодирует тРНК-LeuUUR, терминатор транскрипции.

*m.12315G>A*, ген MT-TL2, кодирует тРНК-LeuCUN. Мутация изменяет G:C пару оснований на A:C.

*m.13513G>A*, ген MT-ND5, кодирует субъединицу ND5 комплекса I (NADH-дегидрогеназы). Мутация, которая соответствует аминокислотному изменению Asp393Asn.

## 1.5 Вариабельность мутаций мтДНК в различных типах тканей

Выявление молекулярно-генетических механизмов возникновения и развития различных патологий является приоритетной задачей медико-биологического направления фундаментальной медицины [5,52,53]. Основные механизмы патогенеза заболеваний до настоящего времени изучены недостаточно. Однако именно они, как полагают, зачастую приводят к необратимым изменениям тканей и органов [54–61].

Мутации митохондриального генома ассоциированы с рядом заболеваний, в том числе, сердечно-сосудистых [3,21,22,43,51,62]. В основе их развития лежит атеросклероз, поэтому большое значение приобретает ранняя диагностика и семейный анализ атеросклероза, в том числе, с помощью методов молекулярной генетики [29,30]. Полагают, что возможной причиной атеросклероза могут быть соматические мутации митохондриального генома человека [52,54,55,62,63].

Jana Naue с сотрудниками, проанализировав несколько точечных мутаций мтДНК, обнаружили, что уровень гетероплазмы данных мутаций наиболее высок в мышцах и печени (79% и 69%, соответственно), немного меньше - в мозге, волосах и сердце (от 36,7% до 30,2%). Более низкий уровень гетероплазмы наблюдался в костной ткани, крови, легких и буккальном эпителии (19,8% -16,2%). Накопление мутантных копий митохондриального генома было найдено в мышцах (в позициях 64, 72, 73, 189 и 408), печени (в позиции 72) и мозге (делеция в позиции 71) [6].

Аналогично с предыдущими авторами, Chinnery P.F с коллегами было показано, что самый высокий уровень гетероплазмы мутантной мтДНК наблюдался в скелетных мышцах, был немного ниже в волосяных фолликулах, еще ниже - в буккальном эпителии, и самым низким - в клетках крови (лейкоцитах и тромбоцитах). При этом 90% лиц с мутацией m.3243A>G (n = 68) и 91% лиц с мутацией m.8344A>G (n = 22) имели более высокий уровень мутантной мтДНК в мышцах, чем в крови [7].

Lee H.Y. с соавторами анализировали уровень гетероплазмии второго гипервариабельного сегмента (ГВС2) митохондриального генома в клетках крови, мозга, сердца, печени, скелетных мышц и волосяных фолликулов, которые были собраны во время вскрытий 25 человек. Гетероплазмия в клетках крови была обнаружена у 15 из 25 человек (60%). Кроме того, гетероплазмия была обнаружена в тканях мозга, сердца, печени и скелетных мышцах данных людей. У тринадцати из 15 индивидов была обнаружена гетероплазмия ГВС2 в клетках волосяных фолликулов [64].

Frederiksen A.L. и др., проанализировав 65 человек из девяти семей с мутацией m.3243A>G, определили мутационную нагрузку (% мутированных мтДНК) в различных тканях. Следует отметить, что мутационную нагрузку измеряли в различных типах клеток - лейкоцитах крови, буккальном эпителии, клетках скелетных мышц и эпителиальных клетках мочи. Эти клетки получены из трех эмбриогенных зародышевых листков. Согласно результатам данного исследования, выявлена значимая корреляция между мутационной нагрузкой во всех четырех видах ткани ( $R = 0.80-0.89$ ,  $p < 0,0001$ ). По отношению к клеткам крови, выступающим в качестве контроля, мутационная нагрузка в буккальном эпителии увеличилась на 16%, в эпителиальных клетках мочи - на 31%, а в мышцах на 37%. Отмечены значительные различия в мутационной нагрузке митохондриального генома между лейкоцитами крови, буккальным эпителием и эпителиальными клетками мочи ( $p < 0,0001$ ), но не было никакой разницы по данному параметру между мышцами и эпителиальными клетками мочи [25].

Li M. со своими коллегами проанализировали полный митохондриальный геном 12 образцов различных тканей, полученных при аутопсии от каждого из 152 индивидов. Был определен уровень гетероплазмии мутаций, локализованных в 393 позициях митохондриального генома. Уровень гетероплазмии некоторых мутаций оказался ассоциирован с определенными видами тканей, показывая именно в них высокие значения [26].

Samuels D.C. и др. в своей работе изучили дефекты митохондриальной ДНК десяти видов ткани (почек, легких, печени, тонкой кишки, толстой кишки, скелетных мышц, селезенке, белом веществе мозга, кожи выше пояса и кожи ниже пояса), полученных при вскрытии двух лиц, не имевших онкологических заболеваний. Оба индивида умерли от инфаркта миокарда. Было выявлено 20 гетероплазмичных мутаций с уровнем гетероплазмии более одного процента. В трех из десяти видов ткани (печень, почки и скелетные мышцы) обнаружены несколько митохондриальных мутаций, которые были общими для данных людей. Мутации митохондриального генома m.60T>C и m.72T>C выявлены в печени и почках обоих индивидов. В то же время мутации в позициях m.94G>A и m.203G>A были обнаружены в печени и/или почках данных людей. Следует отметить, что мутации m.60T>C, m.72T>C и m.94G>A часто происходят в печени и почках. Еще три мутации в позициях 64, 189 и 408 были выявлены в скелетных мышцах. Мутация в позиции 67 была найдена только в скелетных мышцах. Уровень гетероплазмии данных мутаций (часто возникающих в печени, почках и скелетных мышцах) варьировал от 1 до 21%. Однако данные однонуклеотидные замены не были обнаружены в других видах ткани. При этом, в одних и тех же тканях разных индивидов значения уровня гетероплазмии мутаций были близки [65].

Группа ученых, Pfeiffer H. и др., взяла в качестве материала для исследований клетки периферической крови, буккального эпителия и волосяных фолликулов 30-летней монозиготной тройни. Был изучен уровень гетероплазмии мутаций в гомополимерном участке, состоящем из повторов цитозина во ГВС2. В клетках крови и буккального эпителия выявлено накопление молекул мутантной мтДНК с одной и двумя вставками повторов цитозина, по сравнению с референсной кембриджской последовательностью (CRS). При этом не было никаких статистически значимых различий в уровне гетероплазмии мутаций между клетками крови и буккального эпителия одного и того же индивида, а также между тремя монозиготными братьями. В клетках волосяных фолликулов было

обнаружено уменьшение количества повторов цитозина, по сравнению с клетками крови и буккального эпителия, у всех трех однояйцовых близнецов [66].

Roberts К.А. и Calloway С. проанализировали образцы волос у 127 человек. Из 1589 образцов волос 1478 (93%) имели одну или несколько гомоплазмичных мутаций, а 111 (7%) – одну или несколько гетероплазмичных мутаций. 71% (82/116) индивидов имели гомоплазмичные, а 29% (34/116) – гетероплазмичные мутации, по крайней мере, в одном образце волос. Следует отметить, что гетероплазмия митохондриального генома в образцах волос составляла от 0 до 90% и ее уровень не зависел от принадлежности к определенной популяционной группе, косметического лечения, возраста, пола, и от того, взяты ли волосы у живого или мертвого человека [67].

Krjutškov К с коллегами исследовали 16 различных типов ткани у трех мужчин 40–54 лет. Они обнаружили, что уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома в некоторых типах тканей может быть на очень низком уровне либо вообще отсутствовать, в то время как в других типах ткани он достаточно высок. Например, в костном мозге уровень гетероплазмии мутации некодирующего региона m.16093T>C варьировал, составляя 5–8% в костном мозге, в аорте - 31–60%, а в мочевом пузыре достигал до 62%. Авторы полагают, что это может объясняться возникновением соматических митохондриальных мутаций в онтогенезе человека [68].

Pyle А. с соавторами обнаружили, что при тяжелом сепсисе в лейкоцитах периферической крови больных, имеющих мутацию m.3243A>G, снижается общее количество копий мтДНК. Аналогичное уменьшение копий митохондриального генома было замечено и при других митохондриальных цитопатиях, а также в клеточных линиях (цибридах NT2 тератокарциномы) с мутацией m.3243A>G. Ученые предполагают, что одной из причин уменьшения количества копий мтДНК при тяжелом сепсисе может быть увеличение в крови количества нейтрофилов, в которых количество копий митохондриального

генома в три раза меньше, чем в лейкоцитах. Однако при анализе отдельных моноцитов или лимфоцитов также выявлено снижение копий мтДНК, по сравнению с аналогичными отдельными клетками здоровых доноров [69].

Calloway C.D с коллегами провели исследования одной из самых мутабельных областей митохондриального генома человека - ГВС2, с использованием сиквенс-специфических олигонуклеотидных зондов у 43 индивидов. Были проанализированы ткани мышцы, сердца, мозга и клетки крови. Уровень гетероплазии ГВС2 отличался в разных типах ткани, будучи выше в мышечной ткани, что подтверждает результаты других исследований [27].

Panadés-de Oliveira L. и др. изучили мутацию m.13045A>G в скелетных мышцах и крови двух пациентов (мать и дочь). В крови данной мутации выявлено не было. Авторы связывают это с высокой скоростью обновления клеток крови и негативной селекцией мутантной мтДНК, ассоциированной с патологией. Уровень гетероплазии в скелетных мышцах у матери составил 50%, а у дочери – 84%. Также у дочери детектировали мутацию m.13045A>G в моче на уровне 5%, что, по мнению авторов, говорит о том, что использование мочи в качестве клинического материала для изучения мутаций митохондриального генома несколько некорректно [70].

### **1.6 Вариабельность мутаций мтДНК в различных типах тканей от здоровых лиц и пациентов с различными заболеваниями**

Ряд авторов в своих научных работах изучали не только распределение гетероплазии мутаций митохондриального генома в различных тканях, но сопоставляли полученные данные о мутационной нагрузке с различными заболеваниями человека.

Первая работа на эту тему была опубликована в 1994 году, когда Matthews P.M. с коллегами нашли различия в уровне гетероплазии мутации m.3243A>G между различными типами тканей у женщины с кардиомиопатией и молочнокислым ацидозом. Более высокий процент гетероплазии был



обнаружен в сердце (49%), скелетных мышцах (56%) и печени (55%), чем, например, в почках (3%). Кроме того, авторы сравнили вариабельность данной митохондриальной мутации у взрослого человека и эмбриона. Результаты исследования показали, отсутствие значимых отличий по уровню гетероплазмии мутации m.3243A>G в различных типах тканей эмбриона. В то же время подобные отличия наблюдались у взрослого человека. Это, по мнению исследователей, может свидетельствовать о неравномерном распределении митохондриальной ДНК между различными тканями в процессе онтогенеза человека [28].

В 1997 году Harrison T.J. и др. исследовали финскую семью, члены которой имели ряд заболеваний, ассоциированных с митохондриальной дисфункцией. В их работе был определен уровень гетероплазмии мутации m.3243A>G в образцах цельной крови, буккального эпителия и волосяных фолликулов троих пациентов. Первый пациент, женщина 48 лет, имела инсулиннезависимый сахарный диабет, нейросенсорную тугоухость и дистрофию пигментного эпителия сетчатки. Второй пациент, мужчина 47 лет, который являлся братом данной женщины, имел инсулиннезависимый сахарный диабет, нейросенсорную тугоухость, но у него отсутствовала дистрофия пигментного эпителия сетчатки. Третий пациент, мужчина 28 лет, являвшийся сыном первой пациентки, не имел вышеупомянутых заболеваний. Распределение уровня гетероплазмии мутации m.3243A>G у троих пациентов в образцах было следующим:

Пациент 1: Цельная кровь – 8%, волосяные фолликулы – 6%, буккальный эпителий – 18%.

Пациент 2: Цельная кровь – 12%, волосяные фолликулы – 33%, буккальный эпителий – 30%.

Пациент 3: Цельная кровь – 23%, волосяные фолликулы – 15%, буккальный эпителий – 16%.

На основании полученных результатов авторы статьи пришли к следующим выводам: тяжесть симптомов заболевания (суммарное наличие или отсутствие

установленных заболеваний), по-видимому, не коррелирует с мутационной нагрузкой по средней степени гетероплазмии в трех изученных тканях. Исследование подтвердило, что гетероплазмия мтДНК передается по материнской линии [71].

Как пишет Раі С.-У. с соавторами, буккальный эпителий и клетки крови часто используются в качестве эталонных образцов при анализе ДНК. Основной целью данной работы было сравнение уровня дефектов митохондриальной ДНК буккального эпителия у лиц, регулярно жевавших бетель (*Piper betle*) и здоровых людей, никогда его не жевавших. Изучены первый и второй гипервариабельные сегменты контрольного региона D-петли митохондриального генома в парных образцах крови и клеток буккального эпителия в трех группах:

- 1) 75 доноров, которые никогда не жевали бетель (контрольная группа). Возраст участников исследования составлял от 21 до 66 лет.
- 2) 60 доноров, жевавших бетель, возраст которых был от 18 до 62 лет.
- 3) 67 пациентов с раком, вызванным употреблением бетеля. Их возраст составлял от 21 до 80 лет.

Информация о половом составе групп в статье отсутствовала.

Среди этих трех групп наличие дефектов митохондриальной ДНК обнаружено у 61% (41 из 67) онкобольных. В группе доноров, жевавших бетель, 10% (6 из 60) митохондриальных хромосом имели мутации. В то же время в группе доноров, которые никогда бетель не жевали, дефекты митохондриального генома имелись только у 1,3% (1 из 75) индивидов. Значимой корреляции между возрастом и мутационной нагрузкой выявлено не было [72].

Интересные результаты в своей работе получили Литвинова Н.А и др. Они сравнили мутационную нагрузку митохондриального генома в крови и буккальном эпителии у 20 пациентов с митохондриальной энцефаломиопатией. Было установлено, что менее половины выявленных вариантов мтДНК встречались в обеих исследованных тканях. В образцах буккального эпителия пациентов была обнаружена мутация m.3010G>A, ассоциированная с синдромом

циклической рвоты, которая в крови пациентов выявлена не была. В то же время мутации m.12308A>G, характерная для СРЕО (хронической прогрессирующей наружной офтальмоплегии, инсульта, кардиомиопатии) и m.4216T>C, встречающаяся при LHON и инсулинорезистентности, были детектированы как в буккальном эпителии, так и в крови пациентов. Авторы полагают, что межтканевые различия выявленных генных вариантов, возможно, связаны с особенностями проявления энергетического дисбаланса. Данные о возрасте и поле пациентов в данной работе не представлены [8].

Claeys K.G. с коллегами проанализировали уровень гетероплазмии мутации m.8993T>G/C в крови (100%), моче (94%), буккальном эпителии (92%) у 30-летнего мужчины с нейрогенной мышечной слабостью, атаксией и пигментным ретинитом (NARP). Во всех трех анализируемых тканях наблюдался высокий уровень мутации m.8993T>G/C. При проведении аналогичного исследования с образцами тканей его матери авторам не удалось детектировать такую же высокую мутационную нагрузку: уровень гетероплазмии был менее 2% [73].

Kärppä M. И др., изучающие мутацию митохондриального генома m.15923A>G и её взаимосвязь с различными заболеваниями, сравнили её уровень в крови, буккальном эпителии и скелетных мышцах у 64-летнего пациента с двухсторонним птозом, диплопией и непереносимостью физических упражнений. Мутационная нагрузка составляла 33% в скелетных мышцах, 2% в буккальном эпителии, а в крови обнаружена не была. При анализе СОХ-отрицательных мышечных волокон (индикатор дефицита цитохром-С-оксидазы) было установлено, что уровень гетероплазмии в них примерно в 2 раза выше, чем в норме (92% и 43 % соответственно) [74].

Schlapakow E. с коллегами сравнили уровень гетероплазмии мутации m.5667G>A в экстраокулярных и скелетных мышцах при хронической прогрессирующей наружной офтальмоплегии (СРЕО) у 14-летнего мальчика. Достоверных различий в уровне гетероплазмии найдено не было. Уровень мутационной нагрузки в экстраокулярных мышцах составил  $86\% \pm 4,6\%$ ; в

скелетных мышцах -  $87,8\% \pm 5,7\%$ . Однако, при проведении гистохимического анализа авторы выявили более высокую долю волокон с дефицитом цитохром-С-оксидазы в экстраокулярной мышце (41%), по сравнению со скелетной мышцей (10%). Как они предполагают, это может быть обусловлено облегченной сегрегацией мутации m.5667G>A в экстраокулярных мышцах, которые в первую очередь поражаются при СРЕО[75].

При анализе приведенных выше исследований были получены данные о наиболее часто встречающихся объектах для исследования вариабельности гетероплазмии мутаций митохондриального генома (таблица 2).

Таблица 2

Наиболее распространенные материалы исследований:

Тип клеток, ткани	Число публикаций
Скелетные мышцы	10
Буккальный эпителий	9
Клетки крови	10
Печень	4
Мозг	4
Волосяные фолликулы	5
Сердце	4

В 13 работах авторы указывали на различие в уровне гетероплазмии в различных органах и тканях человека, в 6 работах уровень гетероплазмии значимо не отличался.

Так, например, соотношение уровня гетероплазмии, между лейкоцитами и буккальным эпителием, по одним данным, отличался в 4 раза [48], а по другим – в 1,5 раза [23]. Это может быть обусловлено как популяционными различиями, так и недостаточной статистической значимостью, на что указывают сами авторы данных работ. Однако и в первом, и во втором исследовании уровень гетероплазмии в буккальном эпителии был выше аналогичного уровня в клетках

лейкоцитов. В двух работах различий в мутационной нагрузки между лейкоцитами и буккальным эпителием выявлено не было [8,73].

Важным этапом при установлении роли мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) в функционировании клеток и генетической предрасположенности к различным заболеваниям является изучение влияния мутаций митохондриального генома на процессы клеточного дыхания. Изучения влияния мутаций мтДНК на митохондриальную дисфункцию и клеточные процессы в целом возможно с помощью создания клеточной модели, а именно цитоплазматических гибридов с разным уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома. Основой для изучения атеросклероза на клеточной модели может быть моноцитоподобная клеточная линия, так как моноциты являются одним из ключевых участников процесса атерогенеза [1-3, 47].

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Характеристика материала

Материалы исследования были взяты в соответствии с задачами исследования.

Клеточная линия ТНР-1 (рисунок 2) была выбрана в качестве основы для создания цитоплазматических гибридных клеток. Данная линия была приобретена в ФГБУН «Институт цитологии РАН».

Описание клеточной линии ТНР-1:

- 1) Происхождение: человек, периферическая кровь, острая моноцитарная лейкемия.
- 2) Морфология: моноцитоподобная.
- 3) Способ культивирования: суспензионный.
- 4) Условия культивирования: среда - RPMI 1640, сыворотка - эмбриональная бычья 10%, др. компоненты – 2-меркаптоэтанол  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ .
- 5) Кариология:  $2n=46$ , модальное число хромосом 50, количество маркеров – 8 (дифференциальная окраска), количество полиплоидов 2.5%.
- 6) Дифференцировка: в макрофагоподобные клетки.
- 7) HLA клеточный фенотип – A2, A9, B5, DRw1, DRw2.

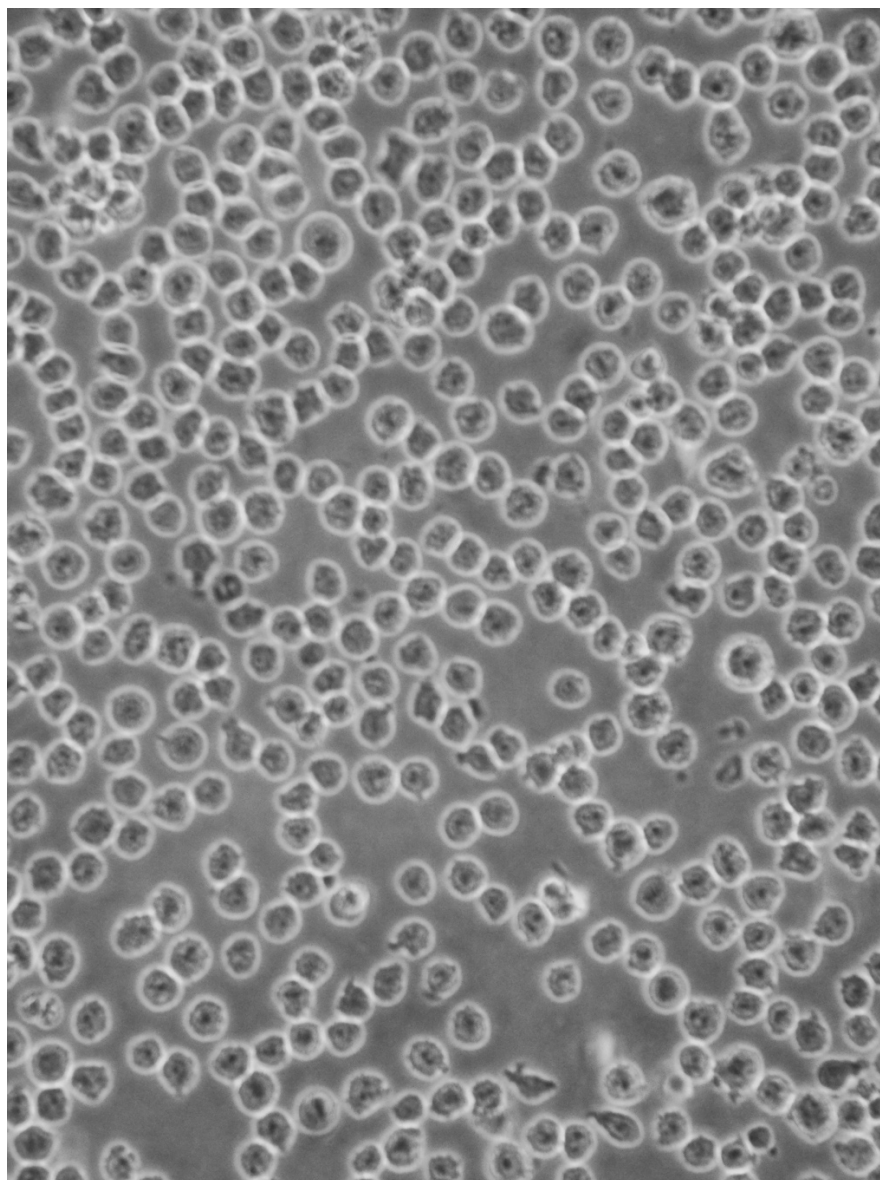


Рис.2. Клеточная линия THP-1.

В качестве доноров митохондрий использовались тромбоциты, полученные из периферической крови пациентов ГКБ №68.

Образцы различных типов клеток и тканей человека были получены от государственных клинических и научных учреждений (таблица 3). Забор образцов осуществлялся компетентными специалистами имеющие соответствующую квалификацию и аттестацию. К донорству допускались только лица при наличии письменных информированных добровольных согласий.

Количество образцов различных типов клеток и тканей человека

Материал исследования	Количество образцов	Источник
Аутопсийный материал: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ интима аорты</li> <li>▪ сосочковые мышцы миокарда</li> <li>▪ паренхима печени</li> <li>▪ паренхима селезенки</li> <li>▪ скелетная мускулатура</li> </ul>	21 образец каждого вида тканей	Лаборатория патоморфологии сердечно-сосудистых заболеваний ИЭК НМИЦ Кардиологии
Буккальный эпителий и цельная кровь	134 образца каждого вида тканей	Коллекция образцов на базе ГКБ №68 г. Москвы. Составитель – Орехова В.А.
Нейтрофилы, лимфоциты и моноциты	41 образец каждого вида клеток	Клинико-диагностическая лаборатория ИКК НМИЦ Кардиологии

Характеристика пациентов ГКБ №68, являющихся участниками исследования вариабельности гетероплазмии некоторых мутаций митохондриального генома в буккальном эпителии и цельной крови, представлена в таблице 4.



