

На правах рукописи

Хотина Виктория Александровна

**ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА В
ФОРМИРОВАНИИ ПРОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА
МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ THP-1 И СОЗДАНЫХ НА
ИХ ОСНОВЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук **Собенин Игорь Александрович**

Официальные оппоненты:

Грачев Алексей Николаевич – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биологии стромальных клеток опухолей Научно-исследовательского института канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Макаревич Павел Игоревич – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» февраля 2025 года в 14 часов на заседании диссертационного совета 24.1.180.01 при ФГБНУ «НИИОПП» по адресу: 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д. 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «НИИОПП», а также на сайте: <https://niiopp.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 202__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор биологических наук



Н.Б. Панкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Атеросклероз представляет собой хроническое заболевание, которое лежит в основе возникновения и развития целого ряда сердечно-сосудистых заболеваний человека (ССЗ). В настоящее время ССЗ являются одной из ведущих причин смертности и заболеваемости людей по всему миру.

Согласно принятой в настоящее время концепции, в основе патогенеза атеросклероза лежат как нарушение липидного обмена, так и хроническое воспаление, непосредственно поражающее сосудистую стенку и присутствующее на всех стадиях развития атеросклеротических поражений (Аронов Д. М., Лупанов В. П., 2011; Орехов А. Н., 2013; Фадеев Г. А. *et al.*, 2020). Тем не менее, атеросклероз является сложным многофакторным заболеванием, развитие и течение которого зависит от множества других аспектов, в том числе генетических. Например, недавние исследования выявили корреляцию мутаций митохондриальной ДНК (мтДНК) с атеросклерозом у пациентов (Sazonova M. A. *et al.*, 2015; Sazonova M. A. *et al.*, 2017; Sobenin I. A. *et al.*, 2012; Сазонова М. А. *et al.*, 2014).

Современные исследования направлены на выявление взаимосвязи между наличием мутаций в мтДНК и возникновением таких ССЗ, как ишемическая болезнь сердца (ИБС), инфаркт миокарда, инсульт, коронарный стеноз, кардиомиопатия, а также заболевание периферических артерий (ЗПА) (Glanz V. Y. *et al.*, 2020; Gonzalez-Freire M. *et al.*, 2020; Heidari M. M. *et al.*, 2017; Heidari M. M. *et al.*, 2020; Hu H. *et al.*, 2020; Sazonova M. *et al.*, 2016; Sazonova M. A. *et al.*, 2016; Sazonova M. A. *et al.*, 2019; Sazonova M. A. *et al.*, 2019). Проявление данных мутаций зависит от их уровня гетероплазмии, представляющего собой соотношение количества мтДНК дикого типа к количеству мутантной мтДНК. Патологический порог гетероплазматических мутаций мтДНК может проявляться в виде появления клинических симптомов заболевания (Sazonova M. *et al.*, 2016; Sobenin I. A. *et al.*, 2012; Сазонова М. А. *et al.*, 2014). Однако стоит отметить, что характер и механизмы связи мутаций мтДНК и начальных звеньев атерогенеза окончательно не изучены.

Недавно была выявлена мутация m.15059G>A в митохондриальном гене, кодирующем цитохром b (*MT-CYB*), в лейкоцитах и клетках из липофиброзных бляшек пациентов с ИБС и атеросклерозом (Sobenin I. A. *et al.*, 2013; Баринаова В. А. *et al.*, 2015; Сазонова М. А. *et al.*, 2014; Синёв В. В. *et al.*, 2016; Синёв В. В. *et al.*, 2021). Более того, была продемонстрирована положительная корреляция данной мутации с первичной гипертензией и толщиной интимамедии у пациентов с диагностированным атеросклерозом (Sobenin I. A. *et al.*, 2012; Sobenin I. A., 2013; Баринаова В. А. *et al.*, 2015). Мутация m.15059G>A приводит к образованию стоп-кодона, останавливающего синтез цитохрома b, что способствует его укорочению на 244 аминокислоты из 380 (Andreu A. L. *et al.*, 1999; Sazonova M. A. *et al.*, 2017). Было выдвинуто предположение, что данная мутация может приводить к дисфункции III комплекса электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), сопровождающейся нарушением функции митохондрий в клетках, в том числе присутствующих в атеросклеротических поражениях, что может способствовать ускорению развития последних (Синёв В. В. *et al.*, 2016).

Выявление связи функциональных последствий мутагенеза мтДНК с развитием атеросклероза у человека позволит получить новые знания об атерогенезе как возрастном дегенеративном патологическом процессе и создаст основу для разработки новых подходов к диагностике, профилактике и лечению атеросклероза. Результаты исследования связи мутагенеза митохондриального генома и функциональной активности клеток в модельных условиях позволят обосновать предположение, что митохондрии с нарушенной функцией могут являться терапевтической мишенью при атеросклерозе.

Цель работы. Изучение связи митохондриальной мутации m.15059G>A в гене, кодирующем митохондриальный цитохром b, с изменением метаболизма и функциональной активности моноцитоподобных клеток, приводящим к формированию проатеросклеротического клеточного фенотипа.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* на митохондриальную функцию моноцитоподобных клеток;
2. Исследовать связь мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* с изменением воспалительного статуса моноцитоподобных цитоплазматических гибридов TC-HSMAM1;
3. Оценить влияние мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* на базальную и индуцированную модифицированными липопротеидами низкой плотности активность внутриклеточного метаболизма липидов в цибридах TC-HSMAM1;
4. Изучить влияние мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* на профиль экспрессии генов, ассоциированных с апоптозом в моноцитоподобных клетках линии TC-HSMAM1;
5. Выявить связь мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* с модуляцией экспрессии генов, ассоциированных с пролиферацией, регуляцией клеточного цикла, транскрипцией белков и синтетической активностью в клетках цибридной линии TC-HSMAM1.

Научная новизна исследования. В настоящем исследовании впервые выявлены функциональные последствия мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB*, кодирующем митохондриальный цитохром b, в контексте проатеросклеротического фенотипа иммунных клеток. Применение цитоплазматических гибридов (цибридов), несущих митохондриальные мутации, ассоциированные с атеросклерозом, позволило воспроизвести ключевые клеточные и молекулярные нарушения, связанные с развитием заболевания. Использование системы редактирования генома на основе CRISPR/Cas9 (MitoCas9) для целенаправленного удаления мутантной мтДНК в цибридах предоставило новый инструмент для изучения митохондриальной дисфункции и ее роли в атерогенезе.

Настоящее исследование демонстрирует, что мутация m.15059G>A приводит к нарушению митофагии, усилению окислительного стресса и изменению воспалительного ответа, что вносит вклад в развитие атеросклероза. Эти результаты подчеркивают важность митохондриальной дисфункции в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и открывают перспективы для разработки терапевтических подходов, направленных на коррекцию патологических состояний, ассоциированных с нарушением функции митохондрий.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость данного исследования заключается в углублении научных знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе атеросклероза и ассоциированных с митохондриальными мутациями. Впервые показана патогенетическая роль мутации m.15059G>A в гене цитохрома b (*MT-CYB*), которая приводит к нарушению функциональной активности моноцитов и макрофагов, что способствует формированию проатерогенного фенотипа данных клеток. Полученные данные углубляют понимание роли митохондриальной дисфункции в качестве одного из значимых факторов в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, расширяя фундаментальные знания о молекулярно-клеточных механизмах патогенеза атеросклероза. Результаты настоящего исследования также подчеркивают значимую связь митохондриальных мутаций с развитием воспалительных процессов при атерогенезе, что открывает новые возможности для дальнейших исследований в этой области.

Практическая значимость работы заключается в применении инновационных подходов к изучению атеросклероза, основанных на генной инженерии и редактировании митохондриального генома с использованием технологии CRISPR/Cas9. Эти подходы могут быть использованы для создания высокоэффективных клеточных моделей, позволяющих изучать влияние митохондриальных мутаций на клеточные процессы. Полученные результаты открывают перспективы поиска новых молекулярных терапевтических мишеней для коррекции митохондриальной дисфункции при атеросклерозе и сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, они закладывают основу для разработки высокотехнологичных методов терапии, направленных на редактирование митохондриального генома для коррекции патологических состояний, связанных с мутациями в мтДНК.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* способствует развитию митохондриальной дисфункции в моноцитоподобных клетках, что выражается в снижении мембранного потенциала митохондрий, повышении продукции активных форм кислорода, увеличении немитохондриального дыхания, утечке протонов и снижении митохондриальной эффективности клеток.

2. Мутация m.15059G>A ассоциирована с нарушением активации PINK1/Parkin-опосредованной митофагии и воспалительной реакции, выраженной изменением профиля секреции ФНО α и ИЛ-1 β и увеличением экспрессии генов *NLRP3* и *IL1B*.

3. Наличие мутации m.15059G>A в макрофагах ассоциировано с увеличенной экспрессией *FASN* и дисбалансом экспрессии генов, регулирующих апоптоз, за счет повышения экспрессии *CASP3* и снижения экспрессии *BAX* и *CASP9*.

4. Мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* влияет на регуляцию как митотического деления моноцитоподобных клеток, так и синтетической активности макрофагальных клеток, что выражается в повышенной экспрессии *CCNB1*, *POLR1A* и *COL6A1*.

Личный вклад автора. Все лабораторные исследования, представленные в данной работе, были выполнены автором лично. Автор настоящей работы самостоятельно осуществлял анализ и статистическую обработку полученных данных, а также подготовку и написание научных публикаций по теме диссертационного исследования.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных данных обоснована выполненными задачами и применением современных методов и подходов. Интерпретация полученных данных базируется на адекватно подобранных методах статистического анализа, а выводы объективно обоснованы и подтверждены обширным экспериментальным материалом. Результаты исследования представлены и апробированы на международных научных конференциях и опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых научных изданиях.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 26 печатных работ, в том числе 9 статей в рецензируемых журналах (8 в рецензируемых иностранных журналах и 1 статья в рецензируемых журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК РФ) и 17 тезисов в сборниках докладов научных конференций. Результаты диссертационной работы были представлены на: 19 International Symposium on Atherosclerosis (ISA2021) (Киото, Япония, 2021); 89 конгрессе European Atherosclerosis Society 2021 (EAS2021) (Хельсинки, Финляндия, 2021); 90 конгрессе European Atherosclerosis Society 2022 (EAS2022) (Милан, Италия, 2022); 11 International Congress on Lipid & Atherosclerosis (ICoLA 2022) (Сеул, Республика Корея, 2022); 91 конгрессе European Atherosclerosis Society 2023 (EAS2023) (Маннхейм, Германия, 2023); 34 конгрессе Great Wall International Congress of Cardiology/Asian Heart Society Congress (GW-ICC/AHSC2023) (Пекин, Китай, 2023); 16 конгрессе Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease 2023 (APSAVD2023) (Куала-Лумпур, Малайзия, 2023).

Структура и объём работы. Диссертационная работа включает такие разделы, как введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 318 источников (22 на русском и 296 на иностранных языках). Работа изложена на 193 страницах и сопровождается 32 рисунками и 9 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. ТНР-1 – линия моноцитоподобных клеток, выделенных из периферической крови больного острым моноцитарным лейкозом; ТС-HSMAM1 – линия цитоплазматических гибридов, созданных методом ПЭГ-слияния безмитохондриальных rho0-клеток на основе линии ТНР-1 с тромбоцитами пациентов, несущих мутации в генах, кодируемых мтДНК (Синёв В. В., *et al.*, 2017).

