Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

На правах рукописи

Хотина Виктория Александровна

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА В ФОРМИРОВАНИИ ПРОАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1 И СОЗДАННЫХ НА ИХ ОСНОВЕ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ

3.3.3 – Патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Собенин Игорь Александрович

оглавление

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ6
ВВЕДЕНИЕ15
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 19
1.1. Атеросклероз как многофакторное заболевание19
1.1.1. Понятие атеросклероза, общие сведения
1.1.2. Основные типы атеросклеротических поражений
1.2. Роль моноцитов и макрофагов в атерогенезе
1.2.1. Характеристика субпопуляций макрофагов
1.2.2. Участие макрофагов в формировании атеросклеротических поражений
1.3. Связь митохондриальной дисфункции с возникновением и развитием
атеросклероза
1.3.1. Основные последствия развития митохондриальной дисфункции в клетках атеросклеротических поражений
1.3.2. Структура, функции и механизмы регуляции митохондриального генома
1.3.3. Корреляция мутаций митохондриального генома с развитием атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний
1.4. Использование современных методов для исследования атерогенеза <i>in vitro</i> 46
1.4.1. Клеточные модели исследования атеросклероза 46
1.4.2. Основные подходы к редактированию митохондриального генома
1.5. Заключение к обзору литературы 58

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
2.1. Работа с культурами клеток 60
2.1.1 Клеточные линии
2.1.2 Протокол культивирования моноцитоподобных клеточных линий и
дифференцировки в макрофагоподобные клетки 62
2.1.3 Трансфекция клеток катионными липосомами и вектором MitoCas9
2.2. Молекулярно-биологические методы 64
2.2.1 Выделение ДНК из образцов клеток
2.2.2 Выделение РНК из образцов клеток и проведение реакции обратной
транскрипции для получения комплементарной ДНК
2.2.3 Количественная полимеразная цепная реакция
2.2.4 Т7-анализ эффективности внесения двуцепочечных разрывов в
митохондриальной ДНК68
2.2.5 Цифровая капельная полимеразная цепная реакция
2.3. Биохимические методы70
2.3.1 Электрофорез в агарозном геле70
2.3.2 Иммуноферментный анализ провоспалительных цитокинов71
2.3.3 Выделение суммарной фракции ЛПНП из плазмы крови
2.3.4 Определение содержания общего холестерина и общего белка 74
2.3.5 Определение скорости потребления кислорода клетками
2.4. Микроскопия
2.4.1 Оценка жизнеспособности клеток 78
2.4.2 Оценка колокализации митохондрий и лизосом при помощи
конфокальной микроскопии79
2.5. Проточная цитофлуориметрия

2.5.1 Оценка уровня АФК, генерируемого клетками, и перекисного
окисления липидов
2.5.2 Анализ мембранного потенциала митохондрий 81
2.6. Статистическая обработка данных
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
3.1. Удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A в гене <i>MT-CYB</i> , при
помощи РНК-комплекса MitoCas9 в клетках линии цитоплазматических
гибридов TC-HSMAM184
3.2. 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
3.3. Анализ скорости потребления кислорода и митохондриального
биоэнергетического профиля клеток цибридных линий TC-HSMAM1 и
Cas9-TC-HSMAM1
3.4. Оценка митохондриальной дисфункции по отношению к активации
митофагии в клетках линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-
HSMAM1
3.5. Анализ экспрессии генов, опосредующих митофагию, в клетках линий
ТНР-1, цибридов TC-HSMAM1 и цибридов Cas9-TC-HSMAM1 101
3.6. Оценка секреции цитокинов клетками линий THP-1, TC-HSMAM1 и
3.6. Оценка секреции цитокинов клетками линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 в условиях активации провоспалительного ответа 103
 3.6. Оценка секреции цитокинов клетками линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 в условиях активации провоспалительного ответа 103 3.7. Оценка способности клеток линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-

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

108

3.9. Оценка накопления внутриклеточного холестерина липопротеидов низкой плотности клетками линий TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1...111 3.10. Оценка регуляции внутриклеточного метаболизма липидов в клетках линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 в условиях инкубации с ЛПНП. 113 Анализ экспрессии генов, регулирующих апоптоз, в клетках линий 3.11. ТНР-1, цибридов TC-HSMAM1 и цибридов Cas9-TC-HSMAM1......116 3.12. Анализ экспрессии генов, регулирующих пролиферацию И клеточный цикл, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-Анализ экспрессии генов, ассоциированных с синтетической 3.13. активностью и регуляцией транскрипции, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. 119 Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 122 ВЫВОДЫ.....147 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ......149

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 мутаций ДНК выявили корреляцию митохондриальной (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.*, 2016; 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; Баринова 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 интима-медии у пациентов с диагностированным атеросклерозом (Sobenin I. A. et al., 2012; Sobenin I. A., 2013; Баринова В. А. et al., 2015). m.15059G>A образованию Мутация приводит к 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 и задачи исследования

Цель: 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.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- 1. Оценить влияние мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* на митохондриальную функцию моноцитоподобных клеток;
- Исследовать связь мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* с изменением воспалительного статуса моноцитоподобных цитоплазматических гибридов TC-HSMAM1;
- 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;
- 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.

Методология и методы исследования

Цитоплазматические гибриды (цибриды) представляют собой линии эукариотических клеток, образованные путем слияния клеток, лишенных митохондрий (rho0), с безъядерными клетками, являющимися донорами митохондрий (например, тромбоцитами). В экспериментах была использована цибридная линия TC-HSMAM1, охарактеризованная по полоногеномной ДНК. последовательности митохондриальной Для удаления мтДНК. содержащей мутацию m.15059G>A в гене цитохрома b (MT-CYB) был использован адаптированный для применения на митохондриях вектор MitoCas9. В качестве системы доставки вектора к клеткам использованы липосомы. Эффективность маннозил-содержащие катионные вектора MitoCas9 по удалению мтДНК с мутацией в гене *MT-CYB* оценивали по числу разрезанных митохондриальных колец методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР). На цибридной линии клеток TC-HSMAM1 были оценены параметры, характеризующие митохондриальную дисфункцию, а также функциональные показатели, связанные с формированием патологического (проатеросклеротического) фенотипа. Эти показатели включали показатели митохондриальной дисфункции (изменение мембранного потенциала митохондрий, уровня продукции активных форм кислорода и образования продуктов перекисного окисления липидов мембран митохондрий с помощью митофагии проточной цитофлуориметрии; уровня (по соотношению колокализации митохондрий и лизосом клеток методом конфокальной микроскопии; по экспрессии генов РТЕN-индуцированной киназы 1 (PINK1), E3 убиквитин-лигазы паркин (PRKN) и ассоциированных с микротрубочками белков 1А/1В легкой цепи 3В (MAP1LC3B); оценка митохондриальной биоэнергетической функции и скорости потребления кислорода клетками полярографическим методом); способность клеток накапливать холестерин множественно модифицированных липопротеидов низкой плотности; внутриклеточного метаболизма липидов активность (по содержанию внутриклеточного холестерина клетками биохимическими методами, по генов митохондриальной ацетил-КоА-ацетилтрансферазы экспрессии 1 (ACAT1), лизосомальной липазы (LIPA), синтазы жирных кислот (FASN), гидролазы эфира холестерина 1 (CES1) и нейтральной гидролазы сложных эфиров холестерина 1 (NCEH1) методом количественной ПЦР); способность к провоспалительной активации (по оценке секреции цитокинов ИЛ-1β, ΦΗΟα,

(CCL2), ИЛ-6, ИЛ-8 методом иммуноферментного анализа); MCP-1 воспалительный статус клеток (по экспрессии генов, ассоциированных с воспалением и формирование инфламмасомы (NLRP3, CASP1 и IL1B) методом количественной ПЦР); активность апоптоза (по экспрессии генов Bcl-2 ассоциированного X белка (BAX), регулятора апоптоза Bcl-2 (BCL2), каспазы 3 (*CASP3*), каспазы 9 (*CASP9*) и фактора активации апоптотической протеазы (APAF1)методом количественной ПЦР); пролиферативную 1 И синтетическую активность (по оценке экспрессии генов ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), циклина B1 (CCNB1) и циклина D1 (*CCND1*); генов синтеза клеточных белков субъединицы А РНК-полимеразы 1 типа (POLR1A), субъединицы А РНК-полимеразы 3 типа (POLR3A) и субъединицы 1 коллагена 6 типа (СОССА1) методом количественной ПЦР).

Научная новизна исследования

В настоящем исследовании впервые выявлены функциональные мутации m.15059G>A MT-CYB, последствия В гене кодирующем митохондриальный цитохром b, в контексте проатеросклеротического фенотипа иммунных клеток. Применение цитоплазматических гибридов (цибридов), несущих митохондриальные мутации, ассоциированные С клеточные атеросклерозом, позволило воспроизвести ключевые 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.

работы Практическая значимость 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 ФНОα и ИЛ-1β 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 обоснована полученных данных выполненными задачами и применением современных методов и подходов. Интерпретация полученных данных базируется на адекватно подобранных методах статистического анализа, а выводы объективно обоснованы и подтверждены экспериментальным материалом. Результаты исследования обширным 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 сопровождена 32 рисунками и 9 таблицами.

введение

Атеросклероз является многофакторным заболеванием, лежащим в основе множества сердечно-сосудистых патологий и остающимся одной из ведущих причин смертности в мире (Аронов Д. М., Лупанов В. П., 2011; Орехов А. Н., 2013; Фадеев Г. А. *et al.*, 2020). Основными процессами, способствующими развитию атеросклероза, являются повышенный уровень липопротеидов в плазме крови, эндотелиальная дисфункция, хроническое воспаление и окислительный стресс.

Начальным звеном в развитии атеросклеротических поражений является накопление внутриклеточных липидов клетками интимы, происходящее в результате фагоцитоза модифицированных частиц липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) (Аронов Д. М., Лупанов В. П., 2011; Орехов А. Н., 2013; Фадеев Г. А. et al., 2020). В свою очередь, фагоцитоз модифицированных ЛПНП может запускать активацию клеточного провоспалительного ответа, представляющего собой реакцию врожденного иммунитета (Orekhov A. N. et al., 2020; Фадеев Г. А. et al., 2020). Нарушения реакций врожденного иммунного ответа могут приводить к хронизации воспаления, что в конечном итоге может привести к развитию атеросклеротических поражений. Одним из факторов нарушения врожденного иммунитета при развитии атеросклероза считается митохондриальная дисфункция. Исследования последних лет продемонстрировали, развитие митохондриальной дисфункции ЧТО вследствие повреждения митохондриальной ДНК (мтДНК) свободными радикалами или наличия в ней гетероплазматических мутаций может быть тесно связано с патогенезом атеросклероза (Glanz V. Y. et al., 2020; Mercer J. R. et al., 2010; Orekhov A. N. et al., 2022; Sazonova M. A. et al., 2017; Судаков Н. П. *et al.*, 2007).

Дисфункция митохондрий в свою очередь приводит к развитию окислительного стресса за счет генерации митохондриями активных форм кислорода (АФК), которые усиливают окисление ЛПНП и белков, вызывают значительное повреждение ядерной ДНК и собственной мтДНК, гибель клеток, а также способствуют активации NF-кВ-зависимой сборки NLRP3 инфламмасомы, что приводит к высвобождению про-воспалительных цитокинов (McGuire P. J., 2019; Orekhov A. N. et al., 2019; Shemiakova T. et al., 2020). В норме, избыточные, а также дисфункциональные, митохондрии подвергаются деградации путем процесса, известного как митофагия (Gkikas I. et al., 2018). Данный процесс представляет собой один из типов селективной аутофагии, которая активируется через сигнальный путь, включающий PTENиндуцированную киназу 1 (PINK1) и белок Parkin, либо осуществляется за счет взаимодействия с митохондриальными рецепторами, такими как BNIP3 (белок 3, взаимодействующий с BCL2), NIX (Nip3-подобный белок X) и FUNDC1 (белок 1, содержащий домен FUN14) (Gkikas I. et al., 2018). Эти молекулярные пути играют ключевую роль В поддержании митохондриального гомеостаза, обеспечивая удаление поврежденных митохондрий. Однако, нарушение данного процесса, в том числе вызванное наличием ряда мутаций в мтДНК могут приводить к сохранению в клетках дисфункциональных митохондрий, способствуя таким образом хронизации воспалительного ответа (Cho D. H. et al., 2020). Таким образом формируется «порочный круг», который вносит вклад в развитие атеросклеротических поражений, сопровождающихся формированием бляшек (Orekhov A. N. et al., 2020).

В совокупности вышеописанные события приводят к изменению функционального состояния клеток, в том числе моноцитов и макрофагов, субпопуляций являющихся ИЗ основных клеточных одними В атеросклеротических поражениях. Так, традиционным клеточными маркерами атеросклероза, характеризующими функциональное состояние и проатеросклеротический фенотип клеток, в частности, макрофагов, считают секрецию компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), пролиферацию, липидоз (накопление липидов и холестерина), клеточную гибель и секрецию провоспалительных молекул (Sobenin I. A. et al., 2015; Sobenin I. A., 2017).

Наиболее серьезные нарушения функционирования митохондрий происходят при возникновении мутации в генах белков, участвующих в процессах окислительного фосфорилирования. Так, впервые обнаруженная у пациентов с митохондриальной миопатией, нонсенс мутация m.15059G>A в b (MT-CYB)впоследствии была гене цитохрома охарактеризована положительной корреляцией с первичной гипертензией и толщиной интимамедии у пациентов с диагностированным атеросклерозом (Andreu A. L. et al., 1999; Sobenin I. A. et al., 2012; Sobenin I. A., 2013; Баринова В. A. et al., 2015). Более того, данная мутация была выявлена в клетках липофиброзных бляшек и лейкоцитах пациентов с ИБС и атеросклерозом (Sobenin I. A. et al., 2013; Баринова В. А. et al., 2015; Сазонова М. А. et al., 2014; Синёв В. В. et al., 2016; Синёв В. В. *et al.*, 2021). Мутация m.15059G>A приводит к образованию стопкодона, останавливающего синтез цитохрома b, что приводит к его укорочению на 244 аминокислоты из 380. Данное событие может приводить к нарушению функциональной активности III комплекса ЭТЦ, что в свою очередь может способствовать развитию дисфункции митохондрий (Andreu A. L. et al., 1999; Sazonova M. A. et al., 2017). Предполагается, что наличие клеток с мутацией m.15059G>A в мтДНК в области атеросклеротических поражений может ускорять развитие атеросклероза (Синёв В. В. et al., 2016). Подобный эффект, способствующий прогрессированию сосудистых патологий, может быть обусловлен нарушениями энергетического обмена и усилением окислительного стресса, которые характерны для клеток с нарушенной митохондриальной функцией.

Ha сегодняшний день митохондрии признаны перспективными разработки инновационных подходов терапии мишенями ДЛЯ К И профилактике широкого спектра хронических заболеваний, включая атеросклероз и патологии сердечно-сосудистой системы (Arauna D. et al., 2019; Gutierrez-Mariscal F. M. et al., 2020; Kornfeld O. S. et al., 2015; Perez Ortiz J. M. et al., 2020). Разрабатываемые фармакологические препараты обладают антиоксидантными свойствами и направлены на снижение окислительного

стресса клеток и тканей организма. Однако, при разработке терапевтических подходов необходимо также учитывать функциональную роль различных вариантов мтДНК, лежащих в основе заболеваний, а также молекулярных механизмов, обуславливающих митохондриальную дисфункцию. В свою очередь, мутация m.15059G>A в гене *МТ-СҮВ* может быть использована в качестве как маркера предрасположенности к атеросклерозу на ранних стадиях заболевания, так и потенциальной мишени при разработке антиатеросклеротических препаратов.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Атеросклероз как многофакторное заболевание

1.1.1. Понятие атеросклероза, общие сведения

Атеросклероз представляет собой прогрессирующие изменения в стенках артерий эластического и мышечно-эластического типа, которые заключаются в избыточном накоплении липопротеидов низкой плотности в результате нарушения обмена липидов и белков, проникновении в очаг поражения клеток крови, таких как моноциты и лимфоциты, а также реактивном разрастании фиброзной ткани и ее последующих комплексных изменений (Аронов Д. М., Лупанов В. П., 2011; Орехов А. Н., 2013; Фадеев Г. A. et al., 2020). Артериальная стенка состоит из трех слоев, таких как интима, медиа адвентиция. Атеросклеротические изменения И возникают непосредственно в интиме сосуда, куда происходит миграция клеток кровяного русла и гладкомышечных клеток (ГМК) из медии.

Возникновение и развитие атеросклероза обусловлено множеством экзогенных и эндогенных факторов (Jebari-Benslaiman S. et al., 2022; Libby P. et al., 2019). К основным факторам, обуславливающим предрасположенность к развитию атеросклероза, относятся такие нарушения и заболевания, как гиперхолестеринемия, дислипопротеинемия, ожирение, артериальная гипертензия и сахарный диабет (Gonzalez-Guerra A. et al., 2021; Liang Y. et al., 2021; Poznyak A. et al., 2020; Zhang T. et al., 2019). В свою очередь, к другим факторам риска развития атеросклероза относят недостаточную физическую активность (гиподинамия), курение, пол, возраст, нарушения сна и хронический стресс (Gao S. et al., 2022; Hsu S. P., Lee W. Sen, 2020; Libby P., 2021; Man J. J. et al., 2020). Современные исследования предполагают, что на развитие и прогрессирование атеросклероза также могут оказывать влияние как изменения в микробиоме человека, так и циркулирующие микроРНК,

длинные некодирующие РНК и кольцевые РНК, метилирование ДНК, митохондриальная дисфункция, в том числе опосредованной появлением мутаций в митохондриальном геноме клеток, вовлекаемых в атеросклеротические поражения (Cao Q. *et al.*, 2020; Gorabi A. M. *et al.*, 2021; Orekhov A. N. *et al.*, 2019; Shoeibi S., 2020; Tao J. *et al.*, 2021; Vourakis M. *et al.*, 2021).

Инициирующим событием атеросклерозе В является активация эндотелия, за которым следует каскад событий, таких как накопление липидов и фиброзных элементов, клеточных компонентов соединительной ткани, белков и компонентов ВКМ в интиме сосудов. Данные события в последствии вызывают активацию воспалительных процессов, а развивающееся при этом способствует хроническое воспаление ремоделированию сосудов. Образующаяся при этом атеросклеротическая бляшка приводит к развитию ряда сердечно-сосудистых осложнений (Jebari-Benslaiman S., et al., 2022; Шварц Я. Ш., Чересиз Е. А., 2011).

Атеросклеротические поражения в основном возникают в областях сосудов, характеризующихся низким пристеночным напряжением сдвига, чаще всего включающих области ветвления и бифуркации. Изменение напряжения сдвига может непосредственно влиять на морфологию и функцию эндотелия сосудов и стимулировать миграцию и пролиферацию ГМК и мононуклеарных клеток, таких как моноциты и лимфоциты. Нарушение ламинарного потока крови или турбулентный поток снижают напряжение сдвига и способствуют развитию дисфункции и проницаемости эндотелия и последующей инфильтрации в интиму ЛПНП (Gimbrone M. A., García-Cardeña G., 2013; Jebari-Benslaiman S. *et al.*, 2022). Кроме того, эндотелиальная дисфункция может вызываться снижением генерации оксида азота (NO), необходимого для обеспечения вазодилатации сосудов. Выработка NO катализируется эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS), ингибирование которой происходит вследствие повышенного окислительного стресса, вызванного продукцией провоспалительных цитокинов (фактор некроза

опухоли α (ΦΗΟα) и интерлейкинов ИЛ-1 и ИЛ-6), молекул адгезии (VCAM-I и ICAM-I) и хемокинов, например, моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) (Esper R. J. *et al.*, 2006; Jebari-Benslaiman S. *et al.*, 2022).

1.1.2. Основные типы атеросклеротических поражений

На текущий момент выделяют четыре типа атеросклеротических поражений: начальное поражение, жировая (липидная) полоса, липофиброзная бляшка и фиброзная бляшка (рис. 1) (Орехов А. Н., 2013).



Рисунок 1. Типы атеросклеротических поражений в соответствии с современной классификацией. Рисунок подготовлен с использованием пакета программ Adobe Illustrator 2021 (Adobe, Inc., США).