## Характеристика пациентов

	Возраст
Мужчины (37 чел.)	61±10
Женщины (97 чел.)	61±11

## 2.2 Методы исследования

## 2.2.1 Создание цитоплазматических гибридов (цибридов)

Цибриды – это клеточные линии, полученные с помощью слияния rho0-клеток (безмитохондриальных) с клетками-донорами цитоплазмы, содержащей митохондрии. Для создания морфологически однородных и устойчивых к многократному пересеванию цибридных линий преимущественно используют постоянные клеточные линии, т. е. те клетки, которые прошли этап дедифференцировки. В таблице 5 представлены используемые растворы и среды.

Таблица 5

## Растворы и среды

	Компонент	Концентрация	Производитель
Ростовая среда	RPMI-1640	-	Gibco
	L-глутамин	300 мг/л	НПП "ПанЭко"
	2-Меркаптоэтанол	$2 \times 10^{-5}$ М	Acros
	Сыворотка эмбриональная бычья	10 % от общего объема	HyClone
	Пенициллин-стрептомицин, 100-кратный	пенициллин - 50 ед/мл, стрептомицин - 50 мкг/мл	НПП "ПанЭко"
	D-глюкоза	2500 мг/л	Amresco
	Пируват натрия	110 мкг/л	НПП "ПанЭко"
10 × цитрат в физиологическом растворе	Физиологический раствор	0,15 М NaCl	НПП "ПанЭко"
	Цитрат натрия ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) тринатриевой соли, дигидрат)	0,10 М	Amresco
ПЭГ раствор			

	Полиэтиленгликоль 1500	42% от общего объема	Acros
	Диметилсульфоксид (ДМСО)	2 мл	Amresco
	DMEM [-Ca <sup>2+</sup> ]	9,5 мл	Gibco
Готовые растворы и среды	Уридин	50 мг/мл раствор	Sigma-Aldrich
	Этидиум бромид	1% раствор	AppliChem
	Фиколл-урографин	плотность 1,077	НПП "ПанЭко"
	Диметилсульфоксид (ДМСО)		Amresco
	Физиологический раствор	0,15 М NaCl	НПП "ПанЭко"
	DMEM [-Ca <sup>2+</sup> ]		Gibco
	Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR GreenI		Синтол

### 2.2.1.1 Создание безмитохондриальных (rho0) клеток

Возможность создания rho0-клеток человека основана на применении ингибиторов репликации мтДНК, таких как ДНК-интеркалирующий краситель этидиум бромид (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид). Низкие концентрации этидиум бромида частично или полностью ингибируют репликацию митохондриального генома, но не оказывают никакого влияния на репликацию ядерной ДНК.

Для создания безмитохондриальных клеточных линий (rho0) в нашей лаборатории использовали стандартную методику М. Кинга и Г. Аттарди, которая включает в себя два этапа:

1. Проверка возможности получения безмитохондриальных клеток. Нативную клеточную линию культивировали в ростовой среде с добавлением этидиума бромида и уридина в одном варианте и с добавлением только этидиума бромида в другом варианте. На этапе подтверждения создания rho0-клеток были подобраны оптимальные концентрации используемых добавок к среде.

2. Получение безмитохондриальной клеточной линии. На данном этапе, с учётом подобранных условий культивирования, клеточные линии помещали в ростовую среду с добавлением 500 нг/мл этидиума бромида и 200 мкг/мл уридина.

Время культивации составило 18 недель. Частота пассажей – каждые 2/3 дня. Далее из ростовой среды исключают этидиум бромид.

Культивирование полученных безмитохондриальных клеток, согласно методике, производится на ростовой среде с добавлением 200 мкг/мл уридина.

### **2.2.1.2 Выделение тромбоцитов из крови**

Цитоплазматические гибриды были получены путем слияния безмитохондриальных клеток с тромбоцитами, выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий. Тромбоциты были выделены из цельной крови методом центрифугирования на градиенте плотности фиколла-урографина.

#### **1. Подготовка крови перед выделением тромбоцитов.**

К крови, полученной от пациентов-доноров, добавляли 10 × цитрат в физиологическом растворе в соотношении 1:1. Полученную смесь центрифугировали 20 мин при 200g при температуре 12 °С.

#### **2. Выделение тромбоцитов.**

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

#### **3. Криохранение клеток (тромбоцитов).**

К 11 мл раствора тромбоцитов в физрастворе добавляли 1,5 мл стерильного ДМСО и 3 мл FBS. 2.4.3. Криовials помещали в штатив для контролируемого замораживания клеток (1°C /мин) на 8 часов при температуре -80°C. Далее хранили образцы в жидком азоте.

### **2.2.1.3 Получение гибридных культур**

Проникновение митохондрий в rho0-клетки возможно только при химическом или физическом воздействии на клеточную мембрану, которое приводит к образованию пор в мембране и индуцирует их адгезию.

Мы использовали методику «ПЭГ-слияния», которая позволяет создавать цитоплазматические гибриды путем слияния rho0-клеток с тромбоцитами,

выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий (рисунок 7). Следует подчеркнуть, что использование тромбоцитов значительно упрощает протокол получения гибридных линий, так как тромбоциты содержат только митохондриальный геном. Ядерный геном в них отсутствует.

#### 2.2.1.3.1 Подготовка клеток перед слиянием

Если тромбоциты были заморожены, то мы сначала их размораживали и удаляли из клеток криопротектор. Для этого добавляли суспензию с тромбоцитами в 14 мл, подогретого при температуре 37 °С физиологического раствора. Криопробирку с тромбоцитами предварительно нагревали на водяной бане при температуре 37°С. Далее центрифугировали 15 мин при 1500g при температуре 15°С. Отбирали супернатант.

#### 2.2.1.3.2 Подготовка rho0-клеток

Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 180g при температуре 25°С. Ресуспендировали rho0-клетки в среде ДМЕМ [-Ca<sup>2+</sup>] в концентрации 5x10<sup>5</sup>кл/мл.

#### 2.2.1.3.3 Слияние клеток

Rho0-клетки, приготовленные в пункте 2.2.1.3.2, добавляли к осадку тромбоцитов, приготовленных в пункте 2.2.1.3.1. Центрифугировали 10 мин при 180g при температуре 25°С. Отбирали супернатант. Далее добавляли 100 мкл 42% ПЭГ к осадку тромбоцитов с rho0-клетками, ресуспендировали. По истечении 1 мин, ресуспендировали в течении 30 сек.

Полученную суспензию клеток культивировали в ростовой среде в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°С.

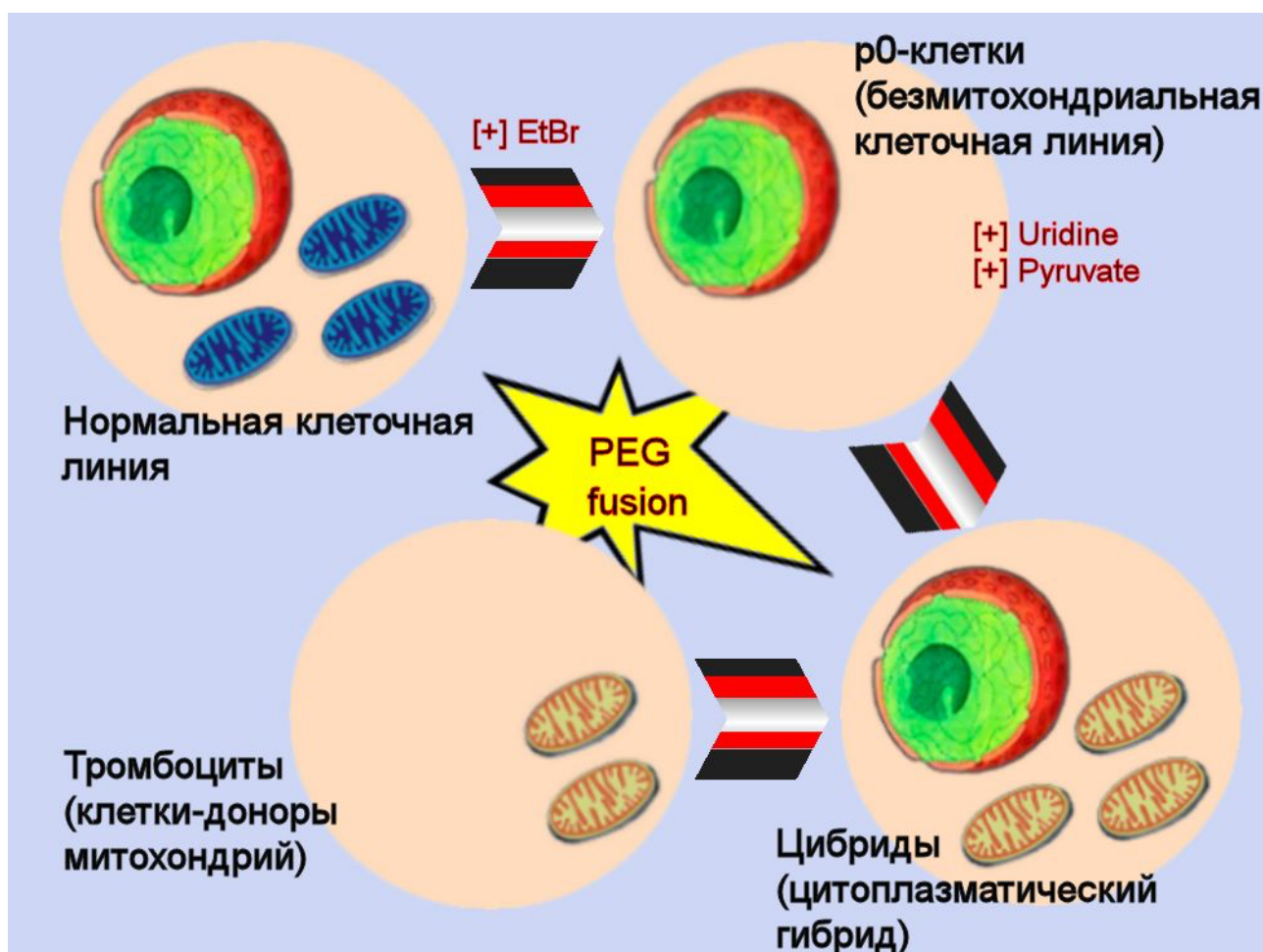


Рис.3. Схема создания цитоплазматических гибридов.

Схема изготовлена с помощью программы GIMP 2.10.22.

#### 2.2.1.4 Проверка безмитохондриальных (rho0) клеток и цибридных культур

Все культуры были проверены на копияность митохондриального генома и, соответственно, была подтверждена либо «безмитохондриальность» (rho0-клетки), либо наличие митохондрий (цибриды) с помощью проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBRGreenI (Евроген). Контролем выступала нативная культура клеток ТНР-1.

Определение копияности проводилось с использованием синтетических матриц производства «НПК Синтол» на основе участка митохондриальной ДНК в концентрациях  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  и  $10^6$ . На основе показаний Ст-величины матриц

строили калибровочную кривую, которую использовали для определения копийности ДНК в исследуемых образцах.

## **2.2.2 Измерение мембранного потенциала и совокупной массы митохондрий с помощью конфокальной микроскопии**

Данные методики объединены в одну, так как их измерение происходит в рамках одного эксперимента. Серия экспериментов была проведена на базе лаборатории департамента клинической неврологии и двигательных нарушений института неврологии университетского колледжа Лондона (Великобритания).

### **2.2.2.1 Прикрепление клеток к покровным стеклам для микроскопии**

В 6-луночный планшет помещали стекла для микроскопии, предварительно обработанные 96% этанолом в течение 2–3 часов.

Стерилизовали планшеты со стеклами под УФ-излучением в течении 40 мин. После стерилизации добавляли в середину стекла 150–200 мкл поли-Д-лизина (Sigma-Aldrich) на 10 мин (для суспензионных клеточных линий). В предварительно просушенные стекла вносили 150–200 мкл клеток в ростовой среде.

Подготовленные таким образом препарат помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на ночь при 37<sup>0</sup>C и 5%-ом уровне CO<sub>2</sub>.

### **2.2.2.2 Проведение измерения на конфокальном микроскопе**

Используемое оборудование: Микроскоп ZeissLSM710 с камерой LSMT-PMТ. Подготовка и настройка оборудования проводили с использованием инструкции по эксплуатации прибора.

#### **2.2.2.2.1 Подготовка клеток**

Со стекла для микроскопии с клетками отбирали ростовую среду и добавляли раствор Хэнкса (Gibco) на 10 мин.

Для измерения мембранного потенциала добавляли к клеткам раствор Хэнкса содержащий буфер HEPES(Gibco) и красители Calcein(Invitrogen) и, метиловый эфир тетраметилпродамина(TMRM)(Invitrogen) по 25 нМ на 40 мин.

TMRM – потенциал-зависимый катионный краситель, который накапливается в митохондриях (свечение в красном спектре).

Calcein – мембранопроницаемый краситель для мечения живых клеток (свечение в зеленом спектре).

#### 2.2.2.2.2 Измерение

Стекла помещали в зажим для стекол микроскопа, предварительно протерев его 96% этанолом.

В программном обеспечении микроскопа в режиме «Z-stack» (3D-сканирование из 16 слоев) выставляли минимальное и максимальное значение фокуса при увеличении 40X (на рабочую линзу окуляра должно быть нанесено иммерсионное масло). Производили запись интенсивности свечения 5–10 клеток на каждом стекле по 5 повторностей.

Для определения массы митохондрий делали 2D-снимок 5–10 клеток.

### 2.2.3 Измерение клеточного дыхания

Скорость потребления кислорода клетками измеряли полярографически, используя закрытый Pt-электрод Кларка в составе прибора OxygraphPlus (HansatechInstruments).

Суспензию клеток центрифугировали 5мин при 200g при температуре 25°C.

Отбирали супернатант и добавляли 30–100 мкл в зависимости от количества клеток раствора Хэнкса, ресуспендировали клетки. Далее клетки помещали на лед.

Подготовка электрода Кларка и измерительной камеры к работе включала в себя процедуру установки прибора и его калибровку, согласно инструкции по эксплуатации.

Измерения проводили в рабочем объеме измерительной камеры 0,5 мл при 37°C с постоянным перемешиванием. В камеру вносили 500 мкл среды MiR05

(0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 60 mM K-lactobionate, 20 mM Taurine, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 0.1% Bovine serum albumin; pH 7.1) и аликвоту образца, содержащую 5млн клеток. После добавления клеток и различных аналитических веществ кривая поглощения кислорода должна достигнуть плато, после чего можно добавлять следующее вещество.

При постановке эксперимента были использованы вещества, представленные в таблице 6.

Таблица 6

Характеристика и последовательность веществ, используемых для измерения клеточного дыхания

Вещество	Концентрация	Производитель	Действие	Последовательность добавки
Сукцинат	1 mM	Sigma-Aldrich	Субстрат цикла Кребса и фермента дыхательной цепи сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный ферментный комплекс II)	(1)
Олигомицин А	1 мкМ	Sigma-Aldrich	Блокирует протонный канал (F <sub>0</sub> в комплексе V) и не дает протонам возвращаться в матрикс. Поэтому АТФ-синтаза (F <sub>1</sub> ) теряет способность синтезировать АТФ.	(2)
ФССР(карбонил цианид-4-трифторметоксифенилгидразон)	1 мкМ	Sigma-Aldrich	Разобщитель окислительного фосфорилирования. Липофильное вещество, способное принимать протоны и переносить их через внутреннюю мембрану митохондрий минуя V комплекс (его протонный канал).	(3)



Калия цианид	1 М	Sigma-Aldrich	Ингибируют цитохром-С-оксидазу, тем самым блокируя перенос электронов в дыхательной цепи.	(4)
--------------	-----	---------------	---	-----

После проведения измерений рабочую камеру электрода промывали 96%-ым этиловым спиртом и дистиллированной водой.

Рассчитывали скорость дыхания клеток, выраженную в нг-молекул кислорода/мин.

Определение биоэнергетического профиля осуществляли в соответствии с схемой, представленной на рисунке 4.

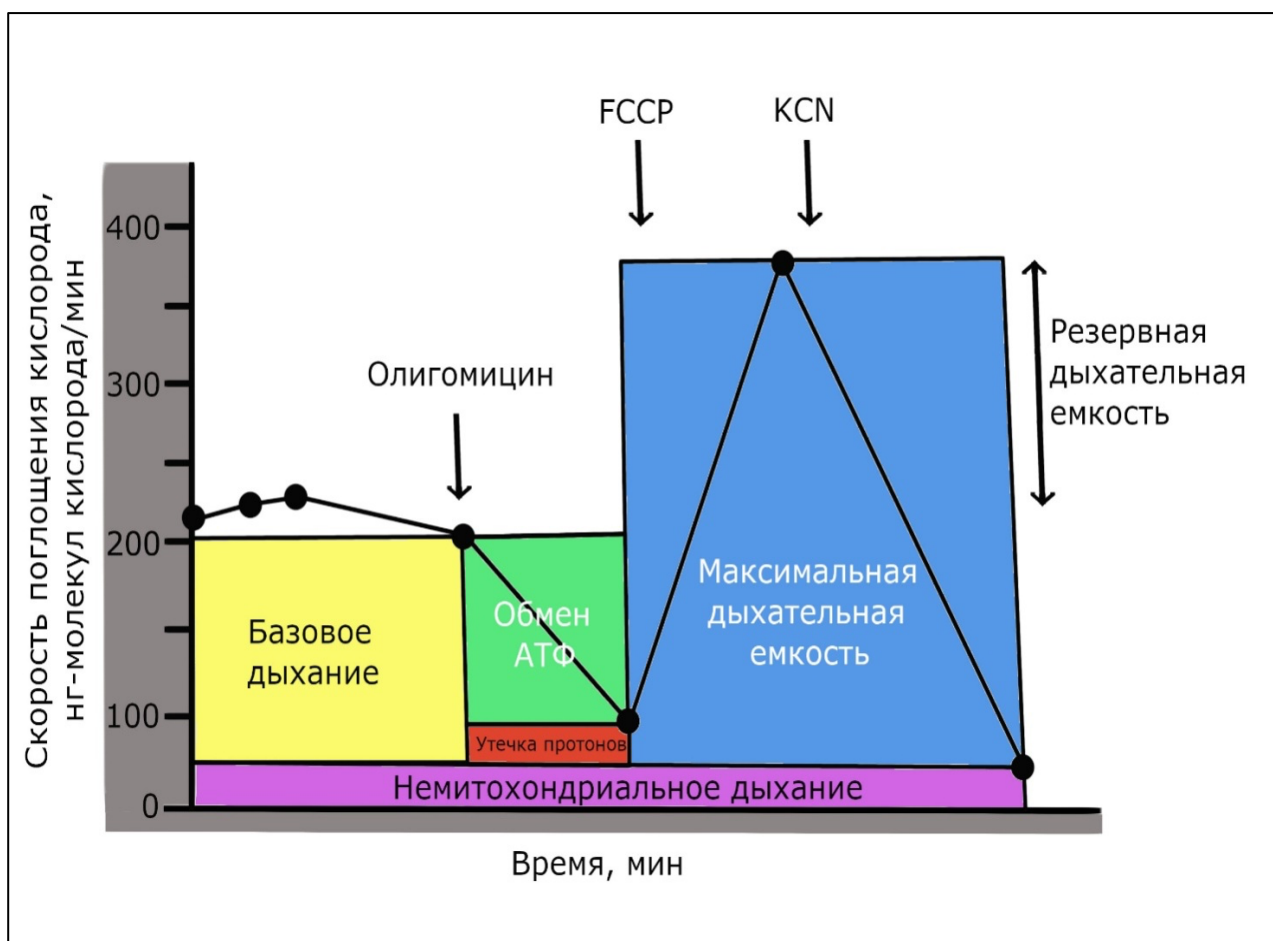


Рис.4.Схема биоэнергетического профиля дыхания.

Схема изготовлена с помощью программы GIMP 2.10.22.

При измерении клеточного дыхания оцениваются такие показатели, как «утечка протонов», «АТФ-зависимое потребление кислорода», «максимальная дыхательная емкость», «резервная дыхательная емкость» и «общая митохондриальная эффективность». Рассмотрим каждый из этих показателей:

Утечка протонов— это физиологический процесс, который представляет собой повторное поступление протонов в митохондриальный матрикс посредством облегченной диффузии. То есть протоны, прокачиваемые во время транспорта электронов, приводящие к потреблению кислорода, но не к образованию АТФ.

Определяется по формуле:

***Утечка протонов = Дыхание под действием олигомицина – Дыхание под действием калия цианида (немитохондриальное дыхание) [76–81].***

Обмен АТФ (АТФ-зависимое потребление кислорода). Потребление кислорода, чувствительное к олигомицину, АТФ-зависимое потребление кислорода представляет собой количество кислорода, потребляемое для образования АТФ в комплексе V или АТФ-синтазе. Оно определяется путем измерения клеточного дыхания после добавления олигомицина.

Определяется по формуле:

***Обмен АТФ = Базовое дыхание – Утечка протонов [76–81].***

Максимальная дыхательная емкость. Максимально возможное потребление кислорода митохондриями. Определяется при использовании разобщителей дыхания, например, FCCP.

Определяется по формуле:

***Максимальная дыхательная емкость = Дыхание под действием FCCP – Дыхание под действием калия цианида (немитохондриальное дыхание) [76–81].***

Резервная дыхательная емкость. Это способность митохондрий реагировать на увеличение потребности в энергии. Резервная емкость показывает, насколько близко к своему биоэнергетическому пределу работает клетка. Таким образом, резервная емкость описывает оценку потенциального биоэнергетического резерва, который может потребоваться клетке во время стресса.

Определяется по формуле:

***Резервная дыхательная емкость = Максимальная дыхательная емкость – Базовое дыхание [80,81].***

Общая митохондриальная эффективность. Сводный показатель, предложенный Valu K. Chacko с соавторами. Отражает положительные аспекты биоэнергетической функции (резервная емкость и дыхание, связанное с АТФ) и сопоставляет их с потенциально вредными аспектами (немитохондриальное потребление кислорода и утечка протонов).

Определяется по формуле:

***Общая митохондриальная эффективность =  $\log(\text{Обмен АТФ} + \text{Резервная дыхательная емкость}) / (\text{Немитохондриальное дыхание} + \text{Утечка протонов})$***  [80].

#### **2.2.4 Выделения различных фракций клеток крови на двойном градиенте плотности фиколла-урографина**

Метод основан на центрифугировании цельной крови и последовательного отбора различных фракций. Разделение клеток в градиенте плотности основан на различиях в величине их плавучей плотности.

При центрифугировании клетки проходят через градиентный раствор фиколла-урографина и занимают соответствующее своей плавучей плотности положение.

Для выделения моноцитов и лимфоцитов клеток человека используют градиент плотности, равный 1,077 г/см<sup>3</sup>. Плавучая плотность данного (первого) градиента больше, чем фракции моноцитов и лимфоцитов, поэтому данные

клетки располагаются над градиентом. Фракция нейтрофилов, располагается между первым и вторым градиентом плотности. В качестве второго градиента используется раствор фиколла-урографина с плотностью 1,119 г/см<sup>3</sup>. Остальные гранулоциты и эритроциты, имеющие большую плавучую плотность, чем все остальные фракции и растворы фиколла-урографина, проходят через градиентный раствор и располагаются на дне пробирки (рисунок 5).