Условия культивирования и трансфекции. Суспензионные культуры культивировались в среде RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мМ β-меркаптоэтанола, 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C. Для адгезии и индукции дифференцировки в макрофаги использовали 50 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата. Суспензию гибридов ТС-HSMAM1 трансфицировали вектором MitoCas9 для удаления мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A в гене цитохрома b, с использованием катионных липосом М6.

Выделение нуклеиновых кислот. Суммарную ДНК выделяли с использованием смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта в соответствии со стандартным протоколом. Суммарную РНК выделяли с использованием реагента Extract RNA (Евроген, Россия) в соответствии со стандартным протоколом производителя. РНК обрабатывали ДНКазой ezDNase™ Enzyme (Thermo Fisher Scientific, США) и использовали для синтеза кДНК с помощью набора MMLV RT kit (Евроген, Россия).

Анализ эффективности удаления мтДНК с мутацией. Суммарная ДНК использовалась для амплификации последовательности мтДНК, окружающей мутацию m.15059G>A с последующим T7EI-анализом эффективности внесения двуцепочечных разрывов в мтДНК с помощью Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix и T7 эндонуклеазы I (New England BioLabs, США) в соответствии с протоколом производителя. Полученные ПЦР-продукты анализировали с использованием электрофореза в агарозном геле. Отобранные по результатам электрофореза ПЦР-продукты анализировали с помощью цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) для количественной оценки эффективности удаления мутантной мтДНК. Амплификацию проводили на системе QX200 (BioRad, США).

Количественная ПЦР в реальном времени. Уровень мРНК анализируемых генов нормализовали по усредненным значениям экспрессии *GAPDH* и *CAP1*. Подбор и дизайн праймеров проводили с использованием онлайн-ресурсов Primer Blast и Oligo Analyzer. Реакцию ПЦР проводили с использованием набора qPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия) согласно стандартному протоколу на приборе CFX96 Touch (BioRad, США).

Иммуноферментный анализ. Секрецию цитокинов клетками оценивали с помощью набора ELISA Kits (R&D Systems, США) согласно протоколу производителя.

Многоэтапное препаративное ультрацентрифугирование по методу Lindgren использовали для выделения суммарной фракции ЛПНП (плотность 1,025-1,063 г/мл) из плазмы крови.

Содержание общего холестерина определяли с помощью набора Fluitest CHOL (Analyticon, Германия) согласно протоколу производителя. Экстракцию внутриклеточных липидов проводили смесью гексана и изопропанола. Результаты нормировали по отношению к содержанию общего белка в клетках, которое определяли по методу Лоури с использованием фенольного реагента Folin–Ciocalteu (Sigma Aldrich, США).

Конфокальная микроскопия. Анализ внутриклеточной колокализации митохондрий и лизосом, меченых при помощи флуоресцентных красителей MitoTracker Green и LysoTracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific, США) в условиях индукции митофагии с помощью карбонилцианид-4-трифторметоксифенилгидразона (FCCP) проводили с использованием конфокального микроскопа STELLARIS 5 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного объективом HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL.

Полярнографический метод применяли для анализа скорости потребления кислорода клетками при помощи Oxygraph+ (Hansatech Instruments Ltd, Великобритания) с закрытым Pt-электродом Кларка. Биоэнергетический профиль митохондрий оценивали путем добавления ингибиторов окислительного фосфорилирования: олигомицин А; FCCP; антимицин А.

Проточная цитофлуориметрия. Применяли для оценки уровня внутриклеточных АФК, перекисного окисления липидов и мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) с использованием флуоресцентных зондов H_2DCFDA (Люмипроб, Россия), MitoCLOx (Люмипроб, Россия) и MitoTracker Orange CMTRos (Thermo Fisher Scientific, США), соответственно. Анализ интенсивности флуоресценции клеток проводили при помощи проточного цитометра CytOFLEX S (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка данных. Оценка нормальности распределения данных проводилась с помощью критериев Шапиро–Уилка или Колмогорова–Смирнова. При нормальном распределении в выборках статистическую обработку полученных данных для попарных сравнений осуществляли с использованием t -критерия Стьюдента. В случае, если выборки не соответствовали нормальному распределению, применяли непараметрический U -критерий Манна–Уитни. Для множественных сравнений при нормальном распределении использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением поправки Бонферрони. Если распределение выборок не соответствовало нормальному, для множественных сравнений применяли критерий Краскела–Уоллиса в сочетании с поправкой Бонферрони. Признавали различия между группами достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics (IBM Inc., США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A в гене *MT-CYB*, при помощи РНК-комплекса MitoCas9 в клетках линии цитоплазматических гибридов ТС-HSMAM1

Было успешно проведено удаление мтДНК с мутацией m.15059G>A в гене *MT-CYB* при помощи РНК-комплекса MitoCas9 (рис. 1) в культуре цибридов ТС-HSMAM1. Эффективность трансфекции и удаления мутантной мтДНК в области гена *MT-CYB* оценивали при помощи Т7Е1-анализа, который позволяет определить наличие гетеродуплекса, формирующегося после разрезания последовательности ДНК эндонуклеазой Cas9 в сайте целевого гена, и цкПЦР.

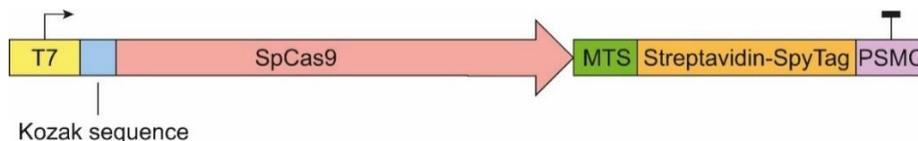


Рисунок 1. Схема целевого участка вектора MitoCas9. T7 – последовательность T7 промотора. Sniper-Cas9 – последовательность, кодирующая Cas9 нуклеазу. MTS – сайт митохондриальной локализации, полученный из последовательности гена *COX8A*. Streptavidin-SpyTag – сшивка стрептавидин/биотина. PSMC – терминаторная область. Схема подготовлена с использованием пакета программ Adobe Illustrator 2021 (Adobe, Inc., США).

Для подтверждения разрезания мтДНК в участке гена *MT-CYB* был проведен гель-электрофорез Т7Е1-обработанных ПЦР-продуктов, амплифицированных с мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A. Т7Е1-анализ позволил выявить наличие гетеродуплексов в шести образцах ПЦР-продуктов, амплифицированных с мтДНК цибридов ТС-HSMAM1, трансфицированных MitoCas9. В свою очередь, в образцах с ПЦР-продуктами, амплифицированными с мтДНК из контрольных цибридов ТС-HSMAM1, не наблюдалось расщепления T7 эндонуклеазой I, о чем свидетельствует наличие единственной полосы в агарозном геле (рис. 2). Полученный результат подтверждает способность разработанного ранее вектора MitoCas9 расщеплять двухцепочечную мтДНК в целевом сайте.

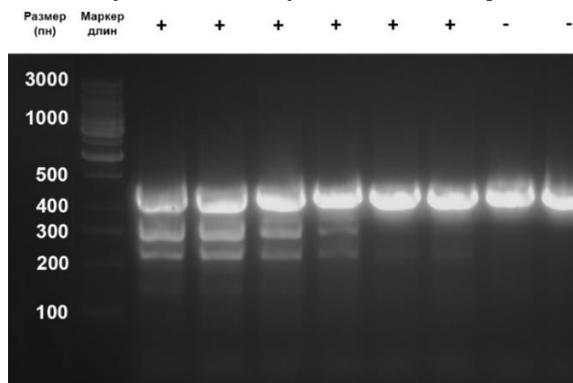


Рисунок 2. Результат гель-электрофореза ПЦР-продуктов, обработанных T7 эндонуклеазой I, амплифицированных из мтДНК с мутацией m.15059G>A.
(+) – ПЦР-продукты, в которых обнаружено расщепление.
(-) – ПЦР-продукты, в которых расщепления не обнаружено.

Далее с помощью цкПЦР было выявлено снижение уровня гетероплазии мутации m.15059G>A в клетках ТС-HSMAM1, трансфицированных РНК-комплексом MitoCas9, до $12,81 \pm 3,24\%$ ($p < 0,05$) с исходного уровня в $79,29 \pm 11,58\%$, по сравнению с контрольными клетками, которые не подвергались трансфекции (рис. 3). Также было оценено снижение мутационного фона в мтДНК в клетках цибридной линии, трансфицированных РНК-комплексом MitoCas9, в течение продолжительного периода времени. Отбор проб клеточной суспензии для анализа производился через 7 и 14 суток после трансфекции. В результате цкПЦР анализа было показано, что происходило снижение мутационного фона до $26,86 \pm 3,92\%$ и $25,31 \pm 9,35\%$ на 7 и 14 сутки, соответственно, после трансфекции клеток по сравнению с контрольными клетками, не подвергавшимися трансфекции (рис. 3). Одновременно с этим наблюдалось значительное снижение жизнеспособности клеток на 1 сутки после трансфекции РНК-комплексом MitoCas9 до $64 \pm 4\%$ по сравнению с контрольными клетками, которая к 7 суткам восстанавливалась до значений $93 \pm 3\%$. На 14 день уровень

жизнеспособности трансфицированных клеток составлял $96\pm 4\%$. Кроме того, трансфекция цибридов РНК-комплексом MitoCas9 не приводила к значительным морфологическим изменениям клеток.

Таким образом, была показана способность вектора MitoCas9 разрезать мтДНК в области гена, несущего патогенную мутацию $m.15059G>A$, с последующим удалением мтДНК в клетках цитоплазматических гибридов TC-HSMAM1 с высокой эффективностью. В результате были получены клетки TC-HSMAM1 с удаленной мутантной мтДНК (Cas9-TC-HSMAM1), использованные в дальнейших исследованиях (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2021; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2021; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022).

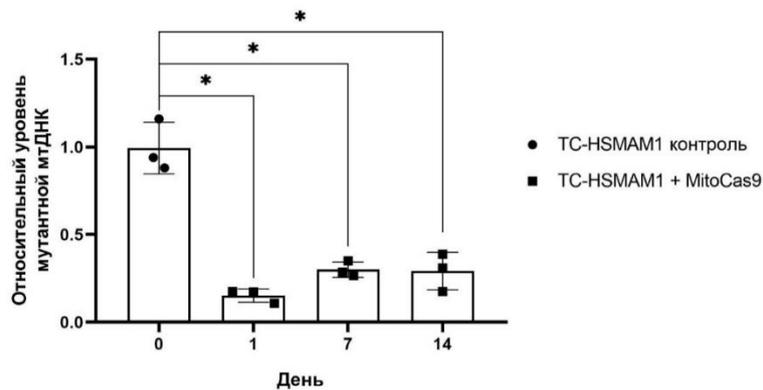


Рисунок 3. Анализ эффективности снижения числа копий мтДНК, несущих мутацию $m.15059G>A$ в митохондриальном гене *MT-CYB*, в клетках TC-HSMAM1 в течение 14 дней после трансфекции РНК-комплексом MitoCas9. TC-HSMAM1 контроль – относительное число ДНК-матриц с мутацией $m.15059G>A$ (*MT-CYB*) в цибридах. TC-HSMAM1 + MitoCas9 – относительное число ДНК-матриц с мутацией $m.15059G>A$ (*MT-CYB*) в цибридах после трансфекции РНК-комплексом MitoCas9. * $p < 0,05$, *U*-критерий Манна–Уитни.