Начальные атеросклеротические поражения (І тип поражения) характеризуются накоплением внеклеточных липидов в соединительнотканном матриксе, а также миграцией мононуклеарных клеток. Инфильтрация в интиму ЛПНП, циркулирующих в кровотоке, происходит трансэндотелиально путем диффузии или трансцитозом, опосредуемом скавенджер-рецепторами класса В типа 1 (SR-B1) и рецептором, подобным рецептору активина A типа 1 (ALK1) (Jebari-Benslaiman S. *et al.*, 2022; Libby P. *et al.*, 2019; Орехов A. H., 2013). В дальнейшем ЛПНП в интиме сосудов подвергаются множественным модификациям, таким как окисление, гликозилирование, десиалилирование, агрегация, потеря липидов, уменьшение размера частиц и увеличение их электроотрицательного заряда (Boogert M. A. *et al.*, 2019; Lu M., Gursky O., 2013; Parthasarathy S. *et al.*, 2010; Tertov V. V. *et al.*, 1998; Zakiev E. R. *et al.*, 2016)

Миграция моноцитов из кровотока в интиму путем адгезии, активации и трансэндотелиальной миграции происходит за счет их избирательного привлечения активированными эндотелиальными клетками (Libby P. *et al.*, 2019; Ropraz P. *et al.*, 2018). Процесс миграции моноцитов в интиму опосредуется P-селектином, молекулами адгезии VCAM-I и ICAM-I, а также хемокинами CXCL1, CXCL2, CXCL4, CCL5 и MCP-1 (CCL2), которые вырабатываются в том числе клетками эндотелия (Jebari-Benslaiman S. *et al.*, 2022). Считается, что в дальнейшем моноциты дифференцируются в макрофаги, поляризованные по фенотипу M1 (провоспалительный) или M2 (противовоспалительный) (Jinnouchi H. *et al.*, 2020).

Жировые (липидные) полосы (II тип поражения) характеризуются внеклеточным и внутриклеточным накоплением липидов в макрофагах и ГМК, их дифференцировкой в пенистые клетки, образующие слои и скопления (Орехов А. Н., 2013). На поверхности макрофагов и ГМК экспрессируется ряд рецепторов, способствующих захвату нативных (LDLR) и модифицированных ЛПНП (LOX-I, CD36, SR-AI, TLR-4) (Chen Z. et al., 2021; Sukhorukov V. N. et al., 2020). Избыточное внутриклеточное накопление холестерина ЛПНП способствует превращению макрофагов и ГМК в пенистые клетки. В то же время, повышенная миграция моноцитов в интиму с последующей их дифференцировкой в макрофаги приводит к скоплению большого количества пенистых клеток, индуцирующих рост атеросклеротического поражения. событию Последнему способствует избыточное также накопление

холестерина в субэндотелиальном пространстве в виде кристаллов холестерина (Jebari-Benslaiman S. *et al.*, 2022; Libby P. *et al.*, 2019).

Липофиброзные бляшки (Va тип поражения) помимо черт, характерных для липидных полос, имеют также массивное, насыщенное липидами, некротическое ядро и расположенную над ним фиброзную покрышку, состоящую из соединительной ткани (Jebari-Benslaiman S. et al., 2022; Libby P. et al., 2019; Орехов А. Н., 2013). Некротическое ядро представляет собой нагруженную липидами гипоцеллюлярную область co сниженным содержанием коллагена, которая увеличивается за счет гибели макрофагов, накопления клеточного дебриса, а также нарушения процесса эффероцитоза (Linton M. F. et al., 2016; Visscher M. et al., 2019). В совокупности, это приводит к развитию воспалительных процессов, окислительного стресса и гибели соседних клеток, таких как ГМК. В свою очередь, фиброзная покрышка представляет собой субэндотелиальный барьер между просветом сосуда и атеросклеротическим некротическим ядром, и состоит из пролиферирующих ГМК, обладающих синтетическим фенотипом, и ВКМ (Bennett M. R. et al., 2016; Watson M. G. et al., 2018). ГМК фиброзной покрышки способствуют выработке компонентов ВКМ, таких как коллаген, эластин и протеогликаны. Однако, развитие воспалительных процессов способствует нарушению стабильности фиброзной покрышки (Stefanadis C. et al., 2017). Например, цитокины, некоторые провоспалительные такие как ИЛ-1β, ΦΗΟα, интерферон-ү (ИФН-ү), могут ингибировать выработку коллагена и повышать экспрессию матриксных металлопротеиназ макрофагами, что может привести к снижению прочности фиброзной покрышки и ее разрыву, с последующим формированием тромба (Jebari-Benslaiman S. et al., 2022).

Фиброзные бляшки (Vc тип поражения) характеризуются преобладанием соединительнотканного матрикса, где липидный компонент может отсутствовать (Орехов А. Н., 2013). Отдельно также стоит отметить, что в атеросклеротических бляшках могут развиваться процессы кальцификации, которые проявляются в виде костеподобного образования внутри бляшки и

инициируются в областях с локальным уменьшением коллагеновых волокон и воспалением (Nakahara T. *et al.*, 2017).

1.2. Роль моноцитов и макрофагов в атерогенезе

1.2.1. Характеристика субпопуляций макрофагов

В принимают настоящее время известно, что макрофаги участие формировании, непосредственное В развитии И регрессии атеросклеротических бляшек на всех стадиях атерогенеза. В частности, это зависит от вовлечения макрофагов в процессы инфильтрации интимы сосуда липидами и развития воспалительных реакций. Как было описано выше, в основном макрофаги атеросклеротических бляшек имеют происхождение от моноцитов, циркулирующих в крови, однако, в меньшей степени, они также могут происходить из ГМК, которые способны к дифференцировке в макрофагоподобные клетки (Feil S. et al., 2014; Randolph G. J., 2014).

Принято считать, что В состав популяции макрофагов атеросклеротических бляшек включено несколько субпопуляций (таб. 1) (Deng H. et al., 2020; Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016). К первой субпопуляции относятся активированные по классическому пути провоспалительные макрофаги, которые поляризованны по фенотипу M1 (Martinez F. O., Gordon S., 2014). Они способны к секреции таких провоспалительных цитокинов, как ФНОα, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-12, а также хемокина МСР-1, известного как хемокиновый лиганд с С-С мотивом 2 (ССL2) (Murray P. J. et al., 2014; Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016; Yunna C. et al., 2020). Данные молекулы способствуют привлечению большего числа моноцитов в очаги поражения (развивающиеся бляшки). Кроме того, M1 макрофаги также способны генерировать АФК и NO, посредством активации НАДФН-оксидазы и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), соответственно (Deng H. et al., 2020; Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016). Высокая секреция провоспалительных молекул М1 макрофагами способствует росту атеросклеротических бляшек и повышению их нестабильности (Yang S. *et al.*, 2020).

Вторая субпопуляция представляет собой активированные по альтернативному пути противовоспалительные макрофаги, поляризованные по фенотипу M2 (Deng H. et al., 2020). Они способны к секреции противовоспалительных молекул, таких как ИЛ-10, трансформирующий фактор роста-β (TGF-β) и хемокины CCL17 и CCL22 (Deng H. et al., 2020; Dyken S. J. Van, Locksley R. M., 2013; Yunna C. et al., 2020). В отличие макрофагов, поляризованных по фенотипу М1, данная субпопуляция макрофагов способствует уменьшению размера атеросклеротических бляшек и повышению их стабильности (Yang S. et al., 2020). Настоящий эффект достигается благодаря их способности вырабатывать противовоспалительные молекулы, что способствует замедлению воспалительных процессов в пораженных участках сосудов и способствует стабилизации бляшек. Макрофаги М1 в большей степени локализуются в наиболее нестабильных участках атеросклеротических бляшек (плечи бляшки), тогда как В некротическом ядре и фиброзной покрышке могут обнаруживаться оба фенотипа M1 и M2. Таким образом может поддерживаться баланс между M1 провоспалительной активностью макрофагов благоприятными И противовоспалительными эффектами макрофагов М2 в фиброзной покрышке. Стоит отметить, что в адвентиции число макрофагов М2 обычно в два-три раза выше, чем макрофагов M1 (Abdolmaleki F. et al., 2019).

В свою очередь, альтернативно активированные макрофаги M2 делятся на четыре подтипа: M2a, M2b, M2c и M2d (таб. 1). Каждый из перечисленных фенотипов макрофагов по-разному влияют на течение атеросклероза (Yang S. *et al.*, 2020). Активированные с помощью ИЛ-4 или ИЛ-13 макрофаги M2a приводят к повышенной секреции ИЛ-10, TGF-β, CCL17, CCL18 и CCL22 и усиливают эндоцитарную активность, способствуют росту клеток и восстановлению тканей. Макрофаги M2b активируются с помощью иммунных комплексов в комбинации с липополисахаридом (ЛПС) и ИЛ-1β. Данная

макрофагов способна субпопуляция К выработке И секреции как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, среди которых ФНОα, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИЛ-10. Макрофаги М2с, также известные как инактивированные макрофаги, активируются под воздействием глюкокортикоидов, ИЛ-10 и TGF-β. В свою очередь, эти клетки синтезируют широкий спектр цитокинов, таких как ИЛ-10, TGF-β, CCL16 и CCL18, которые играют ключевую роль в регуляции воспалительных реакций и поддержании тканевого гомеостаза. М2с макрофаги играют одну из основных ролей в процессе фагоцитоза апоптотических клеток. Макрофаги M2d индуцируются антагонистами TLR (toll-подобный рецептор), секретируют ИЛ-10 и факторы роста эндотелия сосудов (VEGF), что способствует ангиогенезу (Chinetti-Gbaguidi G. *et al.*, 2015).

На процесс поляризации макрофагов во многом влияет микроокружение внутри атеросклеротических поражений (Yang S. *et al.*, 2020). Поляризация М1 макрофагов индуцируются ИФН-ү и ЛПС, в то время как М2 макрофагов – ИЛ-4 и ИЛ-13 (Deng H. *et al.*, 2020; Dyken S. J. Van, Locksley R. M., 2013; Yunna C. *et al.*, 2020). Ключевым аспектом поляризации макрофагов является изменение экспрессии маркеров клеточной поверхности. У М1 макрофагов наблюдается повышенная экспрессия CD80, CD86 и CD16/32, тогда как у М2 макрофагов обнаружена экспрессия аргиназы-1 (Arg-1) и макрофагального маннозного рецептора 1 (MMR, также известный как CD206) (Dyken S. J. Van, Locksley R. M., 2013; Yunna C. *et al.*, 2020). Функции макрофагов тесно связаны с их метаболическими особенностями (Stremmel C. *et al.*, 2019). Макрофаги M1 преимущественно характеризуются гликолитическим типом метаболизма, в то время как макрофаги M2 – митохондриальным окислительным фосфорилированием и метаболизмом жирных кислот.

Некоторые данные свидетельствуют о существовании также ряда других субпопуляций макрофагов, населяющих атеросклеротические бляшки (Boyle J. J. *et al.*, 2009; Chinetti-Gbaguidi G. *et al.*, 2015; Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016; Yang S. *et al.*, 2020; Никифоров Н. Г. *et al.*, 2015). К ним относятся популяции

²⁶

M(Hb), HA-mac, Mhem, Mox и M4, индукция которых происходит в связи с воздействием гемоглобин-гаптоглобиновых комплексов, гема, окисленных фосфолипидов и хемокина CXCL4, соответственно (таб. 1).

В геморрагических зонах атеросклеротических бляшек человека обнаруживаются макрофаги с фенотипом M(Hb), которые представляют собой субпопуляцию макрофагов CD68⁺, экспрессирующих MMR и скэвенджеррецептор, богатый цистеином белок M130 типа 1 (CD163) (Finn A. V. *et al.*, 2012). CD163 принимает участие в клиренсе и эндоцитозе гемоглобингаптоглобиновых комплексов после кровоизлияния в бляшках. Фенотип макрофагов M(Hb) характеризуется выработкой противовоспалительных факторов (ИЛ-10) и сниженной продукцией AФK, а за счет активности Xрецептора печени α (LXR α) и индукции оттока холестерина, эти макрофаги менее подвержены внутриклеточному накоплению липидов.

Субпопуляция макрофагов, ассоциированных с кровоизлиянием в атеросклеротических бялшках (HA-mac), характеризуются высокими уровнями CD163 и низкими уровнями человеческого лейкоцитарного антигена-DR (HLA-DR) (Boyle J. J. *et al.*, 2009). Кровоизлияние внутри бляшек ускоряет развитие атеросклероза за счет развития окислительного стресса и способствует развитию и дестабилизации бляшки. Макрофаги HA-mac способствуют очищению от гемоглобина, снижают продукцию АФК и развитие окислительного стресса, таким образом проявляя атеропротекторные свойства.

Поляризация макрофагов по фенотипу Mhem опосредуется присутствием гема в атеросклеротических бляшках (Boyle J. J. *et al.*, 2011; Boyle J. J. *et al.*, 2012). Также, как и M(Hb), макрофаги Mhem характеризуются экспрессией LXRα, и белка, члена 1 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA1), за счет которых они менее подвержены накоплению липидов. Кроме того, макрофаги Mhem характеризуются повышенной экспрессией CD163 и HO-1, что способствует антиоксидантной защите.

Таким образом, макрофаги M(Hb), HA-mac и Mhem обладают сходными функциями и в меньшей степени способны к дифференцировке в пенистые клетки. В то же время, данные фенотипы макрофагов способны снижать уровни окислительного стресса. Данные фенотипы могут сосуществовать в областях кровоизлияния в атеросклеротических бляшках человека, или могут представлять различные стадии дифференцировки одной клеточной субпопуляции (Chinetti-Gbaguidi G. *et al.*, 2015).

Окисленные фосфолипиды или ЛПНП способны индуцировать поляризацию макрофагов по фенотипу Мох за счет активации NFE2L2, ядерного фактора транскрипции, родственного эритроидному фактору 2, что было продемонстрировано на модели атеросклероза у мышей (Kadl A. *et al.*, 2010). В отличии от макрофагов М1 и М2, у макрофагов Мох наблюдается сниженная фагоцитарная и хемотаксическая активность. В ответ на воздействие окисленных фосфолипидов макрофаги Мох экспрессируют некоторые провоспалительные маркеры, такие как ИЛ-1β и циклооксигеназа 2 (COX-2), а также антиоксидантные ферменты, такие как гемоксигеназа-1 (HO-1) и тиоредоксин редуктаза 1 (Txnrd1).

Тромбоцитарный фактор 4, также известный как хемокин 4 с мотивом CXC (CXCL4), секретируемый эндотелиальными клетками в атеросклеротических бляшках, индуцирует поляризацию макрофагов по фенотипу M4 (Domschke G., Gleissner C. A., 2019). Макрофаги M4 характеризуются отсутствием способности к фагоцитозу, и, кроме того, не экспрессируют CD163 и HO-1. Характерными маркерами макрофагов M4 считаются CD68⁺, матриксная металлопротеиназа 7 (MMP7) и кальцийсвязывающий белок S100A8. В атеросклеротических бляшках человека макрофаги М4 преимущественно присутствуют в адвентиции и интиме, и их c нестабильностью преобладание связано бляшки. Макрофаги M4 секретируют провоспалительные цитокины ИЛ-6 и ФНОα, а также характеризуются сниженной экспрессией скэвенджер-рецепторов, таких как

CD36 или SR-1, участвующих в захвате ЛПНП, из чего следует их сниженная способность к дифференцировке в пенистые клетки.

Фенотип	Стимул поляризации	Основные	Функции
		маркеры	
M1	ИФН-ү, ЛПС	ФНОа, ИЛ-1β,	Развитие воспаления, рост
		ИЛ-6, ИЛ-12,	атеросклеротических бляшек,
		CCL2, CD80,	повышение их нестабильности
		CD86 и CD16/32	
M2a	ИЛ-4, ИЛ-13	ИЛ-10, ТGF-β,	Снижение воспаления, рост клеток,
		CCL17, CCL18 и	восстановление тканей,
		CCL22, Arg-1,	уменьшение размера
		MMR	атеросклеротических бляшек,
			повышение их стабильности
M2b	Комбинация	Высокая	Регуляция воспалительных
	иммунных	экспрессия ИЛ-10,	реакций
	комплексов с ИЛ-1β	низкая экспрессия	
	или ЛПС	ИЛ-12	
M2c	ИЛ-10, ТGF-β,	MMR, ИЛ-10,	Фагоцитоз апоптотических клеток
	глюкокортикоиды	TGF-β, CCL16 и	
		CCL18	
M2d	Антагонисты TLR	ИЛ-10, VEGF	Ангиогенез
M(Hb)	Гемоглобин-	CD163, MMR,	Отток холестерина, менее
	гаптоглобиновые	CD68 ⁺ , ИЛ-10	подвержены к дифференцировке в
	комплексы		пенистые клетки, снижение
HA-mac	Гемоглобин-	Высокая	окислительного стресса, клиренс
	гаптоглобиновые	экспрессия	гемоглобина
	комплексы	CD163, низкая	
		экспрессия HLA-	
		DR	
Mhem	Гем	CD163, ATF-1	
Mox	Окисленные	ИЛ-1β, СОХ-2,	Снижение фагоцитарной
	фосфолипиды	HO-1, Txnrd1,	активности
	(ЛПНП)	NFE2L2	
M4	CXCL4	CD68 ⁺ , MMP-7,	Отсутствие фагоцитоза, менее
		S100-A8, ИЛ-6,	подвержены к дифференцировке в
		ФНОα, сниженная	пенистые клетки, воспалительные
		экспрессия CD36	реакции, повышение
		и SR-1	нестабильности бляшек

Таблица 1. Общие характеристики субпопуляций макрофагов

1.2.2. Участие макрофагов в формировании атеросклеротических поражений

Механизмы, регулирующие атерогенез и формирование атеросклеротических бляшек, в которых принимаю участие макрофаги, разнообразны (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016).

Привлечение большого числа моноцитов из кровотока в интиму с их дальнейшей дифференцировкой в макрофаги на ранних стадиях развития атеросклеротического поражения и их дальнейшее превращение в пенистые клетки за счет активного поглощения липидов приводит к формированию и расширению жировых полос. Кроме того, рост атеросклеротического поражения возможен также за счет преобладания локальной пролиферации макрофагов над процессами миграции моноцитов на более поздних стадиях развития бляшки. Существует предположение, что снижение или остановка пролиферации резидентных макрофагов будет приводить к уменьшению размера поражения (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016).

Образование пенистых клеток из макрофагов в основном вызвано нарушением баланса между поглощением липидов, внутриклеточным перераспределением липидов и обратным транспортом холестерина. Данные процессы тесно взаимосвязаны и представлены множественными путями поглощения ЛПНП макрофагами и внутриклеточного накопления липидов, которые опосредуются функционированием таких органелл, как лизосомы, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), и таких ферментов, как нейтральная гидролаза сложных эфиров холестерина (NCEH), ацетил-КоАацетилтрансфераза (ACAT), а также ABCA1 и ABCG1. В совокупности, их взаимодействие представляет собой сложный динамический процесс с многофакторной регуляцией (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2020). Поглощение ЛПНП макрофагами опосредуется такими рецепторами, как рецептор липопротеидов низкой плотности (LDLR), скэвенджер-рецептор класса В (CD36), лектин-подобный рецептор 1 для окисленных ЛПНП (LOX1), а также скэвенджер-рецептор класса A (SR-A) (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2020). Внутриклеточный метаболизм липидов включает в себя процессы гидролиза, этерификации, накопления в липидных каплях и отток холестерина из клеток, опосредуемый ABCA1 и ABCG1. В макрофагах накопление липидов также регулируется Х-рецепторами печени (LXR), которые могут снижать эндоцитоз, опосредованный скэвенджер-рецепторами, усиливать отток холестерина из клеток и опосредовать противовоспалительные эффекты (Stremmel C. *et al.*, 2019).

В свою очередь, внутриклеточное накопление липидов в макрофагах приводит к активации провоспалительного пути NF-кВ и формирования инфламмасомного комплекса, что приводит к продукции медиаторов воспаления, таких как ИЛ-1 β , ИЛ-18, ИЛ-6 и ФНО α (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2020; Ганковская Л. В. *et al.*, 2023). Кроме того, недавно было показано, что макрофаги M2 обладают более высокой активностью поглощения липидов и образования пенистых клеток, в то время как у макрофагов M1 демонстрируется обратный эффект (Baidžajevas K. *et al.*, 2020). Это позволяет сделать вывод о том, что поляризация макрофагов, значительно влияет на их метаболизм липидов.