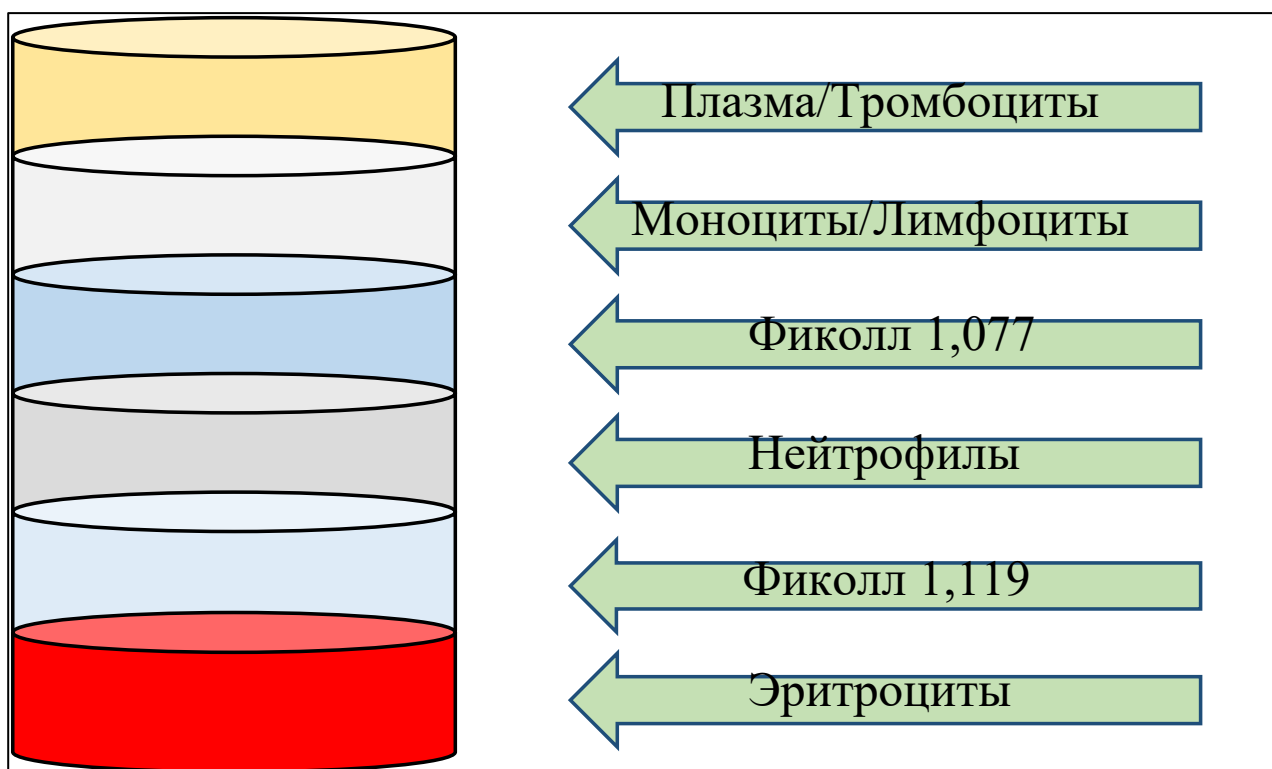


Рис.5. Схема разделения крови на двойном градиенте плотности фиколла-урографина.

Кровь, содержащую антикоагулянт, брали из клинической лаборатории НМИЦ Кардиологии им. Мясникова.

Отбирали 500 мкл цельной крови, а остаток центрифугировали в течение 7 мин при 1000 об/мин для отбора фракции тромбоцитов. Оставшуюся кровь разбавляли PBS/EDTA в соотношении 2:1 и проводили выделение лейкоцитарной фракции путём центрифугирования пробы в течение 20 мин при 1500 об/мин.

Лейкоцитарную пленку, разведенную в PBS/EDTA, переносили в пробирку, в которой предварительно были последовательно наложены фиколл плотностью 1,119 г/см<sup>3</sup> (ПанЭко, Россия) и LSM плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> (MP Biomedicals, США). Далее центрифугировали в течение 20 мин при 1500 об/мин и отбирали фракции нейтрофилов и моноцитов/лимфоцитов.

### **2.2.5 Разделение фракции моноцитов/лимфоцитов с использованием магнитных наночастиц высокой аффинности**

Фракцию моноцитов/лимфоцитов разводили МАКС-буфером (MiltenyiBiotecGmbH, Германия) до объема 8 мл, добавляли магнитные частицы к CD14 (MiltenyiBiotecGmbH, Германия) и инкубировали 30 мин при 37°С.

Колонку для выделения моноцитов помещали на магнитный штатив и промывали её МАКС-буфером в количестве 3 мл.

Затем в колонку добавляли фракцию моноцитов/лимфоцитов. По завершению прогонки снимали колонку с магнитного штатива и помещали её над 15 мл пробиркой. Добавляли 8 мл МАКС-буфера для снятия моноцитов с колонки.

Моноциты и лимфоциты осаждали в центрифуге на 1500 об/мин 15 мин.

### **2.2.6 Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции**

ДНК можно выделить из любых тканей, клетки которых содержат молекулы ДНК, в том числе, лейкоцитов крови, содержащих ядерный и митохондриальный геном.

Стандартная методика получения чистого препарата ДНК основана на том, что эта молекула является полярной и не растворяется в органических растворителях, таких как фенол, хлороформ или этанол. Традиционно для выделения ДНК используется фенол-хлороформная экстракция.

#### **2.2.6.1 Метод выделения ДНК**

Стандартный метод выделения ДНК включает следующие этапы:

1) Лизис клеток с помощью додецилсульфата натрия;

2) Расщепление белков с помощью протеиназы К;

3) Очистка лизата от белков с помощью фенола и хлороформа.

Метод фенол-хлороформной экстракции, как и многие другие методы, существует в ряде модификаций, поэтому имеет смысл рассмотреть подробнее процедуру, используемую в данной научно-исследовательской работе [1].

Этап 1.

Для осаждения клеточного осадка пробы центрифугировали в течение 20 минут при 13700 об/мин.

В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл с образцами различных фракций клеток крови добавляли по 700 мкл лизирующего буфера (0,32 моль/л сахарозы; 5 ммоль/л  $MgCl_2$ ; 100% TritonX-100; 0.01 моль/л Tris-HCl, pH 7.6). Далее инкубировали 15 минут на 65°C с додецилсульфатом натрия (SDS). Затем добавляли по 30 мкл протеиназы К (10 мг/мкл). Пробы центрифугировали 15 минут при 13700 об/мин. Ресуспендировали и инкубировали в термостате «Гном» при 56°C в течении 8 часов.

Этап 2.

После инкубации полученный раствор переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 2 мл. Далее вносили в раствор 500 мкл смеси фенола и хлороформа в соотношении 1:1. Центрифугировали в течение 15 минут при 13700 об/мин. Далее отбирали верхнюю часть супернатанта, содержащую ДНК, переносили ее в новую пробирку объемом 2 мл.

Этап 3.

Осаждали ДНК с помощью 900 мкл изопропанола и центрифугировали в течении 5 минут при 13700 об/мин. Супернатант удаляли, а осадок высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 3 минут. Ту же самую процедуру повторяли с добавлением 900 мкл этилового спирта, охлажденного при -20°C. Осадок ДНК высушивали в термостате «Гном» с открытой крышкой или при комнатной температуре, затем его растворяли в 100 мкл буфера TE.

### **2.2.6.2 Методика измерения концентрации ДНК на наноспектрофотометре**

Концентрацию раствора ДНК в нг/мкл измеряли на наноспектрофотометре IMPLEN NanoPhotometr™ (ImplenGmbH, Германия) с использованием микрокуветы LabelGuard™(ImplenGmbH, Германия) в режиме «DS DNA» при длине волны 260 нм. Далее ДНК разводили до концентрации 30 нг/мкл.

### **2.2.7 Метод полимеразной цепной реакции**

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – это копирование необходимого фрагмента ДНК с помощью ДНК-полимеразы (амплификация ДНК).

ПЦР включает три циклически повторяющиеся стадии:

- 1) денатурация ДНК – расхождение двойной спирали ДНК;
- 2) отжиг праймеров – гибридизация праймеров с комплементарной последовательностью ДНК;
- 3) синтез – достраивание комплементарных цепей ДНК.

Данные стадии многократно повторяются, что приводит к экспоненциальному росту получаемых ампликонов интересующей последовательности ДНК.

#### **2.2.7.1 Использование полимеразной цепной реакции как промежуточного этап подготовки к пиросеквенированию**

В рамках данной работы ПЦР была проведена с целью амплификации короткоцепочечных участков мтДНК, для достижения необходимого количества копий ампликонов, достаточного для дальнейшего анализа этих участков. Данные о последовательности праймеров и условиях реакций ПЦР были получены Сазоновой М.А. с соавторами на основе исследований, посвящённых митохондриальным мутациям, ассоциированным с различными патологиями человека [1,3]. Для реакции брали раствор ДНК с концентрацией 30 нг/мкл, и синтезированные фирмой «Синтол» праймеры с концентрацией 10 пмоль/мкл.

Исследование проводилось с использованием амплификатора PTC DNA Engine 200 (Bio-Rad, Китай).

Реакцию проводили в 30 мкл реакционной смеси. Условия проведения реакции и последовательность праймеров отличались для различных мутаций (таблица 7).

Реакционная смесь и условия ПЦР были следующие:

- 1) 4,6 мкл мQ (H<sub>2</sub>O)
- 2) 4 мкл смесь dNTPs 10x: 2 mM dATP, 2 mM dTTP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP
- 3) 4 мкл 10x буфер для ПЦР (16,6 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl (pH 8,8))
- 4) 25mM MgCl<sub>2</sub>
  - 4.1) 2,4 мкл при необходимой концентрации 2,5 mM
  - 4.2) 4 мкл при необходимой концентрации 1,5 mM
- 5) 1,33 мкл Taq-полимераза («Синтол»)
- 6) 4 мкл матричная ДНК
- 7) 2,7 мкл праймер F (+)
- 8) 2,7 мкл праймер R (-)

Таблица 7

Условия для ПЦР фрагментов митохондриального генома

Мутация	Праймеры для ПЦР	C(Mg <sup>++</sup> )	Программа
m.1555A>G	TAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAA bio-GTAAGGTGGAGTGGGTTTGGG	2,5mM	AT2
m.3256C>T	bio-AGGACAAGAGAAATAAGGCC	2,5mM	AT1
m.3336T>C	ACGTTGGGGCCTTTGCGTAG		
m.12315G>A	bio-CTCATGCCCCCATGTCTAA TTACTTTTATTTGGAGTTGCAC	2,5mM	AT2
m.13513G>A	CCTCACAGGTTTCTACTCCAAA bio-AAGTCCTAGGAAAGTGACAGCGAGG	1,5mM	AT1



Значения температуры и времени в программе амплификатора выставлялись в следующей последовательности:

- 1) 3 мин при 94°C
- 2.1) 30 сек при 94°C
- 2.2) 30 сек 35 циклов при 56°C (AT1) и 50°C (AT2)
- 2.3) 1 мин при 72°C
- 3) 7 мин при 72°C
- 4) 4 мин при 20°C

#### **2.2.7.2 Метод лонг-полимеразной цепной реакции**

Для данного метода использовали набор LongRange PCR Kit (Qiagen)

Реакционная смесь и условия ПЦР были следующие:

- 1) 4,6 мкл мQ (H<sub>2</sub>O)
- 2) 5 мкл Буфер Long Range PCR
- 3) 2,5 мкл смесь dNTPs: 10 мМ dATP, 10 мМ dTTP, 10 мМ dGTP, 10 мМ dCTP
- 4) 0,4 мкл смесь ферментов LongRange PCR
- 5) 4 мкл; матричная ДНК
- 6) 2,7 мкл праймер F (+)
- 7) 2,7 мкл праймер R (-)

Реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси. Праймеры были взяты аналогичные обычной ПЦР, описанной выше, для мутации m.3336T>C.

Значения температуры и время в программе на амплификаторе выставлялись в следующей последовательности:

- 1) 3 мин при 93°C
- 2) 15 сек при 93°C
- 3) 30 сек при 62°C
- 4) 1 мин/1000 н.п. при 68°C

- 5) 15 сек при 93°C
- 6) 30 сек при 62°C
- 7) 1 мин/1000 н.п. при 68°C
- 8) по завершению программы при 4°C

### **2.2.8 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле**

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом для разделения фрагментов ДНК в соответствии с их размером.

Размеры фрагментов ДНК определяются с помощью маркеров молекулярного веса (DNA Ladder).

В наших исследованиях электрофорез был использован с целью оценки качества проведения ПЦР путем визуализации, связанных с красителем ампликонов. Полосы ампликонов, разделенных электрофорезом на агарозном геле, сравнивали с полосами маркеров молекулярного веса. Электрофорез амплификатов проводили в горизонтальном аппарате фирмы «Хеликон» в агарозном геле с использованием 0,5-кратного буфера TBE (маточный 10-кратный буфер TBE содержал Трис-HCl 108 г/л, борную кислоту 55 г/л, 40 мл/л 0,5 М ЭДТА, pH=8,0). Концентрация агарозы («Fluka») составляла 1,2–1,7%. Гель окрашивали с помощью добавления раствора бромистого этидия (0,5 мкг/мл). В качестве красителя использовали раствор бромфенолового синего и ксилолцианола в смеси вода-глицерин (50% воды, 50 % глицерина) с концентрацией каждого красителя 0,25%. Количество красителя составляло 1 мкл на 10 мкл образца. В качестве маркеров молекулярного веса использовали молекулярный маркер pUC19+Msp1. Электрофорез проводили при следующих параметрах: мощность - 100 Вт, сила тока – 0,05 А, время - 40 минут. Визуализацию геля и фиксацию изображений производили с помощью геледокументирующей системы MolecularImager® GelDoc™ XR System (BioRad) при использовании ультрафиолетового фильтра [1, 22].

## 2.2.9 Пиросеквенирование

Пиросеквенирование короткоцепочечных ампликонов, полученных при проведении ПЦР, проводилось для детекции нуклеотидной последовательности данных фрагментов и оценки уровня гетероплазии в исследуемых позициях мтДНК. Использовался прибор PyroMark Q96 MD фирмы Qiagen.

Метод пиросеквенирования, также обозначаемый как «секвенирование путем синтеза», был разработан Полом Нином в Королевском техническом институте (Стокгольм, Швеция) в 1996 г. Метод основан на детекции высвобождающегося при синтезе ДНК пирофосфата [82] и на измерении вспышки, возникающей при взаимодействии АТФ с люциферинном.

### 2.2.9.1 Проведение реакции пиросеквенирования

Проведение реакции пиросеквенирования включает в себя пять этапов [83]:

Этап 1.

Сиквенс-праймер гибридизируется с одноцепочечным ПЦР-ампликоном, который используется в качестве матрицы. Полученный фрагмент инкубируется с ферментами: ДНК-полимеразой, АТФ-сульфаразой, люциферазой и апиразой; а также с субстратом: аденозин-5-фосфосульфатом и люциферинном (рисунок 3)

Этап 2.

В реакционную смесь добавляется первый нуклеотид. ДНК-полимераза достраивает его к цепи ДНК в соответствии с принципом комплементарности. При этом реакция сопровождается выделением пирофосфата (PPi) в количестве, эквивалентном сумме включенных нуклеотидов (рисунок 6).

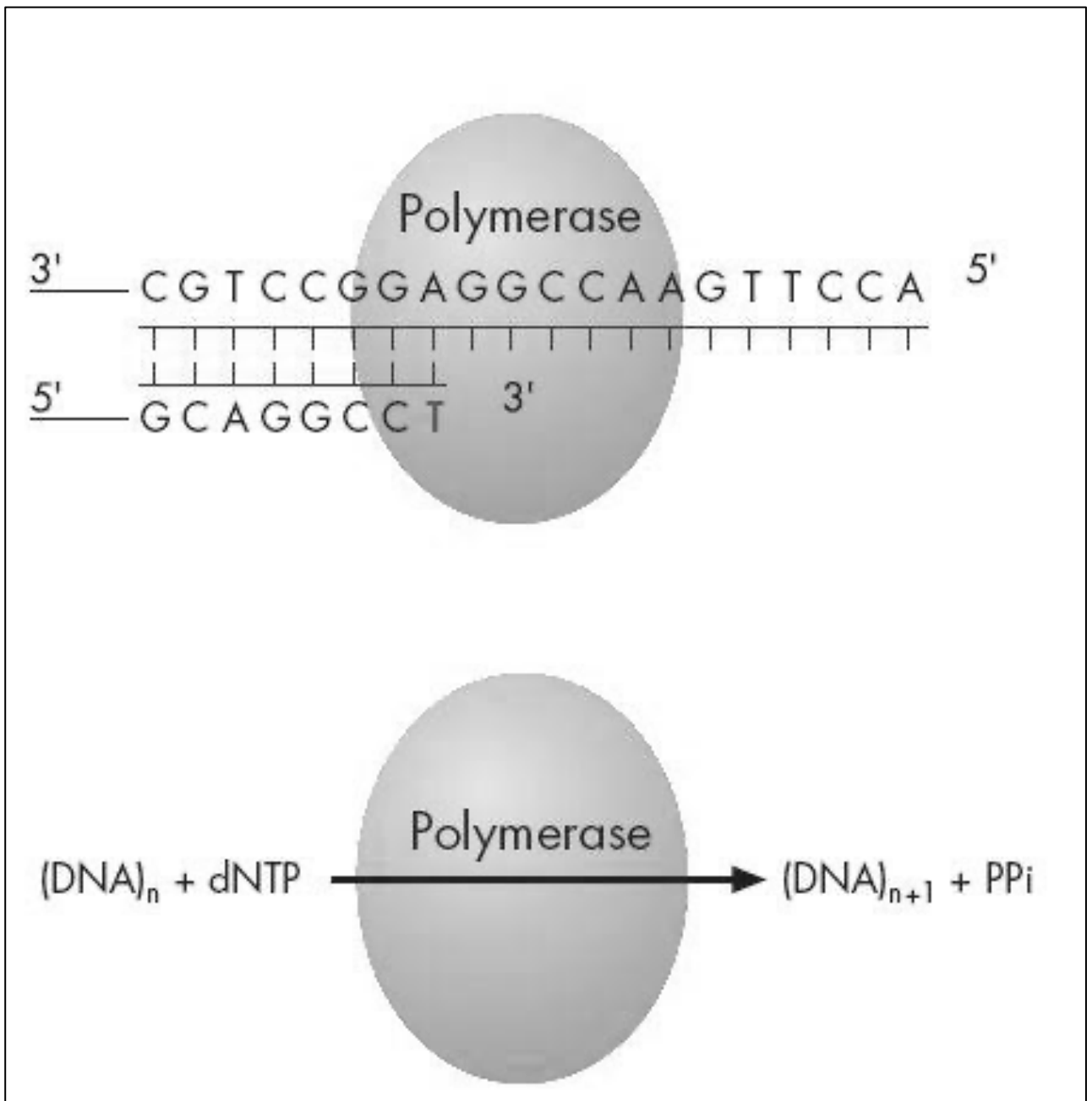


Рис.6. Первый и второй этапы пиросеквенирования.

### Этап 3.

С помощью фермента сульфаразы из пирофосфата образуется АТФ. При ее взаимодействии с люциферинном генерируется видимый свет, пропорционально количеству молекул АТФ. Пиросеквенатор детектирует этот свет и преобразует его в соответствующий пик на пирограмме. Высота каждого пика (световой сигнал) пропорциональна количеству встроенных нуклеотидов в цепь ДНК (рисунок 4). Например, если в определенном положении цепи ДНК имеется один

нуклеотид С – на пиетрограмме будет виден пик, соответствующий однократной вспышке, а если подряд три нуклеотида С – трехкратной вспышке (т. е. пик будет в три раза выше). Если же добавляемый в реакцию нуклеотид не комплементарен изучаемому участку ДНК, выделения пирофосфата, а следовательно, и вспышки, не происходит.

#### Этап 4.

Апираза, нуклеотид-разрушающий фермент, постоянно убирает оставшиеся не присоединенными нуклеотиды и АТФ. Затем в реакционную смесь добавляется следующий нуклеотид (рисунок 7).

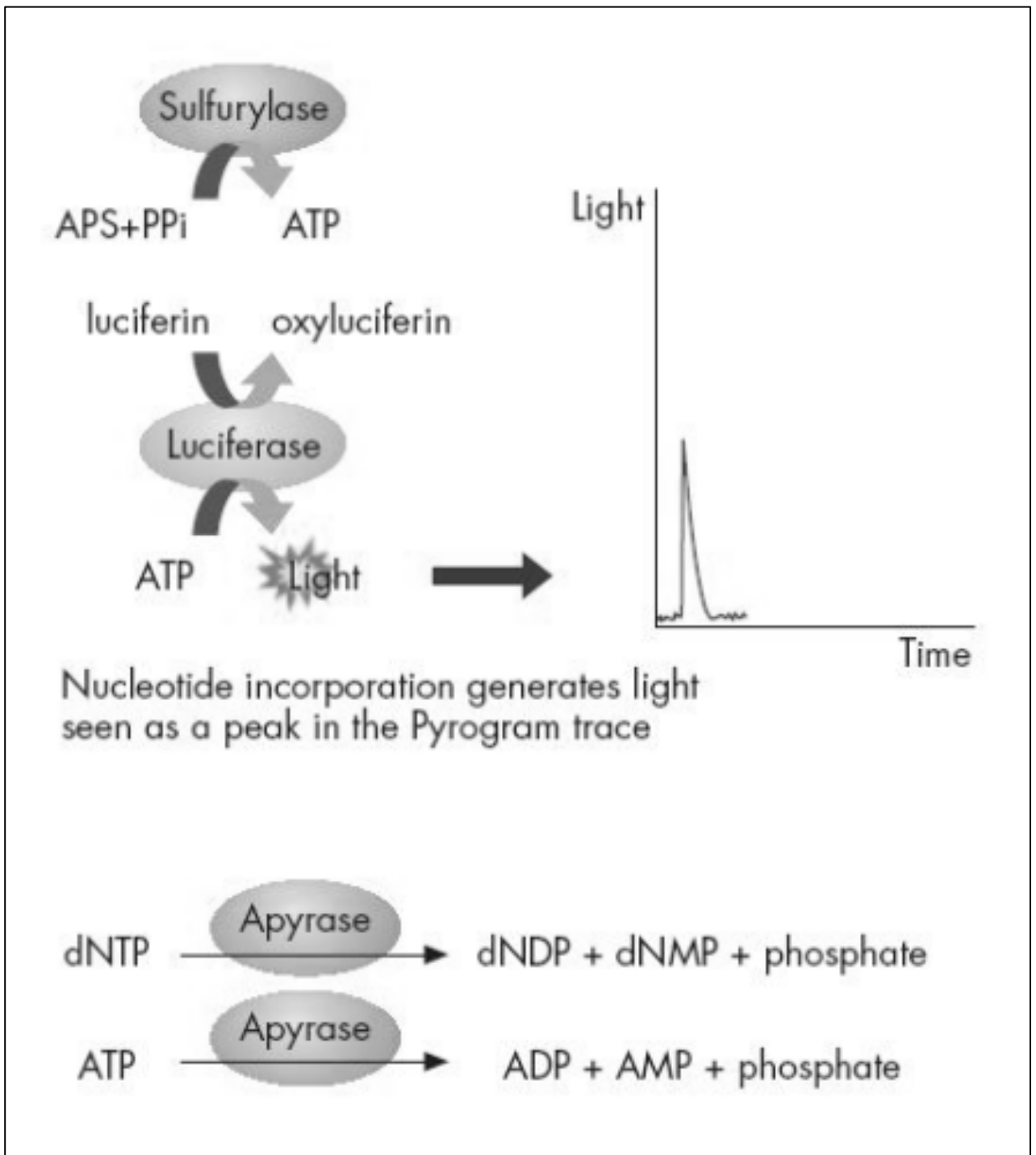


Рис.7. Третий и четвертый этапы пиросеквенирования.