2. Оценка митохондриальной дисфункции по отношению к изменению уровня митохондриального мембранного потенциала, продукции АФК и образования продуктов перекисного окисления липидов митохондриальной мембраны в цитоплазматических гибридах TC-HSMAM1 и клетках Cas9-TC-HSMAM1

Выявлено, что удаление мутантной мтДНК в цибридных клетках приводит к значительному увеличению уровня $\Delta\Psi_m$ на 40,21% по сравнению с контрольными клетками (рис. 4). Обнаружено незначительное, но статистически значимое, снижение уровней АФК в цибридных клетках Cas9-TC-HSMAM1 на 11,63% по сравнению с контрольными клетками TC-HSMAM1 (рис. 5). Кроме того, было выявлено статистически значимое снижение уровня перекисного окисления липидов митохондриальных мембран в клетках Cas9-TC-HSMAM1 на 10,14% по сравнению с контрольными клетками TC-HSMAM1 (рис. 6).

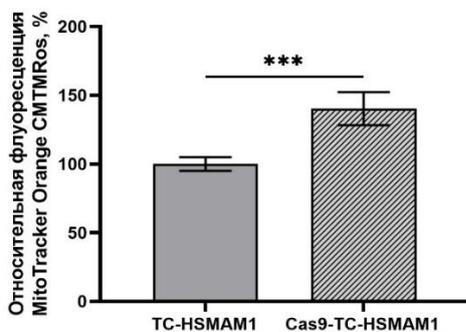


Рисунок 4. Анализ изменения уровня $\Delta\Psi_m$ цибридных клеток TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, *** $p < 0,001$. *t*-критерий Стьюдента.

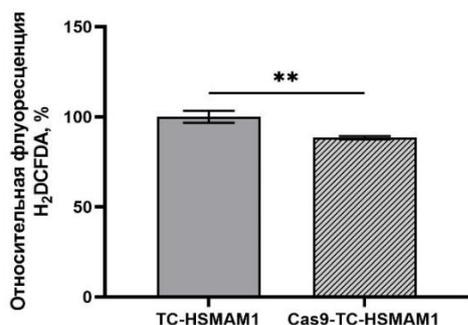


Рисунок 5. Анализ изменения уровня АФК в цибридных клетках TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ** $p < 0,01$. t -критерий Стьюдента.

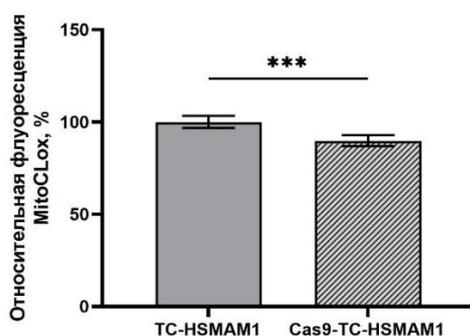


Рисунок 6. Анализ изменения уровня окисленного митохондриального кардиолипина в цибридных клетках TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, *** $p < 0,001$. t -критерий Стьюдента.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* вероятно играет роль в развитии митохондриальной дисфункции и окислительного стресса в моноцитоподобных клетках, о чем свидетельствует сниженный уровень $\Delta\Psi_m$, а также усиление генерации АФК и перекисного окисления липидов митохондриальной мембраны в исследованных цибридных клетках. Удаление мутантной мтДНК в цибридах способствует улучшению исследуемых параметров, включая значительное повышение $\Delta\Psi_m$, а также снижение уровней АФК и окисленного кардиолипина (Khotina V. A. *et al.*, 2024).

3. Анализ скорости потребления кислорода и митохондриального биоэнергетического профиля клеток цибридных линий TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

Было показано, что скорость потребления кислорода всех исследуемых линий имеет сходный профиль (рис. 7). В клетках с удаленной мутантной мтДНК базальный уровень потребления кислорода статистически значимо от цибридов TC-HSMAM1 не отличался (рис. 8). Однако в условиях добавления к клеткам олигомицина А и антимицина А, у цибридов Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается снижение скорости потребления кислорода по сравнению с контрольными клетками TC-HSMAM1. Последующий анализ митохондриального биоэнергетического профиля показал, что у цибридов Cas9-TC-HSMAM1 значительно снижаются такие параметры, как немитохондриальное потребление кислорода и утечка протонов на 47,39% и 30,26%, соответственно, по сравнению с цибридами TC-HSMAM1 (рис. 8). Кроме того, было показано, что такие параметры, как АТФ-зависимое потребление кислорода и резервная дыхательная емкость статистически значимых отличий между клетками обеих цибридных линий не имеют (рис. 8). Тем не менее, наблюдается снижение максимальной дыхательной емкости в клетках Cas9-TC-HSMAM1 по сравнению с цибридами TC-HSMAM1 на 19,21%. В свою очередь, при оценке общей митохондриальной эффективности клеток путем вычисления ИБЗ было выявлено, что данный параметр значительно увеличивается в цибридах после удаления мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, на 33,98% по сравнению с неотредактированными клетками (рис. 9).

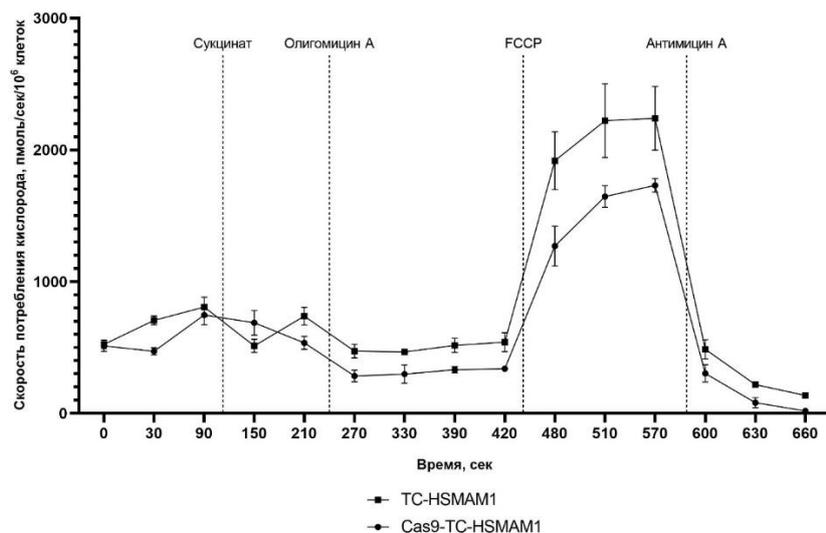


Рисунок 7. Оценка скорости потребления кислорода гибридными клетками TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 в зависимости от добавления модуляторов окислительного фосфорилирования. Mean \pm SD, n = 5.

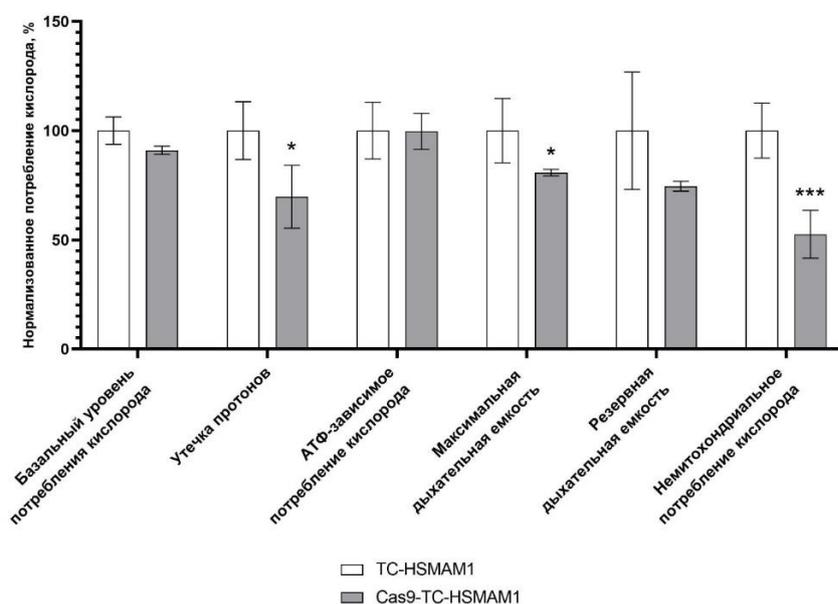


Рисунок 8. Оценка параметров биоэнергетического профиля гибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. t -критерий Стьюдента.

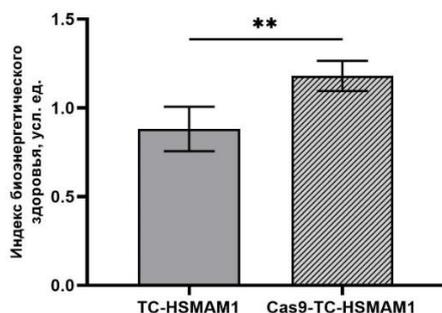


Рисунок 9. Оценка общей митохондриальной эффективности гибридных клеток TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ** $p < 0,01$. t -критерий Стьюдента.

Таким образом, мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB*, приводящая к появлению дефектного варианта цитохрома b, вероятно, способствует увеличению значений для таких параметров биоэнергетического профиля митохондрий, как утечка протонов и немитохондриальное потребление кислорода, одновременно снижая общую митохондриальную эффективность в клетках (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A. *et al.*, 2024; Khotina V. A. *et al.*, 2023).

4. Оценка митохондриальной дисфункции по отношению к активации митофагии в клетках линий ТНР-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

Согласно полученным данным, в клеточной линии TC-HSMAM1 уровень FCCP-индуцированной митофагии не отличался от базального уровня (рис. 10). Таким образом, было показано, что в данной клеточной линии наблюдается нарушение активации митофагии, то есть проявление дефектной митофагии.

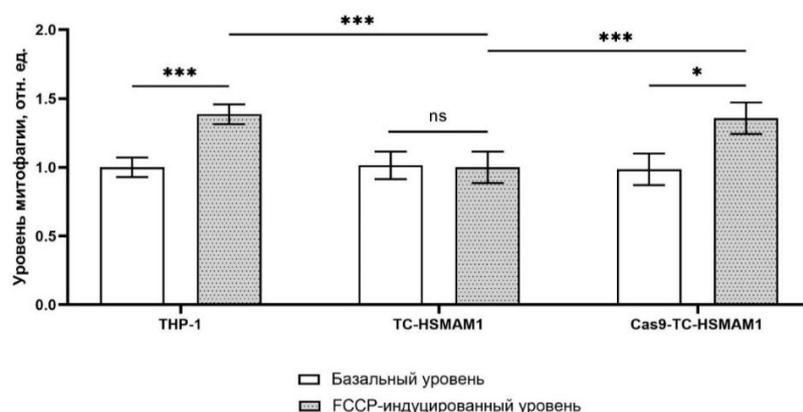


Рисунок 10. Оценка уровня митофагии в клетках линий ТНР-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

В то же время, в контрольной клеточной линии ТНР-1 в условиях добавления FCCP наблюдается увеличение уровня митофагии в 1,39 раз (рис. 10). В клетках линии цибридов Cas9-TC-HSMAM1, инкубированных с FCCP, также наблюдается увеличение митофагии в 1,38 раз по сравнению с базальным уровнем. Полученные данные по оценке активности митофагии дополняются конфокальными изображениями, демонстрирующими колокализацию митохондрий с лизосомами, что позволяет оценить полную картину динамики митофагии (рис. 11-13).