На поздних стадиях в атеросклеротических бляшках усиливается апоптоз макрофагов, частично связанный с развитием стресса ЭПР, который может индуцироваться за счет взаимодействия свободного холестерина, жирных кислот или окисленных ЛПНП с рецепторами CD36, TLR2, SR-A, что приводит к активации STAT1-зависимых сигнальных путей (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016). Апоптоз макрофагов является защитным механизмом на ранних стадиях развития бляшки, который приводит к уменьшению ее размера за счет реализации эффективного эффероцитоза соседними макрофагами. Благодаря данному процессу происходит удаление погибающих клеток до того, как нарушится целостность их мембран, а также предотвращение клеточного некроза. В свою очередь, предотвращение клеточного некроза препятствует высвобождению потенциально повреждающих агентов во внеклеточную

среду, включая молекулы, которые могут стимулировать воспалительные реакции, ферменты, протеазы и оксиданты (Thorp E., Tabas I., 2009).

Нарушения процессов эффероцитоза способствуют увеличению размера бляшки, развитию некротических ядер и усилению воспаления в связи с высвобождением медиаторов воспаления из некротических клеток. В свою очередь, на ранних стадиях бляшки могут подвергаться регрессии, вероятно, за счет эффероцитоза и снижения привлечения моноцитов и макрофагов в очаги поражения (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016).

Кроме того, повышенный стресс ЭПР в макрофагах может запускать процесс аутофагии, что впоследствии приводит к подавлению апоптоза макрофагов и уменьшению окислительного стресса. Нарушение процессов аутофагии в макрофагах связано с активацией инфламмасом в ответ на кристаллы холестерина и снижением оттока холестерина из клеток через ABCA1 (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016). Также в клетках обнаружен особый механизм, ответственный за деградацию митохондрий с нарушенной функцией, который получил название митофагия и представляет собой особый тип аутофагии. Инициация митофагии зависит от P-TEN-индуцированной киназы (PINK1), которая накапливается на внешней мембране митохондрий в ответ на снижение митохондриального мембранного потенциала (ΔΨm), а затем рекрутирует белок Parkin. Окислительный стресс и кристаллы холестерина могут приводить к нарушению целостности лизосомальных мембран, вызывая высвобождение лизосомальных гидролаз и приводя к чрезмерной активности митофагии при длительном воздействии. Это способствует высвобождению из митохондрий цитохрома с, что в дальнейшем может привести к апоптозу (Orekhov A. N. et al., 2019).

1.3. Связь митохондриальной дисфункции с возникновением и развитием атеросклероза

1.3.1. Основные последствия развития митохондриальной дисфункции в клетках атеросклеротических поражений

Активность макрофагов во многом зависит от функционального состояния митохондрий, которые играют ключевую роль в метаболических и сигнальных путях, опосредующих окислительно-восстановительные процессы, биосинтез различных молекул, эффероцитоз и апоптотоз (Dumont A. *et al.*, 2021).

Митохондрии представляют собой многофункциональные органеллы, которые обеспечивают клетки необходимыми для жизнедеятельности ресурсами. Общеизвестной и при этом важнейшей функцией митохондрий является участие в энергетическом обмене и, соответственно, выработке аденозин-5'-трифосфата $(AT\Phi)$ за осуществления счет процессов окислительного фосфорилирования. Реализация данной функции происходит активности локализующихся в митохондриальной мембране за счет дыхательной цепи переноса электронов, или ЭТЦ, и АТФ-синтазы. Не менее важной функцией митохондрий является участие в биосинтезе аминокислот, жирных кислот, липидов и нуклеотидов (Kastaniotis A. J. et al., 2017; Song J. et al., 2021). Также в митохондриях протекают реакции цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса), цикла мочевины, формирование гема и кластеров железо-сера. Кроме того, митохондрии играют главную роль В запрограммированной гибели клеток путем апоптоза, аутофагии и регуляции выживаемости клеток в физиологических и патологических состояниях (Abate M. et al., 2020; Dumont A. et al., 2021). Помимо всего вышеперечисленного необходимо белки учитывать, что митохондриальные участвуют В формировании мембранных контактов с другими клеточными органеллами, такими как ЭПР, что необходимо для внутриклеточного обмена липидами, а также передачи сигналов, в частности опосредованных ионами кальция,

регуляции слияния и деления митохондрий (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2020; Szymański J. *et al.*, 2017).

Основой для воспалительных заболеваний, включая многих атеросклероз, является нарушение функционирования митохондрий. В основе дисфункции митохондрий может лежать широкий спектр нарушений, таких как развитие окислительного стресса вследствие наличия дефектных комплексов ЭТЦ, мутации в мтДНК, возникновение нарушений в цикле Кребса и синтезе АТФ, снижение транспорта метаболитов и субстратов в митохондрии, необходимых для обеспечения ключевых клеточных процессов, изменения электрического и химического трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий, а также нарушение митохондриальной динамики, заключающейся в процессах деления и слияния, и митофагии (Markin A. M., et al., 2021; Nicolson G. L., 2014; Xu M. et al., 2024). В свою очередь, эти изменения приводят к снижению эффективности процессов окислительного фосфорилирования и уменьшению продукции АТФ.

Кроме того, дисфункция митохондрий тесно связана с развитием окислительного стресса за счет генерации митохондриями АФК (Orekhov A. N. et al., 2019). Основными источниками АФК являются комплексы I и III дыхательной цепи митохондрий, семейство ферментов моноаминоксидаз, NADPH-оксидаза 4 (NOX4) и адаптер фактора роста белка p66Shc (Shemiakova T. et al., 2020). NOX4 широко представлена в митохондриях многих тканей и играет важную роль в процессах передачи сигналов АФК, ангиогенезе и адаптивных реакциях на гипоксию, а также способствует развитию воспаления и клеточного стресса. Ферменты семейства моноаминоксидаз локализованы на внешней митохондриальной мембране и генерируют АФК во катаболизма катехоламинов. p66Shc функционирует время В митохондриальной передаче сигналов и может участвовать в генерации перекиси водорода путем окисления цитохрома с. Кроме того, регуляцию выработки ΑФК митохондриями также может опосредовать митохондриальный АТФ-чувствительный калиевый канал.

Митохондрии являются как ключевым источником генерации АФК, так и основной их мишенью воздействия. АФК, продуцируемые митохондриями, усиливают окисление ЛПНП и белков, могут вызывать значительное повреждение ядерной ДНК, гибель клеток, а также воздействовать на молекулы, запускающие высвобождение сигнальные воспалительных цитокинов (Shemiakova T. et al., 2020). Увеличение генерации АФК митохондриями атеросклеротических поражений способствует клеток развитию дисфункции эндотелия, воспаления сосудов и накопления окисленных ЛПНП в артериальной стенке. Кроме того, одной из мишеней собственный митохондриями ΑФК генерируемых является ИХ митохондриальный геном (Orekhov A. N. et al., 2019). Митохондриальная ДНК подвержена окислительному повреждению в связи с отсутствием в ней гистонов и, вероятно, слабо развитых механизмов репарации. Мутации и делеции в мтДНК, в свою очередь, способствуют формированию новых циклов генерации АФК, образуя таким образом порочный круг.

Стоит также отметить недавно описанный механизм участия митохондрий в формировании воспалительного ответа (Dumont A. et al., 2021). Митохондрии являются источником различных молекулярных фрагментов, ассоциированных повреждениями (DAMP), включающих себя с В кардиолипин, сукцинат и TFAM (митохондриальный фактор транскрипции A), АФК, собственно митохондрии и мтДНК, высвобождаемые во внеклеточное пространство (Banoth B., Cassel S. L., 2018; Dumont A. et al., 2021; Faas M. M., Vos P. de, 2020; Glanz V. Y. et al., 2020; Riley J. S., Tait S. W., 2020). Взаимодействие DAMP с клетками атеросклеротических поражений, в том числе макрофагами, способствует активации врожденного иммунного ответа, приводящего к развитию локальных воспалительных процессов (Dumont A. et al., 2021). Например, макрофаги М1 могут высвобождать во внеклеточное свободные митохондрии, пространство как митохондрии, так И инкапсулированные в микровезикулы, которые могут связываться С эндотелиальными клетками и индуцировать выработку ИФН-γ и ФНОα. Более

того, высвобождение мтДНК в цитоплазму клетки и во внеклеточную среду активирует множество различных каскадных реакций и врожденных иммунных ответов, включая cGAS-STING-TBK1, что приводит к экспрессии интерферон-стимулированных генов, способствующего противовирусному иммунитету, экспрессии TLR9 и образованию инфламмасом. Тем не менее, предполагается, что повреждение мтДНК и последующее ее высвобождение из митохондрий активирует каскад защитных сигнальных реакций, усиливающих репарацию ядерной ДНК в клетках (Dumont A. *et al.*, 2021; Wu Z. *et al.*, 2019).

1.3.2. Структура, функции и механизмы регуляции митохондриального генома

В основе современных представлений о происхождении митохондрий лежит эндосимбиотическая теория, утверждающая, что в процессе эволюции исходные анаэробные археи поглотили предшественников митохондрий, которые являлись предками класса Alphaproteobacteria (Protasoni M., Zeviani M., 2021). Эндосимбиотическое происхождение митохондрий подтверждается структурными особенностями данных органелл, в том числе наличием внешней и внутренней мембран, окружающих митохондриальный матрикс и межмембранное пространство. Дополнительные доказательства включают наличие собственной мтДНК, митохондриальных рибосом (миторибосом), кардиолипина в составе мембран, специфичного для бактерий, а также белков типа β-бочонков во внешней мембране. Кроме того, мтДНК присущи особенности, сохранившиеся от бактериального предка, что является одним из главных аргументов в пользу теории эндосимбиоза. Таким образом, сохранение у митохондрий эукариот вышеперечисленных характеристик от общего с бактериями предка подкрепляет теорию эндосимбиоза.

МтДНК представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу, состоящую из 16 569 пар оснований (п.н.), каждая из цепей которой
обозначаются как «тяжелая» (Н) и «легкая» (L), транскрибирующиеся в виде длинных полицистронных молекул, где транскрипция инициируется с промоторов тяжелой цепи (HSP) и промотора легкой цепи (LSP) (Nicholls T. J., Gustafsson C. M., 2018; Nicholls T. J., Minczuk M., 2014). МтДНК не содержит интронов, хотя некоторые области, кодирующие гены, могут перекрываться. Кроме того, мтДНК характеризуется многокопийностью, что означает возможность ее присутствия в клетках тканей организма в количестве от 100 до 10 000 копий. Более того, в одной митохондрии содержится множество копий мтДНК (Protasoni M., Zeviani M., 2021). МтДНК имеет одну некодирующую область, называемую петлей смещения (D-петля). Она представляет собой трехцепочечную структуру, образованную за счет включения третьей короткой цепи 7S ДНК. D-петля играет роль в гомеостазе нуклеотидов, репликации мтДНК и организации нуклеоидов. D-петля характеризуется высокой частотой мутаций, преимущественно в HVR-1 и HVR-2 (гипервариабельный сегмент 1 и гипервариабельный сегмент 2) (Nicholls T. J., Minczuk M., 2014; Omasanggar R. et al., 2020).

1% Только митохондриальных белков кодируется геномом митохондрий, в то время как остальные 99% синтезируются на основе ядерной ДНК (Song J. et al., 2021). Митохондриальный геном содержит 37 генов, включая 2 гена рибосомальных РНК (12S и 16S рРНК), 22 гена транспортных РНК (тРНК) и 11 матричных РНК (мРНК), которые кодируют 13 белков. Эти белки преимущественно представлены субъединицами дыхательной цепи, включая NADH-дегидрогеназы (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), цитохром b (комплекс III), цитохром с оксидазы I, II и III (комплекс IV), а также АТФазы 6 и 8 (комплекс V) (Ott M. et al., 2016; Protasoni M., Zeviani M., 2021). В целом, митохондриальный протеом человека включает в себя приблизительно 1500 белков (Song J. et al., 2021). В ходе эволюции геном эндосимбионта-предшественника митохондрии был частично утрачен или встроен в геном клеток-хозяев, в связи с чем митохондриальным белкам присуще двойное генетическое происхождение. Митохондриальные белки,

кодируемые ядерной ДНК, синтезируются в цитоплазме клетки и посредством транслоказ митохондриальной мембраны импортируются в митохондрии в виде предшественников за счет наличия сигнала митохондриальной дальнейшем локализации. В происходит ИХ перераспределение ПО B внутримитохондриальным компартментам. свою очередь, митохондриальные белки, кодируемые мтДНК, синтезируются внутри митохондрий за счет работы миторибосом (Rodrigues S. C. et al., 2020).

МтДНК упакована в нуклеопротеидный комплекс (нуклеоид) диаметром приблизительно равным 100 нм с основным структурным белком TFAM, выступающим также в роли фактора транскрипции (Gustafsson C. M. et al., 2016; Kukat C. et al., 2015; Nicholls T. J., Gustafsson C. M., 2018). Сегрегация и равномерное распределение мтДНК между дочерними клетками зависит от митохондрий, структуры динамики a также И состава внутренней митохондриальной мембраны вблизи мест контакта митохондрий с ЭПР (Markin A. M. et al., 2021; Nicholls T. J., Gustafsson C. M., 2018). Тем не менее, процесс репликации мтДНК отличается от репликации ядерной ДНК. К основным белкам, обеспечивающим репликацию мтДНК, относятся ДНКполимераза γ (Pol γ), хеликаза Twinkle и митохондриальный одноцепочечный связывающий белок (mtSSB). Кроме того, к обеспечению данного процесса привлекаются дополнительные белки, такие как митохондриальная РНКполимераза (POLRMT), митохондриальный транскрипционный фактор ТFAM, фактор элонгации транскрипции (TEFM), фактор транскрипции B2 (TFB2M), экзонуклеаза MGME1, ДНК-лигаза III и РНКаза H1, играющие ключевую роль в обеспечении стабильности и репарации митохондриального генома (Falkenberg M., 2018; Fontana G. A., Gahlon H. L., 2020; Yasukawa T., Kang D., 2018). Нарушение процесса репликации приводит к появлению одиночных или множественных мутаций, которые приводят к делеции или истощению мтДНК.

В отличии от ядерного генома, механизмы, ответственные за репарацию поврежденной мтДНК, в митохондриях менее развиты и на данный момент

Наиболее изучены. изученным плохо механизмом репарации В митохондриальном геноме является эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER), который исправляет окисленные основания в мтДНК или двуцепочечные разрывы (ДЦР) (Gu S. et al., 2021; Mok B. Y. et al., 2020). Возможна реализация двух подпутей BER, таких как BER с точечной заплаткой, заключающийся в замене только одного нуклеотида, и BER с короткой заплаткой, который способен заменять короткий фрагмент длиной 2–15 нуклеотидов. В митохондриях данный механизм репарации опосредуют белки, также участвующие и в ядерном механизме эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) (Kamenisch Y. et al., 2010). Однако, остается малоизученным вопрос о существовании в митохондриях механизмов репарации ошибочно спаренных нуклеотидов и репарации ДЦР, таких как гомологичная рекомбинация, негомологичное соединение концов (NHEJ) и микрогомологичное соединение концов (MMEJ). Возможность рекомбинации гомологичной В наличия митохондриальном геноме подтверждается присутствием в митохондриальном матриксе белков типа Rad52, Rad51, Rad59p, MRE11 и NIBRIN, опосредующих реализацию данного механизм в ядре (Bian W. P. et al., 2019; Chesner L. N. et al., 2021; Dahal S. et al., 2018; Mbantenkhu M. et al., 2011; Stein A. et al., 2015; Yoo B. C. et al., 2020). Также в пользу существования пути репарации ММЕЈ в митохондриях, свидетельствует наличие таких белков и ферментов, как CtIP, FEN1, MRE11, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1) и ДНК лигазы III (Reddy P. et al., 2015; Tadi S. K. et al., 2016; Wang B. et al., 2021). Однако, на данный момент существует недостаточное количество прямых доказательств в пользу наличия в митохондриальном геноме путей репарации NHEJ и механизмов репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (Dahal S. et al., 2018; Souza-Pinto N. C. de et al., 2009; Tadi S. K. et al., 2016; Wisnovsky S. et al., 2016; Yoo B. C. et al., 2020).

1.3.3. Связь мутаций митохондриального генома с патогенезом атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний

Современные исследования показали, ЧТО некоторые аспекты атеросклероза быть патогенеза могут связаны с нарушениями В функционировании митохондрий, вызванными повреждением мтДНК (Glanz V. Y. et al., 2020; Mercer J. R. et al., 2010; Sazonova M. A. et al., 2017; Tolstik T. V. et al., 2024; Толстик Т. В. et al., 2023). Мутации, возникающие в митохондриальном геноме, изменяют структурные и функциональные свойства митохондрий, что приводит к нарушениям В процессе окислительного фосфорилирования и способствует развитию различных заболеваний. Данные изменения могут стать пусковым механизмом в развитии патологий сердечно-сосудистой системы, в том числе и атеросклероза, путем усиления окислительного стресса и воспалительного ответа. (Glanz V. Y. et al., 2020; Hu H. et al., 2020; Mustafa M. F. et al., 2020; Татевосян А. С. et al., 2023). Некоторые из мутаций мтДНК могут способствовать развитию осложнений данных заболеваний и использоваться в качестве биомаркеров для оценки предрасположенности к развитию патологий.

Мутации мтДНК могут находиться в состоянии гомоплазмии и гетероплазмии. Гомоплазматические мутации затрагивают всю мтДНК клетки, тогда как гетероплазматические мутации характеризуются наличием как нормальных, так и мутантных аллелей в мтДНК в различных пропорциях. Уровень гетероплазмии, который определяет процент мутантной мтДНК в клетке, является важным показателем степени митохондриальной дисфункции и напрямую влияет на выраженность клинических проявлений заболевания, включая тяжесть поражения. Патологический порог гетероплазмии мутантной мтДНК может составлять до 60–90% и проявляться в виде клинических симптомов заболевания, поэтому качественная и количественная оценка уровня гетероплазмии в митохондриальном геноме необходимы для исследования связи между мутациями митохондриального генома и заболеваниями человека (Glanz V. Y. et al., 2020; Sazonova M. et al., 2016; Sobenin I. A. et al., 2012).

Использование современных методов для выявления мутаций в мтДНК позволило установить взаимосвязь между определенными митохондриальными мутациями и различными хроническими патологиями у человека. Среди них были выявлены патологии сердечно-сосудистой системы, такие как ИБС, инфаркт миокарда, инсульт, коронарный стеноз, атеросклероз, кардиомиопатия, ЗПА. Кроме того, была продемонстрирована ассоциация мутаций в мтДНК с рядом других хронических патологических состояний, включая некоторые формы онкологических заболеваний, лиабет И наследственную глухоту (Glanz V. Y. et al., 2020; Gonzalez-Freire M. et al., 2020; Heidari M. M. et al., 2020; Hu H. et al., 2020; Omasanggar R. et al., 2020; Sazonova M. et al., 2016; Sobenin I. A. et al., 2012).

Одними из наиболее изученных являются мутации различных тРНК, кодируемых в митохондриальном геноме. Было показано, что мутации m.5592А>G и m.5024С>T в митохондриальном гене тРНК^{Аla}, а также m.15927G>А в гене тРНК^{Тhr} могут являться наследуемыми факторами риска ИБС, так как они способны изменять структуру и функцию тРНК, увеличивать их нестабильность, что приводит к дисфункции митохондрий, дефициту окислительного фосфорилирования и увеличению продукции АФК в клетках сердечной мышцы и сосудов, способствуя таким образом развитию миопатий и кардиомиопатий (Gammage P. A. et al., 2018; Qin Y. et al., 2014). Кроме того, у пациентов с ИБС были выявлены мутации m.8326A>G, m.8331A>G, тРНК^{Lys} m.8344A>G m.8324T>A И в гене (MT-TK),а также гетероплазматическая мутация m.8231C>A в гене MT-CO2 (Heidari M. M. et al., 2020; Matam K. et al., 2014). Известно о двух точечных мутациях m.5711А>G и m.5725Т> G, гомо- и гетероплазматической соответственно, в тРНК ^{Asn} и гомоплазматической мутации m.5568А>G в тРНК ^{Trp} (Heidari M. M. et al., 2017). Мутация m.5725T>G в тРНК ^{Asn} является патогенной мутацией при ИБС и отличается высокой консервативностью между видами. Также было

обнаружено, что гетероплазматические и гомоплазматические мутации в области 3777–4679 мтДНК, в которых закодированы гены *MT-ND1*, *MT-ND2*, тРНК^{IIe}, тРНК^{Met} и тРНК^{GIn}, положительно коррелируют с проявлением эссенциальной (первичной) артериальной гипертензии, унаследованной от матери (MIEH) (Zhu Y. *et al.*, 2020). К числу таких мутаций мтДНК относят m.3970C>T, m.4048G>A, m.4071C>T, m.4086C>T, m.4164A>G и m.4248T>C в гене *MT-ND1* и m.4386T>C и m.4394C>T в гене тРНК^{GIn}, а также делеции m.4563delG, m.4576delA, m.4611delA и m.4612delT.