Вышеизложенная процедура повторяется до тех пор, пока полностью не достроится анализируемая цепь ДНК. В итоге пирোগрамма выглядит так, как представлено на рисунке 8.

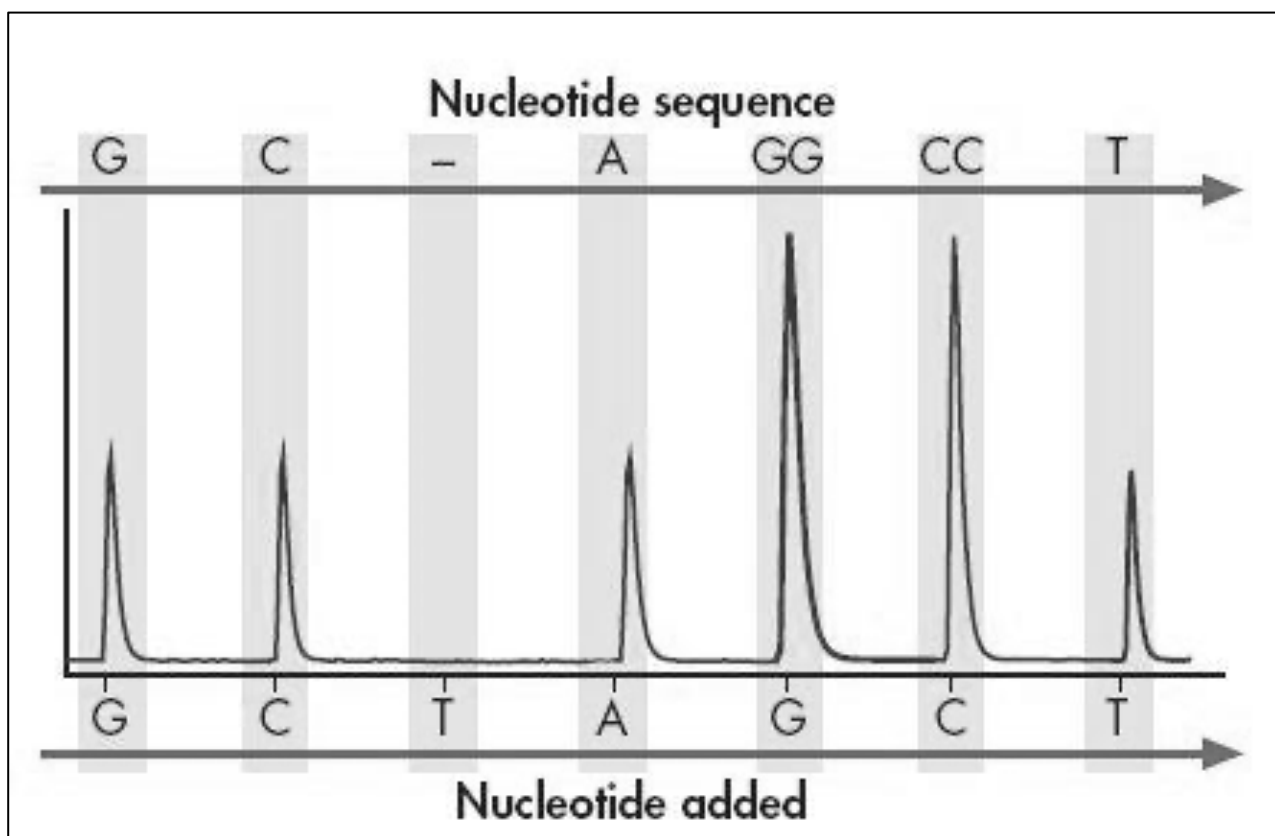


Рис.8.Пирограмма.

Следует отметить, что метод пиросеквенирования отличается от других методов секвенирования тем, что исследуется небольшой фрагмент ДНК (от 5 до 30 нуклеотидов), в который входит анализируемый участок и несколько контрольных соседних нуклеотидов. Анализ последовательности начинается с места присоединения к ПЦР-фрагменту ДНК праймера для секвенирования.

Пробоподготовка и пиросеквенирование проводится с использованием стандартной операционной процедуры.

#### **2.2.9.2 Количественное определение уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома**

Количественная оценка мутантного аллеля заключалась в расчете уровней гетероплазии мутаций мтДНК с использованием значений высоты пиков пирограмм образцов нашей выборки в исследуемой области одноцепочечного ПЦР-фрагмента митохондриального генома. Для определения порогового уровня гетероплазии митохондриальных мутаций, ассоциированных с

возникновением и развитием патологий в организме человека, Сазоновой М.А. с соавторами был разработан метод прямой количественной оценки митохондриального генома [3, 84].

Наша задача заключалась в оценке процента гетероплазии исследуемой мутации, то есть отношения количества фрагментов митохондриальных геномов, содержащихся в данной пробе, несущих исследуемую мутацию, к общему их количеству. Общая формула для подсчёта процента гетероплазии выглядит следующим образом:

$$P = \frac{h - N}{M - N} \cdot 100\%$$

где P – процент гетероплазии;

h – высота пика исследуемого нуклеотида,

N – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100% нормальных аллелей;

M – высота пика исследуемого нуклеотида, соответствующая наличию в образце 100% мутантных аллелей.

Пирограмма считалась пригодной для анализа, если соответствовала следующим требованиям:

- Наличие четко выраженных пиков, значительно превышающих фоновый уровень (т. е. среднее значение высоты пика пирограммы для нуклеотида, отсутствующего в исследуемой последовательности);
- Отсутствие пиков в отрицательном контроле.

Важным этапом в анализе пирограммы был выбор контрольных пиков. В каждом отдельном случае выбирались позиции митохондриального генома, которые являлись контрольными и в 100% случаев были представлены определённым нуклеотидом в митохондриальной ДНК данной популяции. По высотам этих пиков на пирограмме можно было судить о гипотетической высоте пика при 100% гетероплазии для исследуемой позиции. Их сумму делили на количество позиций генома, представленных данными пиками. В случае, если



исследуемая последовательность была длиннее 12 нуклеотидов, в качестве контрольных пиков брали те, которые лежали в области мутации  $\pm 4$  позиции на гистограмме.

В пирограмме находились исследуемые пики (как правило, два), представляющие одну позицию в геноме, и, следовательно, в сумме дающие высоту контрольного пика – условную единицу. От того, какой процент от этой условной единицы составляла высота пика нуклеотида, на который идёт замена при мутировании, и зависел процент гетероплазии [1,3].

Пример расчета процента гетероплазии мутации митохондриального генома представлен на рисунке 9 [3, 84].

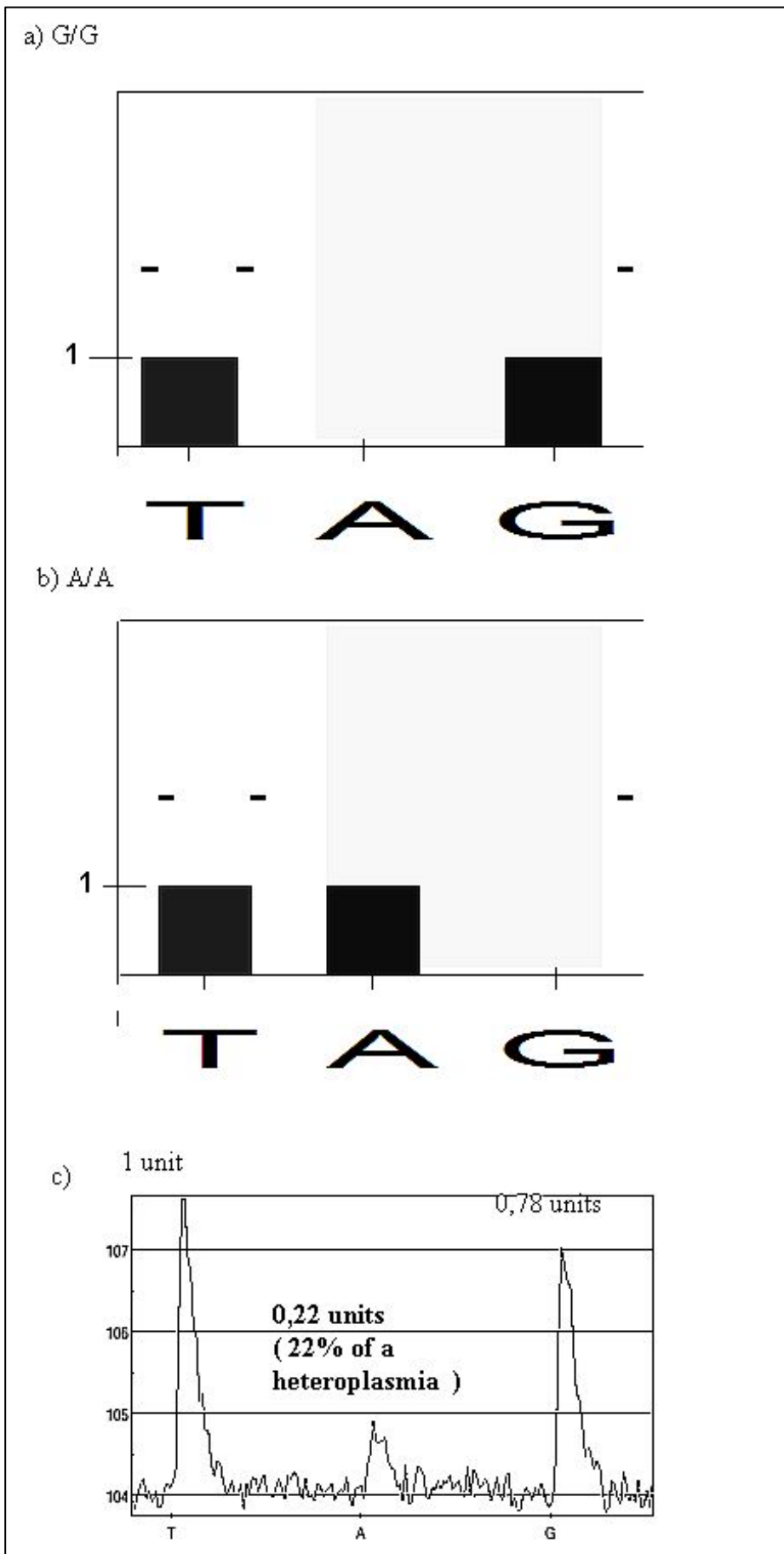


Рис.9. Расчет процента гетероплазии на примере мутации m.3256C>T [3, 84].

В данном случае позиция  $T_1$  является контрольной и в 100% случаев представлена тимином в митохондриальной ДНК данной популяции. По высоте этого пика на пирограмме можно судить о гипотетической высоте пика при 100% (рисунок 6-b) или 0% (рисунок 6-a) гетероплазии для исследуемой позиции. Далее в пирограмме следуют 2 пика –  $A_2$  и  $G_3$ , представляющие одну позицию в геноме. Исследуемый мутантный пик -  $A_2$  равен 0.22 условные единицы, а, следовательно, процент гетероплазии равен 22 [1,3].

### **2.2.10 Методы статистического анализа данных**

Построение графиков и диаграмм проводили с помощью программного пакета OriginPro 2018 SR1 версии 9.5.1.195 (OriginLabCorp., США).

Статистический анализ данных проводили с помощью программного пакета Prism версии 9.1.0 (GraphPadSoftware, США).

Анализ данных по уровню мембранного потенциала проводился с использованием Т-теста для независимых выборок. Данный критерий используется для определения статистической значимости различий средних величин по уровню какого-либо количественного признака. Для применения Т-теста Стьюдента исходные данные проверялись на нормальность распределения двумя критериями: Колмогорова-Смирнова в модификации Лиллифорса и Д'Агостино.

Анализ данных по митохондриальной массе проводился с использованием U-критерия Манна—Уитни для независимых выборок (непараметрического статистического критерия, используемого для сравнения двух независимых выборок по уровню какого-либо признака, измеренного количественно).

Анализ данных по вариабельности гетероплазии мутаций митохондриального генома в различных типах клеток и тканей человека проводился с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона (непараметрического статистического критерия, используемого для сравнения двух связанных (парных) выборок по уровню какого-либо количественного признака, измеренного в непрерывной или в порядковой шкале).

### **Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1 Определение влияния мутаций митохондриального генома на митохондриальную дисфункцию в цитоплазматических гибридных клетках**

Для того чтобы создать цитоплазматическую клеточную линию для начала необходимо получить так называемую «безмитохондриальную (rho0) клеточную линию», т. е. клеточную линию, в которой отсутствуют митохондрии или их количество сильно редуцировано.

Изучение уровня мембранного потенциала и митохондриальной массы в нативной, безмитохондриальной и гибридных линиях может показать как на морфологические, так и биоэнергетические изменения, происходящие в функциональном состоянии митохондрий с разным уровнем дисфункции митохондриального генома.

Изучение клеточного дыхания на гибридной клеточной модели даст возможность прямой оценки эффективности работы митохондриального генома и, в частности, синтеза комплексов дыхательной цепи.

##### **3.1.1 Создание безмитохондриальной клеточной линии на основе культуры ТНР-1**

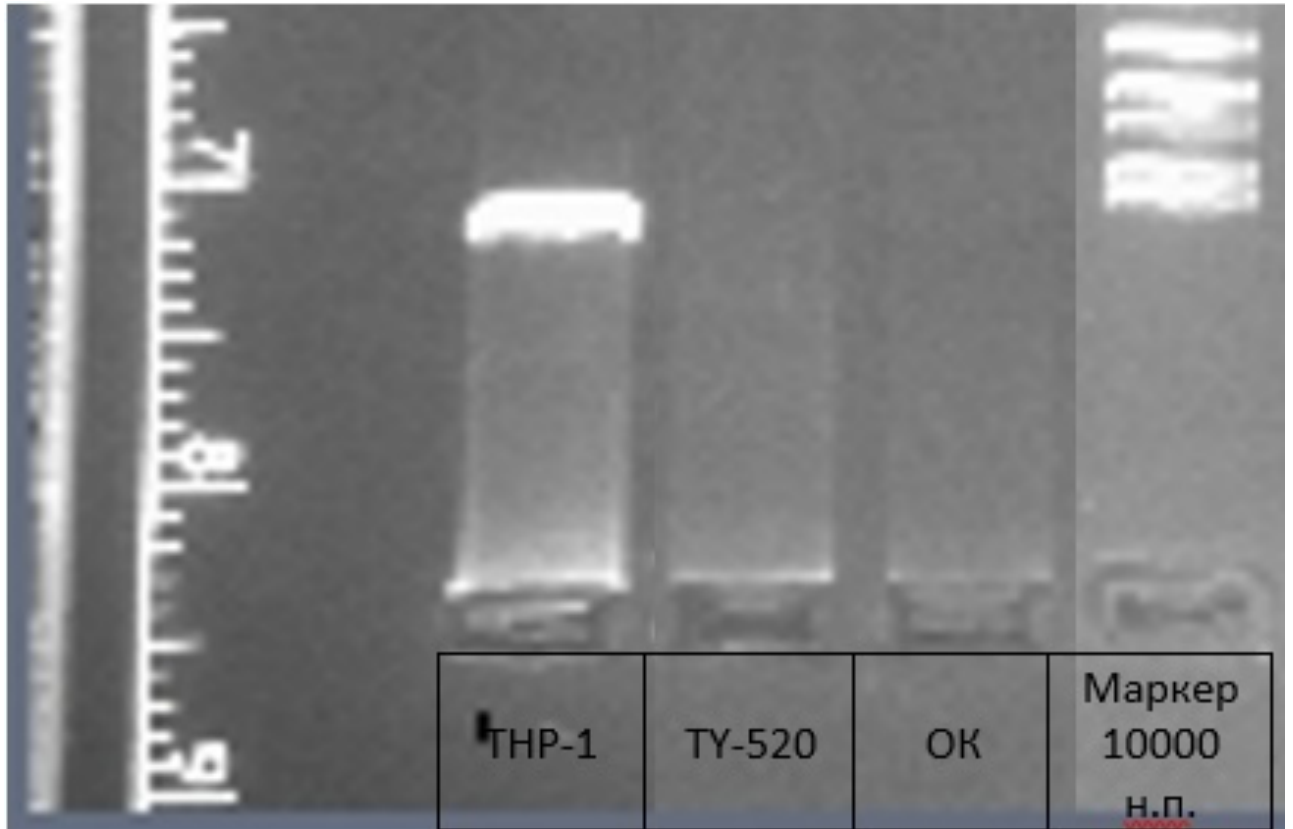
В ходе данного исследования была получена безмитохондриальная клеточная линия (ТУ-520) на основе культуры ТНР-1. Для проверки возможности получения безмитохондриальной культуры ТНР-1 культивировалась в ростовой среде с добавлением 2500 мг/л D-глюкозы, 110 мкг/мл пирувата натрия, 500 нг/мл EtBr и 200 мкг/мл уридина, а также в ростовой среде с добавлением 2500 мг/л D-глюкозы, 110 мкг/мл пирувата натрия, 500 нг/мл EtBr и без уридина. Через 2 недели клетки на среде без уридина погибли, следовательно возможность получить безмитохондриальную клеточную линию из культуры ТНР-1 есть.

Далее культура ТНР-1 культивировалась в ростовой среде с добавлением 2500 мг/л D-глюкозы, 110 мкг/мл пирувата натрия, 500 нг/мл EtBr и 200 мкг/мл

уридина. Продолжительность культивации составила 18 недель с пересеванием культуры каждые 2–3 дня.

По окончании срока культивации была получена культура ТУ-520.

Для проверки полученной культуры на безмитохондриальность проводилась лонг-ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов ПЦР



(рисунок 10) и определение копийности ДНК с помощью красителя SYBR(рисунок 11).

Рис.10. Детекция митохондриального генома в безмитохондриальной культуре и нативной клеточной линии. ТНР-1 - нативная клеточная линия, ТУ-520 – безмитохондриальная клеточная линия, ОК – отрицательный контроль.

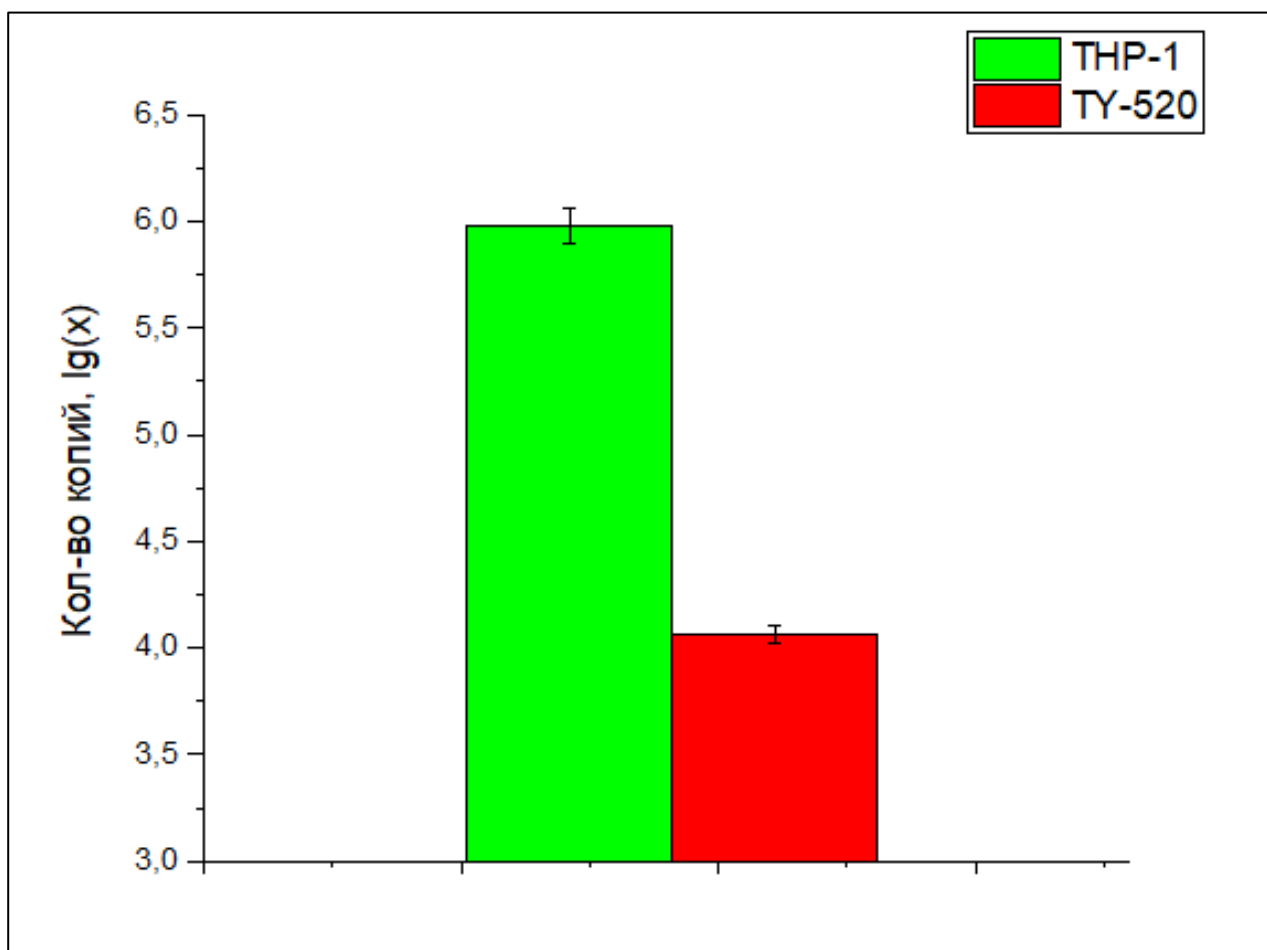


Рис. 11. Количество копий митохондриального генома в безмитохондриальной культуре и нативной клеточной линии.

Из рисунка 10 следует, что в культуре TY-520 нет цельного участка мтДНК ( $\approx 8000$  н.п.), а на рисунке 11 показано, что в безмитохондриальной культуре количество копий мтДНК составляет 1% (меньше в 100 раз) от исходного количество копий мтДНК в нативной культурой клеток THP-1.

### **3.1.2 Создание цитоплазматических гибридов на основе безмитохондриальной клеточной линии**

На базе клеточной линии TY-520 были созданы гибридные линии, несущие определенную мутационную нагрузку. В настоящем исследовании в качестве доноров митохондрий использовались тромбоциты от пациентов поликлиники ГКБ №68. Образцы крови, из которых были выделены тромбоциты, отбирались исходя из порогового значения гетероплазии мутаций митохондриального

генома, ассоциированного с атеросклеротическими бляшками [1]. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8

Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в цельной крови доноров тромбоцитов.

Образец	Суммарная мутационная нагрузка	m.3336T>C	m.1555A>G	m.3256C>T	m.13513G>A	m.12315G>A
ТС- HSM1	Высокий уровень гетероплазии	0	0	50	24	44
ТС- LSM1	Низкий уровень гетероплазии	5	17	15	19	0

Красным шрифтом отмечен уровень гетероплазии мтДНК, превышающий пороговое значение.

Для проверки полученных цибридных культур проводилась лонг-ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов ПЦР (рисунок 12) и определение копийности ДНК с помощью красителя SYBR (рисунок 13).