Согласно полученным результатам, мутация m.15059G>A может быть связана с нарушением процессов митофагии в моноцитах. Дефектная митофагия, в свою очередь, может приводить к сохранению и накоплению в клетках дефектных митохондрий, способствуя таким образом развитию процессов, связанных с формированием проатеросклеротического фенотипа клеток (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2023; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2024).

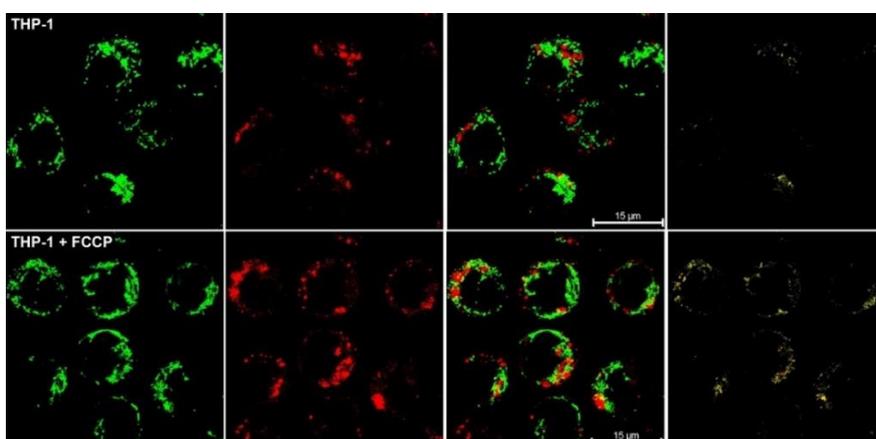


Рисунок 11. Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, для оценки активности митофагии клеток линии ТНР-1 до и после добавления FCCP.

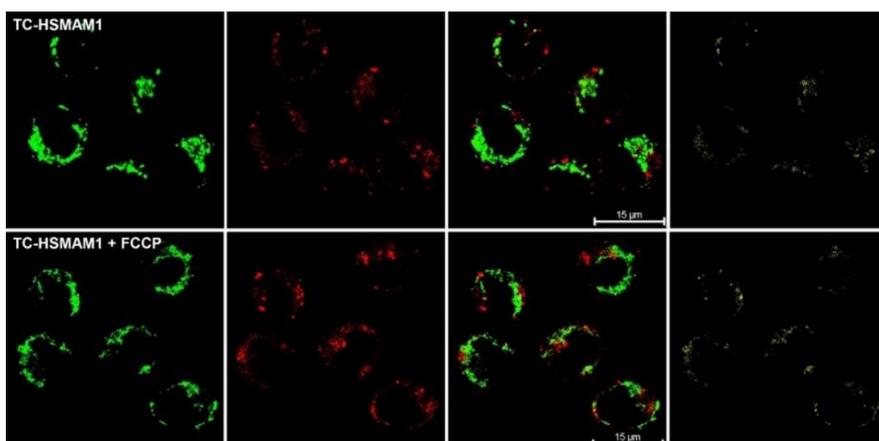


Рисунок 12. Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, для оценки активности митофагии клеток линии TC-HSMAM1 до и после добавления FCCP.

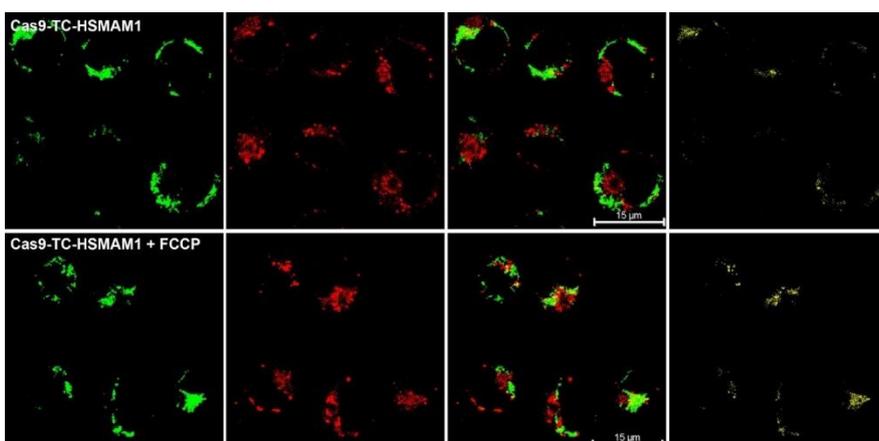


Рисунок 13. Изображения, полученные методом конфокальной микроскопии, для оценки активности митофагии клеток линии Cas9-TC-HSMAM1 до и после добавления FCCP.

Примечание: Митохондрии окрашены флуоресцентным красителем MitoTracker Green (зеленая флуоресценция), лизосомы – LysoTracker Deep Red (красная флуоресценция). Совмещение каналов демонстрирует колокализацию лизосом и митохондрий. Митохондрии, поглощенные лизосомами, показаны желтым. Увеличение 63х.

5. Анализ экспрессии генов, опосредующих митофагию, в клетках линий ТНР-1, цибридов TC-HSMAM1 и цибридов Cas9-TC-HSMAM1

Было показано, что в нормальных физиологических условиях, когда экзогенная стимуляция митофагии в клетках отсутствовала, базальная экспрессия генов *PINK1* и *MAP1LC3B* статистически значимо во всех клеточных линиях не отличается. В то же время, экспрессия *PRKN* статистически значимо снижена в клетках цибридной линии TC-HSMAM1 в 1,83 раза по сравнению с контрольными клетками ТНР-1. Кроме того, экспрессия гена *PRKN* в клетках линии Cas9-TC-HSMAM1 увеличивается в 1,75 раз по сравнению с клетками, несущими мутацию m.15059G>A, до уровня, сходного с контрольными клетками.

Индукция митофагии путем инкубации клеток с FCCP приводит к увеличению экспрессии всех исследуемых генов в контрольных клетках линии ТНР-1 и в цибридах с удаленной мутантной мтДНК. В частности, инкубация Cas9-TC-HSMAM1 с FCCP приводит к увеличению экспрессии *PINK1* в 2,74 раза, *PRKN* в 1,43 раза и *MAP1LC3B* в 6,65 раз по сравнению с базальной экспрессией (рис. 14). Кроме того, установлено, что при индукции митофагии с помощью FCCP уровень экспрессии гена *MAP1LC3B* в клетках линии ТНР-1 и в цибридах Cas9-TC-HSMAM1 значимо не отличается. Однако экспрессия генов *PRKN* и *PINK1* в клетках Cas9-TC-HSMAM1 была снижена в 1,40 и 1,34 раз соответственно, по сравнению с контрольными клетками ТНР-1.

Инкубация цибридов TC-HSMAM1, несущих патологическую мутацию, с FCCP приводит к статистически значимому увеличению экспрессии *MAP1LC3B* в 3,32 раза по сравнению с базальной экспрессией (рис. 14). Однако экспрессия данного гена в клетках TC-HSMAM1 значительно снижена по сравнению как с клетками линии ТНР-1, так и цибридами

Cas9-TC-HSMAM1 (в 2,68 и 3,24 раза соответственно). В то же время, экспрессия генов *PINK1* и *PRKN* в цибридах TC-HSMAM1 статистически значимо не изменяется по сравнению с базальным уровнем.

Таким образом, было показано, что удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, в цибридных клетках приводит к значительному увеличению экспрессии генов *PINK1*, *PRKN* и *MAP1LC3B*. Данные по экспрессии генов, ассоциированных с активацией FCCP-индуцированной митофагии, согласуются с результатами оценки митохондриальной дисфункции, полученными с помощью конфокальной микроскопии (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2024).

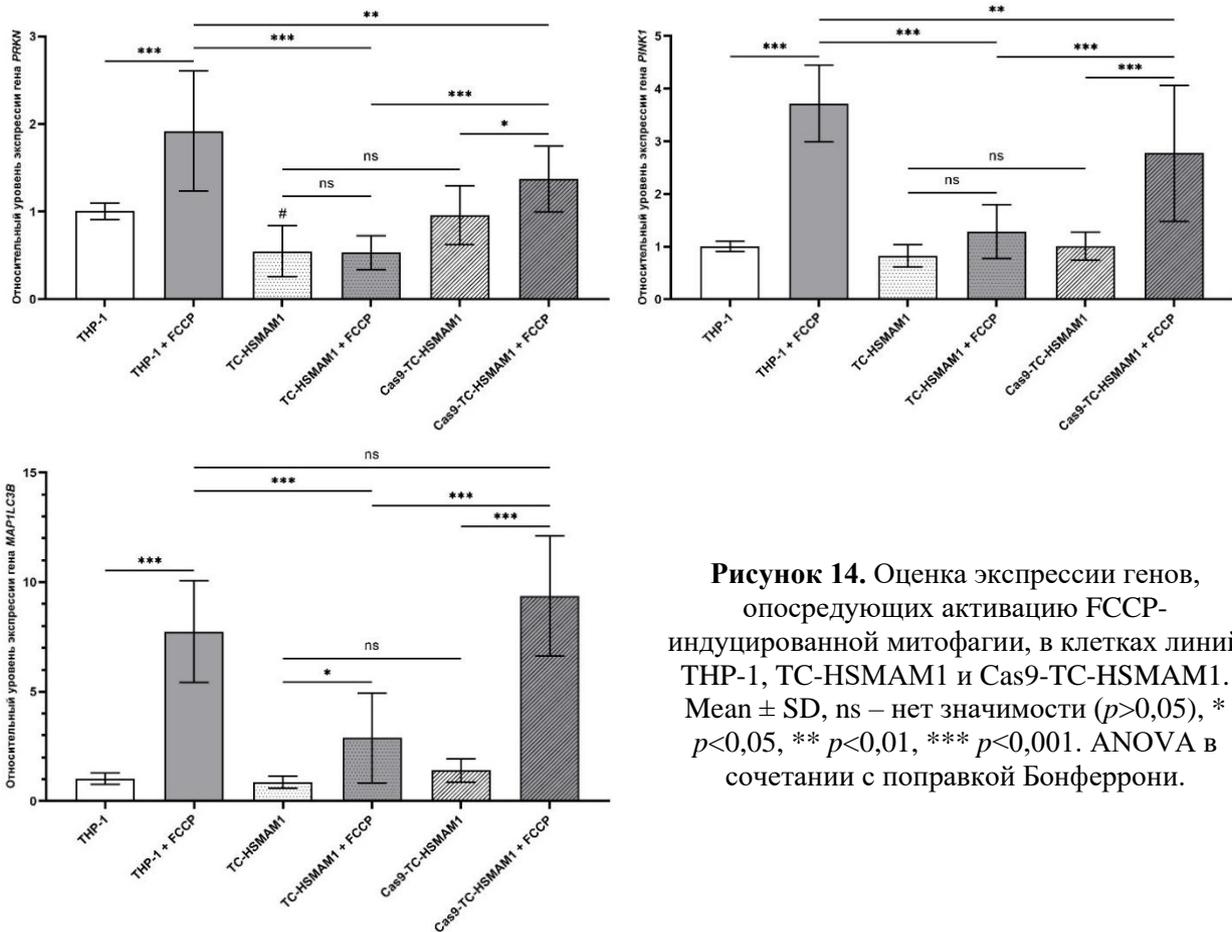


Рисунок 14. Оценка экспрессии генов, опосредующих активацию FCCP-индуцированной митофагии, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

6. Оценка секреции цитокинов клетками линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 в условиях активации провоспалительного ответа

По сравнению с контрольной линией THP-1, в цибридных клетках TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 происходит увеличение базальной секреции ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1 (CCL2) (рис. 15). Однако было обнаружено, что базовая секреция ФНО α клетками Cas9-TC-HSMAM1 статистически значимо от контроля не отличается, тогда как секреция данного цитокина цибридами TC-HSMAM1 значительно усиливается.