Достаточно распространенной является митохондриальная делеция 4977 (mtDNA4977), обнаруживаемая при серьезных неблагоприятных п.н. сердечно-сосудистых событиях (МАСЕ), ИБС, а также раке груди, и она может быть использована для идентификации митохондриальной дисфункции и окислительного повреждения мтДНК (Hu H. et al., 2020). Делеция mtDNA4977 может влиять на гены, кодирующие 5 тРНК, 4 субъединицы комплекса I, 1 субъединицу комплекса IV и 2 субъединицы комплекса V, что может нарушать выработку энергии и приводить к генерации АФК. Более высокие уровни делеции mtDNA4977 среди пациентов с ИБС связаны со снижением количества числа копий мтДНК (Vecoli C. et al., 2018). Высокий уровень повреждения мтДНК на ранних стадиях заболевания может стимулировать биогенез митохондрий в качестве адаптивного ответа, приводя таким образом к увеличению их числа. Однако в долгосрочной перспективе при накоплении повреждений мтДНК, ее истощение становится неизбежным, что ведет к нарушению митохондриальной функции. Истощение мтДНК в клетках и последующее развитие митохондриальной дисфункции играют критическую патогенезе атеросклероза и различных сердечно-сосудистых роль В заболеваний, ускоряя развитие и тяжесть этих патологий.

Существуют исследования, подтверждающие связь мутаций мтДНК с развитием атеросклероза (Glanz V. Y. *et al.*, 2020; Orekhov A. N. *et al.*, 2015; Sazonova M. *et al.*, 2016; Sobenin I. A. *et al.*, 2012; Sobenin I. A. *et al.*, 2013; Sobenin I. A. *et al.*, 2019; Tolstik T. V. *et al.*, 2024; Tolstik T. V. *et al.*, 2024). Более

того, у пациентов с метаболическим синдромом исследовались десять мутаций, ассоциированных с атеросклерозом. Было показано, что наличие данных мутаций коррелирует с такими симптомами метаболического синдрома, как высокие уровни триглицеридов и глюкозы в крови (Sobenin I. A. *et al.*, 2019).

Для выявления митохондриальных мутаций, ассоциированных с атеросклерозом, используются клетки цельной крови (Sazonova M. A. *et al.*, 2019; Sazonova M. A. *et al.*, 2019; Sinyov V. V. *et al.*, 2017; Максимов В. H. *et al.*, 2018; Судаков Н. *et al.*, 2016). Определение порогового значения уровня гетероплазмии мутаций мтДНК, выше которого пациент можно отнести к группе повышенного риска развития атеросклероза, как и определение числа копий мутантных мтДНК, может являться новым критерием оценки предрасположенности к возникновению и развитию атеросклеротических поражений артерий человека (Sazonova M. A. *et al.*, 2017; Sazonova M. A. *et al.*, 2019; Максимов В. Н. *et al.*, 2019; Максимов В. Н. *et al.*, 2018; Судаков Н. *et al.*, 2016).

Так, была выявлена положительная корреляция уровня гетероплазмии мутаций в мтДНК, таких как m.15059G>A, m.12315G>A, m.5178C>A, m.3256C>T, m.652delG, m.3336T>C и m.14459G>A, с толщиной интима-медиа (cIMT) сонных артерий и атеросклерозом, и обратная корреляция уровня гетероплазмии для мутаций m.1555A>G, m.13513G>A и m.14846G>A (Kirichenko T. V. *et al.*, 2020; Kirichenko T. V. *et al.*, 2020; Sazonova M. A. *et al.*, 2015; Sazonova M. A. *et al.*, 2017; Sobenin I. A. *et al.*, 2012; Sobenin I. A. *et al.*, 2019; Caзонова M. A. *et al.*, 2014). Существует значительная разница в уровне гетероплазмии мутаций митохондриального генома между здоровыми тканями и тканями с атеросклеротическими изменениями. Мутации, наблюдаемые в поражённых тканях, локализованы в генах, кодируемых в мтДНК, включая *MT-RNR1* (12S pPHK), *MT-RNR2* (16S pPHK), *MT-TL1* и *MT-TL2* (тPHK ^{Leu}), а также гены, кодирующие субъединицы комплекса NADHдегидрогеназы, такие как *MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND5* и *MT-ND6*, и ген *MT*- *СҮВ* (цитохром b) (таб. 2) (Sazonova M. A. *et al.*, 2016; Sobenin I. A. *et al.*, 2012; Sobenin I. A. *et al.*, 2013).

Нарушения функционирования процессов окислительного фосфорилирования, обусловленные мутациями в генах белков, являющихся компонентами дыхательной цепи, являются наиболее серьезными. Так, ранее была обнаружена мутация m.15059G>A в гене цитохрома b, являющегося субъединицей III комплекса III дыхательной цепи, ассоциированная с митохондриальной миопатией (Andreu A. L. *et al.*, 1999). Позднее была выявлена связь данной мутации с атеросклерозом и первичной гипертензией при анализе клеток атеросклеротических поражений и лейкоцитов пациентов (Sobenin I. A. *et al.*, 2012; Sobenin I. A. *et al.*, 2013; Баринова В. A. *et al.*, 2015).

Недавно было выдвинуто предположение, что некоторые из мутаций макрофагов мтДНК могут изменять активацию моноцитов И атеросклеротических поражений посредством развития митохондриальной дисфункции (Orekhov A. N. et al., 2019). Так, мутации мтДНК m.1811A>G и m.9477G>A, m.14459G>A, m.1555A>G И m.12315G>A связаны с провоспалительной активацией моноцитов крови человека. Наличие мутаций m.1811А>G и m.9477G>A в мтДНК макрофагов вероятно оказывает влияние формирование иммунной толерантности способствует на И продолжительному провоспалительному ответу (Orekhov A. N. et al., 2015). В свою очередь, уровень гетероплазмии мутаций m.14459 G>A, m.1555A>G, и m.12315G>A коррелируют с повышенной секрецией ФНОа (Orekhov A. N. et al., 2015). Кроме того, недавно было показано, что моноциты от пациентов с ИБС и ожирением обладают повышенным числом копий мутантной мтДНК, которое положительно коррелирует с уровнем секреции ΦΗΟα (Tolstik T. V. et al., 2024). Все эти факты указывают на вероятный вклад митохондриальной дисфункции, вызванной наличием мутаций в мтДНК, в возникновении хронического сосудистого воспаления и атеросклероза.

Мутация	Ген	Связанные осложнения и заболевания
m.5592A>G	тРНК ^{Ala} (<i>MT-TA</i>)	ИБС
m.15927G>A	$TPHK^{Thr} (MT-TT)$	IDC
m.8326A>G		ИБС
m.8331A>G	тРНК ^{Lys} (<i>MT-TK</i>)	
m.8324T>A		112 0
m.8344A>G		
m.8231C>A	Цитохром с оксидаза II (<i>MT-CO2</i>)	ИБС
m.5711A>G	TPHK ^{Asn} (<i>MT-TN</i>)	
m.5725T>G		ИБС и атеросклероз
m.5568A>G	$TPHK^{rip}(MT-TW)$	
m.3970C>T		MIFH
m.4048G>A		
m.4071C>T	Субъелиница 1 NADH легилрогеназы (<i>MT-ND1</i>)	
m.4086C>T		
m.4164A>G		
m.4248 T>C		
m.4386T>C	TPHK ^{Gln} (<i>MT-TO</i>)	
m.4394C>T	1111K (<i>m1-1Q</i>)	
m.4563delG		
m.4576delA	3777 <u>4679 область мт</u> ЛНК	
m.4611delA		
m.4612delT		
	5 генов тРНК,	
Делеция	4 гена субъединиц комплекса I,	МАСЕ ИБС
mtDNA4977	1 ген субъединиц комплекса IV,	MIACL, HDC
	2 гена субъединиц комплекса V	
m.15059G>A	Цитохром b (<i>MT-CYB</i>)	
m.14846G>A		
m.3336T>C	Субъединица I NADH дегидрогеназы (<i>MT-NDI</i>)	
m.5178C>A	Субъединица 2 NADH дегидрогеназы (<i>MT-ND2</i>)	
m.13513G>A	Субъединица 5 NADH дегидрогеназы (<i>MT-ND5</i>)	
m.14459G>A	Субъединица 6 NADH дегидрогеназы (<i>MT-ND6</i>)	Атеросклероз
m.3256C>T	TPHK ^{Leu} (<i>MT-TL1</i>)	1110pollarepoo
m.12315G>A	тРНК ^{Leu} (<i>MT-TL2</i>)	
m.652delG	12S pPHK (MT-RNRI)	
m.1555A>G		
m.1811A>G	16S pPHK (<i>MT-RNR2</i>)	
m.9477G>A	Цитохром с оксидаза III (<i>MT-CO3</i>)	
m.5024C>T	тРНК ^{Аla} (<i>MT-TA</i>)	Кардиомиопатии

Таблица 2. Мутации митохондриального генома, ассоциированные с сердечно-сосудистыми заболеваниями

1.4. Использование современных методов для исследования атерогенеза *in vitro*

1.4.1. Клеточные модели исследования атеросклероза

Клеточные in vitro исследования атеросклероза модели для подразделяются на 2D- и 3D-модели (Chen J. et al., 2022). Обычно к 2Dмоделям относят статично культивируемые монослойные клетки. Они могут быть получены как из тканей человека, так и из распространенных коммерческих линий эукариотических клеток. Такие модели являются наиболее распространенными среди исследователей в связи с широкой доступностью и низкой стоимостью, и обычно применяются в исследованиях по оценке эффективности и токсичности лекарственных препаратов, а также изучения конкретных молекулярных механизмов атерогенеза на отдельных типах клеток (Chen J. et al., 2022). Кроме того, широкую популярность в последнее время получили технологии совместного культивирования нескольких клеточных линий для прямого и непрямого взаимодействия между клетками.

Наиболее распространенными типами клеток, используемых в исследованиях атеросклероза, являются эндотелиальные клетки, моноциты, макрофаги и ГМК (Zhang Y. *et al.*, 2021).

В качестве модельных эндотелиальных клеток обычно используют эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC). Они имеют физиологические и патологические характеристики взрослых эндотелиальных клеток. HUVEC широко используются для исследования участия эндотелиальных клеток в атерогенезе, в частности для выяснения роли эндотелия в реакции стенки кровеносных сосудов на растяжение, силы напряжения сдвига и генерацию АФК (Chen J. *et al.*, 2022; Zhang Y. *et al.*, 2021).

Самыми распространенными клеточными линиями, применяемыми для изучения молекулярно-клеточных аспектов атерогенеза, являются мононуклеарные макрофаги мышей RAW264.7 и моноцитоподобная

клеточная линия человека THP-1 (Chen J. *et al.*, 2022; Zhang Y. *et al.*, 2021). Макрофаги RAW264.7 используются для сопоставления результатов исследования атеросклероза в мышиных моделях. Кроме того, используются мышиные перитонеальные макрофаги и макрофаги, происходящие из костного мозга мышей (Zhang Y. *et al.*, 2021).

В качестве модельных ГМК в исследованиях атеросклероза обычно используют первичные ГМК крыс или мышей, а также человеческие ГМК сосудов (VSMC). Обычно ГМК применяют для изучения таких ключевых параметров атеросклероза, как пролиферация и миграция клеток, кальцификация клеток и бляшки, а также клеточная фенотипическая трансформация (Chen J. *et al.*, 2022; Zhang Y. *et al.*, 2021).

В к традиционным 2D-моделям дополнение популярность В получили 2D-клеточные исследовании атеросклероза листы И микрожидкостные чипы с 2D-клеточной культурой, которые используются для более адекватного воспроизведения физиологических и патологических состояний тканей человека (Chen J. et al., 2022). Тем не менее, 2D-модели имеют ряд ограничений, связанных с невозможностью полноценной имитации атеросклеротических бляшек человека, топографическими проблемами и жесткостью субстрата, на котором клетки культивируются, сложностями в адекватной интерпретации результатов по исследованию токсичности и эффективности лекарственных препаратов (Chen J. et al., 2022).

Однако решением вышеперечисленных проблем клеточного моделирования атеросклероза могут стать 3D-клеточные модели (Chen J. *et al.*, 2022). Данный подход позволяет создавать клеточные конструкции, которые не только воспроизводят трехмерную структуру тканей, но и позволяют создать более естественный ВКМ, что способствует моделированию как межклеточного взаимодействия, так и взаимодействию клеток с ВКМ. 3D-модели тканей *in vitro* разрабатываются с помощью такого подхода, как биофабрикация (Moroni L. *et al.*, 2018). Данный подход позволяет создавать сложные структуры с использованием живых клеток, клеточных агрегатов,

биоматериалов и биоактивных молекул путем биопечати или биосборки. Более того, данные технологии позволяют также создавать искусственные трехмерные трубки, имитирующие анатомию сосудов и выдерживающие давление жидкости, формирующееся в организме человека и животных (Atchison L. *et al.*, 2017; Dash B. C. *et al.*, 2016). Данные искусственные артерии состоят из эндотелиальных клеток, ГМК и перицитов человека, что позволяет моделировать сосудистые аспекты конкретных заболеваний в наиболее приближенных к естественным условиях.

Стоит отдельно отметить, что для некоторых исследований создаются новые клеточные линии на основе тех, что были описаны выше, с использованием клеточно-инженерных подходов. Например, в настоящее время наиболее распространенным подходом для создания моделей не только хорошо известных митохондриальных заболеваний, но и атеросклероза, являются трансмитохондриальные методы. С помощью данного подхода можно создавать клеточные линии, несущие патогенный митохондриальный геном. Такие клеточные линии получили название цитоплазматических гибридов (цибридов).

Цибриды содержат митохондрии с мутациями в мтДНК от безъядерных клеток доноров и постоянный ядерный геном клеток, лишенных митохондрий (th0). Такие клеточные линии позволяют исследовать влияние мтДНК на различные фенотипические и биохимические параметры клеток. Например, для изучения роли митохондриальных мутаций в развитии заболеваний, таких как синдром MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия с лактатацидозом и инсультоподобными эпизодами), наследственная оптическая нейропатия Лебера (LHON), синдром Ли, синдром NARP (нейропатии, атаксии и пигментного ретинита) и MERRF (миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами), созданы цибридные клеточные линии с мутациями, такими как m.3243A>G и m.3271T>C (MT-TL1 и MT-TL2), m.14459G>A и m.14484T>C (MT-ND6), m.8344A>G и m.8356T>C (MT-TK) (Brown M. D. *et al.*,

2000; Chomyn A. *et al.*, 1992; Koga Y. *et al.*, 1995; Masucci J. P. *et al.*, 1995; Trounce I. *et al.*, 1994; Vergani L. *et al.*, 1999). Такие клеточные линии позволяют исследовать влияние данных мутаций на метаболизм клеток, их биоэнергетику и устойчивость к повреждающим агентам, в том числе в контексте наследственных заболеваний.

Недавно было создано несколько клеточных линий цибридов, используемых для исследования взаимосвязи ряда мутаций мтДНК с атеросклерозом (Sazonova M. A. et al., 2018; Sazonova M. A. et al., 2019; Sazonova M. D. et al., 2021; Синёв В. В. et al., 2017). Для создания данных цибридных клеток использовались моноцитоподобная клеточная линия ТНР-1, в которой с помощью бромистого этидия были удалены митохондрии. В качестве доноров митохондрий применялись тромбоциты пациентов с установленным диагнозом атеросклероза, несущие патогенные мутации в мтДНК (Sazonova M. A. et al., 2019). Такой подход позволяет исследовать влияние специфических мутаций на клеточные функции и механизмы, связанные с развитием атеросклеротических поражений. В настоящее время данные уникальные клеточные линии цибридов, созданных на основе линии исследованиях, направленных на ТНР-1, используются в выявление молекулярно-клеточных патологических механизмов развития митохондриальной дисфункции в моноцитах и макрофагах в контексте атеросклероза (Bezsonov E. E. et al., 2021; Sukhorukov V. N. et al., 2021; Sukhorukov V. N. et al., 2022; Sukhorukov V. N. et al., 2022; Zhuravlev A. D. et al., 2022).

1.4.2. Основные подходы к редактированию митохондриального генома

Наличие большого числа мутаций прямо или косвенно участвующих в развитии атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний говорит о необходимости осуществления редактирования митохондриального генома с целью выявления роли и функции как отдельных мутаций мтДНК, так и их комбинаций. Кроме того, при использовании такого подхода становится возможным создавать новые клеточные модели митохондриальных заболеваний, а также разрабатывать подходы к терапии данных патологий.

В настоящее время для редактирования митохондриального генома применяются методы с использованием митохондриально-таргетированных нуклеаз, включая нуклеазы с цинковыми пальцами (mtZFN), направленные на митохондрии эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (mitoTALEN), а также системы, основанные на CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (Gammage P. A. et al., 2016; Reddy P. et al., 2015; Wang B. et al., 2018). Данные инструменты могут быть адаптированы для целенаправленного расщепления мтДНК и создают возможности для мутаций. Основной работы коррекции патогенных принцип таких генетических конструкций заключается в образовании ДЦР в целевых участках ДНК.

Редактирующая платформа mtZFN представляет собой химерный фермент, включающий в себя Cys₂His₂ белок с цинковыми пальцами (ZFP), конъюгированный с С-концевым каталитическим ферментом FokI. Кроме того, такая редактирующая конструкция содержит домен с дополнительной последовательностью, направленной на митохондрии (MTS) и сигнальный (NES), которые способствуют пептид ядерного экспорта точной митохондриальной локализации (Gammage P. A. et al., 2016). Успешное применение mtZFN было продемонстрировано на мышиной модели, несущей в ткани сердечной мышцы мутацию m.5024C>T в гене тРНК^{Аla}, связанную с миопатиями, кардиомиопатиями и дефицитом процессов окислительного фосфорилирования (Gammage P. A. et al., 2018).

Система редактирования генома mitoTALEN состоит из ДНКсвязывающего домена, слитого с эндонуклеазным доменом FokI, также как и платформа mtZFN, и функционируют в виде димеров (Yang Y. *et al.*, 2018). Каждый из мономеров mitoTALEN содержит 14,5–16,5 повторов для точного нацеливания на мтДНК. Один из мономеров обычно направлен на мутантную

тогда как другой последовательность В геноме, связывается с последовательность дикого типа с длиной спейсера 14–17 п.н., что определяет специфическое расщепление мутантной мтДНК при димеризации нуклеазы FokI. На мышиной модели гетероплазматической мутации m.5024C>T гена тРНК^{Аla}, упомянутой ранее, было успешно продемонстрировано снижение мутационной нагрузки в скелетных мышцах и сердце при использовании mitoTALEN, где в качестве способа доставки использовался вектор на основе аденоассоциированного вируса AAV9 (Bacman S. R. et al., 2018). Однократная инъекция AAV9-mitoTALEN имела длительный и стабильный эффект, сохранявшийся до 10-24 недель. Для повышения эффективности и упрощения доставки редактирующих конструкций в пораженные ткани на основе TALEN были разработаны молекулярные гибридные конструкции I-TevI-TALE (mitoTev-TALE), представляющие собой мономерные нуклеазы из фага Т4 (I-TevI) с доменом GIY-YIG и ДНК-связывающим доменом TALE (Pereira C. V et al., 2018).