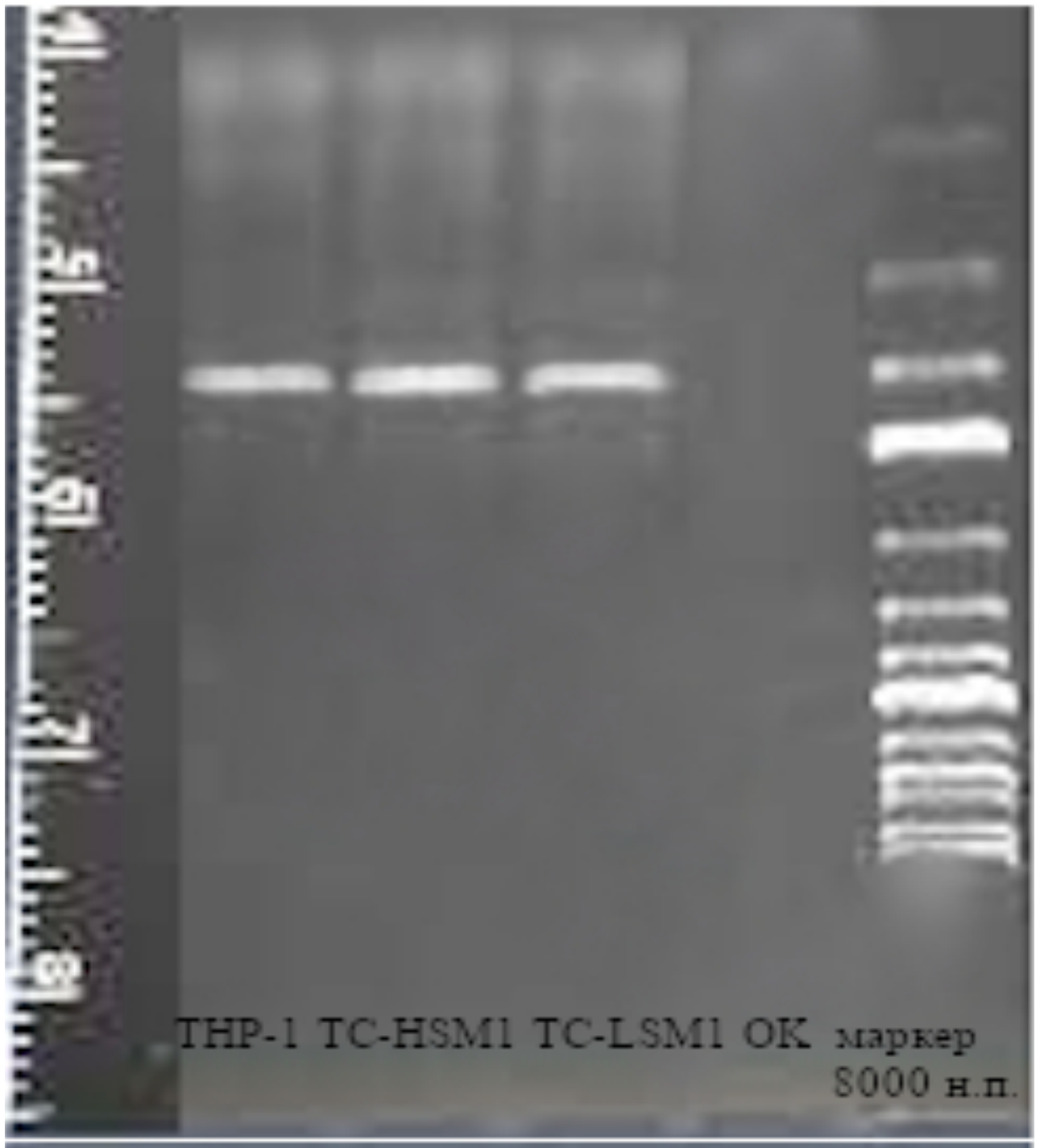


Рис. 12. Детекция митохондриального генома в нативной и в гибридных линиях. TNP-1 - нативная клеточная линия, TC-HSM1 – гибридная клеточная линия с высоким уровнем гетероплазии, TC-LSM1 – гибридная клеточная линия с низким уровнем гетероплазии, OK – отрицательный контроль.



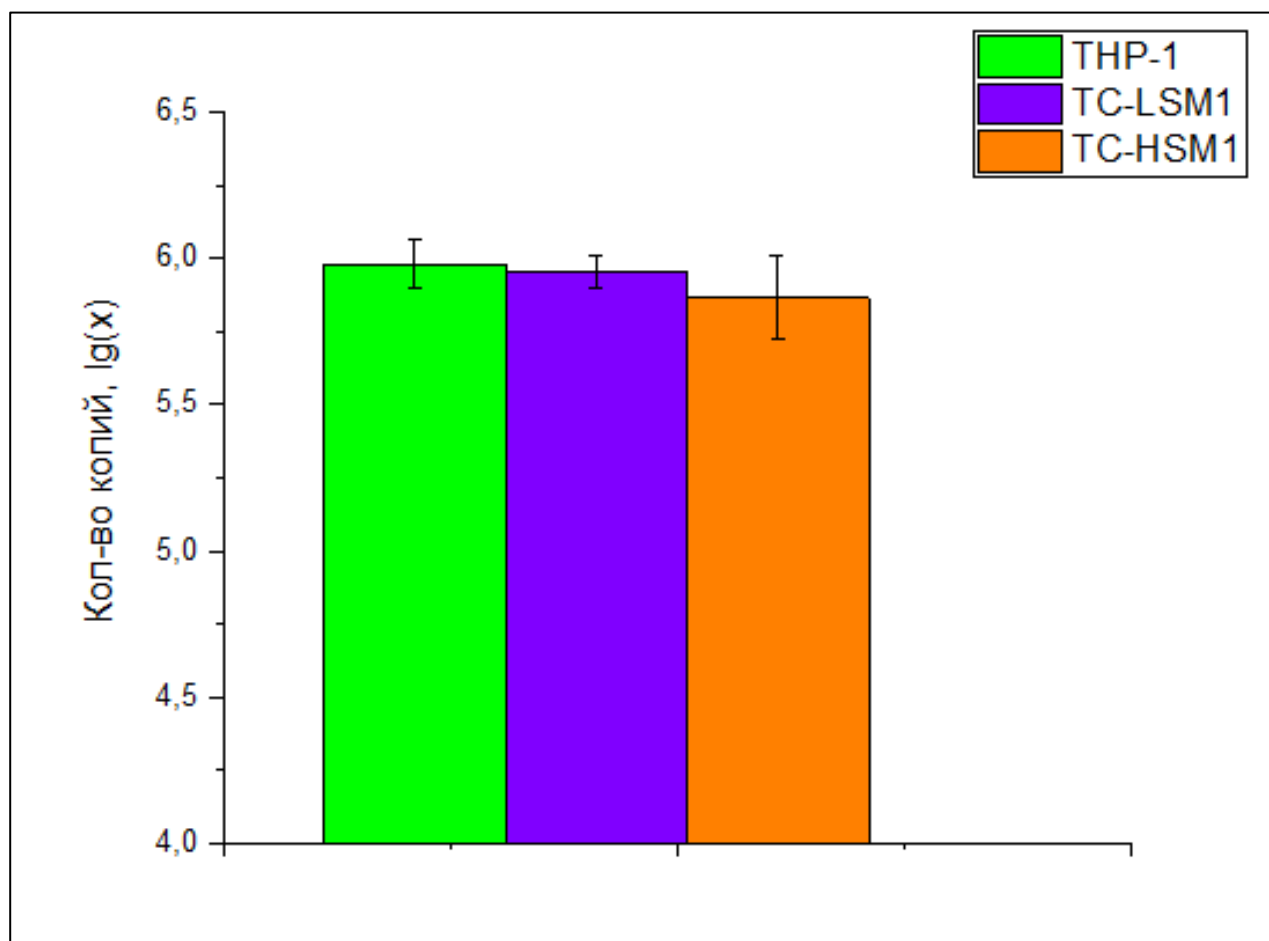


Рис. 13. Количество копий митохондриального генома в нативной и в гибридных линиях.

Из рисунка 12 следует, что в гибридных культурах, так же как и в нативной линии THP-1, детектируется цельный участок мтДНК ( $\approx 8000$  н.п.), а на рисунке 13 показано, что в гибридных культурах, так же как и в нативной линии THP-1, количество копий мтДНК находится примерно на одном уровне .

### 3.1.3 Уровень мембранного потенциала

Измерение мембранного потенциала проводили с помощью конфокального микроскопа ZeissLSM710 с камерой LSMT-PMT. Уровень мембранного потенциала определяли по интенсивности свечения красителя TMRM. Митохондриальную массу определяли по соотношению красителей TMRM/Calcein.

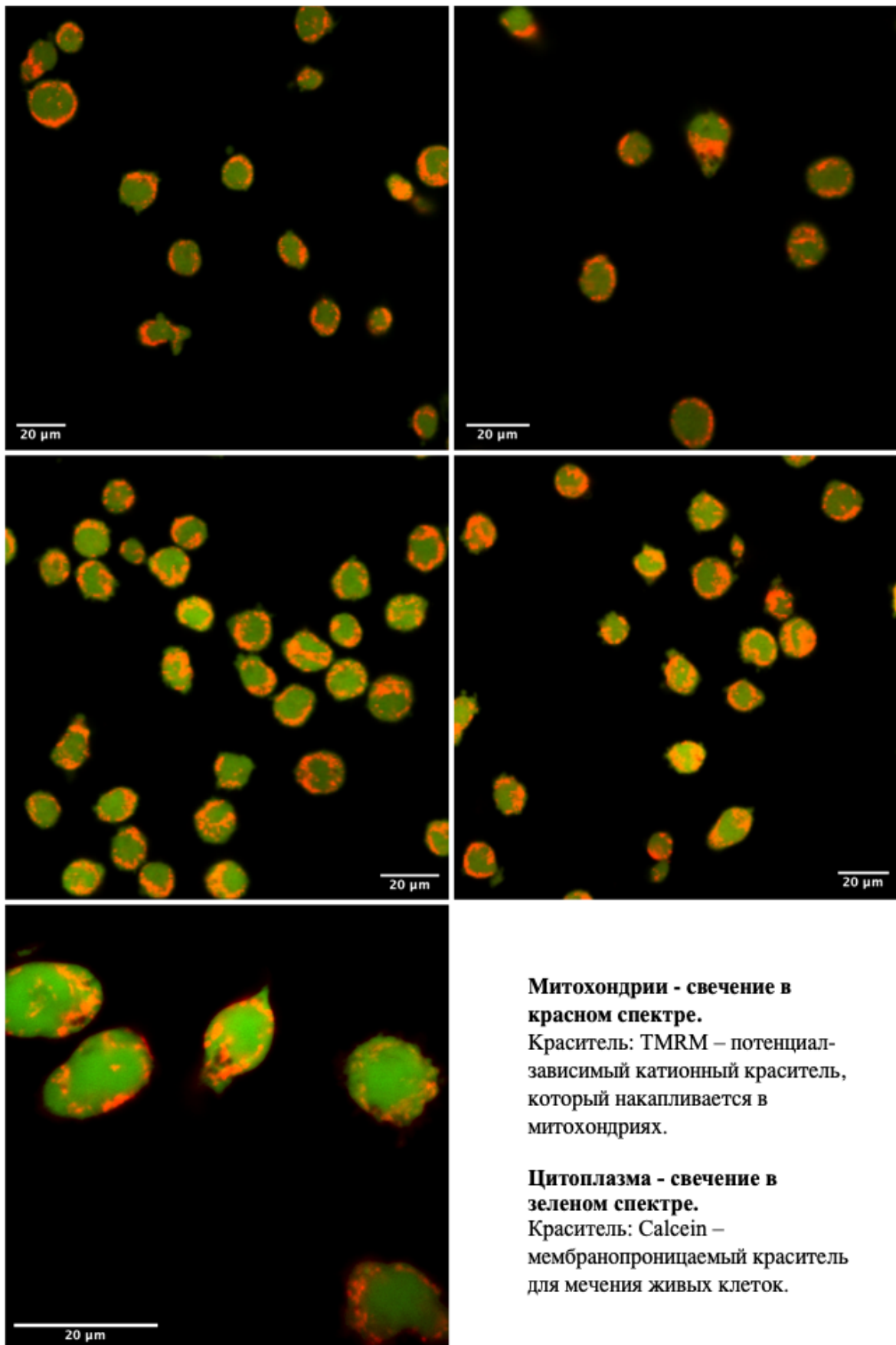


Рис. 14. Микрофотографии нативной линии (ТНР-1).

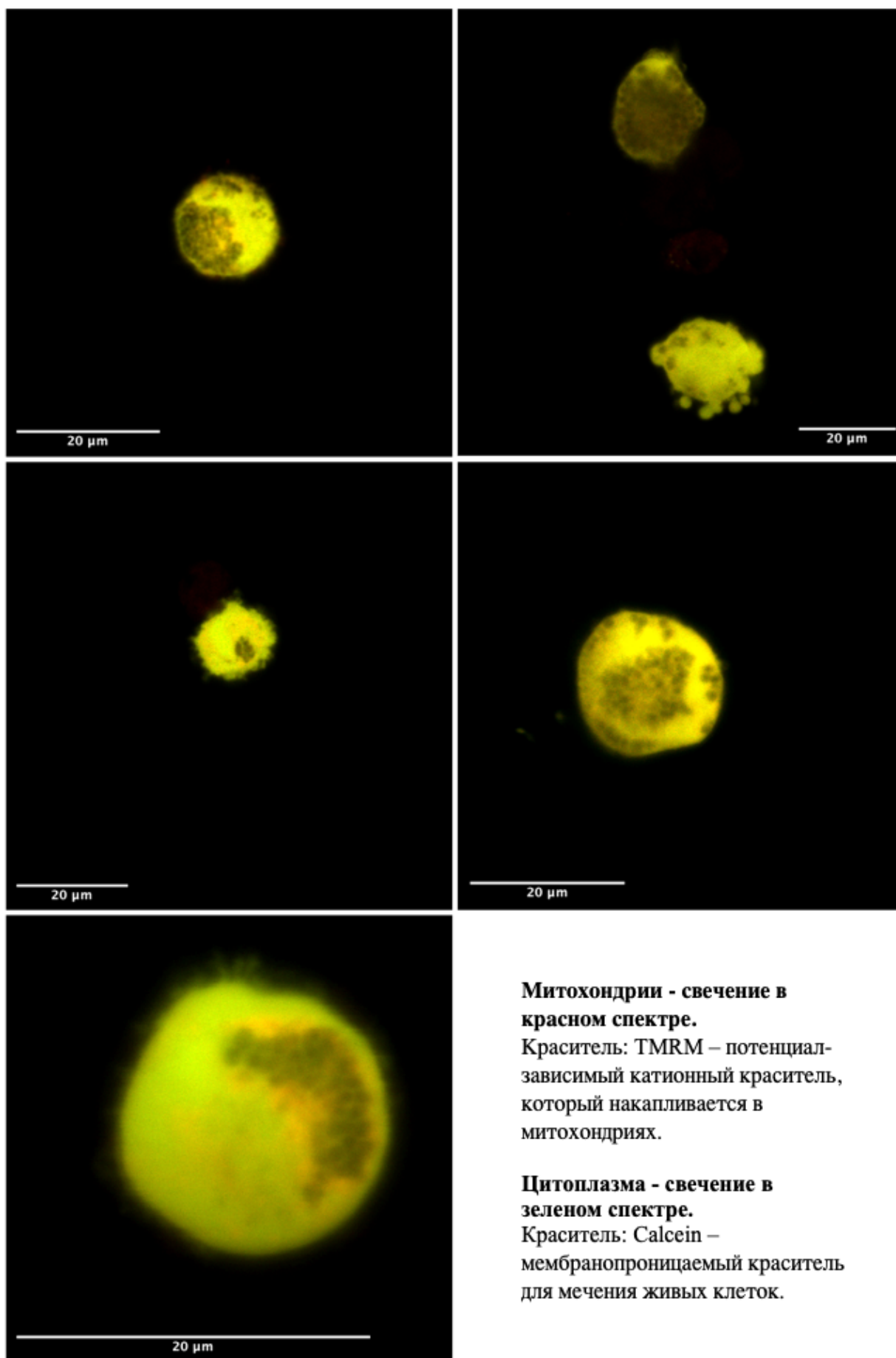


Рис. 15. Микрофотографии безмитохондриальной линии (TY-520).

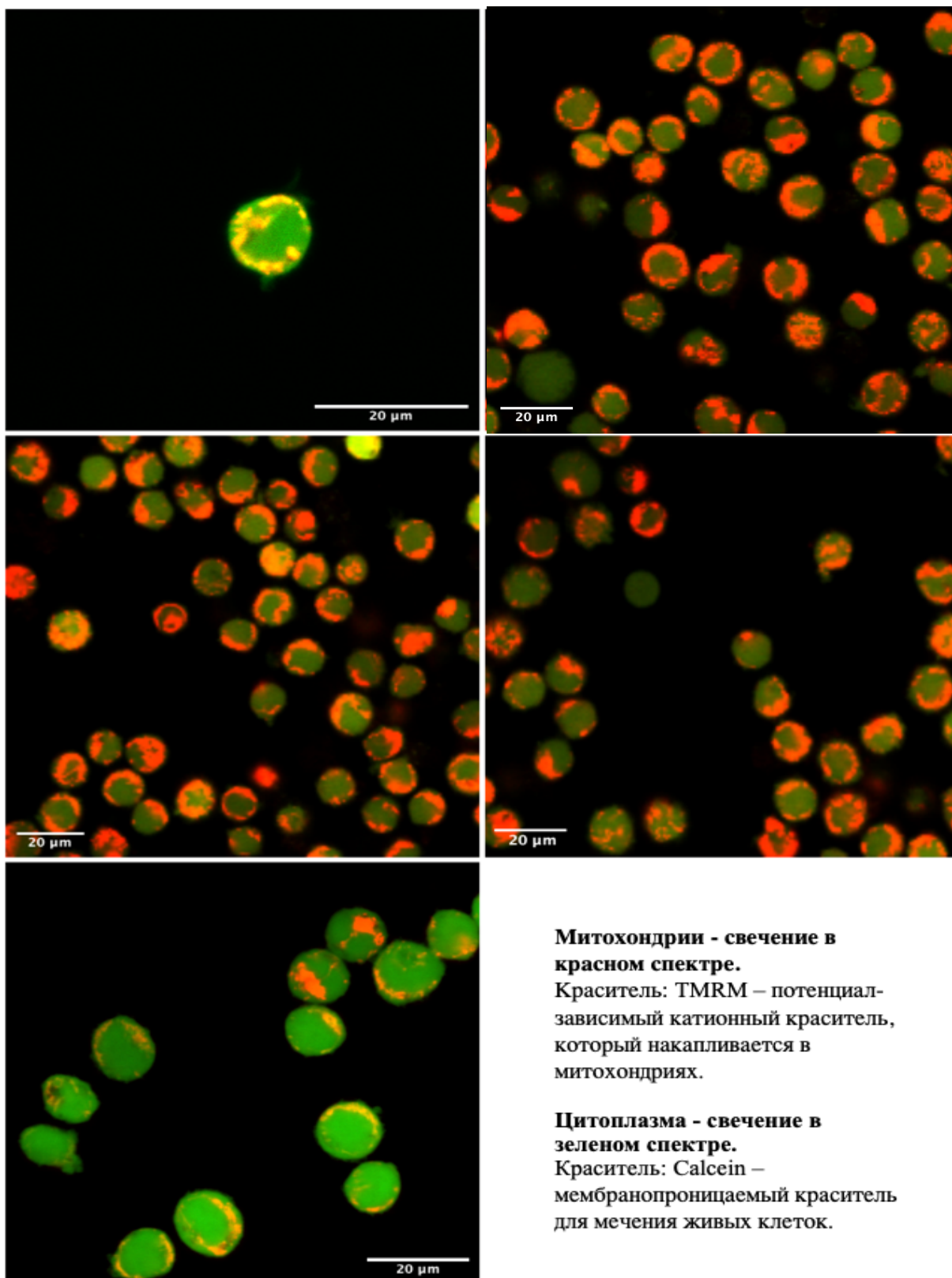


Рис. 16. Микрофотографии гибридной линии с низким суммарным уровнем гетероплазмы (TC-LSM1).

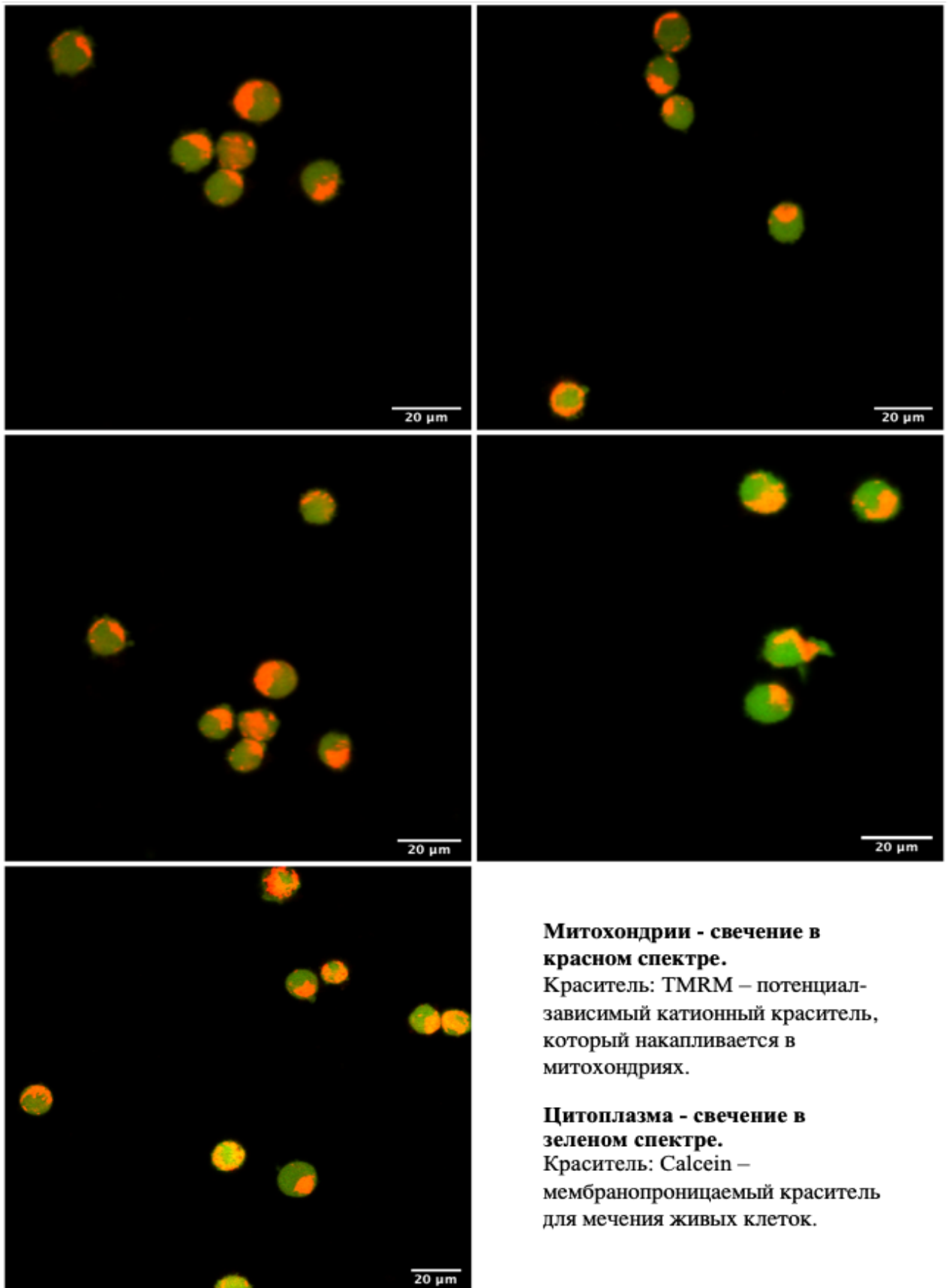


Рис. 17. Микрофотографии гибридной линии с высоким суммарным уровнем гетероплазии (TC-HSM1).