Стимуляции провоспалительного фенотипа клеток с помощью ЛПС приводит к значительному увеличению секреции всех цитокинов всеми исследуемыми клеточными линиями. Было выявлено, что секреция ИЛ-8 и MCP-1 в обеих цибридных линиях не имеет статистически значимых отличий от контрольных клеток THP-1. Кроме того, секреция ИЛ-1 β и ФНО α цибридами TC-HSMAM1 статистически значимо снижена по сравнению с клетками контрольной линии THP-1. В то же время, секреция данных цитокинов клетками Cas9-TC-HSMAM1 не отличается от контрольных клеток. Стоит отметить, что удаление мутантной мтДНК в цибридах приводит к значительному увеличению секреции ИЛ-6 по сравнению с клетками линий THP-1 и TC-HSMAM1.

Таким образом, были выявлены сходства между клетками линий TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1, заключающиеся в базальном уровне секреции ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1 (CCL2). Тем не менее, было выявлено снижение базальной секреции ФНО α в клетках цибридов после удаления мутации m.15059G>A по сравнению с цибридными клетками, несущими данную мутацию. В то же время, стимуляция клеток с помощью ЛПС приводила к увеличению секреции ИЛ-1 β и ФНО α клетками Cas9-TC-HSMAM1 до уровня, сходного с контрольной клеточной линией THP-1. Кроме того, в ответ на стимуляцию ЛПС наблюдаются статистически значимое увеличение секреции ИЛ-6 и ИЛ-8 клетками Cas9-TC-HSMAM1 по сравнению с TC-HSMAM1.

На основании полученных результатов можно заключить, что цибридные клетки линии TC-HSMAM1 значительно отличаются по профилю иммунного ответа от контрольных клеток линии THP-1. Клетки Cas9-TC-HSMAM1 не отличаются по базальной секреции цитокинов от клеток линии TC-HSMAM1 с неотредактированным митохондриальным геномом, за исключением сниженной секреции ФНО α . Таким образом, можно сделать вывод, что мутация m.15059G>A вероятно связана с изменением провоспалительного ответа клеток за счет изменения уровня секреции ФНО α и ИЛ-1 β (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A. *et al.*, 2023a).

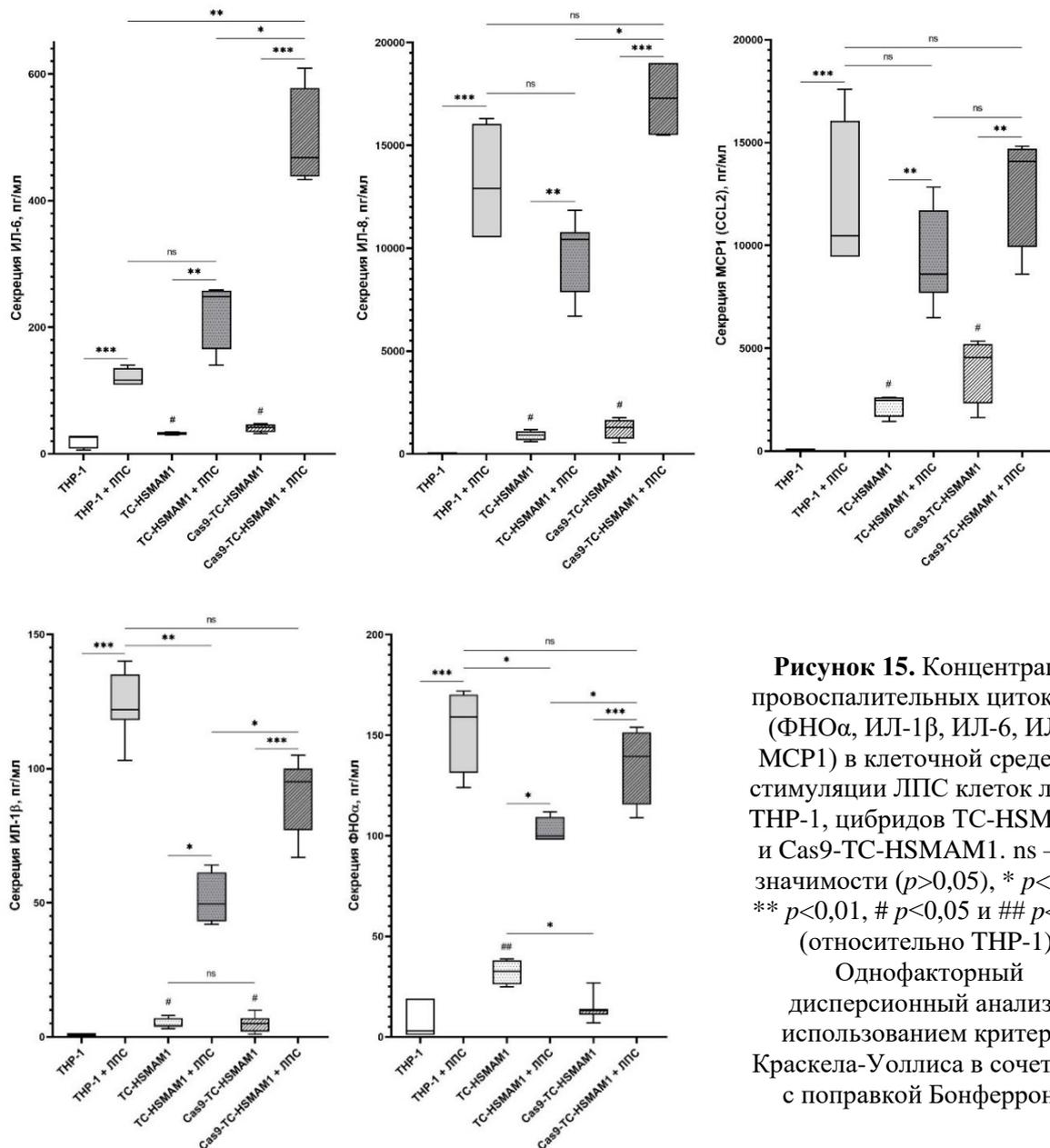


Рисунок 15. Концентрация провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, MCP1) в клеточной среде при стимуляции ЛПС клеток линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. ns – нет значимости ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, # $p < 0,05$ и ## $p < 0,01$ (относительно THP-1).

Однофакторный дисперсионный анализ с использованием критерия Краскела-Уоллиса в сочетании с поправкой Бонферрони.

7. Оценка способности клеток линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 формировать эндотоксиновую толерантность к ЛПС

В контрольных клетках линии THP-1 в ответ на первичную стимуляцию с помощью ЛПС наблюдается статистически значимое увеличение секреции ФНО α по сравнению с условиями без стимуляции (рис. 16). В то же время, наблюдается отсутствие данного эффекта после повторной стимуляции, которое выражается в снижении секреции данного цитокина в 3,74 раза по сравнению с условиями при однократной стимуляции. Таким образом, в клетках THP-1 наблюдается проявление эндотоксиновой толерантности.

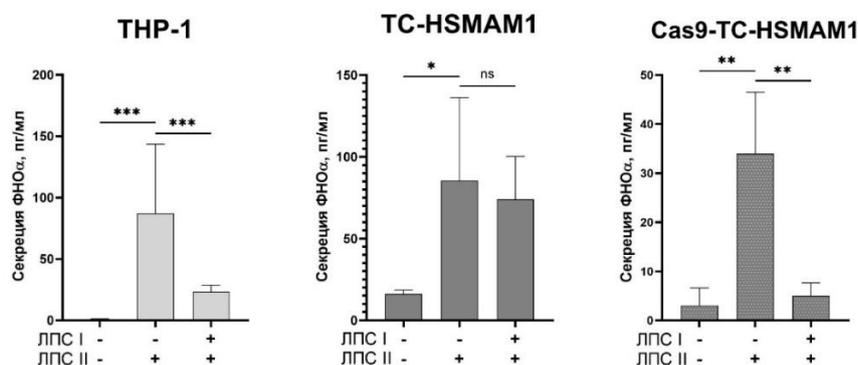


Рисунок 16.

Концентрация ФНО α в клеточной среде в условиях двойной провоспалительной стимуляции с помощью ЛПС клеток линий THP-1, гибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. t -критерий Стьюдента.

В свою очередь, в клетках TC-HSMAM1 наблюдается повышенная секреция ФНО α как при первичной, так и при повторной стимуляции с помощью ЛПС в 5,31 и 4,59 раз соответственно по сравнению с условиями без стимуляции. Таким образом, в гибридах, несущих мутацию m.15059G>A, не происходит формирования эндотоксиновой толерантности при воздействии на них ЛПС.

В гибридах с удаленной мутантной мтДНК обнаруживается снижение секреции ФНО α по сравнению как с клетками THP-1, так и с гибридами TC-HSMAM1 после первичной стимуляции ЛПС до значений $34,00 \pm 12,49$ пг/мл. Тем не менее, при повторной стимуляции клеток Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается снижение секреции ФНО α в 6,81 раз по сравнению с уровнем секреции данного цитокина после первой стимуляции. Соответственно, наблюдается восстановление эндотоксиновой толерантности у гибридов Cas9-TC-HSMAM1.

Таким образом, исследуемая мутация m.15059G>A оказывает негативное влияние на способность моноцитов формировать эндотоксиновую иммунную толерантность, что вероятно будет препятствовать разрешению воспаления и способствовать его хронизации (Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2023a; Sukhorukov V. N. et al., 2024).

8. Анализ экспрессии генов, ассоциированных с формированием инфламмосомы, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

Выявлено, что уровень базальной экспрессии генов *NLRP3* и *IL1B* в клетках гибридной линии TC-HSMAM1 статистически значимо увеличен по сравнению с контрольными клетками THP-1 — в 1,66 и 192,88 раз, соответственно (рис. 17). В то же время, экспрессия гена *CASP1* статистически значимо от контрольных клеток не отличается. В гибридах после удаления мутации m.15059G>A обнаружено снижение базальной экспрессии гена *CASP1*, а также увеличение экспрессии *IL1B* в 136,70 раз по сравнению с контрольными клетками. В то же время, экспрессия гена *NLRP3* статистически значимо от контрольных клеток не отличается. Кроме того, базальная экспрессия всех исследуемых генов в клетках Cas9-TC-HSMAM1 статистически значимо снижена по сравнению с клеточной линией TC-HSMAM1.

Стимуляция клеток линии TC-HSMAM1 с помощью ЛПС приводила к увеличению экспрессии гена *CASP1* в 1,90 раза по сравнению с клетками без стимуляции, тогда как экспрессия генов *IL1B* и *NLRP3* не изменялась. Более того, экспрессия гена *IL1B* в ЛПС-

стимулированных клетках TC-HSMAM1 значительно превышает таковую в клетках линии THP-1, использованной в качестве контроля. Однако, экспрессия гена *CASP1* в ЛПС-стимулированных клетках TC-HSMAM1 значительно снижена по сравнению с контрольными клетками в аналогичных условиях. В стимулированных с помощью ЛПС клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается статистически значимое увеличение всех исследуемых генов по сравнению с нестимулированными клетками. В то же время, экспрессия *NLRP3* статистически значимо увеличивается в 1,28 раз по сравнению с клеточной линией TC-HSMAM1, тогда как экспрессия генов *CASP1* и *IL1B* между обеими клеточными линиями не отличается.