В качестве альтернативы эндонуклеазам рестрикции mitoTALEN/ZFN недавно была создана конструкция на основе самонаводящейся эндонуклеазы I-CreI, получившей название mitoARCUS. В отличие от ранее упомянутых платформ она является мономерной, обладает относительно небольшим размером, и способна распознавать последовательности, отличающиеся всего на одну пару оснований (Zekonyte U. et al., 2021). Показано, что внутривенное введение mitoARCUS мышам, приводит к эффективному сдвигу уровня гетероплазмии мутации m.5024C>T в гене тРНКАla в тканях печени и скелетных мышц животных без истощения общих уровней мтДНК с сохранением эффекта через 6, 12 и 24 недели. Таким образом, применение mitoTALEN/ZFN наглядно демонстрирует, что такие редактирующие конструкции могут быть весьма эффективными инструментами В экспреиментах in vivo без проявления сильной цитотоксичности в клетках и тканях (Bacman S. R. et al., 2018; Gammage P. A. et al., 2018).

Но несмотря на то, что mtZFN и mitoTALEN демонстрируют успешное снижение уровня гетероплазмии мтДНК, данные редактирующие системы обладают рядом недостатков, которые могут затруднять проведение исследований митохондриального генома. Главными препятствиями в применении редактирующих конструкций остаются их крупные размеры и гетеродимерная структура, что создает сложности при упаковке генов, которые их кодируют, в вирусные векторы для доставки внутрь клеток. Дополнительной трудностью является неспособность mtZFN и mitoTALEN различать точечные мутации в последовательностях мтДНК, что требует трансфекций эффективного многократных для снижения уровня гетероплазмии (Gammage P. A. et al., 2016; Hashimoto M. et al., 2015). Возможно, недавно созданные mitoTev-TALE или mitoARCUS могли бы получить более успешное и широкое применение, в частности в связи с их малым размером (Pereira C. V et al., 2018; Zekonyte U. et al., 2021).

Другим подходом к редактированию и снижению гетероплазмии мтДНК является метод, основанный на CRISPR, который получил широкое применение в редактировании ядерного генома (Bian W. P. et al., 2019; Hussain S. R. A. et al., 2021; Loutre R. et al., 2018; Wang B. et al., 2021). Общеизвестно, что CRISPR являются частью бактериальной иммунной системы, распознающей мотив РАМ, прилегающий к протоспейсеру (protospacer adjacent motive), который представляет собой последовательность ДНК длиной от 2 до 6 п.н., находящейся сразу за целевым сайтом эндонуклеазы (Wang H. et al., 2016). В конструкциях mito-CRISPR, нацеленных на мтДНК, используются такие нуклеазы, как Cas9 и Cas12a (paнee известный как Cpf1), а также а также химерные гидовые РНК (гРНК), специфически распознающая последовательности РАМ (Antón Z. et al., 2021). Эффективность таких редактирующих систем во многом зависит от адресной доставки нуклеазы CRISPR с помощью MTS, точного нацеливания на мтДНК с помощью гРНК и образования функционального рибонуклеопротеидного комплекса Cas9-гРНК в митохондриальном матриксе, что обеспечивает точное и стабильное

редактирование мтДНК и функциональную нуклеазную активность комплекса CRISPR-RNP (Antón Z. *et al.*, 2021; Yoo B. C. *et al.*, 2020).

В исследованиях механизмов различных заболеваний на клеточных линиях и модельных животных часто демонстрируется эффективность работы редактирующей системы mito-CRISPR/Cas9 по снижению содержания мутантной мтДНК. Например, модельной клеточной на линии цитоплазматических гибридов синдрома MELAS была продемонстрирована различная эффективность нацеливания на митохондрии и влияние на митохондриальную динамику и функцию нескольких нуклеаз CRISPR, таких как SpCas9 типа II (Streptococcus pyogenes), SaCas9 (Staphylococcus aureus), LbCas12a (Cpf1) типа V (*Lachnospiraceae* bacterium) И AsCas12a (Acidaminococcus sp.) (Antón Z. et al., 2021). В частности, в работе, связанной с применением системы mito-CRISPR/Cas9 на основе вектора pSpCas9-mito, была показана ее способность снижать количество копий мтДНК в эукариотических клетках (Bian W. P. et al., 2019). Данная система также включала два фланкирующих сайта MTS к гену COX8A (субъединица 8А цитохром с оксидазы), а в качестве целевых сайтов использовались гены МТ-ND1 и MT-ND4 (Loutre R. et al., 2018). Однако некоторые данные демонстрируют, что SpCas9 характеризуется сниженной локализацией в митохондриях по сравнению с другими нуклеазами (Antón Z. et al., 2021). Ее способствует использование нарушению морфологии И функций митохондрий, в то время как наиболее эффективными себя показывают LbCas12a с различными MTS сайтами.

Как ранее уже упоминалось, для направленного транспорта редактирующих конструкций в митохондриальный матрикс используется MTS сайт, также называемый каноническим сигналом митохондриальной локализации (MLS). Он представляет собой короткий пептид длиной 15–70 аминокислот, несущий положительно заряженные основные остатки (Bacman S. R. *et al.*, 2020; Gammage P. A. *et al.*, 2016; Hussain S. R. A. *et al.*, 2021). Для импорта белков в митохондрии крайне важно учитывать заряд, длину и

Наиболее распространенными структуру МТЅ сайта. MTS сайтами, используемыми В исследованиях, являются последовательности митохондриальных генов *SOD2* (митохондриальная супероксиддисмутаза 2) и COX8A (Bian W. P. et al., 2019; Hashimoto M. et al., 2015; Loutre R. et al., 2018). При трансфекции клеток с использованием гРНК совместно с Cas9 конструкциями, содержащими MTS сайт, наблюдается колокализация последовательности гРНК с целевыми участками в митохондриях и значительное снижение количества мутантной мтДНК (Hussain S. R. A. et al., 2021).

В настоящее время одним из наиболее перспективных подходов для направленной доставки CRISPR/Cas9 к митохондриальному геному считается механизм естественного импорта РНК в митохондрии. Как показано ранее, доставка комплементарных мутантной мтДНК рекомбинантных РНК в митохондрии способствует подавлению репликации данной мтДНК и снижению уровня гетероплазмии (Comte C. et al., 2013). Развитие этой привело попыткам создать специфическую стратегии К систему CRISPR/Cas9 мтДНК редактирования на основе С использованием естественного пути импорта РНК в митохондрии (Loutre R. et al., 2018). В результате применения редактирующей системы с Cas9, а также сайтом MTS к гену *COX8A* (MTS^{COX8A}-hCas9) и двумя гРНК, направленными на некодирующую область мтДНК и ген МТ-СҮВ, было отмечено уменьшение количества копий мтДНК в 2-3 раза (Loutre R. et al., 2018). Предполагается, связывание комплекса hCas9/rPHK с последовательностью что В некодирующей области нарушает образование трехцепочечной структуры Dпетли, препятствуя таким образом репликации мтДНК и делая другие ее участки более уязвимыми для действия второго комплекса hCas9/гРНК.

Несмотря на значительные успехи, ограниченные знания о механизмах транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии и отсутствие эффективных методов переноса гРНК через митохондриальную мембрану остаются одними из основных препятствий для успешного применения системы mitoCRISPR/Cas9 (Gammage P. A. et al., 2018). Считается, что структура митохондриальных мембран и особенности транспорта через них затрудняет проникновение большинства нуклеиновых кислот внутрь органелл, что делает митохондрии трудно достижимыми для CRISPR-конструкций. Разница в эффективности импорта белков в митохондрии, наблюдаемая в исследованиях при использовании различных нуклеаз, может быть объяснена общей доменной организацией импортируемых ферментов, различными Nконцевыми вторичными структурами и различием в общем пептидном заряде (Antón Z. et al., 2021). Например, LbCas12a по сравнению с SpyCas9 обладает меньшим более положительным зарядом меньшей размером, И гидрофобностью, что, вероятно, может объяснить его более высокую эффективность нацеливания на митохондрии.

Для переноса гРНК и Cas9 в митохондрии также предлагается полинуклеотидфосфорилазы (ПНПаза) или использование комплекса ТОМ/ТІМ (Chacinska A. et al., 2010; Hussain S. R. A. et al., 2021). ПНПаза присутствует во внутренней мембране и межмембранном пространстве митохондрий и недавно была признана первым компонентом пути импорта рРНК, тРНК, а также микроРНК в митохондрии (Shepherd D. L. et al., 2017). В свою очередь, комплекс ТОМ/ТІМ представляет собой способ импорта белков в митохондрии и состоит из транслоказы внешней мембраны митохондрий (TOM) и транслоказы внутренней мембраны митохондрий (TIM) (Chacinska A. et al., 2010). Возможность реализации импорта редактирующих конструкций mito-CRISPR в митохондрии данным путем подтверждается исследованием с использованием LbCas12a и блокаторов митохондриального импорта (Antón Z. et al., 2021). Была продемонстрирована успешная локализация и активность LbCas12a в митохондриальном матриксе как у клеток дикого типа, так и у MELAS цибридов. Однако при импорте редактирующих конструкций через комплекс ТОМ/ТІМ необходимо учитывать различия в заряде импортируемых белков, так как он значительно влияет на эффективность митохондриального импорта.

Перспективным альтернативным подходом для направленного переноса редактирующих конструкций в митохондрии является использование липидных наночастиц (липосом), которые могут быть модифицированы для снижения цитотоксичности И повышения селективности доставки нуклеиновых кислот (Katayama T. et al., 2019; Zakirov F. H. et al., 2020). При разработке митохондриальных липосом особое внимание необходимо уделять составу липидов митохондриальной мембраны, молярному соотношению компонентов липосом, размеру частиц, молекулярной массе и соотношению катионных и анионных групп (N/P), определяющих общий заряд носителя. Также недавно была разработана митохондриальная система доставки на основе липосом, получившая название MITO-Porter, которая способна доставлять инкапсулированные вещества в митохондрии посредством слияния мембран (Katayama T. et al., 2019; Yamada Y. et al., 2008). Однако, такая система доставки не является универсальной и требует оптимизации для специфического использования с конкретными клеточными ЛИНИЯМИ (Ishikawa T. et al., 2018).

Не стоит оставлять без внимания существование в митохондриях собственных систем репарации мтДНК, упомянутых ранее (Bian W. P. et al., 2019; Chesner L. N. et al., 2021; Dahal S. et al., 2018; Gu S. et al., 2021; Mbantenkhu M. et al., 2011; Mok B. Y. et al., 2020; Reddy P. et al., 2015; Stein A. et al., 2015; Tadi S. K. et al., 2016; Wang B. et al., 2021; Yoo B. C. et al., 2020). Например, механизм репарации MMEJ может приводить к образованию небольших вставок и делеций во фланкирующих сегментах ДНК, а также крупных значительных делеций ДНК. Это высоко мутагенный процесс, который может негативно влиять на результат редактирования генома (Sinha S. et al., 2016). Кроме того, для осуществления механизмов репарации ДЦР, образовавшихся в результате действия эндонуклеаз рестрикции, в мтДНК необходимо наличие матрицы оцДНК или двуцепочечной ДНК. В одном из последних исследований с использованием системы mito-CRISPR/Cas9 и Oligo-HEX в качестве матричной оцДНК была подтверждена возможность

встраивания данной оцДНК в регионы D-петли мтДНК (Bian W. P. *et al.*, 2019). Решением этой проблемы могли бы стать ингибиторы белков, вовлеченных в механизмы репарации мтДНК. Однако роль конкретных белков, участвующих в процессах MMEJ и гомологичной рекомбинации в митохондриях, а также последствия их ингибирования для клеток, остается недостаточно исследованной областью.

Также стоит учитывать возможность появления нецелевой активности в ядерном геноме при использовании митохондриальных редактирующих конструкций в случае их попадания в ядро клетки. Для успешного снижения уровня гетероплазмии мутантной мтДНК необходимо, чтобы нацеливание на происходило с высокой специфичностью. последовательность-мишень Например, рассмотренного исследования В случае ранее сравнения эффективности нуклеаз CRISPR, авторы отмечают, что серьезной проблемой при использовании Cas12a может являться именно расщепление ядерной ДНК в сайтах, не являющихся целевыми для разработанной конструкции (Antón Z. et al., 2021; Murugan K. et al., 2020). В связи с приведенными выше данными крайне важен правильный подбор нуклеаз и подходов к нацеливанию редактирующих конструкций на мтДНК.

Принимая во внимание температурные различия между ядром и митохондриями, важно учитывать чувствительность Cas9 к изменениям температуры, что может влиять на ее эффективность и специфичность расщепления ДНК (Xiang G. *et al.*, 2017). Согласно гипотезе, температура в митохондриях может превышать температуру цитозоля и ядра на 10° С, достигая значений 48–50°С (Chrétien D. *et al.*, 2018). Такая разница в температуре может влиять на сборку и эффективность расщепления RNP-комплекса редактирующей конструкции, так как даже небольшое увеличение температуры на 2°С способствует усилению нецелевого расщепления ДНК (Xiang G. *et al.*, 2017). Кроме того, снижение температуры также может влиять на эффективность работы CRISPR/Cas9 в виде RNP-комплекса (Xiang G. *et al.*, 2017). При использовании рекомбинантных PHK для снижения уровня

гетероплазмии мтДНК было установлено, что РНК с более высокой температурой плавления показывают лучшую эффективность, ЧТО подчеркивает важность учета температурных различий между митохондриями и остальными клеточными структурами (Loutre R. et al., 2018). Эти результаты предполагают, что специфичность системы mito-CRISPR/Cas9 может быть повышена за счет создания высокоточных гРНК с минимальным уровнем нецелевой активности, а также использования термостабильных вариантов Cas9 с улучшенной точностью работы (Mougiakos I. et al., 2017; Xiang G. et al., 2017). необходимо Таким образом, учитывать внутриклеточный температурный градиент при разработке редактирующих конструкций.

1.5. Заключение к обзору литературы

Анализ данных литературы указывает на одну из ведущих ролей митохондриальной дисфункции в нарушении функциональной активности макрофагов и моноцитов при атеросклерозе. Митохондрии выполняют важные функции в метаболизме клеток, в связи с чем любые изменения в их структуре и функциональных свойствах приводят к нарушению окислительновосстановительных процессов, усилению воспаления и запуску программируемой клеточной гибели.

Как было описано ранее, в основе дисфункции митохондрий лежат нарушение их динамики, процессов митофагии, нарушение трансмембранного электрического переноса молекул И изменения И химического трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий, что в конечном итоге может приводить к развитию окислительного стресса и генерации АФК. Вероятно, мутации и делеции в мтДНК также способствуют повышенной продукции АФК, которые в свою очередь могут влиять не только на окисление белков, липидов и ядерной ДНК, но и собственной мтДНК. Таким образом формируется порочный круг, приводящий к еще большему числу повреждений митохондриального генома и образованию в нем мутаций.

Вероятно, митохондриальная дисфункция вносит существенный вклад в избыточное накопление холестерина макрофагами, развитие воспалительных реакций и таким образом способствует прогрессированию атеросклероза. В частности, выявлена корреляция некоторых мутаций мтДНК со способностью к активации моноцитов, полученных из крови пацентов с атеросклерозом. В основе данного феномена, как полагают, лежит митохондриальная дисфункция.

Тем не менее, остается нерешенным вопрос – как именно мутации митохондриального генома связаны с атерогенезом и какой вклад в развитие проатеросклеротического фенотипа клеток вносят конкретные мутации. Наиболее перспективным методом исследования в данном случае может адаптированная технология редактирования генома, являться под митохондриальный геном. К числу таких подходов можно отнести CRISPR/Cas9, TALEN И ZFN которые продемонстрировали свою эффективность в удалении мутаций в мтДНК. Редактирующие платформы на основе данных технологий способны с высокой точность вносить разрывы в мтДНК, способствуя снижению мутационной нагрузки в клетках. Подобные технологии можно применять для удаления отдельных мутаций в случае, если митохондриальный геном содержит несколько мутаций в разных генах, что позволит исследовать вклад отдельных вариантов мутаций в развитие патологического процесса.

Исследование вопросов, связанных с ролью мутаций мтДНК в атерогенезе и использованием подходов к снижению мутационной нагрузки, позволит с большей точностью выявить предрасположенность человека к развитию атеросклероза и обнаружить новые мишени для проведения антиатеросклеротической терапии. В частности, настоящая работа посвящена исследованию роли мутации m.15059G>A, обнаруженной в гене *MT-CYB*, кодирующем митохондриальный белок цитохром b, в развитии проатеросклеротического фенотипа моноцитов и макрофагов человека.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Работа с культурами клеток

2.1.1 Клеточные линии

В работе были использованы следующие клеточные линии:

ТНР-1: представляют собой линию моноцитоподобных клеток, выделенных из периферической крови больного острым моноцитарным лейкозом (рис. 2). Была получена из клеточного банка ФГБУН «Институт цитологии РАН» (Санкт-Петербург, Россия).



Рисунок 2. Микрофотография моноцитоподобных клеток линии ТНР-1.

TC-HSMAM1: гибридов, линия цитоплазматических 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). Последовательность мтДНК данной линии была охарактеризована с использованием секвенирования нового поколения (таб. 3) (данные не опубликованы). Линия была создана в рамках выполнения диссертационной работы Синёва Василия Владимировича «Клеточная модель митохондриальной дисфункции при атеросклерозе» (специальность 1.5.22 – клеточная биология, 1.5.7 – генетика) (Синёв В. В., 2022). Клеточная линия была получена на безвозмездной основе из лаборатории медицинской генетики Института экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия), руководитель Собенин Игорь Александрович.

Таблица 3. Перечень мутаций и уровень мутационной нагрузки мтДНК клеток линии TC-HSMAM1

Ген, мутация	Уровень
	гетероплазмии
Субъединица 5 NADH дегидрогеназы (<i>MT-ND5</i>), m.13513G>A	55,8%
Цитохром b (<i>MT-CYB</i>), m.15059G>A	43,3%
12S pPHK (<i>MT-RNR1</i>), m.652delG	27,4%
Субъединица 2 NADH дегидрогеназы (<i>MT-ND2</i>), m.5178C>A	22,8%
тРНК ^{Leu} (<i>MT-TL2</i>), m.12315G>A	17,9%
тРНК ^{Leu} (<i>MT-TL1</i>), m.3256С>Т	17,3%

Cas9-TC-HSMAM1: клетки, полученные в результате удаления мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, в цитоплазматических гибридах TC-HSMAM1 с помощью вектора MitoCas9. Были получены в лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «НИИОПП» (Москва, Россия) в рамках выполнения настоящего диссертационного исследования. 2.1.2 Протокол культивирования моноцитоподобных клеточных линий и дифференцировки в макрофагоподобные клетки

Клетки линий THP-1 и TC-HSMAM1 культивировались во флаконах с вентилируемой крышкой объемом 75 см³ в среде RPMI-1640 с содержанием Lглутамина (Capricorn Scientific, Германия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭTC) (Gibco, CША), 50 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma Aldrich, США), 50 мкг/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) в CO₂-инкубаторе (Binder, Германия) при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Культивирование клеток происходило в течение 1 месяца после разморозки культуры с поддержанием рабочей концентрации клеток 5·10⁵ клеток/мл.

Для обеспечения адгезии и индукции дифференцировки клеток THP-1 и TC-HSMAM1 в макрофаги клетки инкубировали в 24-луночных культуральных планшетах при плотности 1·10⁶ клеток на лунку в течение 48 часов в присутствии 50 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) (Sigma Aldrich, США) в 1 мл среды RPMI-1640, содержащей L-глютамин, 10% ЭТС и антибиотики (Chanput W. *et al.*, 2014).

2.1.3 Трансфекция клеток катионными липосомами и вектором MitoCas9

Суспензию гибридов TC-HSMAM1 клеток цитоплазматических трансфецировали вектором MitoCas9 в виде РНК-комплекса для удаления мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A в гене цитохрома b. Вектор MitoCas9 содержал полную последовательность кодирующую Sniper-Cas9 (Streptococcus pyogenes) с фланкирующей MTS (митохондриально нацеленная последовательность) к гену СОХ8А человека (субъединица 8А цитохром-Соксидазы) и промоторную область эндонуклеазы T7. После сайта MTS была добавлена последовательность Streptavidin-SpyTag через аптамер S1m для одновременной доставки нуклеазы Cas9 и sgPHK в митохондрии (CarlsonStevermer J. *et al.*, 2017). Биотинилированную sgPHK использовали для повышения эффективности и специфичности разрезания мтДНК вектором MitoCas9. Sniper-Cas9 обладает низкой нецелевой активностью, что позволяет проводить высокоточное редактирование митохондриального генома (Huang X. *et al.*, 2022; Lee J. *et al.*, 2019; Lee J. K. *et al.*, 2018). В связи с тем, что температура в митохондриях на несколько градусов превышает температуру в цитоплазме клетки, был проведен сайт-специфический мутагенез для повышения термостабильности Sniper-Cas9 (Chrétien D. *et al.*, 2018).