Из рисунка 15 следует, что в безмитохондриальной культуре (ТУ-520) невозможно детектировать свечение красителя TMRM, а следовательно, и митохондрии на том же уровне, что и в культуре ТНР-1 (рис. 14). Если митохондрии в культуре ТУ-520 и есть, то определить их локализацию и функциональную активность не предоставляется возможным, во всяком случае, с помощью конфокальной микроскопии. В гибридных линиях (рис. 16 и 17), напротив, уровень свечения красителя TMRM на достаточном уровне и, как и в культуре ТНР-1, позволяет определить локализацию митохондрий в клетке.

Таблица 9

Уровень мембранного потенциала в нативной (ТНР-1), безмитохондриальной (ТУ-520) и гибридных (ТС-LSM1 и ТС-HSM1) линиях

Клеточная линия	Интенсивность свечения TMRM(aU)
ТНР-1	1322,99
ТУ-520	Н/Д
ТС-HSM1	1314,67
ТС-LSM1	2485,32

Далее был проведен статистический анализ полученных данных с использованием Т-теста для независимых выборок с предварительной проверкой нормальности по критериям Колмогорова-Смирнова в модификации Лиллифорса и Д'Агостино:

ТНР-1 - ТС-HSM1:	0,28
ТНР-1 - ТС-LSM1:	0,01
ТС-HSM1- ТС-LSM1:	0,01

Достоверными считали различия при 95% уровне значимости. Из таблицы 9 следует, что уровень мембранного потенциала в культуре ТС-LSM1 (низкий уровень гетероплазии) в 1,9 раз выше, чем в культуре ТС-HSM1 (высокий

уровень гетероплазии). На таком же уровне значимости разница в уровне мембранного потенциала между нативной и цибридной с низким уровнем гетероплазии культурами.

Таблица 10

Митохондриальная масса нативной (ТНР-1), безмитохондриальной (ТУ-520) и цибридных (ТС-LSM1 и ТС-HSM1) линий

Клеточная линия	Отношение интенсивности свечения TMRM/Calcein
ТНР-1	35,52
ТУ-520	Н/Д
ТС-HSM1	22,22
ТС-LSM1	34,86

Далее был проведен статистический анализ полученных данных с использованием U-критерий Манна—Уитни для независимых выборок:

ТНР-1 - ТС-HSM1	0,03
ТНР-1 - ТС-LSM1	0,22
ТС-HSM1- ТС-LSM1	0,03

Достоверными считали различия при 95% уровне значимости. Из таблицы 10 следует, что митохондриальная масса в культуре ТС-LSM1 (низкий уровень гетероплазии) в 1,6 раз выше, чем в культуре ТС-HSM1 (высокий уровень гетероплазии). На таком же уровне значимости разница в митохондриальной массе между нативной и цибридной с высоким уровнем гетероплазии культурами.

### 3.1.4 Оценка митохондриальной дисфункции

Оценку митохондриальной дисфункции проводили с помощью прибора OxуgraphPlus. Уровень клеточного дыхания оценивали с помощью скорости поглощения кислорода, выраженной в нг-молекул кислорода/мин.

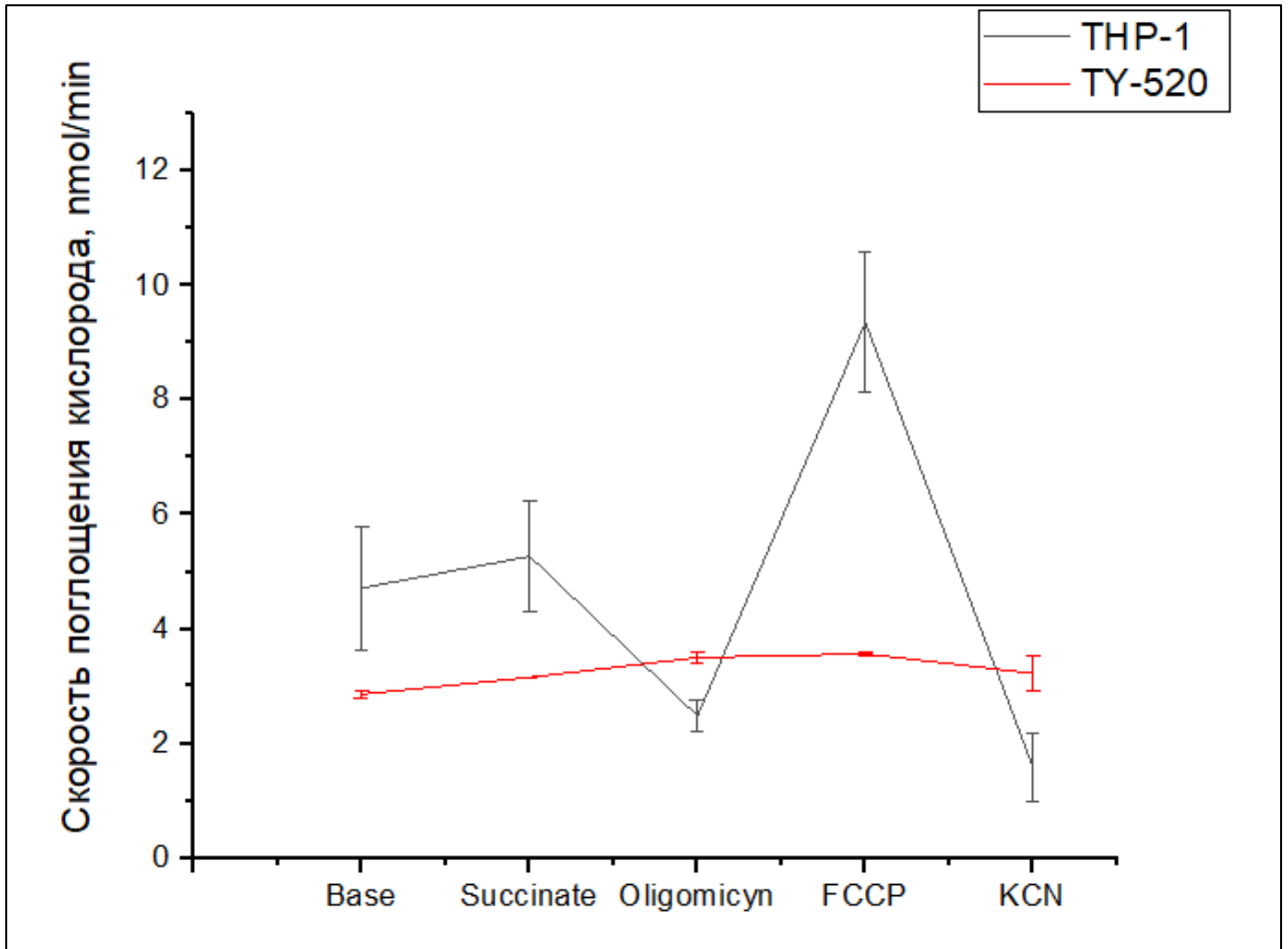


Рис.18. Клеточное дыхание нативной (ТНР-1) и безмитохондриальной (ТУ-520) линий.

На рисунке 18 видно, что безмитохондриальная линия (ТУ-520) не реагирует на различные добавки. Уровень скорости поглощения кислорода не меняется, в отличие от нативной линии (ТНР-1).



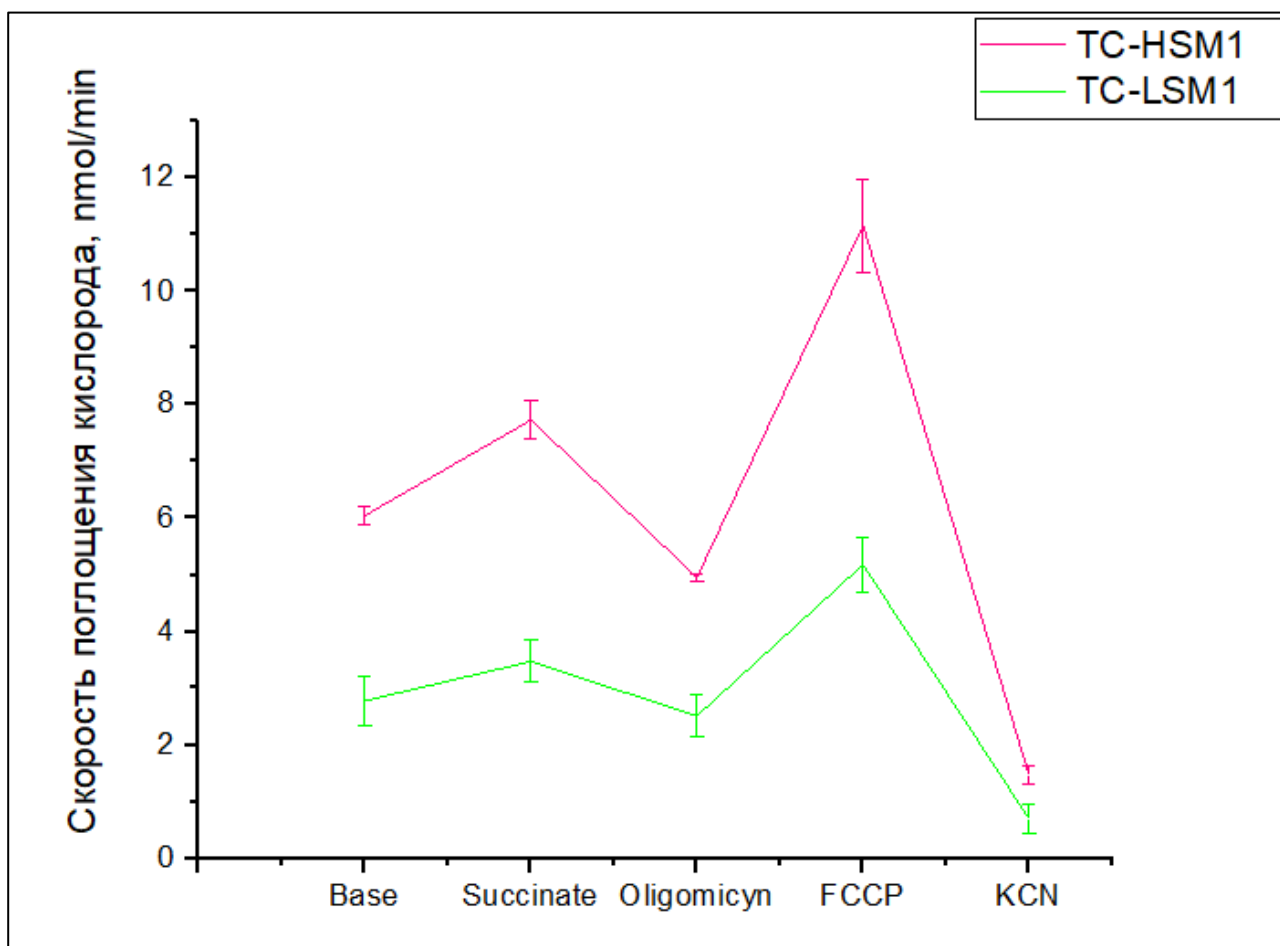


Рис.19. Клеточное дыхание гибридных линий с низким уровнем гетероплазии (TC-LSM1) и с высоким уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома (TC-HSM1).

На рисунке 19 видно, что скорость поглощения кислорода в двух гибридных линиях разная. Этот показатель выше у линии TC-HSM1.

Далее был проведен анализ биоэнергетического профиля нативной (ТНР-1), безмитохондриальной (ТУ-520) и гибридных (TC-LSM1 и TC-HSM1) линий.

Биоэнергетический профиль клеток нативной (ТНР-1), безмитохондриальной (ТУ-520) и гибридных (ТС-LSM1 и ТС-HSM1) линий

Биоэнергетический профиль Клеточная линия	Базовое дыхание	Дыхание с сукцинатом	Утечка протонов	Обмен АТФ	Максимальная дыхательная емкость	Резервная дыхательная емкость	Общая митохондриальная эффективность
ТНР-1	3,13	3,69	0,90	2,79	7,78	4,09	0,34
ТУ-520	0,36	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
ТС-HSM1	4,57	6,26	3,48	2,78	9,69	3,43	0,16
ТС-LSM1	2,08	2,78	1,82	0,96	4,49	1,71	0,17

Из таблицы 11 следует, что дыхание культуры ТУ-520 находится на уровне нулевых значений. На внесение каких-либо добавок культура не реагирует.

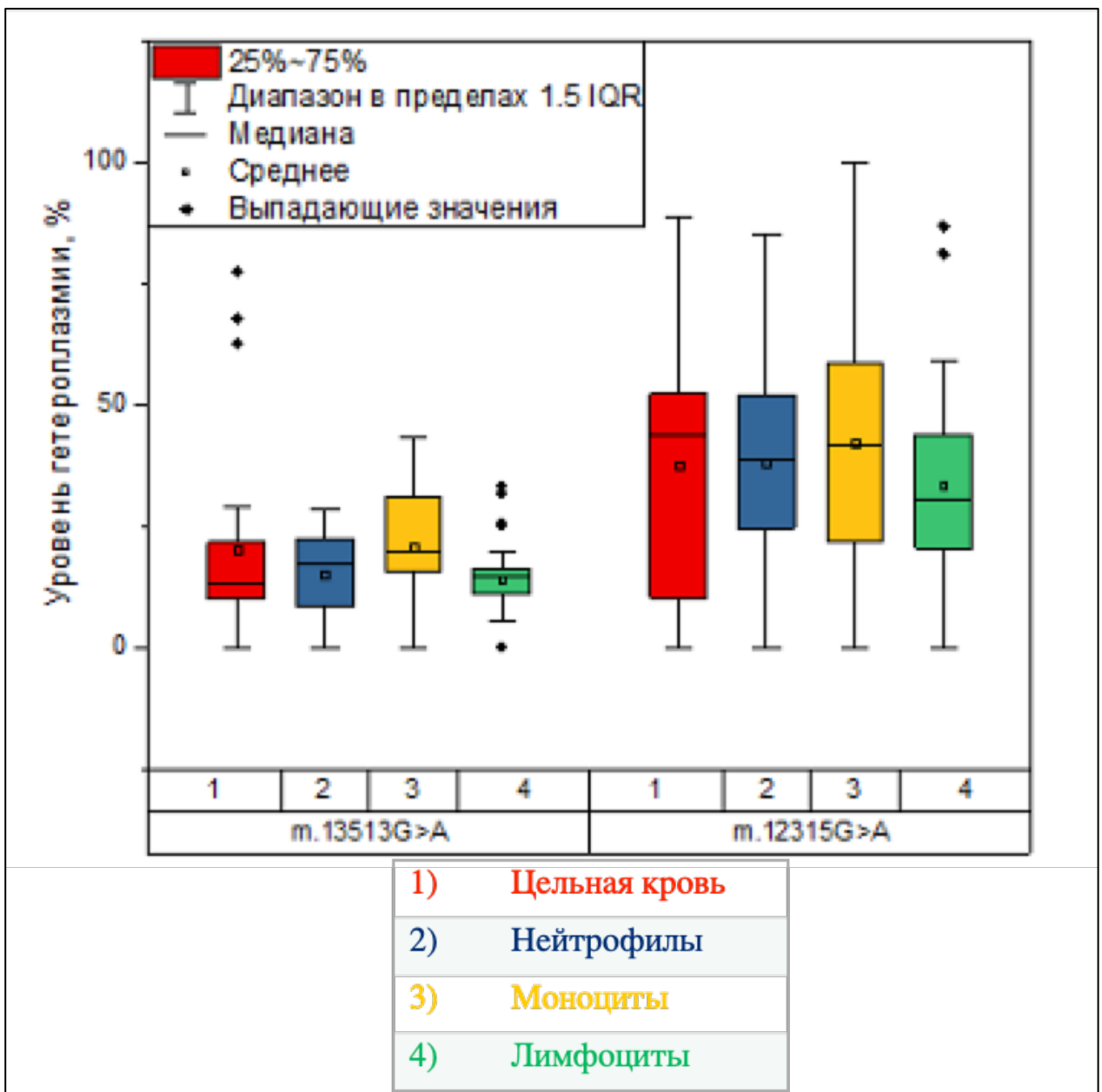
Базовое дыхание линии с высоким уровнем гетероплазии (ТС-HSM1) выше в 2,2 раза, чем у культуры с низким уровнем гетероплазии (ТС-LSM1). Общая митохондриальная эффективность у гибридных культур примерно на одном уровне, но в два раза ниже, чем в культуре ТНР-1.

### 3.2 Определение уровня гетероплазии митохондриального генома по мутациям m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C в различных типах клеток и тканей человека

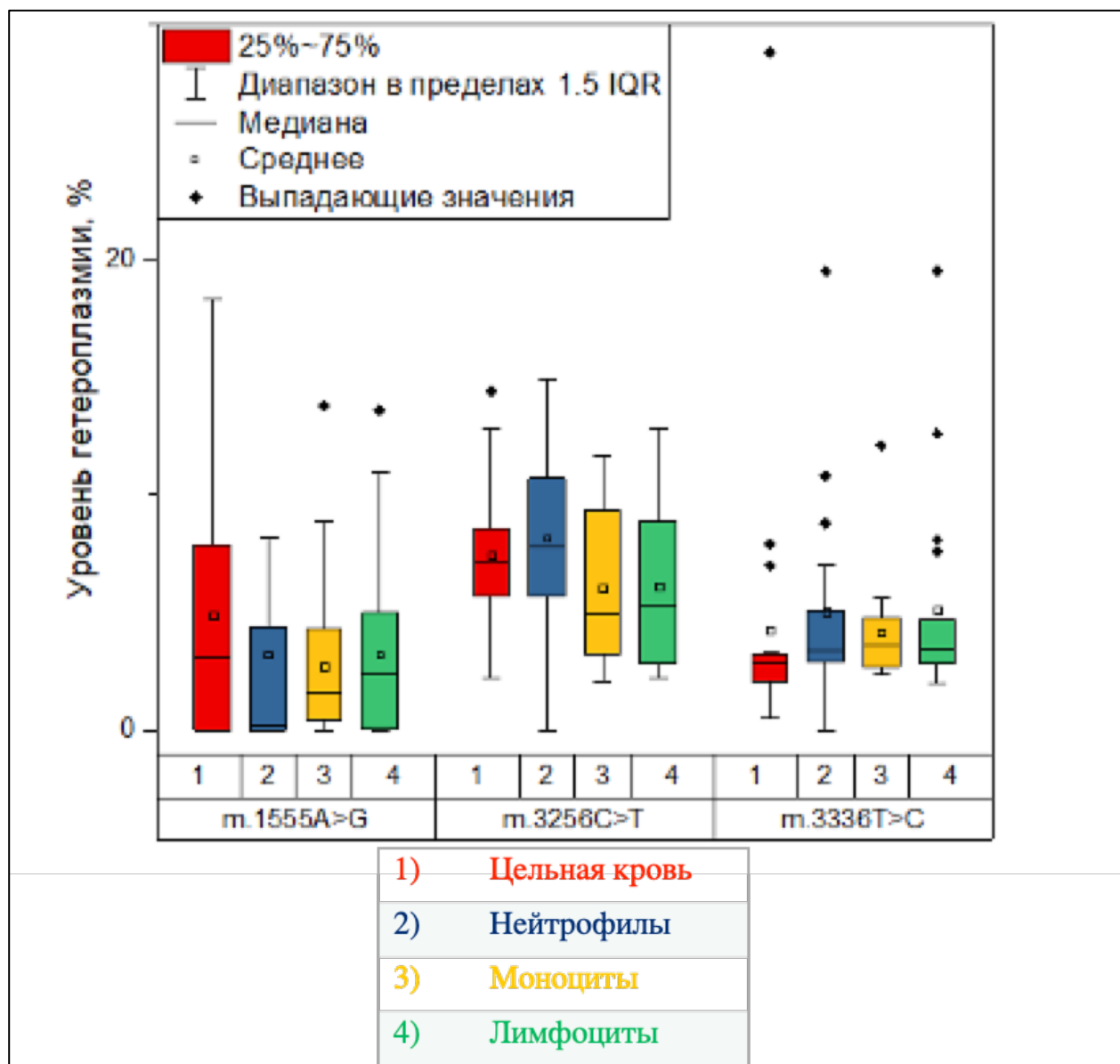
Была проведена оценка вариабельности гетероплазии мутаций митохондриального генома по пяти мутациям мтДНК, ассоциированным с атеросклерозом. Уровень гетероплазии определялся количественно с помощью пиросеквенатора PyroMark Q96 MD.

### 3.2.1 Определение уровня гетероплазии по мутациям m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C в лейкоцитах крови человека (нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах)

В настоящем исследовании получены данные об уровне гетероплазии мутаций митохондриального генома в различных типах клеток крови человека. Средние значения уровня гетероплазии, выраженные в процентах, каждой из рассматриваемых мутаций, со стандартной ошибкой среднего, представлены на рисунке 20.



А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A



Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C

Рис.20. Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в различных типах клеток крови человека от 41 донора: А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A, Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C.

Далее был проведен статистический анализ полученных данных с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона (таблица 12).

Значимость отличий уровня гетероплазии в различных типах клеток крови человека

	m.12315G>A	m.13513G>A	m.1555A>G	m.3256C>T	m.3336T>C
Цельная кровь - Нейтрофилы	0,40	0,71	0,03	0,06	0,02
Цельная кровь - Моноциты	0,23	0,47	0,03	0,33	0,27
Цельная кровь - Лимфоциты	0,15	0,57	0,12	0,25	0,23
Нейтрофилы - Моноциты	0,27	0,01	0,34	0,01	0,66
Нейтрофилы - Лимфоциты	0,19	0,56	0,13	0,01	0,93
Моноциты - Лимфоциты	0,07	0,01	0,84	0,45	0,90

Достоверными считали различия при 95% уровне значимости. Согласно статистическим данным, значимыми являются различия между нейтрофилами и моноцитами по мутациям m.13513G>A и m.3256C>T, нейтрофилами и лимфоцитами по мутации m.3256C>T, а также между моноцитами и лимфоцитами по мутации m.13513G>A.

### 3.2.2 Определение уровня гетероплазии митохондриального генома по мутациям m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C в цельной крови и буккальном эпителии

Проанализирован уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в цельной крови и буккальном эпителии. Средние значения уровня гетероплазии, выраженные в процентах, каждой из рассматриваемых мутаций, со стандартной ошибкой среднего, представлены на рисунке 21.