Таким образом, можно заключить, что мутация m.15059G>A может быть ассоциирована с усилением про-воспалительного ответа и формированием NLRP3 инфламмосомы в связи с повышенной базальной экспрессией генов *NLRP3* и *IL1B* (Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2023b; Khotina V. A. et al., 2023).

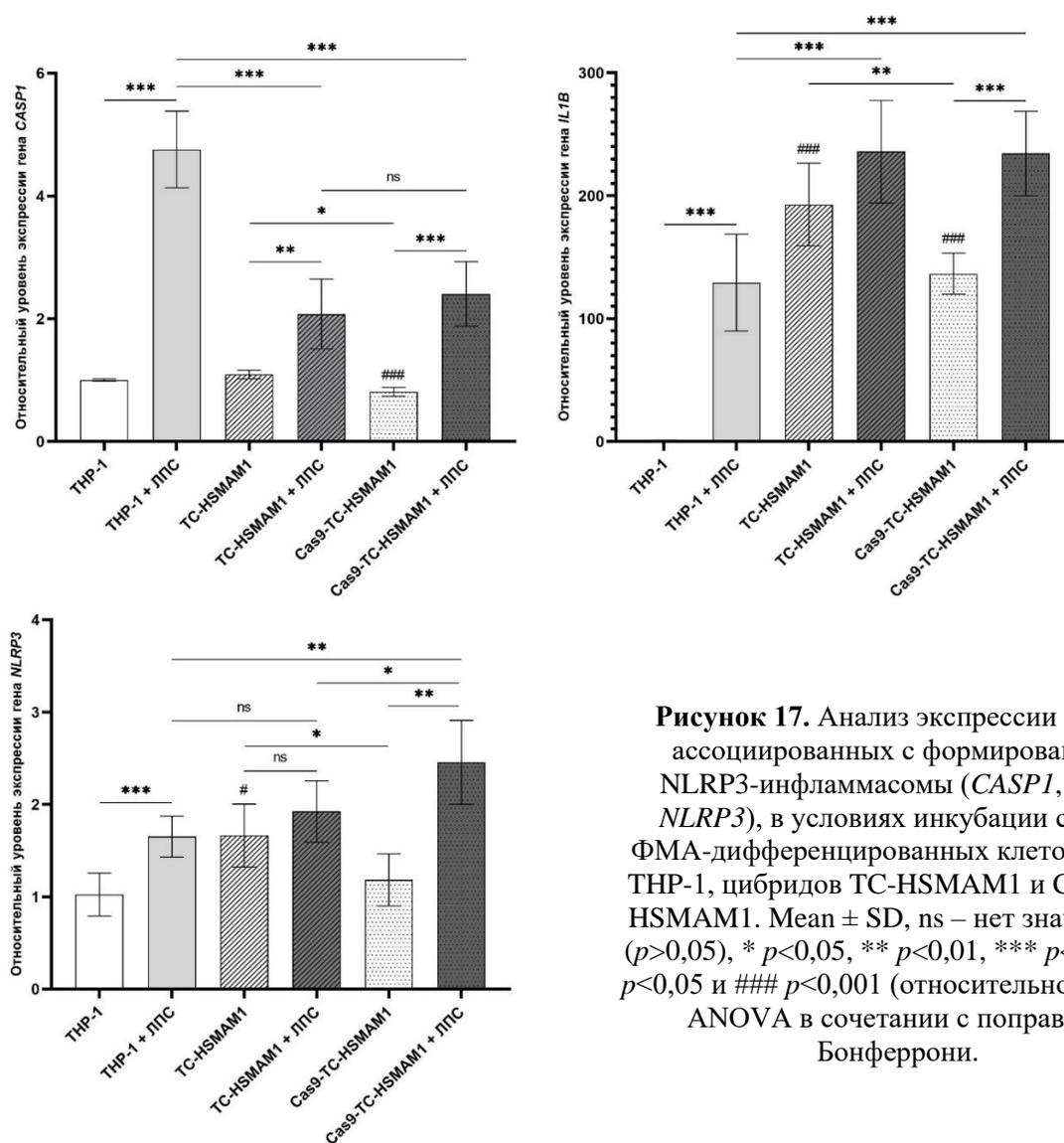


Рисунок 17. Анализ экспрессии генов, ассоциированных с формированием NLRP3-инфламмосомы (*CASP1*, *IL1B*, *NLRP3*), в условиях инкубации с ЛПС ФМА-дифференцированных клеток линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$ и ### $p < 0,001$ (относительно THP-1). ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

9. Оценка накопления внутриклеточного холестерина липопротеидов низкой плотности клетками линий TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

Обнаружено, что исходное содержание общего холестерина во всех исследуемых линиях клеток статистически значимо не отличалось (рис. 18). С другой стороны, в клетках контрольной линии THP-1, инкубированных с ЛПНП атеросклеротических больных, содержание холестерина возрастало в 1,15 раз, что свидетельствует о проявлении ЛПНП больных атерогенных свойств в культуре нативных клеток. Инкубация цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 с атерогенными ЛПНП также приводила к статистически

значимому увеличению содержания общего холестерина в 1,29 и 1,26 раз соответственно по сравнению с клетками, не инкубированными с ЛПНП.

Тем не менее, значения содержания общего холестерина в обеих гибридных линиях, инкубированных с ЛПНП больных, статистически значимо не отличаются между собой, что может свидетельствовать о том, что мутация *m.15059G>A* в гене *MT-CYB* не оказывает значительного влияния на внутриклеточное накопление холестерина ЛПНП клетками, поскольку удаление мтДНК не привело к значимому изменению накопления холестерина в гибридных линиях (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023a; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2024; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022).

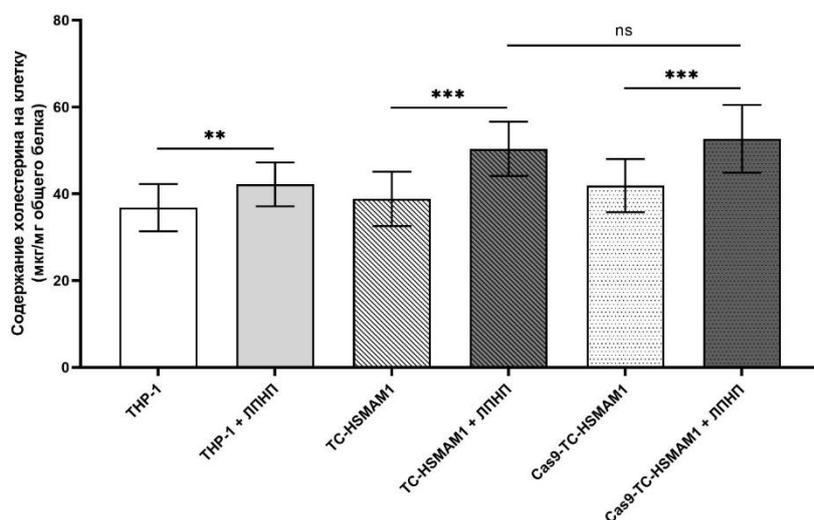


Рисунок 18. Анализ содержания холестерина клетками линий THP-1, гибридов TC-HSMAM1 и гибридов Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

10. Оценка регуляции внутриклеточного метаболизма липидов в клетках линий THP-1, гибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 в условиях инкубации с ЛПНП

Анализ экспрессии выявил снижение базальных уровней всех изучаемых генов в клетках линии TC-HSMAM1 по сравнению с контрольной линией THP-1 (рис. 19). В клетках Cas9-TC-HSMAM1 также наблюдается снижение экспрессии генов *ACAT1*, *FASN* и *NCEH1* по сравнению с клетками линии THP-1, однако уровень базальной экспрессии генов *LIPA* и *CES1* остается на сопоставимом с контролем уровне. В то же время, в клетках TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 значения экспрессии большинства генов, кодирующих ферменты липидного метаболизма, статистически значимо не различались, за исключением генов *CES1* и *LIPA*, для которых было продемонстрировано повышение экспрессии в клетках Cas9-TC-HSMAM1.

В результате инкубации контрольных клеток THP-1 с атерогенными ЛПНП наблюдалось значительное повышение экспрессии генов *ACAT1*, *LIPA*, *CES1* и *NCEH1*, а также снижение экспрессии *FASN* по сравнению с базальными уровнями. В гибридах TC-HSMAM1 инкубация с ЛПНП приводила к увеличению экспрессии *ACAT1* и *FASN*, при этом экспрессия генов *LIPA*, *NCEH1* и *CES1* оставалась на базальном уровне. Инкубация ЛПНП клеток Cas9-TC-HSMAM1 с удаленной мутантной мтДНК сопровождалась повышением экспрессии генов *LIPA* и *ACAT1*, и снижением экспрессии *FASN* по сравнению с базальными уровнями, тогда как экспрессия *NCEH1* и *CES1* оставалась неизменной.

Комплексная оценка экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты липидного метаболизма, в клетках гибридных линий до и после удаления мтДНК, несущей *m.15059G>A* мутацию, позволяет предположить, что наличие в клетках данной мутации может оказывать влияние на внутриклеточный липидный метаболизм, за счет изменения экспрессии гена *FASN* (рис. 19). В отсутствие мутации *m.15059G>A* добавление ЛПНП к макрофагальным клеткам приводит к снижению экспрессии *FASN*, что, вероятно, может быть обусловлено снижением потребности клеток в *de novo* синтезированных жирных кислотах, связанного с наличием экзогенного источника жирных кислот. Однако, в гибридах, несущих мутацию *m.15059G>A*, снижении экспрессии данного гена не наблюдалось (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023a; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2024; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022).