За 24 часа перед трансфекцией клетки в концентрации 1.106 клеток/мл помещались в среду RPMI-1640 с 10% ЭТС без добавления антибиотиков. Для трансфекции клеток использовали катионные липосомы М6 в объёме 9,24 мкл исходя из соотношения N/P = 6/1, PHK-комплекс MitoCas9 в концентрации 1000 нг/мл и 50 мкл RPMI-1640 без добавок. Катионные липосомы были выбраны как наиболее эффективный способ доставки РНК-комплекса MitoCas9 в клетки. Ранее было показано, что маннозилсодержащие катионные липосомы являются эффективными системами доставки нуклеиновых кислот в дендритные клетки и моноциты (Марков О. В. et al., 2017). Кроме того, данные липосомы содержат липид-помощник DOPE, улучшающий их фьюзогенные свойства и облегчающий выход нуклеиновых кислот из эндосом в цитоплазму (Михеев А. А. et al., 2020). Смесь липосом и нуклеиновых кислот инкубировали 20 минут при комнатной температуре и далее добавляли к клеткам. Спустя 24 часа инкубацию с трансфекционными реагентами останавливали, промывали клетки теплым фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS), после чего помещали в культуральные флаконы с вентилируемой крышкой объемом 25 см³ в концентрации 5·10⁵ клеток/мл в объеме 5 мл среды RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, 10% ЭТС и антибиотиков для дальнейшего культивирования. Забор материала для исследований осуществлялся на 1, 7 и 14 сутки инкубации.

2.2. Молекулярно-биологические методы

2.2.1 Выделение ДНК из образцов клеток

Суспензионные клетки в количестве 1.106 отбирали из культуральных флаконов в микропробирки типа «Эппендорф» и центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Осадок клеток лизировали путем добавления 500 мкл разогретого до 60°С буфера SNET (20 мМ Tris-HCl, 5 мМ ЭДТА, 400 мМ NaCl, 1% SDS, pH = 8.0) и 5 мкл протеиназы K (10 мг/мл) (Sigma Aldrich, CША) в каждую пробирку. Образцы инкубировали при 60°С в течение 12 часов в (ДНК-Технология, Россия) термостате «Термит» лля обеспечения оптимального лизиса клеток. Далее пробирки с клеточным лизатом центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин для осаждения нерастворенного осадка образца, после чего переносили 1 мл лизата, не захватывая нерастворенный осадок в новую пробирку объемом 2 мл. К лизату добавляли 500 мкл фенола (АО «Экос-1», Россия) и 500 мкл смеси хлороформа (АО «Экос-1», Россия) и изоамилового спирта (АО «Экос-1», Россия) в соотношении 24:1 в соответствии со стандартным протоколом (Butler J. M., 2012). Пробирки перемешивали на ротамиксе RM-1 (Elmi, Латвия) со скоростью 10 грт при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего центрифугировали при 16000 g в течение 15 минут. Водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли 1 мл изопропанола (АО «Экос-1», Россия) и перемешивали. Образцы оставляли на инкубацию при -20°С на 1 час, после чего повторно центрифугировали при 16000 g в течение 25 минут при 4°С. После этого удаляли супернатант, добавляли 1 мл 70% этанола (АО «Экос-1», Россия), перемешивали и вновь центрифугировали при 16000 g в течение 5 минут при 4°С. Этанол осторожно удаляли, сохраняя осадок ДНК, который оставляли на высушивание при комнатной температуре на 15 минут. Осадок ДНК растворяли в 200 мкл воды свободной от нуклеаз. Определяли концентрацию ДНК при помощи спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu,

Япония). Выделенную ДНК использовали для проведения цифровой капельной ПЦР и T7EI-анализа.

2.2.2 Выделение РНК из образцов клеток и проведение реакции обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК

Клетки гомогенезировали и лизировали в пробирках типа «Эппендорф» путем добавления реагента Extract RNA (Евроген, Россия) исходя из соотношения 500 мкл лизирующего реагента на 1·10⁶ клеток. Клеточный лизат перемешивали, затем инкубировали при 37°С в течение 30 мин в термостате «Термит» (ДНК-технология, Россия). Далее к клеточному лизату добавляли 500 мкл смеси хлороформа (АО «Экос-1», Россия) и изоамилового спирта (АО «Экос-1», Россия) в соотношении 24:1. Перемешивали пробирки в ротамиксе RM-1 (Elmi, Латвия) при 10 грт в течение 30 мин при комнатной температуре. Центрифугировали образцы при 16000 g в течение 30 минут при 4°С. После отбирали верхнюю водную фазу в новые пробирки. Добавляли в водную фазу 500 мкл изопропилового спирта (АО «Экос-1», Россия) на каждый 1 мл реагента, использованного для гомогенизации. Инкубировали смесь при -20°С в течение 12 часов. Центрифугирование образцов проводили при 16000 д в течение 45 минут при 4°С. После этого супернатант удаляли, оставляя осадок РНК на дне пробирки. Добавляли 1 мл 75% этанола (АО «Экос-1», Россия), затем вновь центрифугировали при 16000 g в течение 30 минут при 4°С. После удаления супернатанта осадок сушили в течение 5-7 минут при комнатной температуре. РНК растворяли в 10 мкл воды, свободной от РНКаз. После растворения РНК добавляли ДНКазу ezDNase^{тм} Enzyme (Thermo Fisher Scientific, США) для удаления остатков геномной и митохондриальной ДНК. Обработку ДНКазой образцов РНК проводили в соответствии с протоколом производителя. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием набора для обратной транскрипции MMLV RT kit (Евроген, Россия) с инструкцией производителя. В соответствии Определяли концентрацию кДНК при помощи спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu, Япония).

2.2.3 Количественная полимеразная цепная реакция

Экспрессию мРНК генов оценивали путем количественной ПЦРамплификации в реальном времени обратно транскрибированных фрагментов мРНК (кДНК). Уровень мРНК анализируемых генов нормализовали по усредненным значениям экспрессии двух генов «домашнего хозяйства» GAPDH и CAP1, для которых уровень экспрессии считался стабильным и неизменным. Специфичность амплификации определяли по наличию единичного пика на кривой плавления. Праймеры были подобраны в соответствии с температурой отжига в диапазоне от 58°С до 62°С (таб. 4). Дизайн праймеров проводили с использованием онлайн-ресурсов Primer Blast (Primer-BLAST, 2014) и Oligo Analyzer (Integrated DNA Technologies - IDT, 2023). При подборе праймеров для амплификации кДНК учитывали экзонинтронную структуру целевого гена, размещая праймеры таким образом, чтобы их сайты связывания находились в разных экзонах, что позволяет исключить возможное присутствие геномной ДНК в анализируемых образцах.

Для детекции путем количественной ПЦР в реальном времени использовали интактный краситель SYBR Green I, реакцию проводили на приборе CFX96 Touch (BioRad, CША). В качестве реактивов использовали набор qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Реакция ПЦР проводилась согласно стандартному протоколу: 1. Начальная денатурация (преинкубация) при 95°C (10 мин); 2. Цикловая денатурация (45 циклов) при 95°C (15 сек); 3. Отжиг праймеров и элонгация при 60°C (90 сек).

Далее была построена кривая плавлений на диапазоне температур 65-97°С с шагом 0,5 секунд. Кривая плавления была необходима для оценки качества проведения ПЦР реакции и отслеживания накопления неспецифичных продуктов ПЦР. Нормализация полученных данных выполнялась относительно средних значений Ct для генов *GAPDH* и *CAP1*. Относительное количество мPHK целевых генов в клетках THP-1 и цибридах определяли согласно методу $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, где $\Delta\Delta$ Ct рассчитывали как разность между Δ Ct для клеток THP-1 и Δ Ct для цибридов, при этом Δ Ct = (Ct целевого гена) – (среднее Ct для *GAPDH* и *CAP1*).

Ген	Последовательность праймера (5'-3')	
PCNA	F: GCCAGAGCTCTTCCCTTACG	
	R: TAGCTGGTTTCGGCTTCAGG	
CCNB1	F: AGGTTGTTGCAGGAGACCAT	
	R: CAGCTGCAGCATCTTCTTGG	
CCND1	F: AGCTGTGCATCTACACCGAC	
	R: GAAATCGTGCGGGGTCATTG	
POLRIA	F: CGACGACGACGAGGAAGAC	
	R: AAGCATTTGGTGTGGGGCAAC	
POLR3A	F: ACGGTCTCAAAGTTGTCCCC	
	R: CCTCTACCAGTTCGACCGC	
COL6A1	F: CATCAGCCAGACCATCGACA	
	R: AGCACACTTGCTCCACGTTA	
LIPA	F: GCAGGACAGCTCCAGAATGA	
	R: AACAGACCACCAACCCCAAG	
ACATI	F: GGAGGCTGGTGCAGGAAATA	
	R: AGCAAGGAAAGGCTGCCTAA	
FASN	F: AGGAATGCACACTCACCAGC	
	R: GAAGACAAAGCCACCCCAAG	
NCEHI	F: CGTGGTCTTCTGCCCAAGT	
	R: AAGGTGACCAGGACGCACT	
CES1	F: ATGTGGCTCCGTGCCTTT	
	R: AGTAAACCTCAGGGGTCCAAG	
TNFA	F: TCCCCAGGGACCTCTCTCTA	

Таблица 4. Праймеры для определения экспрессии генов методом количественной ПЦР

	R: CTTGTCACTCGGGGGTTCGAG
II I R	F: GCTCGCCAGTGAAATGATGG
	R: GGTGGTCGGAGATTCGTAGC
CASP3	F: TGCTATTGTGAGGCGGTTGT
	R: TCACGGCCTGGGATTTCAAG
CASP9	F: CAGGCCCCATATGATCGAGG
	R: CTGGCCTGTGTCCTCTAAGC
NLRP3	F: ACCTTTCTTCCATGGCTCAGG
	R: AGCCAAATGCTTACCAGAAAGT
CASPI	F: GAAAAGCCATGGCCGACAAG
	R: CCTTCACCCATGGAACGGAT
APAF1	F: CTTCTTCCAGTGTAAGGACAGT
	R: AAACAACTGGCCTCTGTGGT
PRKN	F: GGTCGATTCTGACACCAGCA
	R: CAGCTCCTTCCCTGCGAAAA
PINK1	F: CCATCTGGTTCAACAGGGCA
	R: AAATCTGCGATCACCAGCCA
MAPILC3B	F: GCCGCACCTTCGAACAAGA
	R: GGCGGGTTTTGTGAACCTGA
GAPDH	F: GTCAACGGATTTGGTCGTATTG
	R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
CAPI	F: GAGATTGCTGGGCGGTTCTT
	R: TAATGGACCACCTCCGGACT

2.2.4 *Т7-анализ эффективности внесения двуцепочечных разрывов в* митохондриальной ДНК

Выделенная из TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 клеток геномная ДНК была использована для амплификации последовательности мтДНК, окружающей мутацию m.15059G>A, для T7-анализа эффективности внесения двуцепочечных разрывов в мтДНК. Первый этап T7 анализа заключается в синтезировании ПЦР-продукта области, в которой произошло разрезание двуцепочечной ДНК с помощью MitoCas9. Для первого этапа T7 анализа использовали 100 нг ДНК, 25 мкл Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (New England BioLabs, США), 10 мкМ прямого праймера, 10 мкМ обратного праймера и воду UltraPure, не содержащую ДНКаз/РНКаз (Invitrogen, США). Общий объем реакции составлял 50 мкл. Далее проводили ПЦР при помощи амплификатора T100 (BioRad, США) в соответствии с протоколом производителя: 1. Начальная денатурация при 98°C (30 сек); 2. Отжиг праймеров и элонгация (35 циклов): 98°C (5 сек), 65°C (10 сек), 72°C (20 сек). 3. Остановка реакции 72°C (2 мин). Образцы охлаждались до 4°C.

Далее проводили второй этап T7 анализа, заключающийся в разрезании ПЦР-продуктов, содержащих гетеродуплекс, при помощи T7 эндонуклеазы I (New England BioLabs, США). T7 эндонуклеаза I распознает и расщепляет неидеально совпадающую ДНК. Предварительно смешивали для проведения реакции 100 нг ПЦР-продуктов, 2 мкл 10х NEB2 буфера и воду UltraPure, не содержащую ДНКаз/РНКаз (Invitrogen, США). Общий объем реакции составлял 19 мкл. Далее проводили денатурацию и отжиг в соответствии с официальным протоколом NEB в амплификаторе T100 (BioRad, США): 1. Начальная денатурация при 95°С (5 мин); 2. Отжиг праймеров и элонгация в диапазонах 95-85°С (скорость измерения -2°С/секунда) и 85-25°С (скорость измерения -1°С/секунда). Образцы охлаждались до 4°С. Далее к смеси добавляли 1 мкл T7 эндонуклеазы I и инкубировали при 37°С в течение 45 минут, после чего реакцию останавливали добавлением 1,5 мкл 0,25 М ЭДТА. ПЦР-продукты, обработанные T7 эндонуклеазой I, далее анализировали с использованием метода электрофореза в агарозном геле.

2.2.5 Цифровая капельная полимеразная цепная реакция

Для количественной оценки эффективности удаления мтДНК с мутацией в митохондриальном гене, кодирующем цитохром b (*MT-CYB*) была проведена цифровая капельная ПЦР (цкПЦР) на ПЦР-продуктах,

амплифицированных с выделенной ранее мтДНК, отобранных по результатам проведенного T7EI-анализа с визуализацией в агарозном геле.

Праймеры были подобраны в соответствии с температурой отжига в диапазоне от 58°C до 62°C с использованием онлайн-ресурса Primer Blast (Primer-BLAST, 2014) (таб. 5). Амплификацию проводили на системе для цифровой капельной ПЦР QX200 (BioRad, CША) согласно программе: 1. Начальная денатурация (преинкубация) при 94°C (6 мин); 2. Цикловая денатурация (40 циклов) при 94°C (15 сек); 3. Отжиг праймеров и элонгация при 61°C (80 сек).

После проведения цифровой капельной ПЦР в программе по обработке результатов QuantaSoft Analysis Pro (BioRad, США) подсчитывали число событий (точек). Точкой является флуоресцентный ответ положительной (мтДНК с мутацией) или отрицательной матрицы (интактная мтДНК без мутации, дикий тип).

Таблица 5. Праймеры для определения эффективности разрезания в митохондриальном гене цитохрома b

Ген	Последовательность праймера (5'-3')
	Fmut: TTAACCACTCATTCATTGACCTACCT
MT-CYB	Fwt: TTAACCACTCATTCATTGAGGTAG
	R: CCTGTAATGATTTGGACTATTAGGCAG

2.3. Биохимические методы

2.3.1 Электрофорез в агарозном геле

Для электрофоретического разделения ПЦР-продуктов, обработанных T7 эндонуклеазой I, использовали 1,5% агарозный гель в 1х TAE буфере (40 мМ Трис-HCl, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА), содержащий 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Электрофорез проводили в камере для горизонтального

электрофореза Mini-Sub Cell GT (BioRad, CША) с использованием источника питания PowerPack Universal (BioRad, CША) при 120 В, 100 мА и 12 Вт в течение 30 минут. Для определения длин фрагментов ПЦР-продуктов использовали маркер 50 bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Электрофорез проводили в течение 30 минут, при условиях I = 120 В, A = 100 mA, R = 12W. Документирование результатов осуществляли с помощью системы Gel Doc XR+ Gel Documentation System (BioRad, CША).

2.3.2 Иммуноферментный анализ провоспалительных цитокинов

Иммуноферментный анализ (ИФА) секреции цитокинов клетками проводили после провоспалительной стимуляции клеток с помощью бактериального липополисахарида (ЛПС) *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma Aldrich, США). Клетки ($1 \cdot 10^6$) инкубировали в полной среде RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, 10% ЭТС и 1 мкг/мл ЛПС в 24-луночных планшетах. Инкубацию проводили при 37°С в CO₂-инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 часов, после чего клетки переносили в пробирки и центрифугировали при 200 g в течение 10 минут. Супернатант отбирали в отдельные пробирки для оценки секреции цитокинов клетками с помощью коммерческого набора ELISA Kits (R&D Systems, США) к CCL2 (MCP-1), ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1β и ФНОα согласно протоколу производителя.

Анализ эндотоксиновой толерантности моноцитарных клеток к ЛПС проводили по схеме с двукратной стимуляцией (рис. 3). Для первичной стимуляции провоспалительного ответа (ЛПС I) клетки ($3 \cdot 10^5$) культивировали в полной среде RPMI-1640 с добавлением 10% ЭТС и 1 мкг/мл ЛПС в 48-луночных планшетах при 37°С в CO₂-инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂ в течение 24 часов (Zaric S. S. *et al.*, 2011). После инкубации клетки центрифугировали при 200 g, промывали теплым DPBS, затем добавляли свежую среду с или без 1 мкг/мл ЛПС и инкубировали еще 4 часа для повторной стимуляции провоспалительного ответа (ЛПС II). После инкубации

клетки отбирали в пробирки, центрифугировали при 200 g в течение 10 мин и отбирали супернатант в отдельные пробирки для оценки секреции клетками ФНОα.



Анализ эндотоксиновой толерантности иммунных клеток к липополисахариду



Рисунок 3. Схема анализа эндотоксиновой толерантности иммунных клеток к ЛПС. Схема подготовлена с использованием пакета программ Adobe Illustrator 2021 (Adobe, Inc., США).

Антитела из коммерческого набора перед началом работы разводили DPBS в соотношении 1:120. Приготовленный раствор антител вносили в каждую лунку 96-луночного планшета Nunc MaxiSorp ELISA Plates (Thermo Fisher Scientific, США) в объеме 100 мкл. Далее инкубировали антитела в течение 16 часов при комнатной температуре. После инкубации лунки планшета промывали в трехкратной повторности промывочным буфером объемом 200 мкл. После промывки в каждую лунку планшета вносили по 300 мкл реагента для делюции. Далее планшет инкубировали на орбитальном шейкере S-3L (Elmi, Латвия) при 100 грт в течение 1 часа при комнатной температуре. После инкубации планшет промывали и добавляли в каждую
лунку по 50 мкл реагента для делюции и 50 мкл исследуемого образца, а затем повторно инкубировали планшеты аналогичным путем. После промывания в лунки добавляли 100 мкл антител для детекции цитокинов и повторно инкубировали на орбитальном шейкере S-3L при 100 rpm в течение 2 часов при комнатной температуре. Далее лунки планшета промывали и добавляли по 100 мкл Streptavidin-HRP. Инкубировали планшет в течение 20 минут при комнатной температуре, закрыв от прямого попадания света. После инкубации лунки планшета промывали и добавляли по 100 мкл раствора субстрата. Инкубировали 20 минут при комнатной температуре, закрыв от прямого попадания света. Добавляли по 50 мкл раствора для остановки реакции. Далее оптическую регистрировали плотность образцов при помощи микропланшетного ридера AMR-100T (Allsheng, Китай) при длине волн 450 нм и 495 нм.

Полученные значения концентрации цитокинов в 1 мл среды нормировали на количество клеток (1·10⁶) в исследуемом образце (пг/мл).

2.3.3 Выделение суммарной фракции ЛПНП из плазмы крови

Фракцию ЛПНП получали крови пациентов ИЗ плазмы с диагностированным атеросклерозом использованием с многоэтапного препаративного ультрацентрифугирования по методу Lindgren (Havel R. J. et al., 1955; Orr J. et al., 1993). Для регулирования плотности в образцы добавляли Ультрацентрифугирование выполнялось при температуре бромид калия. 10°С, с использованием центрифуги Optima XL-90 и ротора модели 50Ті (Beckman Coulter, США), при скорости 195000 g. Выделенные таким образом ЛПНП были охарактеризованы как множественно модифицированные и обладающие атерогенными свойствами (Tertov V. V. et al., 1992). Для предотвращения окислительных процессов ЛПНП на всех этапах процедуры к образцам добавляли 3 мМ ЭДТА. Выделенные ЛПНП (плотностью 1,025-1,063 г/мл) были диализированы против фосфатно-солевого буфера (pH 7,4) с

добавлением 0,01 мМ ЭДТА после чего образцы стерилизовали путем фильтрации через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Corning, США). Количественное содержание белка в образцах ЛПНП определяли по методу Лоури с использованием фенольного реагента Folin–Ciocalteu (Sigma Aldrich, США) (Lowry O. H. *et al.*, 1951). Препараты ЛПНП хранили в темноте при 4 °C и использовали в течение 10 дней. Для инкубации с клетками использовали ЛПНП в концентрации 100 мкг/мл.