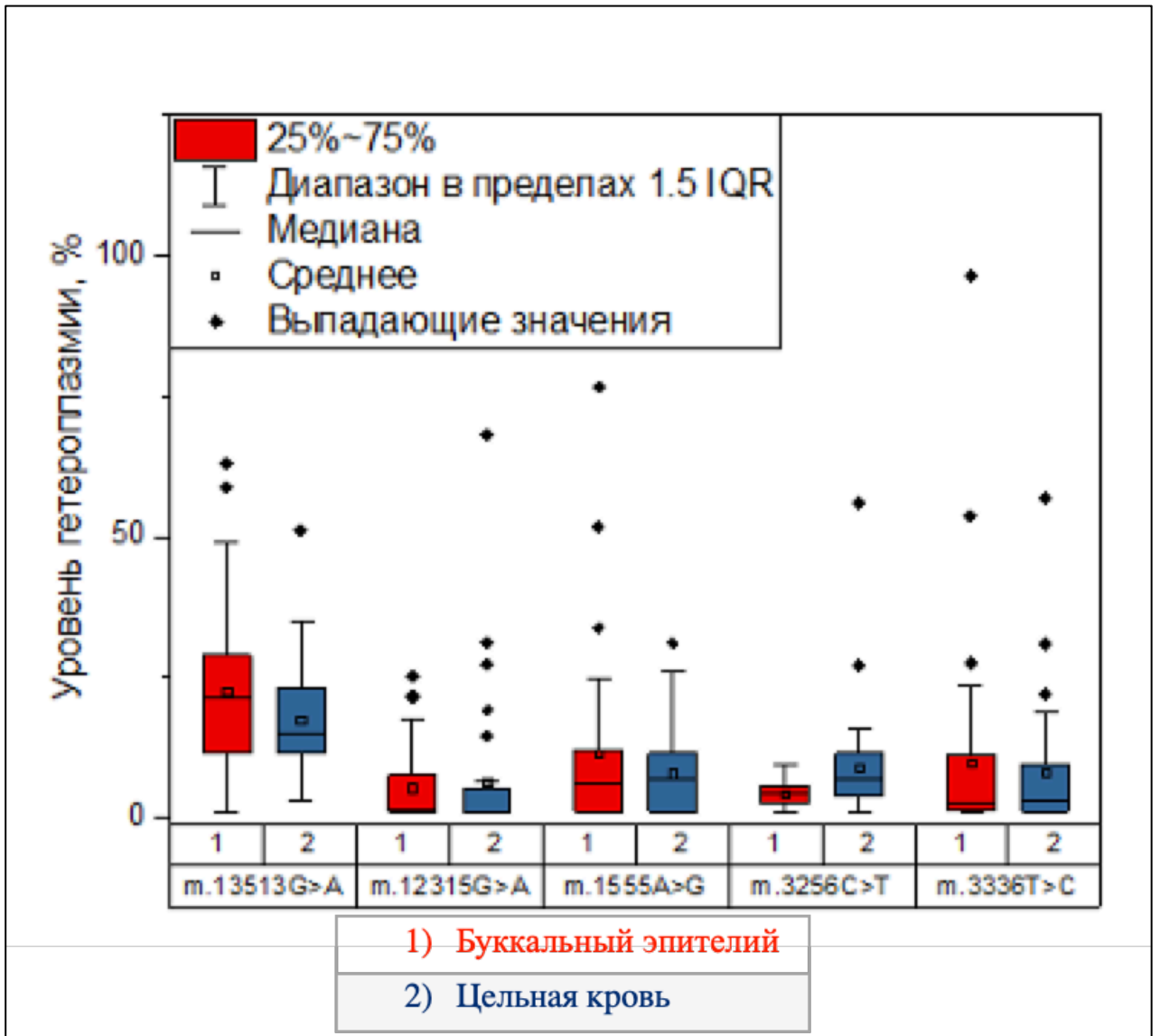


Рис.21. Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в цельной крови и буккальном эпителии от 134 доноров.

Далее был проведен статистический анализ полученных данных с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона (таблица 13).

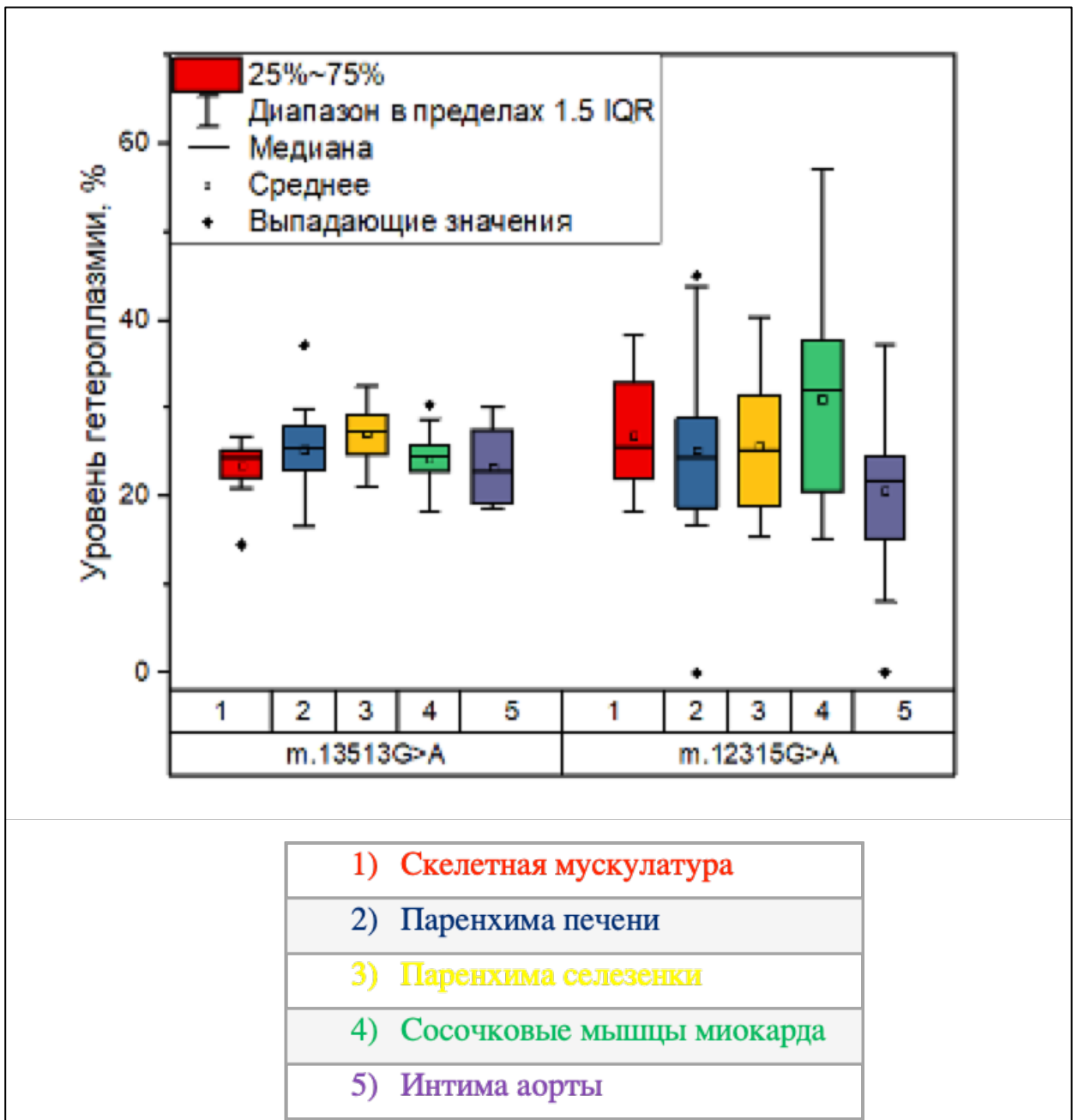
Значимость отличий уровня гетероплазмии в цельной крови и буккальном эпителии человека

	m.12315G>A	m.13513G>A	m.1555A>G	m.3256C>T	m.3336T>C
Буккальный эпителий - цельная кровь	0,01	0,64	0,07	0,01	0,01

Достоверными считали различия при 95% уровне значимости. Согласно статистическим данным, значимыми являются различия между буккальным эпителием и клетками цельной крови по мутациям m.12315G>A, m.3256C>T и m.3336T>C.

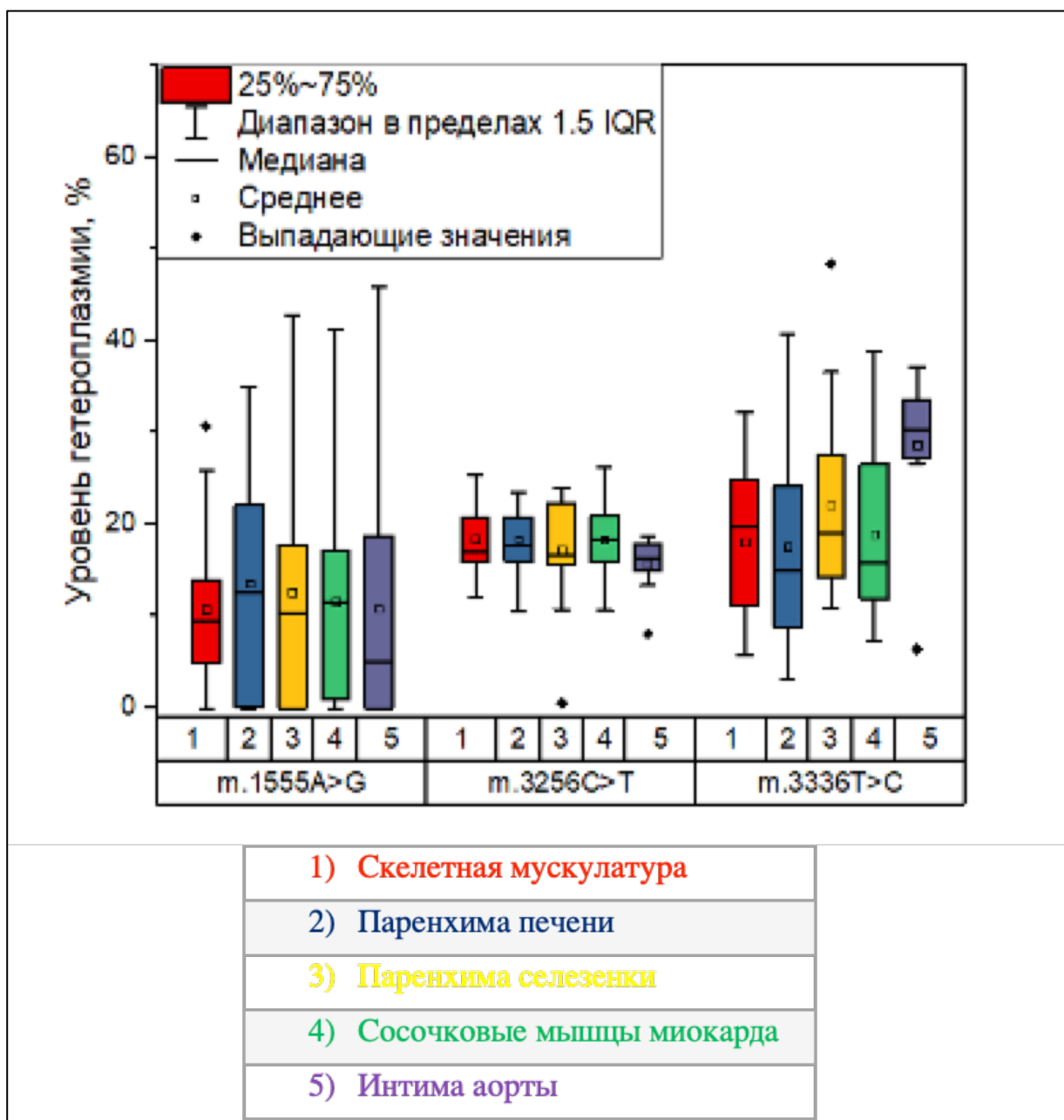
### **3.2.3 Определение уровня гетероплазмии по мутациям m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C в интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре**

В настоящей работе получены данные об уровне гетероплазмии мутаций митохондриального генома в интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре. Средние значения уровня гетероплазмии, выраженные в процентах, каждой из рассматриваемых мутаций, со стандартной ошибкой среднего, представлены на рисунке 22.



А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A





Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C

Рис.22. Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в интиме аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре 21 донора: А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A, Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C.

Далее был проведен статистический анализ полученных данных с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона (таблица 14).

Значимость отличий уровня гетероплазии в интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре человека

Тип ткани	m.12315G>A	m.13513G>A	m.1555A>G	m.3256C>T	m.3336T>C
Скелетная мускулатура - паренхима печени	0,68	0,12	0,23	0,68	0,39
Скелетная мускулатура - паренхима селезенки	0,19	0,01	0,70	0,56	0,25
Скелетная мускулатура - сосочковые мышцы миокарда	0,19	0,47	0,43	0,73	0,70
Скелетная мускулатура - интима аорты	0,73	0,38	0,90	0,97	0,10
Паренхима печени - паренхима селезенки	0,23	0,07	0,61	0,39	0,12
Паренхима печени - сосочковые мышцы миокарда	0,08	0,14	0,56	0,73	0,62
Паренхима печени - интима аорты	0,82	0,13	0,47	0,57	0,50
Паренхима селезенки - сосочковые мышцы миокарда	0,06	0,01	0,96	0,75	0,08

Паренхима селезенки - интима аорты	0,99	0,19	0,57	0,68	0,65
Сосочковые мышцы миокарда - интима аорты	0,50	0,85	0,99	0,52	0,25

Достоверными считали различия при 95% уровне значимости. Согласно статистическим данным, значимыми являются различия между скелетной мускулатурой и паренхимой селезенки; а также паренхимой селезенки и сосочковыми мышцами миокарда по мутации m.13513G>A.

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно полученным результатам по созданию безмитохондриальной клеточной линии (rho0), удалось получить линию клеток - ТУ-520 с меньшим в 91 раз количеством копий митохондриальной ДНК по сравнению с нативной линией ТНР-1. Примечательно, что при проведении электрофоретического разделения продуктов лонг-ПЦР, цельного участка мтДНК ( $\approx 8000$  н.п.) в культуре ТУ-520 детектировано не было, что может свидетельствовать о нарушении целостности митохондриальной молекулы ДНК, и невозможности кодирования важных белковых субъединиц ферментов [85]. Проведенная далее конфокальная микроскопия наглядно показала невозможность детектирования свечения красителя TMRM в культуре ТУ-520, что в целом согласуется с данными о значительном снижении копий мтДНК в безмитохондриальной линии. В гибридных линиях, напротив, видно, что уровень свечения красителя TMRM на достаточном уровне, как и в культуре ТНР-1. Следовательно, можно утверждать о положительных результатах создания гибридных линий.

Уровень мембранного потенциала (интенсивность свечения красителя TMRM) в культуре с низкой мутационной нагрузкой (ТС-LSM1), значимо превышал (в 1,9 раз) аналогичный уровень в культуре с высокой мутационной нагрузкой (ТС-HSM1). Также в 1,6 раз был выше уровень митохондриальной массы в культуре ТС-LSM1 по сравнению с ТС-HSM1, однако статистической значимости этот показатель не достиг. Данные могут свидетельствовать и о более высокой митохондриальной плотности в гибридной линии с низким уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома [86]. Снижение уровней мембранного потенциала, митохондриальной массы, а также наличие мутаций мтДНК может привести к ухудшению способности к слиянию и делению митохондрий и, как следствие, к недостаточной эффективности дыхания для удовлетворения потребностей клетки [87].

При изучении клеточного дыхания безмитохондриальная культура ТУ-520 показала, что базовое дыхание в ней находится на очень низком уровне и не

изменяется как при добавлении субстрата дыхания (сукцинат), так и при добавлении ингибиторов дыхания, что в целом согласуется с рядом аналогичных исследований [31,85,88].

Клеточное дыхание в цибридных линиях было хорошо детектируемо, по ряду показателей, например базовое дыхание в культуре ТС-HSM1 даже превышало аналогичный показатель в культуре ТНР-1. Следует отметить, что создаваемые цибридные линии, несущие более высокие уровни гетероплазмии мутаций митохондриального генома, в основном, в научных работах, имеют более низкий уровень базового дыхания [89–91].

При сравнении двух цибридных линий по биоэнергетическому профилю было установлено, что:

1) Культура ТС-HSM1 имеет более высокий базовый уровень поглощения кислорода, максимальной и резервной дыхательных емкостей по сравнению с культурой ТС-LSM1.

2) Культура ТС-HSM1 имеет более высокий уровень обмена АТФ и утечки протонов по сравнению с культурой ТС-LSM1, что может быть связано с повреждением комплексов дыхательной цепи или митохондриальной мембраны [81,92].

3) Общая митохондриальная эффективность двух цибридных линий примерно на одинаковом уровне, причем в культуре ТС-LSM1 даже выше, чем в ТС-HSM1.

Если подвести итог по сравнению двух цибридных линий по биоэнергетическому профилю, то культура с высокой мутационной нагрузкой (ТС-HSM1) имеет, на первый взгляд, более высокие показатели клеточного дыхания, по сравнению с культурой с низкой мутационной нагрузкой (ТС-LSM1), однако если учесть практически не отличающийся уровень общей митохондриальной эффективности, то можно выдвинуть предположение о том, что клетки, несущие высокий уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома, пытаются компенсировать повышенным уровнем

дыхания имеющиеся повреждения в комплексах дыхательной цепи, чтобы выйти на тот же уровень митохондриальной эффективности, что и клетки с низким уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома.

Результаты настоящего исследования по уровню гетероплазмии мутаций m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C митохондриального генома были рассмотрены, как возможные отличительные признаки различных типов клеток и тканей человека, имеющих разное происхождение в процессе эмбриогенеза (таблицы 15, 16 и 17).

Таблица 15

Общие клетки-предшественники у изучаемых лейкоцитов человека

Тип клеток	Происхождение
Нейтрофилы	СКК → КОЕ-ГМ → КОЕ-Г(Н)
Моноциты	СКК → КОЕ-ГМ → КОЕ-М
Лимфоциты	СКК → КОЕ-Л

Полученные данные по уровню гетероплазмии мутаций m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G и m.3336T>C говорят о том, что практически не обнаружены отличия в мутационной нагрузке между нейтрофилами и лимфоцитами (за исключением m.3256C>T), а также моноцитами и лимфоцитами (кроме m.13513G>A), имеющими общего предшественника – стволовые клетки крови. Кроме того, отсутствуют значимые отличия по уровню гетероплазмии мутаций митохондриального генома m.12315G>A, m.1555A>G и m.3336T>C (кроме m.3256C>T и m.13513G>A) между нейтрофилами и моноцитами, имеющими общего предшественника, помимо СКК и КОЕ-ГМ. Согласно данным по уровню гетероплазмии большинства мутаций митохондриального генома можно предположить, что нет какого-либо

направленного накопления или уменьшения мутантного аллеля в определенных лейкоцитах крови, по сравнению с другими типами лейкоцитов

Таблица 16

Происхождение изучаемых типов тканей аутопсийного материала человека из разных видов зародышевого листка

Тип ткани	Происхождение
Сосочковые мышцы миокарда	Мезодерма
Паренхима печени	Энтодерма
Паренхима селезенки	Мезодерма
Скелетная мускулатура	Мезодерма
Интима аорты	Мезодерма

Так как паренхима печени имеет энтодермальное происхождение, а сосочковые мышцы миокарда, паренхима селезенки, скелетная мускулатура и интима аорты - мезодермальное; и мезодерма формируется позже энтодермы, можно было предположить, что уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома будет существенно отличаться и, возможно, накапливаться, в паренхиме печени, в отличие от других типов тканей. Однако, как показало проведенное исследование, уровень гетероплазмии мутаций m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C в паренхиме печени существенно не отличается от уровня гетероплазмии в интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре, и носит скорее случайный характер.

Уровень гетероплазмии мутаций m.13513G>A и m.1555A>G значимо не отличается во всех типах тканей, что может говорить о том, что данный параметр остается неизменным с момента его наследования по материнской линии.

Происхождение буккального эпителия и цельной крови человека из разных видов зародышевого листка

Тип ткани	Происхождение
Цельная кровь	Мезодерма
Буккальный эпителий	Эктодерма

По мутациям m.12315G>A, m.3256C>T и m.3336T>C наблюдаются значимые отличия между тканью эктодермального происхождения (буккальный эпителий) и мезодермального происхождения (цельная кровь).

В то же время, данные по мутациям m.13513G>A и m.1555A>G свидетельствуют, что между данными тканями различного происхождения значимых отличий по уровню гетероплазии нет.

Полученные результаты по различным типам клеток и тканей человека свидетельствуют о том, что уровень гетероплазии митохондриального генома мутаций m.12315G>A, m.13513G>A, m.3256C>T и m.3336T>C в большинстве случаев, а по мутации m.1555A>G во всех случаях, существенно не отличается, что может обуславливать низкую вариабельность гетероплазии мутаций митохондриального генома в различных типах клеток и тканях.

Согласно литературным данным, в различных органах и тканях одного и того же человека уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома может существенно различаться. При этом в клетках крови человека уровень гетероплазии митохондриальных мутаций оказался значительно ниже, по сравнению с другими типами клеток и, в частности, с буккальным эпителием [23,24]. Проведенное в данной работе исследование показало, что согласующиеся с литературными данными различия уровня гетероплазии между буккальным эпителием и клетками крови установлены по мутациям



m.12315G>A и m.3336T>C. Однако, по мутациям m.13513G>A, m.1555A>G и m.3256C>T уровень гетероплазии в цельной крови оказался выше, чем в буккальном эпителии.

Наибольший уровень гетероплазии мутаций мтДНК наблюдался в мышцах, несколько меньший, но также достаточно высокий - в печени и клетках буккального эпителия, значительно ниже - в сердце и крови человека[23–28]. В нашем исследовании уровень гетероплазии оказался выше в скелетной мускулатуре, по сравнению с паренхимой печени, по мутациям m.12315G>A и m.3256C>T, но ниже по мутациям m.13513G>A и m.1555A>G. По мутации m.3336T>C средний уровень гетероплазии одинаков для скелетной мускулатуры и паренхимы печени. Согласуются с литературными данными результаты более высокой мутационной нагрузки в скелетной мускулатуре, по отношению к сердцу, по мутации m.3256C>T. При этом уровень гетероплазии по другим мутациям имеет противоположную тенденцию или, как в случае с мутацией m.13513G>A, имеет равные значения. Что касается различий в уровне гетероплазии между паренхимой печени и сосочковыми мышцами миокарда, то при анализе мутаций m.13513G>A и m.1555A>G подтвердились литературные данные о том, что в печени мутационная нагрузка выше по отношению к сердцу, а по мутациям m.12315G>A и m.3336T>C, наоборот, в печени уровень гетероплазии мтДНК ниже, чем в сердце. По мутации m.3256C>T средние значения уровня гетероплазии не отличаются. Следует отметить, при анализе пяти исследованных мутаций достоверных отличий в уровне гетероплазии между органами и тканями выявлено не было, за исключением различия между скелетной мускулатурой и паренхимой селезенки; и паренхимой селезенки и сосочковыми мышцами миокарда по мутации m.13513G>A ( $p < 0,05$ ). Не наблюдалось также, чтобы по какой-либо одной мутации мтДНК прослеживалась тенденция в уменьшении уровня гетероплазии от мышц к печени и до сердца.

Как указывает ряд авторов, гранулоциты имеют более высокую внутриклеточную гетерогенность мтДНК (большее количество мутаций митохондриального генома), по сравнению с лимфоцитами и CD34+ клетками [94]. На основании этого было выдвинуто предположение, что уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома в гранулоцитах также будет выше по сравнению с другими форменными элементами крови. Полученные результаты об уровне гетероплазмии мутаций m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C в нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах показали, что данная тенденция наблюдается по мутации m.3256C>T, где уровень гетероплазмии в нейтрофилах выше аналогичного уровня в моноцитах и лимфоцитах; по мутациям m.12315G>A и m.13513G>A, где уровень гетероплазмии в нейтрофилах выше аналогичного уровня в лимфоцитах; и по мутациям m.1555A>G и m.3336T>C, где уровень гетероплазмии в нейтрофилах выше аналогичного уровня в моноцитах. Одинаковый уровень гетероплазмии в нейтрофилах и лимфоцитах был зафиксирован по мутациям m.1555A>G и m.3336T>C. Однако значимые отличия наблюдаются только по мутации m.3256C>T. Между моноцитами и лимфоцитами также есть разница в уровне гетероплазмии по мутациям m.12315G>A и m.13513G>A (выше в моноцитах) и по мутациям m.1555A>G и m.3336T>C (выше в лимфоцитах). При этом значимые отличия наблюдаются только по мутации m.13513G>A.