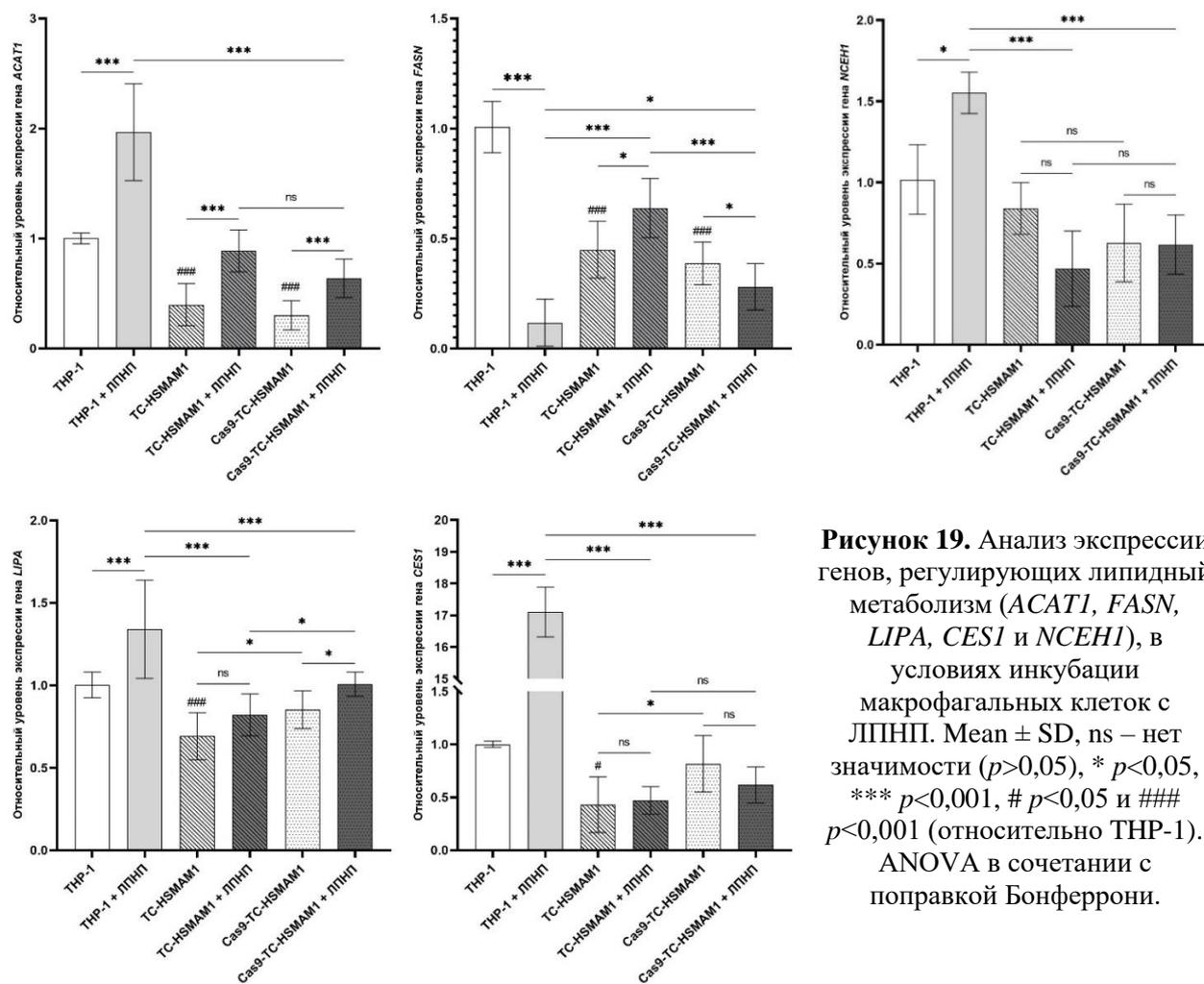


Рисунок 19. Анализ экспрессии генов, регулирующих липидный метаболизм (*ACAT1*, *FASN*, *LIPA*, *CES1* и *NCEH1*), в условиях инкубации макрофагальных клеток с ЛПНП. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$ и ### $p < 0,001$ (относительно THP-1). ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

11. Анализ экспрессии генов, регулирующих апоптоз, в клетках линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и цибридов Cas9-TC-HSMAM1

Наблюдается статистически значимое увеличение экспрессии генов *BCL2*, *CASP3* и *APAF1* в клетках цибридной линии TC-HSMAM1 в 1,62, 2,72 и 2,12 раз соответственно по сравнению с контрольными клетками THP-1 (рис. 20). Кроме того, в клетках линии TC-HSMAM1 наблюдается снижение экспрессии *BAX* и *CASP9* по сравнению с контрольными клетками.

После удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A в цибридных клетках наблюдается увеличение экспрессии генов *BAX* и *CASP9* в 1,42 и 4,08 раз соответственно, а также снижение экспрессии *CASP3* в 1,34 раза по сравнению с неотредактированными клетками. В ходе анализа экспрессии генов *BCL2* и *APAF1* не выявлено статистически значимых различий между двумя линиями цибридных клеток. Тем не менее, уровни экспрессии генов *CASP3* и *CASP9* в клетках Cas9-TC-HSMAM1 оказались значительно выше, чем в контрольной линии THP-1, в то время как для экспрессии *BAX* не было продемонстрировано статистически значимых изменений.

Оценка отношения экспрессии генов *BAX* к *BCL2* показала снижение его значений в клетках TC-HSMAM1 по сравнению с контрольными клетками THP-1 в 2,54 раза (рис. 21). В клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается тенденция к повышению соотношения *BAX/BCL2* относительно TC-HSMAM1, однако значение данного показателя остается ниже уровня, выявленного в контрольных клетках, в 1,94 раза.

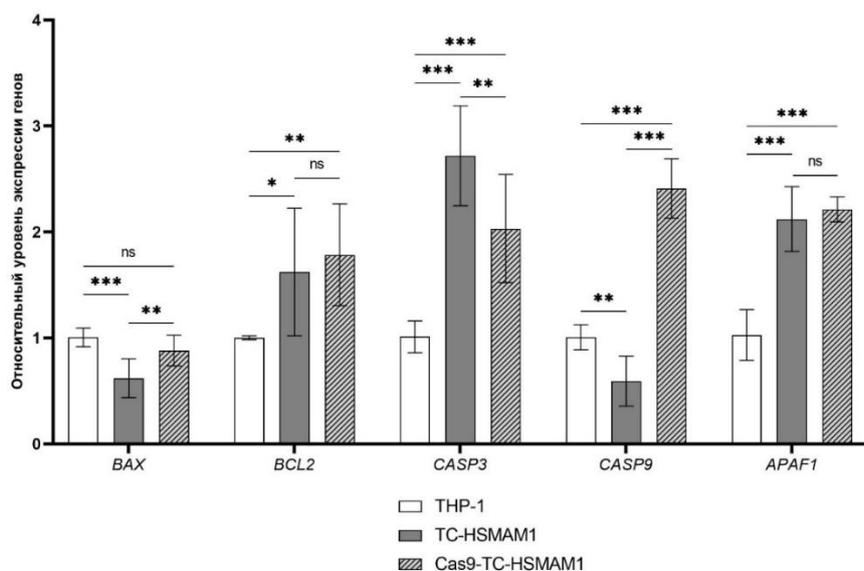


Рисунок 20. Оценка экспрессии генов, ассоциированных с апоптозом, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

Анализ полученных данных показал, что удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, приводит к статистически значимому снижению экспрессии *CASP3*, а также увеличению экспрессии *BAX* и *CASP9* по сравнению с линией цибридов TC-HSMAM1, несущей патогенную мутацию. Таким образом, можно заключить, что мутация m.15059G>A, вероятно, может оказывать влияние на экспрессию данных генов, опосредующих апоптоз в клетках (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b).

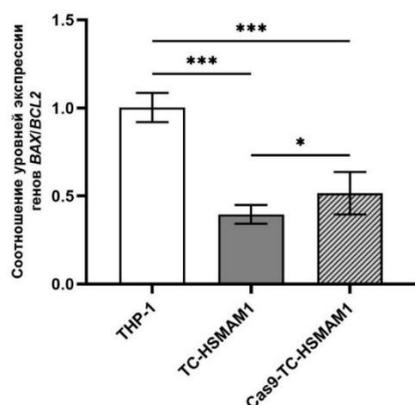


Рисунок 21. Соотношение уровней экспрессии генов *BAX/BCL2* клеток линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

12. Анализ экспрессии генов, регулирующих пролиферацию и клеточный цикл, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

Установлено, что в клетках TC-HSMAM1 экспрессия *PCNA*, *CCNB1* и *CCND1* увеличена в 2,19, 2,73 и 3,71 раза соответственно по сравнению с клетками линии THP-1 (рис. 22). После удаления мутации m.15059G>A в клетках Cas9-TC-HSMAM1 также наблюдается увеличение экспрессии генов *PCNA* и *CCND1* по сравнению с контрольной линией клеток THP-1 в 2,79 и 2,69 раз соответственно. В то же время, было обнаружено, что экспрессия гена *CCNB1* статистически значимо от контрольных клеток не отличалась. Статистически значимой разницы в экспрессии генов *PCNA* и *CCND1* в цибридных клетках до и после удаления мутации не обнаруживается. Однако, в клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается статистически значимое снижение экспрессии гена *CCNB1* по сравнению с TC-HSMAM1.

Таким образом, обнаружено, что наличие мутации m.15059G>A в мтДНК моноцитов может быть связано с увеличением экспрессии гена *CCNB1*, ассоциированного с регуляцией митоза клеток (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b; Khotina V. A. *et al.*, 2023a).

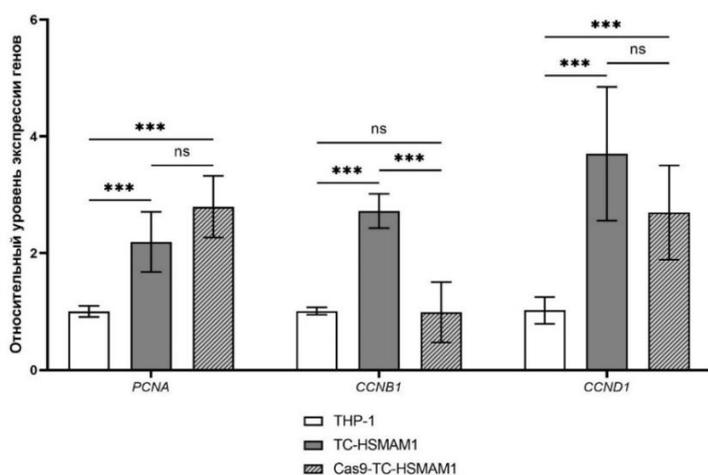


Рисунок 22. Оценка экспрессии генов, опосредующих пролиферативную активность моноцитоподобных клеток линии THP-1, гибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), *** $p < 0,001$. ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

13. Анализ экспрессии генов, ассоциированных с синтетической активностью и регуляцией транскрипции, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

Обнаружено, что экспрессия генов *POLR1A* и *COL6A1* в клетках гибридной линии TC-HSMAM1 статистически значимо увеличивается в 1,54 и 2,41 раз соответственно по сравнению с THP-1, тогда как экспрессия *POLR3A* снижается (рис. 23). После удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A в клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается увеличение экспрессии гена *POLR3A* в 2,07 раз по сравнению с контрольной линией клеток THP-1, тогда как экспрессия гена *POLR1A* статистически значимо снижалась. В то же время, экспрессия *COL6A1* статистически значимо между обеими клеточными линиями не отличалась. По сравнению с линией TC-HSMAM1, в клетках после удаления мтДНК с мутацией наблюдается статистически значимое снижение экспрессии генов *POLR1A* и *COL6A1*, тогда как экспрессия *POLR3A* увеличивается.

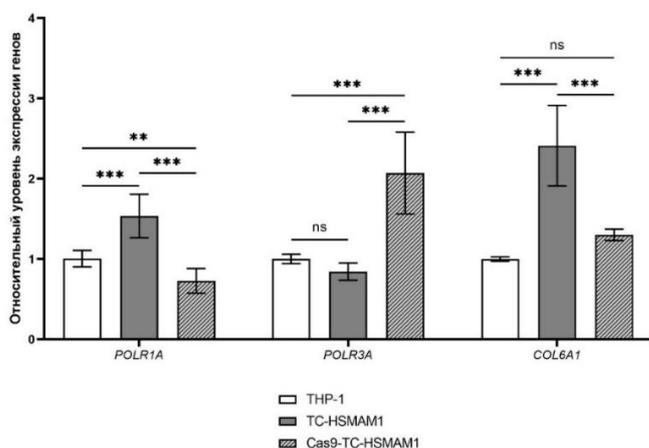


Рисунок 23. Оценка экспрессии генов, опосредующих синтез рНК и коллагена, в ФМА-дифференцированных макрофагальных клетках, полученных из клеток линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean \pm SD, ns – нет значимости ($p > 0,05$), ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони.

На основании полученных данных можно заключить, что наличие мутации m.15059G>A в мтДНК макрофагов может быть связано с увеличением экспрессии *POLR1A* и *COL6A1*, что, вероятно, может способствовать усилению синтеза 18S, 5.8S и 28S рРНК, а также продукции ВКМ (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b; Khotina V. A. et al., 2023a).