2.3.4 Определение содержания общего холестерина в клетках

ФМА-дифференцированные клетки отмывали от культуральной среды теплым DPBS в трехкратной повторности. Внутриклеточные липиды выделяли путем трёхкратной экстракции смесью гексана и изопропанола (в соотношении 3:2) с инкубацией на каждом этапе в течение 30 минут. Полученные экстракты переносили в 96-луночный планшет и выпаривали без использования нагрева до полного испарения растворителя. Высушенный осадок липидов растворяли в смеси, содержащей 15 мМ NaClO₃ и 0,05% Тритон X-100 (Sigma Aldrich, США), добавляли изопропанол и реагент для определения общего холестерина Fluitest CHOL (Analyticon, Германия). В качестве стандартного раствора использовали раствор 1 мг/мл холестерина в изопропаноле. Инкубировали реакционную смесь с образцами при 37°С в течение 30 мин. Определение оптической плотности образцов проводили при помощи микропланшетного ридера AMR-100T (Allsheng, Китай) при длине волны 492 нм. Содержание общего холестерина в образцах нормировали по отношению к содержанию общего белка в клетках (мг/мкг общего белка). Для этого, после экстракции липидов, осадок клеток лизировали путем добавления 0,2 N NaOH в течение 1 часа при 60°С. Количественное содержание белка в клетках определяли по методу Лоури с использованием фенольного реагента Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, США) (Lowry O. H. et al., 1951). Определение оптической плотности образцов проводили при длине волны 750 нм.

2.3.5 Определение скорости потребления кислорода клетками

Суспензию клеток центрифугировали при 200 g в течение 5 мин при комнатной температуре. Супернатант удаляли, после чего осадок клеток ресуспендировали в среде MiR05 (0,5 мМ ЭГТА, 3 мМ MgCl₂, 60 мМ лактобионата калия, 20 мМ таурина, 10 мМ KH₂PO₄, 20 мМ НЕРЕЅ, 110 мМ сахарозы, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, с pH 7.1) и переносили в пробирки типа «Эппендорф». Образцы клеток помещали на лед и инкубировали в течение 10 мин.

потребления Скорость кислорода определяли клетками полярографическим методом при помощи Oxygraph+ (Hansatech Instruments Ltd, Великобритания) с использованием закрытого Pt-электрода Кларка. Электрод Кларка и термостатируемую измерительную камеру предварительно прибор калибровали устанавливали на согласно инструкциям И производителя.

В термостатируемую измерительную камеру вносили 0,5 мл среды MiR05 и суспензию клеток (5·10⁶). Измерения потребления кислорода клетками проводили при 37°С с постоянным перемешиванием образца. Для дальнейшей оценки биоэнергетического профиля митохондрий в образцы поэтапно добавляли ингибиторы окислительного фосфорилирования. Сначала вносили 1 мкМ олигомицина A (Sigma Aldrich, CША) для блокировки протонного канала (F0) комплекса V ЭТЦ, что предотвращает возврат протонов в митохондриальный матрикс и прекращает синтез АТФ АТФдобавляли FCCP Затем 1 мкМ (карбонилцианид-4синтазой (F1). трифторметоксифенилгидразон), который разобщает окислительное фосфорилирование, перенося протоны через внутреннюю мембрану митохондрий, минуя комплекс V. Наконец, вносили 1 мкМ антимицина А для ингибирования комплекса III, блокируя восстановление убихинона в цитохром-bc1-комплексе и нарушая Q-цикл, что прерывает цепочку переноса электронов. По окончанию анализа измерительную камеру и электрод Кларка промывали 1,5 мл 96% этилового спирта с трехкратной отмывкой бидистиллированной водой.

Скорость потребления кислорода клетками, выраженную в нмоль молекул кислорода/секунду, регистрировали путем анализа полученных полярограмм в пакете программ OxyTrace+ (Hansatech Instruments Ltd, Великобритания). За базальный уровень потребления кислорода принимали потребление кислорода клетками в условиях без добавления ингибиторов.

Оценивались ключевые показатели биоэнергетического профиля митохондрий клеток, включая «Максимальная дыхательная емкость», «Резервная дыхательная емкость», «АТФ-зависимое потребление кислорода», «Утечка протонов», «Немитохондриальное потребление кислорода» и «Индекс биоэнергетического здоровья» (рис. 4) (Chacko B. K. *et al.*, 2014).



Рисунок 4. Схема анализа митохондриального биоэнергетического профиля клеток. Схема подготовлена с использованием пакета программ Adobe Illustrator 2021 (Adobe, Inc., CША).

Немитохондриальное потребление кислорода определяется как объем потребляемого клетками кислорода после введения ингибитора антимицина А. Утечка протонов характеризует процесс повторного перемещения протонов в матрикс митохондрий путем облегчённой диффузии, который сопровождается потреблением кислорода без синтеза АТФ. Уровень утечки протонов рассчитывали по формуле:

Утечка протонов =

Потребление кислорода под действием олигомицина А (1) — Немитохондриальное потребление кислорода

АТФ-зависимое потребление кислорода, или обмен АТФ, отражает объем кислорода, который клетки используют для синтеза АТФ при добавлении олигомицина А, преимущественно связанный с активностью комплекса V. Значение обмена АТФ определялось по следующей формуле:

Обмен АТ
$$\Phi =$$
 (2)

Базальный уровень потребления кислорода – Утечка протонов

Максимальная дыхательная емкость указывает на предельный уровень потребления кислорода митохондриями в условиях наличия разобщающих агентов, таких как FCCP. Этот параметр рассчитывался по формуле:

Максимальная дыхательная емкость =

Потребление кислорода под действием FCCP (3)

- Немитохондриальное потребление кислорода

Резервная дыхательная емкость отражает способность митохондрий к адаптации при увеличении потребности в энергии, являясь показателем биоэнергетического запаса клетки для адаптивного ответа на стрессовые условия. Этот показатель рассчитывали по формуле:

Резервная дыхательная емкость =

77

Максимальная дыхательная емкость

– Базальный уровень потребления кислорода

Для оценки общей митохондриальной эффективности использовали paнee предложенный индекс биоэнергетического здоровья (ИБЗ) (Chacko B. K. *et al.*, 2014), который имеет прогностическое значение, поскольку он может показать прогрессирующее ухудшение биоэнергетического состояния клетки до порога, при котором возникает неспособность удовлетворить потребность в энергии. Данный параметр позволяет проанализировать соотношение положительных аспектов биоэнергетического состояния клеток (резервная емкость и дыхание, связанное с синтезом АТФ) к неблагоприятными показателям (немитохондриальное потребление кислорода и утечка протонов). Формула для расчета ИБЗ представлена ниже:

ИБЗ =

$$\log \frac{\text{Резервная дыхательная емкость } \times \text{Обмен АТ}\Phi}{\text{Немитох. потребление кислорода } \times \text{Утечка протонов}}$$
(5)

2.4. Микроскопия

2.4.1 Оценка жизнеспособности клеток

Суспензию клеток смешивали с 0,4% раствором красителя трипанового синего (BioRad, США) в соотношении 4:1 и затем вносили смесь под покровное стекло камеры Горяева. Подсчет клеток производили на инвертированном световом микроскопе «Микромед И» (Микромед, Россия) в течение 15 мин после окрашивания. Число клеток в 1 мл рассчитывали по формуле:

(4)

Для оценки жизнеспособности проводили подсчет окрашенных клеток в суспензии и рассчитывали процент мертвых клеток по формуле:

Жизнеспособность клеток (%) = (7)
$$(1 - \frac{Число окрашенных клеток}{Общее число клеток}) \times 100\%$$

В качестве альтернативного подхода использовали автоматический счетчик клеток TC20 (BioRad, CША) для количественного определения жизнеспособности клеток (Louis K. S., Siegel A. C., 2011; Strober W., 2015). Для этого суспензию клеток смешивали с 0,4% раствором красителя трипанового синего (BioRad, CША) в соотношении 1:1, вносили смесь в двойные слайды для счетчиков клеток (BioRad, CША) и анализировали образцы с помощью прибора. Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения TC20 Data Analyzer (BioRad, CША).

2.4.2 Оценка колокализации митохондрий и лизосом при помощи конфокальной микроскопии

Для оценки митофагии в клетках методом конфокальной микроскопии, в пробирки «Эппендорф» вносили $1 \cdot 10^6$ клеток в объёме 2 мл полной среды RPMI-1640 с добавлением L-глутамина, 10% ЭТС и антибиотиков. Образцы инкубировали с 100 нМ флуоресцентного красителя MitoTracker Green (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 минут. Далее клетки центрифугировали при 200 g в течение 5 минут, отбирали супернатант, после чего осадок ресуспендировали в свежей полной среде RPMI-1640. Осадок клеток ресуспендировали и переносили в 6-луночный планшет. Клетки переносили в 6-луночные планшеты и добавляли 5 мкМ FCCP для индуцирования митофагии, после чего инкубировали при 37°C в CO₂инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в течение 6 часов. Затем добавляли 50 нМ флуоресцентного красителя LysoTracker Deep Red (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали в аналогичных условиях в течение 30 минут. Далее клетки отбирали в пробирки типа «Эппендорф» и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. Супернатант удаляли и к осадку клеток добавляли 2 мл свежей среды RPMI-1640 с L-глутамином, 10% ЭТС и антибиотиками. Осадок клеток ресуспендировали и переносили в чашки для конфокальной микроскопии.

Изображения клеток снимали с использованием конфокального микроскопа Leica STELLARIS 5 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного объективом HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL. Лазер с длиной волны 488 нм использовался для возбуждения MitoTracker Green, при этом флуоресценцию регистрировали в интервале 487–560 нм; лазер с длиной волны 638 нм возбуждал LysoTracker Deep Red, флуоресценцию которого фиксировали в диапазоне 643–798 нм.

Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения CellProfiler (Broad Institute of MIT and Harvard, США). Уровень митофагии определяли как отношение числа поглощенных лизосомами митохондрий к общему количеству митохондрий.

2.5. Проточная цитофлуориметрия

2.5.1 Оценка уровня АФК, продуцируемых клетками, и перекисного окисления липидов

Для анализа с помощью проточной цитофлуориметрии отбирали по $4 \cdot 10^6$ клеток в объёме 4 мл среды RPMI-1640 с L-глутамином, 10% ЭТС и антибиотиками в пробирки типа «Эппендорф». Затем центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок клеток в 2 мл теплого DPBS для удаления остаточных компонентов клеточной среды. Далее повторяли центрифугирование при 200 g в течение 5 мин. Процедуру повторяли трижды для окончательной очистки клеточного осадка.

Затем клетки ресуспендировали в 2 мл теплого DPBS и разделяли суспензию по 1 мл на две пробирки типа «Эппендорф». Далее к одному образцу клеток добавляли 5 мкМ 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H₂DCFDA) (Люмипроб, Россия), флуоресцентного зонда, предназначенного для изучения генерации АФК (пероксид водорода H₂O₂, пероксинитрит) в живых клетках (Lyublinskaya O. G. et al., 2017). К другому образцу клеток добавляли 5 мкМ Россия), MitoCLox (Люмипроб, флуоресцентного зонда, который специфически связывается с митохондриальным фосфолипидом кардиолипином, являющимся высоко чувствительным к перекисному окислению (Lyamzaev K. G. et al., 2019).

Образцы клеток инкубировали в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе при 37°C в условиях атмосферы 5% CO₂. После инкубации суспензию клеток центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Далее удаляли супернатант, ресуспендировали осадок клеток каждого образца в 1 мл теплого DPBS с целью отмывки от флуоресцентных красителей, и переносили по 300 мкл каждого образца в лунки 96-луночного планшета с плоским дном.

Анализ интенсивности флуоресценции клеток проводили при помощи проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, CША), оснащенного 2 лазерами возбуждения с длинами волн 488 нм и 638 нм, а также детекторами флуоресценции, включая 525/40 (FITC), 585/42 (PE), 610/20 (ECD), 660/10 (APC), 690/50 (PC5.5), 712/25 (APC-A700), 780/60 (PC7, APC-A750) нм. Флуоресцентные красители H₂DCFDA и MitoCLox возбуждали лазером при длине волны 488 нм. Интенсивность флуоресценции детектировали в каналах 525/40 и 585/42 нм. Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения CytExpert 2.4 (Beckman Coulter, CША).

2.5.2 Анализ мембранного потенциала митохондрий

Для анализа с помощью проточной цитофлуориметрии отбирали по 2·10⁶ клеток в объёме 2 мл среды RPMI-1640 с L-глутамином, 10% ЭТС и

антибиотиками в пробирки типа «Эппендорф». Затем центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок клеток в 2 мл теплого DPBS для удаления остаточных компонентов клеточной среды. Далее повторяли центрифугирование при 200 g в течение 5 мин. Процедуру повторяли трижды для окончательной очистки клеточного осадка. Затем клетки ресуспендировали в 1 мл теплого DPBS и добавляли 1 мкМ MitoTracker Orange **CMTMRos** (Thermo Fisher Scientific, США), флуоресцентного зонда, который избирательно накапливается в митохондриях живых клеток в зависимости от уровня мембранного потенциала (Chazotte B., 2011). Далее образцы клеток инкубировали в течение 30 мин в СО₂-инкубаторе при 37°С в условиях атмосферы 5% СО₂. После инкубации суспензию клеток центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, удаляли супернатант. Ресуспендировали осадок клеток в 1 мл теплого DPBS с целью отмывки от флуоресцентного красителя, и переносили по 300 мкл каждого образца в лунки 96-луночного планшета с плоским дном.

Анализ интенсивности флуоресценции клеток проводили при помощи проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, CША). Флуоресцентный краситель MitoTracker Orange CMTMRos возбуждали лазером при длине волны 488 нм. Интенсивность флуоресценции детектировали в канале 585/42 нм. Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения CytExpert 2.4 (Beckman Coulter, CША).

2.6. Статистическая обработка данных

Bce эксперименты проводились трехкратной повторности. В Результаты цифровой капельной ПЦР анализировали при помощи программного обеспечения QuantaSoft Analysis Pro (BioRad, США). Данные количественной ПЦР анализировали в программном обеспечении CFX Maestro (BioRad, CША). Для анализа полярограмм скорости потребления кислорода клетками использовали программное обеспечение OxyTrace+

Ltd, Великобритания). (Hansatech Instruments Для анализа данных конфокальной микроскопии использовали программное обеспечение CellProfiler (Broad Institute of MIT and Harvard, США). Для анализа результатов проточной цитофлуориметрии использовали обеспечение программное CytExpert 2.4 (Beckman Coulter, CIIIA).

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, непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни. применяли 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., CША) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., CША).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A в гене *МТ-СҮВ*, при помощи PHK-комплекса MitoCas9 в клетках линии цитоплазматических гибридов TC-HSMAM1

С целью снижения гетероплазмии мутации m.15059G>A (*MT-CYB*) было проведено удаление мутантной мтДНК в цибридных клетках линии ТС-HSMAM1 с помощью PHK-комплекса, наработанного с вектора MitoCas9, созданного ранее (Sukhorukov V. N. et al., 2020; Sukhorukov V. N. et al., 2022). Для повышения стабильности, эффективности и точности разрезания в области мутации m.15059G>A в двуцепочечной мтДНК, в настоящей работе была выбрана стратегия использования вектора MitoCas9 в виде РНКкомплекса, состоящего из мРНК нуклеазы Cas9 и гидовых РНК, в соответствии с ранее предложенным подходом (Hussain S. R. A. et al., 2021). В качестве системы доставки РНК-комплекса MitoCas9 к клеткам использовали маннозил-содержащие катионные липосомы M6 (Марков О. В. et al., 2017; Михеев А. А. et al., 2020). Целевой участок вектора MitoCas9 состоит из последовательности мутантной эндонуклеазы Sniper-Cas9, которая отличается сниженной off-target активностью. Кроме того, в данную последовательность эндонуклеазы были внесены дополнительные мутации в N-домен, взятые из термостабильных бактерий, последовательности эндонуклеаз стабилизирующие эффективность ее работы в условиях повышенных температур (Kleinstiver B. P. et al., 2016; Lee J. K. et al., 2018). Для обеспечения проникновения комплекса непосредственно В митохондрии, была использована классическая последовательность сигнала митохондриальной локализации (MTS) из белка COX8A (Cytochrome C Oxidase Subunit 8A), участвующего в комплексе митохондриальной дыхательной цепи (рис. 5). Также целевой участок вектора MitoCas9 после MTS-сайта содержит последовательность Streptavidin-SpyTag, представляющий собой систему захвата биотинилированных нуклеотидных последовательностей, за счет кофакторного сценария стрептавидин-биотин. Streptavidin-SpyTag позволяет осуществить единовременную доставку в митохондрии как нуклеазы Cas9, так и гидовых РНК при условии биотинилирования последних (Fairhead M. *et al.*, 2014; Gu B. *et al.*, 2018).



Kozak sequence

Рисунок 5. Схема целевого участка вектора MitoCas9, в котором закодирована последовательность нуклеазы Sniper-Cas9 со структурными и регуляторными элементами. Т7 – последовательность Т7 промотора. Sniper-Cas9 – последовательность, кодирующая Cas9 нуклеазу. МТS – 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., CШA).

В настоящей работе было успешно проведено удаление мтДНК с мутацией m.15059G>A в гене *MT-CYB* при помощи PHK-комплекса MitoCas9 в культуре цибридов TC-HSMAM1. Эффективность трансфекции и удаления мутантной мтДНК в области гена *MT-CYB* оценивали при помощи T7EIанализа, который позволяет определить наличие гетеродуплекса, формирующегося после разрезания последовательности ДНК эндонуклеазой Cas9 в сайте целевого гена, и цкПЦР с праймерами, специфически подобранными к мутантной и нативной мтДНК.

Для подтверждения разрезания мтДНК в участке гена *МТ-СҮВ* был проведен гель-электрофорез T7EI-обработанных ПЦР-продуктов, амплифицированных с мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A. В связи с тем, что в процессе CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования двуцепочечной молекулы ДНК в сайте разрезания нуклеазой Cas9 в результате работы внутриклеточных систем репарации ДНК формируются гетеродуплексы, был применен T7EI-анализ (Ломов Н. А. *et al.*, 2019). Гетеродуплексы являются чувствительными к расщеплению T7 эндонуклеазой I, особенностью которой является разрезание участков, несущих несовпадения, такие как шпильки или вставки, в последовательности ДНК. В результате визуализации в агарозном геле. В образцах, где произошло расщепление гетеродуплексов T7 эндонуклеазой I, обнаруживается множество полос различной размерности. Таким образом, T7EI-анализ позволил нам выявить наличие гетеродуплексов в шести образцах ПЦР-продуктов, амплифицированных с мтДНК цибридов TC-HSMAM1, трансфецированных MitoCas9. В свою очередь, в образцах с ПЦР-продуктами, амплифицированными с мтДНК из контрольных цибридов TC-HSMAM1, не наблюдалось расщепления T7 эндонуклеазой I, о чем свидетельствует наличие единственной полосы в агарозном геле. Это подтверждает отсутствие гетеродуплексов в мутантной мтДНК, которая не подвергалась воздействию РНК-комплекса MitoCas9. Полученный результат подтверждает способность разработанного ранее PHK-комплекса MitoCas9 расщеплять двухцепочечную мтДНК в целевом сайте.

Таким образом, было подтверждено разрезание мтДНК в сайте мутации m.15059G>A при помощи гель-электрофореза ПЦР-продуктов, амплифицированных с мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, и обработанных T7 эндонуклеазой I (рис. 6).

Далее с помощью цкПЦР была проведена проверка снижения мутационного фона в мтДНК в клетках цибридной линии, трансфецированных РНК-комплексом MitoCas9. Выявлено снижение уровня гетероплазмии мутации m.15059G>A в клетках TC-HSMAM1, трансфецированных PHK-комплексом MitoCas9, до $12,81\pm3,24\%$ (p<0,05) с исходного уровня в 79,29±11,58%, по сравнению с контрольными клетками, которые не подвергались трансфекции (рис. 7, таб. 4).