В отношении вариабельности уровня гетероплазмии в тканях различного происхождения отметим отсутствие достоверных отличий между тканями энтодермального (паренхима печени) и мезодермального (сосочковые мышцы миокарда, паренхима селезенки, скелетная мускулатура и интима аорты) происхождения, однако также отметим, что по 3 мутациям из 5 в тканях эктодермального (буккальный эпителий) и мезодермального (цельная кровь) достоверные отличия есть (m.12315G>A, m.3256C>T и m.3336T>C).

Полученные результаты, в большинстве своем, говорят о несущественном отличии в уровне гетероплазмии в разных типах клеток и тканей человека.

Однако, при проведении анализа во всех представленных выборках, все же были обнаружены достоверные различия в уровне гетероплазии по тем или иным мутациям. Уровень гетероплазии, в среднем по выборкам, был относительно мал. Поэтому возникал закономерный вопрос: «Корректно ли сравнивать между собой уровень мутаций мтДНК, например, равный 1% и 3% в разных типах тканей?» Ведь с математической точки зрения наблюдается разница в 3 раза, но есть ли такая же разница с биологической точки зрения? На наш взгляд, ответить, в том числе, на эти вопросы поможет создание клеточной модели с искусственно внедренными митохондриями с разными уровнями гетероплазии мутаций митохондриального генома.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным этапом при установлении роли мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) в функционировании клеток и генетической предрасположенности к различным заболеваниям является изучение влияния мутаций митохондриального генома на процессы клеточного дыхания и, в частности, процессы функционирования комплексов дыхательной цепи.

На первом этапе исследований мы задумались над созданием клеточной модели, которая бы позволила нам ответить на вопрос о том, на какие именно процессы функционирования клеток влияют различные мутации митохондриального генома. В настоящей работе были созданы 2 клеточные линии (цитоплазматические гибриды) с разным уровнем гетероплазмии двух мутаций митохондриального генома (высоким и низким). Цитоплазматическая гибридная (цибридная) линия с высоким уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома имеет более высокие показатели клеточного дыхания и более низкие показатели мембранного потенциала, по сравнению с культурой с низким уровнем гетероплазмии этих мутаций мтДНК. Полученные линии имеют одинаковую общую митохондриальную эффективность и сводный показатель исследованного биоэнергетического профиля клеточного дыхания.

На втором этапе работы был проведен сравнительный анализ вариабельности мутаций митохондриального генома в различных клетках и тканях человека. В большинстве случаев уровень гетероплазмии мтДНК в различных клетках и тканях не отличался. Но всё же некоторые типы клеток и тканей по некоторым мутациям имели значимые отличия. Так было показано снижение уровня гетероплазмии в скелетной мускулатуре и сосочковых мышцах миокарда по мутациям в генах дыхательной цепи, по сравнению с паренхимой селезенки. Подобные данные имели место и в митохондриях, содержащихся в клетках крови. Уровень гетероплазмии в буккальном эпителии (очень быстро делящихся клетках) отличался от аналогичного уровня в клетках цельной крови по 3 мутациям митохондриального генома.

## ВЫВОДЫ

1. Созданы цитоплазматические гибриды (цибриды) с высоким уровнем гетероплазмии 2 мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом, которые имеют более высокие показатели клеточного дыхания и более низкие показатели мембранного потенциала, по сравнению с культурой с низким уровнем гетероплазмии этих мутаций мтДНК.
2. Полученные линии имеют одинаковую общую митохондриальную эффективность, что говорит о мощных адаптивных процессах в клетках.
3. Изученные мутации митохондриального генома всегда присутствуют во всех клетках и тканях человека и их уровень сопоставим, что говорит об их материнском типе наследования.
4. Снижение уровня гетероплазмии в скелетной мускулатуре и сосочковых мышцах миокарда по мутациям в генах дыхательной цепи, по сравнению с паренхимой селезенки, говорит о механизмах выбраковки митохондрий с высоким уровнем гетероплазмии посредством процесса митофагии в клетках с высокой энергетической нагрузкой. Подобный процесс имеет место и в митохондриях, содержащихся в клетках крови.
5. Уровень гетероплазмии в буккальном эпителии (очень быстро делящихся клетках) отличается от аналогичного уровня в клетках цельной крови по мутациям m.12315G>A, m.3256C>T и m.3336T>C, что свидетельствует о накоплении мутантного аллеля в течении жизни человека.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ (АТР) – аденозинтрифосфат

ГВС2 – второй гипервариабельный сегмент

ДМСО – диметилсульфоксид

КОЕ-Г(Н) – колониеобразующая единица гранулоцитов (нейтрофилов)

КОЕ-ГМ – колониеобразующая единица гранулоцитарно-макрофагальная

КОЕ-Л – колониеобразующая единица лимфоцитов

КОЕ-М – колониеобразующая единица макрофагов

мтДНК – митохондриальная ДНК

НАД·Н (NADH) – никотинамид-аденин-динуклеотид·Н

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ (PEG) – полиэтиленгликоль

рРНК – рибосомальная РНК

СКК – стволовая кроветворная клетка

СОХ – цитохром-С-оксидаза

Трис-НСl – трис (гидроксиметил) аминметана гидрохлорид

тРНК – транспортная РНК

ТВЕ – смесь трис (гидроксиметил) аминметана гидрохлорида, борной кислоты и этилендиаминтетрауксусной кислоты

ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтетрауксусная кислота

АМР – аденозинмонофосфат

АРS – аденозин-5'-фосфосульфат

СРЕО – прогрессирующая внешняя офтальмоплегия

СРЕО – хроническая прогрессирующая внешняя офтальмоплегия

DEAF – аминогликозидиндуцированная глухота

dNDP – дезоксинуклеозид-дифосфат

dNMP – дезоксинуклеозид монофосфат

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

EtBr – бромистый этидий

FBS – эмбриональная бычья сыворотка

FCCP – карбонил цианид-4-трифторметоксифенилгидразон

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота)

LHON – атрофия зрительного нерва Лебера

MELAS – митохондриальная энцефалопатия с инсультоподобными эпизодами и лактатацидозом

MERRF – миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами

NARP – невропатия с атаксией и пигментным ретинитом

PBS – фосфатно-солевой буфер

PPi – пирофосфат

rho0 - безмитохондриальные клетки

TMRM – тетраметилродамин, метиловый эфир, перхлорат

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Sazonova M.A. et al. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations // *Vessel Plus*. 2017. Vol. 1. P. 182–191.
2. Mitrofanov K.Y. et al. Analysis of mitochondrial DNA heteroplasmic mutations A1555G, C3256T, T3336C, C5178A, G12315A, G13513A, G14459A, G14846A and G15059A in CHD patients with the history of myocardial infarction // *Exp. Mol. Pathol.* 2016. Vol. 100, № 1. P. 87–91.
3. Sazonova M. et al. Studies of the human aortic intima by a direct quantitative assay of mutant alleles in the mitochondrial genome. // *Atherosclerosis*. 2009. Vol. 204, № 1. P. 184–190.
4. Сазонова М.А. и др. Анализ гетероплазмии некоторых генов субъединиц NADH дегидрогеназы в гомогенатах атеросклеротического поражения интимы аорты // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012. № 4. С. 71–74.
5. Temchenko A. et al. Achievements in therapy of atherosclerosis // *Pathogenesis*. 2013. Vol. 11, № 2. P. 11–18.
6. Naue J. et al. Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. // *Mitochondrion*. Netherlands, 2015. Vol. 20. P. 82–94.
7. Chinnery P.F. et al. Nonrandom tissue distribution of mutant mtDNA. // *Am. J. Med. Genet.* 1999. Vol. 85, № 5. P. 498–501.
8. Литвинова Н.А. и др. Тканевые особенности полиморфизмов митохондриальной ДНК // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015. Т. 5. С. 76–78.
9. Lu G. et al. HIV-1 Infection Is Blocked at an Early Stage in Cells Devoid of Mitochondrial DNA // *PLoS One* / ed. Kashanchi F. 2013. Vol. 8, № 10. P. e78035.
10. Gamba J. et al. Nitric Oxide Synthesis Is Increased in Cybrid Cells with m.3243A >G Mutation // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 2012. Vol. 14, № 1. P. 394–410.



11. Caporali L. et al. Cybrid studies establish the causal link between the mtDNA m.3890G>A/MT-ND1 mutation and optic atrophy with bilateral brainstem lesions // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2013. Vol. 1832, № 3. P. 445–452.
12. Trimmer P.A., Bennett J.P. The cybrid model of sporadic Parkinson's disease // *Exp. Neurol.* 2009. Vol. 218, № 2. P. 320–325.
13. Gustafson E.A., Schinazi R.F., Fingerroth J.D. Human Herpesvirus 8 Open Reading Frame 21 Is a Thymidine and Thymidylate Kinase of Narrow Substrate Specificity That Efficiently Phosphorylates Zidovudine but Not Ganciclovir // *J. Virol.* 2000. Vol. 74, № 2. P. 684–692.
14. Jun A.S. et al. Use of transmitochondrial cybrids to assign a complex I defect to the mitochondrial DNA-encoded NADH dehydrogenase subunit 6 gene mutation at nucleotide pair 14459 that causes Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. // *Mol. Cell. Biol. American Society for Microbiology (ASM)*, 1996. Vol. 16, № 3. P. 771–777.
15. Trounce I., Neill S., Wallace D.C. Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T->G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNA-less cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. Vol. 91, № 18. P. 8334–8338.
16. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе // *Рос. хим. ж.* 2007. Т. LI, № 1. С. 93–106.
17. Mueller E.E. et al. Reduction of nuclear encoded enzymes of mitochondrial energy metabolism in cells devoid of mitochondrial DNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012. Vol. 417, № 3. P. 1052–1057.
18. Ma Y. et al. Mitochondrial dysfunction in human breast cancer cells and their transmitochondrial cybrids // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* NIH Public Access, 2010. Vol. 1797, № 1. P. 29–37.

19. Seibel P. et al. Cosegregation of novel mitochondrial 16S rRNA gene mutations with the age-associated T414G variant in human cybrids // *Nucleic Acids Res.* 2008. Vol. 36, № 18. P. 5872–5881.
20. Hayashi J. et al. Introduction of disease-related mitochondrial DNA deletions into HeLa cells lacking mitochondrial DNA results in mitochondrial dysfunction. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. Vol. 88, № 23. P. 10614–10618.
21. Мазунин И.О. и др. Митохондриальный геном и митохондриальные заболевания человека // *Молекулярная биология.* 2010. Т. 44, № 5. С. 755–772.
22. 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 // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2012. № 3. P. 123–128.
23. de Laat P. et al. Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. // *J. Inherit. Metab. Dis.* 2012. Vol. 35, № 6. P. 1059–1069.
24. Spyropoulos A. et al. Near-identical segregation of mtDNA heteroplasmy in blood, muscle, urinary epithelium, and hair follicles in twins with optic atrophy, ptosis, and intractable epilepsy // *JAMA Neurol.* 2013. Vol. 70, № 12. P. 1552–1555.
25. Frederiksen A.L. et al. Tissue specific distribution of the 3243A->G mtDNA mutation. // *J. Med. Genet.* 2006. Vol. 43, № 8. P. 671–677.
26. Li M. et al. Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015. Vol. 112, № 8. P. 2491–2496.
27. Calloway C.D. et al. The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. // *Am. J. Hum. Genet. UNITED STATES,* 2000. Vol. 66, № 4. P. 1384–1397.
28. Matthews P.M. et al. Comparison of the relative levels of the 3243 (A->G) mtDNA mutation in heteroplasmic adult and fetal tissues. // *J. Med. Genet.* 1994. Vol. 31, № 1. P. 41–44.

29. Williams A.J. et al. A Novel System for Assigning the Mode of Inheritance in Mitochondrial Disorders Using Cybrids and Rhodamine 6G // *Hum. Mol. Genet.* 1999. Vol. 8, № 9. P. 1691–1697.
30. Mueller E.E. et al. Functional Differences between Mitochondrial Haplogroup T and Haplogroup H in HEK293 Cybrid Cells // *PLoS One* / ed. Mishmar D. 2012. Vol. 7, № 12. P. e52367.
31. Herst P.M. et al. Glycolytic metabolism confers resistance to combined all-trans retinoic acid and arsenic trioxide-induced apoptosis in HL60p0 cells // *Leuk. Res.* Elsevier, 2008. Vol. 32, № 2. P. 327–333.
32. Jandova J. et al. Somatic alterations in mitochondrial DNA produce changes in cell growth and metabolism supporting a tumorigenic phenotype // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* NIH Public Access, 2012. Vol. 1822, № 2. P. 293–300.
33. Kirches E. LHON: Mitochondrial Mutations and More. // *Curr. Genomics.* Bentham Science Publishers, 2011. Vol. 12, № 1. P. 44–54.
34. Trounce I. et al. Cloning of neuronal mtDNA variants in cultured cells by synaptosome fusion with mtDNA-less cells. // *Nucleic Acids Res.* 2000. Vol. 28, № 10. P. 2164–2170.
35. Chomyn A. et al. Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNA<sup>Lys</sup> mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. // *Am. J. Hum. Genet.* Elsevier, 1994. Vol. 54, № 6. P. 966–974.
36. Chomyn A. Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells // *Methods in Enzymology.* Elsevier, 1996. Vol. 264. P. 334–339.
37. Arduíno D.M. et al. A Cybrid Cell Model for the Assessment of the Link Between Mitochondrial Deficits and Sporadic Parkinson's Disease // *Mitochondrial Med.* Vol. II, Manip. Mitochondrial Funct. *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1265. P. 415–424.

38. Donthamsetty S. et al. Mitochondrial genome regulates mitotic fidelity by maintaining centrosomal homeostasis // *Cell Cycle*. Landes Bioscience, 2014. Vol. 13, № 13. P. 2056–2063.
39. McKenzie M. et al. Capture of Somatic mtDNA Point Mutations with Severe Effects on Oxidative Phosphorylation in Synaptosome Cybrid Clones from Human Brain // *Hum. Mutat.* 2014. Vol. 35, № 12. P. 1476–1484.
40. Picard M. et al. Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111, № 38. P. E4033–E4042.
41. Swerdlow R.H. et al. Mitochondrial dysfunction in cybrid lines expressing mitochondrial genes from patients with progressive supranuclear palsy // *J. Neurochem.* 2000. Vol. 75, № 4. P. 1681–1684.
42. Дубровина А.Р. Полиморфизм митохондриальной ДНК // *Материалы X Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум»*. 2008.
43. Сазонова М. и др. Детекция митохондриальных мутаций генов цитохромов В и С в липофиброзных бляшках интимы аорты человека // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012. № 4. С. 62–65.
44. Shureg. Structure of the human mitochondrial genome [Электронный ресурс] [https://ru.wikipedia.org/wiki/Файл:Mitochondrial\\_DNA\\_ru.svg](https://ru.wikipedia.org/wiki/Файл:Mitochondrial_DNA_ru.svg) (Дата обращения: 15.01.2022).
45. Гинтер Е.К. *Медицинская генетика* // *Медицина*. Москва: Медицина, 2003. 448 с.
46. Kmiec B., Woloszynska M., Janska H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals // *Curr. Genet.* 2006. Vol. 50, № 3. P. 149–159.
47. Егорова Л.А. и др. Возможная роль мутаций митохондриального генома при ишемической болезни сердца // *Клиницист*. 2013. Т. 2, № 2. С. 6–13.

48. Шендеров Б.А. Роль митохондрий в профилактической, восстановительной и спортивной медицине // Вестник восстановительной медицины. 2018. Т. 80, № 1. С. 21–31.
49. Mancini M. et al. Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line // J. Cell Biol. 1997. Vol. 138, № 2. P. 449–469.
50. Алексеев В., Никитин Д., Газизова И. Роль митохондриальной патологии в современной медицине и офтальмологии // Профилактическая и клиническая медицина. 2011. Т. 3, № 40. С. 326–330.
51. Иванова М.М. и др. Некоторые мутации митохондриального генома человека, ассоциированные с цитопатиями // www.medline.ru. 2012. Т. 13, № 26. С. 309–330.
52. Consigny P.M. Pathogenesis of atherosclerosis. // AJR. Am. J. Roentgenol. 1995. Vol. 164, № 3. P. 553–558.
53. Bobryshev Y., Orekhov A. Dendritic cells in atherosclerosis: identification and pathophysiological significance // Pathogenesis. 2013. Vol. 11, № 1. P. 9–17.
54. Incalcaterra E. et al. Genetic risk factors in myocardial infarction at young age. // Minerva Cardioangiol. 2004. Vol. 52, № 4. P. 287–312.
55. Иващенко Т.Э., Стрекалов Д.Л., Соловьева Д.В. Тестирование генетической предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям и генетический паспорт // Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. 2004. № 5.
56. Miasoedova V.A. et al. Study of intima-medial thickness (IMT) of the carotid arteries as an indicator of natural atherosclerosis progress in Moscow population. // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 2012. № 3. P. 104–108.
57. Иванова М.М., Бородачев Е.Н., Сазонова М.А. Заболевания человека, ассоциированные с мутациями митохондриального генома // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012. № 3. С. 115–122.

58. Titov V. Statin-induced inhibition of cholesterol synthesis in liver and very low density lipoproteins. Statins, fatty acids and insulin resistance // Pathogenesis. 2013. Vol. 11, № 1. P. 18–26.
59. Sobenin I.A. et al. Cholesterol of circulating immune complexes as biomarker of atherosclerosis // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 2012. № 3. P. 99–103.
60. Собенин И. и др. Снижение атерогенности сыворотки крови как способ саногенетической профилактики атеросклероза // Патогенез. 2008. Т. 6, № 1. С. 33–41.
61. Shoibonov B. et al. Inhibition of the classical pathway of complement activation by blocking C1q with gipoxenum // Pathogenesis. 2013. Vol. 11, № 2. P. 51–57.
62. Mitrofanov K.I., Sazonova M.A. Association of point mutations in human nuclear and mitochondrial genome with coronary artery disease // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 2012. № 2. P. 51–55.
63. Ivanova M.M., Borodachev E.N., Sazonova M.A. Human pathologies associated with mutations of mitochondrial genome // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 2012. № 3. P. 115–122.
64. Lee H.Y. et al. Differential distribution of human mitochondrial DNA in somatic tissues and hairs. // Ann. Hum. Genet. England, 2006. Vol. 70, № Pt 1. P. 59–65.
65. Samuels D.C. et al. Recurrent tissue-specific mtDNA mutations are common in humans. // PLoS Genet. 2013. Vol. 9, № 11. P. e1003929.
66. Pfeiffer H. et al. Mitochondrial DNA control region diversity in hairs and body fluids of monozygotic triplets. // Int. J. Legal Med. Germany, 2004. Vol. 118, № 2. P. 71–74.
67. Roberts K.A., Calloway C. Characterization of Mitochondrial DNA Sequence Heteroplasmy in Blood Tissue and Hair as a Function of Hair Morphology // J. Forensic Sci. 2011. Vol. 56, № 1. P. 46–60.
68. Krjutškov K. et al. Tissue-specific mitochondrial heteroplasmy at position 16,093 within the same individual. // Curr. Genet. 2014. Vol. 60, № 1. P. 11–16.

69. Pyle A. et al. Depletion of mitochondrial DNA in leucocytes harbouring the 3243A->G mtDNA mutation. // *Journal of medical genetics*. England, 2007. Vol. 44, № 1. P. 69–74.
70. Panadés-de Oliveira L. et al. A novel mutation in the mitochondrial MT-ND5 gene in a family with MELAS. The relevance of genetic analysis on targeted tissues // *Mitochondrion*. 2020. Vol. 50. P. 14–18.
71. Harrison T.J. et al. Macular Pattern Retinal Dystrophy, Adult-onset Diabetes, and Deafness: A Family Study of A3243G Mitochondrial Heteroplasmy // *Am. J. Ophthalmol.* Elsevier Inc., 1997. Vol. 124, № 2. P. 217–221.
72. Pai C.-Y. et al. Mitochondrial DNA sequence alterations observed between blood and buccal cells within the same individuals having betel quid (BQ)-chewing habit. // *Forensic Sci. Int.* Ireland, 2006. Vol. 156, № 2–3. P. 124–130.
73. Claeys K.G. et al. Novel genetic and neuropathological insights in neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinitis pigmentosa (NARP) // *Muscle Nerve*. 2016. Vol. 54, № 2. P. 328–333.
74. Kärppä M. et al. Mutation m.15923A>G in the MT-TT gene causes mild myopathy - Case report of an adult-onset phenotype // *BMC Neurol.* BioMed Central Ltd., 2018. Vol. 18, № 1.
75. Schlapakow E. et al. Distinct segregation of the pathogenic m.5667G>A mitochondrial tRNAAsn mutation in extraocular and skeletal muscle in chronic progressive external ophthalmoplegia // *Neuromuscul. Disord.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 29, № 5. P. 358–367.
76. «БиоХимМак». Оценка митохондриальной дисфункции в первичных кардиомиоцитах. 5 с.
77. «БиоХимМак». Оценка биоэнергетических профилей адипоцитов человека. 5 с.
78. Choi S.W. et al. No consistent bioenergetic defects in presynaptic nerve terminals isolated from mouse models of Alzheimer's disease. // *J. Neurosci.* 2012. Vol. 32, № 47. P. 16775–16784.

79. Choi S.W. et al. Intrinsic bioenergetic properties and stress sensitivity of dopaminergic synaptosomes // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, № 12. P. 4524–4534.
80. Chacko B.K. et al. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. // *Clinical science (London, England : 1979).* 2014. Vol. 127, № 6. P. 367–373.
81. Vayalil P. Mitochondrial oncobioenergetics of prostate tumorigenesis (Review) // *Oncol. Lett. Spandidos Publications,* 2019.
82. Миронов К.О. Справочник заведующего КДЛ / № 4 апрель 2011 Детекция генетических полиморфизмов с использованием системы генетического анализа на основе пиросеквенирования PyroMark Q24.
83. Пиросеквенирование: сочетание секвенирования и количественного анализа [Электронный ресурс].  
<https://www.interlabservice.ru/consulting/articles/piro.php> (Дата обращения: 15.01.2022).
84. Sazonova M.A. et al. A new method of quantitative estimation of mutant allele in mitochondrial genome // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* 2011. № 4. P. 81–84.
85. Shen J. et al. Oxygen consumption rates and oxygen concentration in molt-4 cells and their mtDNA depleted (rho0) mutants. // *Biophys. J.* 2003. Vol. 84, № 2 Pt 1. P. 1291–1298.
86. Gan X. et al. Oxidative stress-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase contributes to mild cognitive impairment-related mitochondrial dysfunction // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. Vol. 75. P. 230–240.
87. H C., JM M., DC C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum // *Cell. Cell,* 2007. Vol. 130, № 3. P. 548–562.
88. Brar S.S. et al. Mitochondrial DNA-depleted A549 cells are resistant to bleomycin // *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 2012. Vol. 303, № 5. P. 413–424.
89. Nunes J.B. et al. OXPHOS dysfunction regulates integrin- 1 modifications and enhances cell motility and migration // *Hum. Mol. Genet.* 2015. Vol. 24, № 7. P. 1977–1990.



90. Li W. et al. The tRNAGly T10003C mutation in mitochondrial haplogroup M11b in a Chinese family with diabetes decreases the steady-state level of tRNAGly, increases aberrant reactive oxygen species production, and reduces mitochondrial membrane potential // *Mol. Cell. Biochem.* 2015. Vol. 408, № 1–2. P. 171–179.
91. Cruz-Bermúdez A. et al. Enhanced tumorigenicity by mitochondrial DNA mild mutations. // *Oncotarget. Impact Journals, LLC*, 2015. Vol. 6, № 15. P. 13628–13643.
92. Hill B.G. et al. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy // *Biological Chemistry*. 2012. Vol. 393, № 12. P. 1485–1512.