ВЫВОДЫ

1. Мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* вносит вклад в развитие митохондриальной дисфункции в моноцитоподобных клетках. Это проявляется в нарушении биоэнергетического профиля митохондрий за счет увеличения немитохондриального дыхания и утечки протонов, а также снижения общей митохондриальной эффективности. Наличие мутации m.15059G>A также приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий и повышению продукции АФК. Наличие мутации m.15059G>A в мтДНК моноцитоподобных клеток приводит к нарушению активации PINK1/Parkin-опосредованного пути митофагии; проявление дефектной митофагии сопровождается сниженной экспрессией *PINK1*, *PRKN* и *MAP1LC3B*.

2. Мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* связана с изменением воспалительного статуса моноцитоподобных и макрофагальных клеток. Моноцитоподобные клетки с мутацией m.15059G>A характеризуются повышенной базальной секрецией ФНО α , а также сниженной секрецией ФНО α и ИЛ-1 β в условиях провоспалительной стимуляции. Клетки с данной мутацией в мтДНК характеризуются неспособностью формировать эндотоксиновую толерантность. Наличие мутации m.15059G>A в мтДНК макрофагальных клеток приводит к повышенной базальной экспрессии генов *NLRP3* и *IL1B*, участвующих в формировании NLRP3-инфламмосомы.

3. Мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* связана с увеличением экспрессии гена *FASN*, что может способствовать усилению синтеза жирных кислот в макрофагах.

4. Наличие мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* вызывает изменения в экспрессии генов, регулирующих апоптоз. В макрофагальных клетках, несущих эту мутацию, наблюдается повышенная экспрессия *CASP3*, сниженная экспрессия *BAX* и *CASP9*, а также снижение соотношения *BAX/BCL2*.

5. Мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* влияет на регуляцию как митотического деления моноцитоподобных клеток, так и синтетической активности макрофагальных клеток. В клетках, несущих данную мутацию в мтДНК, наблюдается повышенная экспрессия генов *CCNB1*, *POLR1A* и *COL6A1*.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Статьи

1. Chistiakov D.A., Kashirskikh D.A., **Khotina V.A.**, Grechko A.V., Orekhov A.N. Immune-Inflammatory Responses in Atherosclerosis: The Role of Myeloid Cells // *Journal of Clinical Medicine*. — 2019. — Vol.8, №1798. DOI: 10.3390/jcm8111798 (CiteScore 5.7; WoS 3.0; Q1)
2. **Хотина В.А.**, Сухоруков В.Н., Каширских Д.А., Собенин И.А., Орехов А.Н. Метаболизм холестерина в макрофагах // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. — 2020. — Т. 9, № 2. — С. 91–101. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-91-101 (К2; РИНЦ 0,967)
3. Markin A.M., **Khotina V.A.**, Zabudskaya X.G., Bogatyreva A.I., Starodubova A.V., Ivanova E.I., Nikiforov N.G., Orekhov A.N. Disturbance of mitochondrial dynamics and mitochondrial therapies in atherosclerosis // *Life*. — 2021. — 11(2):165. DOI: 10.3390/life11020165 (CiteScore 4.3; WoS 3.2; Q2)
4. Dabravolski S.A., **Khotina V.A.**, Sukhorukov V.N., Kalmykov V.A., Mikhaleva L.M., Orekhov A.N. The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Cardiovascular Diseases // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2022. — 23(2):952. DOI: 10.3390/ijms23020952 (CiteScore 8.1; WoS 4.9; Q1)
5. **Khotina V.A.**, Bagheri Ekta M., Baig M.S., Wu W.-K., Grechko A.V., Sukhorukov V.N. Challenges of mitochondrial DNA editing in mammalian cells: focus on treatment of cardiovascular disease // *Vessel Plus*. — 2022. — 6(65). DOI: 10.20517/2574-1209.2022.28 (CiteScore 1.8; Q3)
6. **Khotina V.A.**, Vinokurov A.Y., Bagheri Ekta M., Sukhorukov V.N., Orekhov A.N. Creation of Mitochondrial Disease Models Using Mitochondrial DNA Editing // *Biomedicines*. — 2023. — 11(2):532. DOI: 10.3390/biomedicines11020532 (CiteScore 5.2; WoS 3.9; Q1)
7. Orekhov A.N., Summerhill V.I., **Khotina V.A.**, Popov M.A., Uzokov J.K., Sukhorukov V.N. Role of Mitochondria in the Chronification of Inflammation: Focus on Dysfunctional Mitophagy and Mitochondrial DNA Mutations // *Gene Expression*. — 2023. — Vol. 22., № 4. — P. 329–344. DOI: 10.14218/GE.2023.00061 (CiteScore 3.8; Q2)
8. Sukhorukov V.N., **Khotina V.A.**, Kalmykov V.A., Zhuravlev A.D., Sinyov V.V., Popov D.Y., Vinokurov A.Y., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Mitochondrial Genome Editing: Exploring the Possible Relationship of the Atherosclerosis-Associated Mutation m.15059G>A With Defective Mitophagy // *Journal of Lipid and Atherosclerosis*. — 2024. — Vol. 13, № 2. — P. 166–183. DOI: 10.12997/jla.2024.13.2.166 (CiteScore 6.9; Q1)
9. **Khotina V.A.**, Vinokurov A.Y., Sinyov V.V., Zhuravlev A.D., Popov D.Y., Sukhorukov V.N., Sobenin I.A., Orekhov A.N. Mitochondrial Dysfunction Associated with mtDNA Mutation: Mitochondrial Genome Editing in Atherosclerosis Research // *Current Medicinal Chemistry*. — 2024. DOI: 10.2174/0109298673323639240926095549 (CiteScore 8.6; Q2)

Материалы конференций (Тезисы)

1. Sukhorukov V.N., Kalmykov V.A., **Khotina V.A.**, Sinyov V.V., Khasanova Z.B., Sobenin I.A. Approach to edit mitochondrial DNA mutations associated with atherosclerosis // *Atherosclerosis*. — 2021. — Vol. 331. — P. 70–71. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.06.204 (CiteScore 9.8; WoS 4.9; Q1)
2. Sukhorukov V.N., Kalmykov V.A., **Khotina V.A.**, Shmendel E., Puchkov P., Maslov M., Sobenin I.A. Elimination of atherosclerosis related mutation from mitochondrial Cytb gene // *Proceedings of the 19th International Symposium on Atherosclerosis (ISA2021), Kyoto, Japan, 2021*. — P. 439.
3. Sukhorukov V.N., Kalmykov V.A., **Khotina V.A.**, Omelchenko A.V., Orekhova V.A., Orekhov A.N. Mitochondrial DNA CRISPR/CAS9 editing: An approach to establishing the role of mitochondrial mutations in atherogenesis // *Atherosclerosis*. — 2022. — Vol. 355. — P. 53. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2022.06.385 (CiteScore 9.8; WoS 4.9; Q1)

4. Sukhorukov V.N., **Khotina V.A.**, Sobenin I.A., Orekhov A.N. Mutation in CytB gene associated with macrophage intracellular lipid metabolism // Proceedings of the 11th International Congress on Lipid & Atherosclerosis 2022 (ICoLA 2022), Seoul, South Korea, 2022.
5. **Khotina V.A.**, Zhuravlev A.D., Sukhorukov V.N., Sobenin I.A., Sazonova M.A. Mutation m.15059G>A in Cytb gene associated with macrophage pro-inflammatory cytokines production // *Atherosclerosis*. – 2023. – Vol. 379. – P. 19–20. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.111 (CiteScore 9.8; WoS 4.9; Q1)
6. **Khotina V.A.**, Sukhorukov V.N. Nonsense mutation in mitochondrial CYTB gene and macrophage lipid metabolism // *Atherosclerosis*. – 2023. – Vol. 379. – P. 65. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.257 (CiteScore 9.8; WoS 4.9; Q1)
7. **Khotina V.A.**, Sukhorukov V. N., Sobenin I.A. Association of mutation in CytB gene with caspase-1 activation and IL-1 β production in macrophages // *Atherosclerosis*. – 2023. – Vol. 379. – P. 20. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.112 (CiteScore 9.8; WoS 4.9; Q1)
8. **Khotina V.A.**, Sukhorukov V.N., Sobenin I.A. Association of mutation in the mtDNA Cytb gene with macrophage proliferation and synthetic activity// *Atherosclerosis*. – 2023. – Vol. 379. – P. 29. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.143 (CiteScore 9.8; WoS 4.9; Q1)
9. Sukhorukov V.N., **Khotina V.A.**, Zhuravlev A.D., Orekhov A.N. Dysfunctional mitophagy associated mutation in THP-1 cells // *Atherosclerosis*. – 2023. – Vol. 379. – P. 46. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2023.06.199 (CiteScore 9.8; WoS 4.9; Q1)
10. **Khotina V.A.**, Sukhorukov V.N. Association of the m.15059G>A mutation in Cytochrome B gene and the expression of genes involved in cell cycle regulation, protein synthesis and apoptosis in monocytes and macrophages: implications for atherosclerotic plaque development // *Cardiovascular Innovations and Applications*. – 2023. – Vol. 8. – P. 12–13.
11. **Khotina V.A.**, Sinyov V.V., Sukhorukov V.N. Study of the effect of the m.15059G>A mutation in the MT-CYB gene on mitochondrial respiration and the bioenergetic profile of monocytes: revealing the role of cellular dysfunction in atherosclerosis // *Cardiovascular Innovations and Applications*. – 2023. – Vol. 8. – P. 13.
12. **Khotina V.A.**, Zhuravlev A.D., Sukhorukov V.N. Correlation between mutation m.15059G>A in mitochondrial Cytochrome B gene and pro-inflammatory cytokine secretion in monocytes: implications for the development of atherosclerosis // *Cardiovascular Innovations and Applications*. – 2023. – Vol. 8. – P.12.
13. **Khotina V.A.**, Zhuravlev A.D., Sukhorukov V.N. The link between atherosclerosis-associated mutation in Cytochrome B gene and expression of genes related to NLRP3 inflammasome activation in macrophages // *Cardiovascular Innovations and Applications*. – 2023. – Vol. 8. – P. 13.
14. **Khotina V.A.**, Sinyov V.V., Lee A.A., Kalmykov A.V., Sukhorukov V.N. Impaired mitochondrial respiration of monocytes: a potential role of atherosclerosis-associated mutation m.15059G>A in the Cytochrome b gene in cell energetics // Proceedings of the 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, 2023. – P. 52.
15. **Khotina V.A.**, Zhuravlev A.D., Bagheri-Ekta M., Sukhorukov V.N. Atherosclerosis-associated m.15059G>A mutation in Cytochrome B gene: the role in TNF α secretion and immune tolerance formation by monocytes // Proceedings of the 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, 2023. – P. 51.
16. **Khotina V.A.**, Zhuravlev A.D., Lee A.A., Kalmykov A.V., Sukhorukov V.N. Correlation between atherosclerosis-associated mutation in Cytochrome B gene and NLRP3 inflammasome activation in macrophages // Proceedings of the 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, 2023. – P. 53.
17. **Khotina V.A.**, Bagheri-Ekta M., Sukhorukov V.N. Interplay of the atherosclerosis-associated mutation m.15059G>A in Cytochrome B gene with expression of apoptosis-related genes in macrophages // Proceedings of the 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, 2023. – P. 54.