Также было оценено снижение мутационного фона в мтДНК в клетках цибридной линии, трансфецированных 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±3,92% и 25,31±9,35% на 7 и 14 сутки, соответственно, после

трансфекции клеток по сравнению с контрольными клетками, не подвергавшимися трансфекции (рис. 7, таб. 4). Одновременно с этим наблюдалось значительное снижение жизнеспособности клеток на 1 сутки после трансфекции РНК-комплексом MitoCas9 до $64\pm4\%$ по сравнению с контрольными клетками, которая к 7 суткам восстанавливалась до значений $93\pm3\%$ (рис. 8). На 14 день уровень жизнеспособности трансфецированных клеток составлял $96\pm4\%$. Кроме того, трансфекция цибридов РНК-комплексом MitoCas9 не приводила к значительным морфологическим изменениям клеток (рис. 9-10).

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.*, 2022).



Рисунок 6. Результат гель-электрофореза ПЦР-продуктов, обработанных T7 эндонуклеазой I, амплифицированных из мтДНК с мутацией m.15059G>A. (+) – ПЦР-продукты, амплифицированные из мтДНК с мутацией m.15059G>A, где обнаружено расщепление. (–) – ПЦР-продукты, амплифицированные из мтДНК дикого типа, где расщепления не обнаружено.



Рисунок 7. 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 PHK-комплексом MitoCas9. TC-HSMAM1 контроль – относительное число ДНК-матриц с мутацией m.15059G>A в области гена *MT-CYB* в цибридных клетках до трансфекции PHK-комплексом MitoCas9. TC-HSMAM1 + MitoCas9 – относительное число ДНК-матриц с мутацией m.15059G>A в области гена *MT-CYB* в цибридных клетках до трансфекции PHK-комплексом MitoCas9. TC-HSMAM1 + MitoCas9 – относительное число ДНК-матриц с мутацией m.15059G>A в области гена *MT-CYB* в цибридных клетках после трансфекции PHK-комплексом MitoCas9. * *p*<0,05 при сравнении относительного уровня мутантной мтДНК с контрольным образцом. *U*-критерий Манна–Уитни.

Таблица 6. Уровень мутационной нагрузки (гетероплазмии) мутации m.15059G>A в митохондриальном гене *МТ-СҮВ* в клетках TC-HSMAM1 до и после трансфекции PHK-комплексом MitoCas9.

Время (сутки) после трансфекции РНК-	Гетероплазмия мутации m.15059G>A в гене	
комплексом MitoCas9	МТ-СҮВ	
Контроль (до трансфекции)	79,29±11,58%	
1 сутки	12,81±3,24%	
7 сутки	26,86±3,92%	
14 сутки	25,31±9,35%	



Рисунок 8. Оценка жизнеспособности клеток линии TC-HSMAM1 после удаления мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, с помощью PHK-комплекса MitoCas9



Рисунок 9. Микрофотография клеток линии цитоплазматических гибридов TC-HSMAM1.

30 µm

Рисунок 10. Микрофотография клеток Cas9-TC-HSMAM1.

3.2. 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

Оценку митохондриальной функции в моноцитоподобных цибридных клетках проводили путем анализа уровня митохондриального мембранного потенциала, продукции АФК и образования продуктов перекисного окисления липидов митохондриальной мембраны с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием специфичных флуоресцентных красителей.

Анализ уровня митохондриального мембранного потенциала проводили с использованием MitoTracker Orange CMTMRos. Было выявлено, что удаление мутантной мтДНК в цибридных клетках приводит к значительному увеличению уровня митохондриального мембранного потенциала на 40,21% (*p*<0,001) по сравнению с контрольными клетками (рис. 11).

Внутриклеточную продукцию ΑФК оценивали с помощью специфического флуорохрома H₂DCFDA, который позволяет обнаруживать промежуточные продукты активного кислорода в нейтрофилах и макрофагах (Feng R. et al., 2018; Nadesalingam A. et al., 2018). Оценку перекисного окисления липидов проводили с использованием флуорохрома MitoCLox, который позволяет детектировать перекисное окисление кардиолипина во внутренней мембране митохондрий. Обнаружено незначительное, но статистически значимое снижение уровней АФК в цибридных клетках Cas9-TC-HSMAM1 на 11,63% (p<0,01) по сравнению с контрольными клетками TC-HSMAM1 (рис. 12). Кроме того, было выявлено статистически значимое снижение уровня перекисного окисления липидов митохондриальных мембран в клетках Cas9-TC-HSMAM1 на 10,14% (p<0,05) по сравнению с контрольными клетками TC-HSMAM1 (рис. 13).

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

91



Рисунок 11. Анализ изменения уровня митохондриального мембранного потенциала цибридных клеток TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, *** *p*<0,001. *t*-критерий Стьюдента.



Рисунок 12. Анализ изменения уровня АФК в цибридных клетках TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ** *p*<0,01. *t*-критерий Стьюдента.



Рисунок 13. Анализ изменения уровня окисленного митохондриального кардиолипина в цибридных клетках TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, *** *p*<0,001. *t*-критерий Стьюдента.

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

С целью выяснения связи мутации m.15059G>A в гене MT-CYB с митохондриальной возникновением дисфункции в моноцитоподобных цибридных клетках был проведен анализ митохондриального биоэнергетического профиля клеток цибридных линий TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Биоэнергетическую функцию клеток линий цибридов оценивали по скорости потребления кислорода в условиях добавления ингибиторов окислительного фосфорилирования при помоши полярографического Путем последовательного лобавления метода. ингибиторов окислительного фосфорилирования, таких как олигомицин А, FCCP и антимицин А, был оценен митохондриальный биоэнергетический профиль исследуемых клеток. На основе полученных данных был рассчитан индекс биоэнергетического здоровья, который может служить динамическим биоэнергетического здоровья показателем моноцитов, также а характеризовать общую митохондриальную эффективность клеток.

93



Рисунок 14. Оценка скорости потребления кислорода цибридными клетками TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 в зависимости от добавления модуляторов окислительного фосфорилирования. Mean ± SD, n = 5.

Было показано, что скорость потребления кислорода всех исследуемых линий имеет сходный профиль (рис. 14). В ходе анализа полученных данных было выявлено, что в клетках с удаленной мутантной мтДНК базальный уровень потребления кислорода статистически значимо от цибридов TC-HSMAM1 не отличался (рис. 15, таб. 7). Однако, в условиях добавления к клеткам олигомицина A и антимицина A, у цибридов Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается снижение скорость 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% (p<0,001) и 30,26% (p<0,05), соответственно, по сравнению с цибридами TC-HSMAM1 (рис. 15).

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. 15, таб. 7). Тем не менее, наблюдается снижение максимальной дыхательной емкости в клетках Cas9-TC-HSMAM1 по сравнению с цибридами TC-HSMAM1 на 19,21% (*p*<0,05).

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% (*p*<0,01) по сравнению с неотредактированными клетками (рис. 16, таб. 7).

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).



Рисунок 15. Оценка параметров биоэнергетического профиля цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, * *p*<0,05, *** *p*<0,001. *t*-критерий Стьюдента.



Рисунок 16. Оценка общей митохондриальной эффективности цибридных клеток TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ** *p*<0,01. *t*-критерий Стьюдента.

Таблица 7. Результаты анализа митохондриального биоэнергетического профиля цибридных клеток TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

Параметры	Клеточная линия		<i>p</i> -value, <i>t</i> -
биоэнергетического	TC-HSMAM1	Cas9-TC-HSMAM1	критерий
профиля, mean \pm SD		Casy-TC-HSIMAMI	Стьюдента
Базальный уровень			
потребления	668 37 + 59 75	$608,33 \pm 51,56$	<i>p</i> >0,05 (ns)
кислорода,	$000,57 \pm 59,75$		
пмоль/сек/10 ⁶ клеток			
Немитохондриальное			
потребление	267 87 + 33 73	$140,93 \pm 29,39$	<i>p</i> <0,001
кислорода,	$207,07 \pm 33,73$		
пмоль/сек/10 ⁶ клеток			
Утечка протонов,	247.01 ± 32.61	172.27 ± 35.70	n < 0.05
пмоль/сек/10 ⁶ клеток	$247,01 \pm 32,01$	172,27 ± 55,70	<i>p</i> <0,03
АТФ-зависимое			
потребление	137 33 + 56 78	136.07 ± 36.21	<i>p</i> >0,05 (ns)
кислорода,	$-37,35\pm 50,78$	450,07 ± 50,21	
пмоль/сек/10 ⁶ клеток			
Максимальная			
дыхательная емкость,	$1759,87 \pm 259,77$	$1421,\!87\pm26,\!95$	<i>p</i> <0,05
пмоль/сек/10 ⁶ клеток			
Резервная			
дыхательная емкость,	$1091,50 \pm 293,49$	$813,53 \pm 24,79$	<i>p</i> >0,05 (ns)
пмоль/сек/10 ⁶ клеток			
ИБЗ, усл. ед.	0,88±0,13	1,13±0,24	<i>p</i> <0,01

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

Для оценки митофагии, как проявления нормальной функции митохондрий, в клеточных линиях цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 использовали конфокальную микроскопию для анализа колокализации митохондрий и лизосом в присутствии флуоресцентных красителей. Была PINK/Parkin-опосредованная митофагия, оценена индуцированная в клетках путем деполяризации митохондриальных мембран с помощью FCCP, по сравнению с базальным уровнем митофагии в нестимулированных клетках. В качестве контрольной клеточной линии с

нормальной активацией митофагии была использована моноцитоподобная клеточная линия THP-1.

Согласно полученным данным, в клеточной линии TC-HSMAM1 уровень FCCP-индуцированной митофагии не отличался от базального уровня (рис. 17). Таким образом, было показано, что в данной клеточной линии наблюдается нарушение активации митофагии, то есть проявление дефектной митофагии.

В то же время, в контрольной клеточной линии THP-1 в условиях добавления FCCP наблюдается увеличение уровня митофагии в 1,39 раз (p<0,001). В клетках линии цибридов Cas9-TC-HSMAM1, инкубированных с FCCP, также наблюдается увеличение митофагии в 1,38 раз (p<0,001) 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. 18–20).

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 17. Оценка уровня митофагии в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), * *p*<0,05, *** *p*<0,001. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.



Рисунок 18. Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии, для оценки активности митофагии клеток линии THP-1 до и после добавления FCCP. Митохондрии были окрашены с использованием MitoTracker Green (зеленая флуоресценция), лизосомы были окрашены с

использованием LysoTracker Deep Red (красная флуоресценция). Совмещение каналов показывает колокализацию лизосом и митохондрий. Митохондрии, поглощенные лизосомами, показаны желтым. Увеличение



Рисунок 19. Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии, для оценки активности митофагии клеток линии TC-HSMAM1 до и после добавления FCCP. Митохондрии были окрашены с использованием MitoTracker Green (зеленая флуоресценция), лизосомы были окрашены с использованием LysoTracker Deep Red (красная флуоресценция). Совмещение каналов показывает колокализацию лизосом и митохондрий. Митохондрии, поглощенные лизосомами, показаны желтым. Увеличение

63x.



Рисунок 20. Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии, для оценки активности митофагии клеток линии Cas9-TC-HSMAM1 до и после добавления FCCP. Митохондрии были окрашены с использованием MitoTracker Green (зеленая флуоресценция), лизосомы были окрашены с использованием LysoTracker Deep Red (красная флуоресценция). Совмещение каналов показывает колокализацию лизосом и митохондрий. Митохондрии, поглощенные лизосомами, показаны желтым. Увеличение

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

активации Подтверждение митофагии, индуцированной путем деполяризации митохондриальных мембран с помощью FCCP, в клетках цибридных линий производилось путем оценки экспрессии генов, кодирующих PTEN-индуцированную киназу 1 (*PINK1*), ЕЗ убиквитин-лигазу паркин (PRKN) и ассоциированные с микротрубочками белки 1A/1B легкой цепи 3В (*MAP1LC3B*). Уровни экспрессии генов в цибридных клетках рассчитывались относительно экспрессии генов в контрольных клетках линии THP-1.

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 линий TC-HSMAM1 в 1,83 (p<0,05) раза по сравнению с контрольными клетками THP-1 (рис. 21). Кроме того, экспрессия гена *PRKN* в клетках линии Cas9-TC-HSMAM1 увеличивается в 1,75 раз (p<0,05) по сравнению с контрольными клетками, несущими мутацию m.15059G>A, до уровня, сходного с контрольными клетками (рис. 21).

Индукция митофагии путем инкубации клеток с FCCP приводит к увеличению экспрессии всех исследуемых генов в контрольных клетках линии THP-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 (p<0,001), *PRKN* в 1,43 раза (p<0,05) и *MAP1LC3B* в 6,65 раз (p<0,001) по сравнению с базальной экспрессией (рис. 21). Кроме того, установлено, что при индукции митофагии с помощью FCCP уровень экспрессии гена *MAP1LC3B* в клетках линии THP-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 (*p*<0,01) и 1,34 (*p*<0,01) раз соответственно, по сравнению с контрольными клетками THP-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. 21). Однако экспрессия данного гена в клетках TC-HSMAM1 значительно снижена по сравнению как с клетками линии THP-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 21. Оценка экспрессии генов, опосредующих активацию FCCPиндуцированной митофагии, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), * *p*<0,05, ** *p*<0,01, *** *p*<0,001. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

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

Изменение провоспалительного ответа цибридов с удаленной мутантной мтДНК оценивали по секреции цитокинов клетками в ответ на стимуляцию бактериальным ЛПС при помощи иммуноферментного анализа.

По сравнению с контрольной линией THP-1, в цибридных клетках TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 происходит увеличение базальной секреции ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1 (CCL2) (рис. 22). Однако было обнаружено, что базовая секреция ΦНОα клетками Cas9-TC-HSMAM1 статистически значимо от контроля не отличается, тогда как секреция данного цитокина цибридами TC-HSMAM1 значительно усиливается (рис. 22).

Стимуляции провоспалительного фенотипа клеток с помощью ЛПС приводит к значительному увеличению секреции всех цитокинов всеми исследуемыми клеточными линиями (таб. 8, рис. 22). Было выявлено, что секреция ИЛ-8 и МСР-1 в обеих цибридных линиях не имеет статистически значимых отличий от контрольных клеток THP-1. Кроме того, секреция ИЛ-1β и ФНОα цибридами TC-HSMAM1 статистически значимо снижена по сравнению с клетками контрольной линии THP-1 (рис. 22). 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 (рис. 22).

Таким образом, были выявлены сходства между клетками линий TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1, заключавшиеся в базальном уровне секреции ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP-1 (CCL2) (рис. 22). Тем не менее, было выявлено снижение базальной секреции ФНОα 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-1β и ФНОα клетками Cas9-TC-HSMAM1 до уровня, сходного с контрольной клеточной линией THP-1 (рис. 22). 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 (рис. 22).

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 ФНОα.



Рисунок 22. Концентрация про-воспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, МСР1) в клеточной среде при стимуляции ЛПС клеток линий ТНР-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 непараметрического критерия Краскела-Уоллиса для множественных сравнений в сочетании с поправкой Бонферрони. Таким образом, можно сделать вывод, что мутация m.15059G>A вероятно связана с изменением провоспалительного ответа клеток за счет изменения уровня секреции ΦΗΟα и ИЛ-1β (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A. *et al.*, 2023а).

Клеточная линия	Цитокин	Концентрация цитокинов, медиана (25-й процентиль; 75-й процентиль), пг/мл	
		Базальная секреция	Секреция,
			стимулированная ЛПС
THP-1	ИЛ-1β	1,00	122,00
		(0,01; 1,00)	(118,00; 135,00)
	ΦΗΟα	3,00	159,00
		(1,00; 19,00)	(131,25; 170,25)
	ИЛ-6	27,00	116,00
		(8,00; 27,00)	(109,00; 135,75)
	ИЛ-8	8,00	12913,00
		(7,00; 18,75)	(10528,00; 16057,00)
	MCP-1	49,00	10469,00
	(CCL2)	(25,00; 67,00)	(9454,00; 16069,50)
TC-HSMAM1	ИЛ-1β	4,00	49,50
		(3,00; 7,00)	(43,00; 61,25)
	ΦΗΟα	30,00	100,00
		(25,00; 35,00)	(98,00; 109,50)
	ИЛ-6	31,00	248,50
		(30,00; 33,00)	(165,25; 258,25)
	ИЛ-8	901,50	10434,00
		(675,00; 1102,50)	(7870,00; 10777,00)
	MCP-1	2467,00	8616,00
	(CCL2)	(1669,00; 2595,25)	(7694,00; 11708,00)
Cas9-TC-	ИЛ-1β	5,00	95,00
HSMAM1		(2,00; 7,00)	(77,00; 100,00)
	ΦΗΟα	13,00	139,50
		(11,00; 14,00)	(115,50; 151,50)
	ИЛ-6	41,50	467,50
		(34,25; 46,50)	(437,75; 577,50)
	ИЛ-8	1292,00	17287,00
		(728,50; 1651,50)	(15523,25; 19008,00)
	MCP-1	4562,00	14092,50
	(CCL2)	(2312,00; 5201,00)	(9928,50; 14696,25)

Таблица 8. Выработка провоспалительных цитокинов клетками линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1

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

Способность клеток контрольной линии THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 формировать эндотокисновую толерантность в ответ на провоспалительную стимуляцию бактериальным ЛПС была оценена методом иммуноферментного анализа. Секрецию провоспалительного цитокина ФНОа определяли после первичной и повторной стимуляции клеток с помощью ЛПС.

В контрольных клетках линии THP-1 в ответ на первичную стимуляцию с помощью ЛПС наблюдается статистически значимое увеличение секреции ФНОα по сравнению с условиями без стимуляции (рис. 23). 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 (*p*<0.001). Таким образом, в клетках THP-1 наблюдается проявление эндотоксиновой толерантности.

В свою очередь, в клетках TC-HSMAM1 наблюдается повышенная секреция ΦΗΟα 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 цибридах, несущих мутацию m.15059G>A, не происходит формирования эндотокисновой толерантности при воздействии на них ЛПС.

В цибридах с удаленной мутантной мтДНК обнаруживается снижение секреции ФНО α по сравнению как с клетками THP-1, так и с цибридами TC-HSMAM1 после первичной стимуляции ЛПС до значений 34,00 ± 12,49 пг/мл. Тем не менее, при повторной стимуляции клеток Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается снижение секреции ФНО α в 6,81 раз (*p*<0.001) по сравнению с уровнем секреции данного цитокина после первой стимуляции.

107

Соответственно, наблюдается восстановление эндотоксиновой толерантности у цибридов 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.*, 2023а; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2024).



Рисунок 23. Концентрация ΦΗΟα в клеточной среде в условиях двойной провоспалительной стимуляции с помощью ЛПС клеток линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), * *p*<0,05, ** *p*<0,01, *** *p*<0,001. *t*-критерий Стьюдента.

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

Активация сборки NLRP3-инфламмасомы в ФМАдифференцированных макрофагальных клетках, стимулированных бактериальным ЛПС, оценивалась по экспрессии генов, кодирующих криопирин (*NLRP3*), который является основным компонентом инфламмасом типа NLRP3, каспазу 1 (*CASP1*) и интерлейкин 1β (*IL1B*). Уровни экспрессии
генов в цибридных клетках рассчитывались относительно экспрессии генов в контрольных клетках линии THP-1.

Выявлено, что уровень базальной экспрессии генов *NLRP3* и *IL1B* в клетках цибридной линии TC-HSMAM1 статистически значимо увеличен по сравнению с контрольными клетками THP-1 — в 1,66 (p<0,05) и 192,88 (p<0,001) раз, соответственно (рис. 24). В то же время, экспрессия гена *CASP1* статистически значимо от контрольных клеток не отличается.

В цибридах после удаления мутации m.15059G>A обнаружено снижение базальной экспрессии гена *CASP1* (*p*<0,001), а также увеличение экспрессии *IL1B* в 136,70 (*p*<0,001) раз по сравнению с контрольными клетками (рис. 24). 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 (p<0,01) 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 (*p*<0,05) 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

109

NLRP3 инфламмасомы 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 24. Анализ экспрессии генов, ассоциированных с формированием NLRP3-инфламмасомы (*CASP1*, *IL1B*, *NLRP3*), в условиях инкубации с ЛПС ФМА-дифференцированных клеток линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± 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). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

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

Для анализа накопления холестерина, макрофаги, дифференцированные из клеток THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 инкубировали с атерогенными ЛПНП с последующей оценкой внутриклеточного содержания общего холестерина (рис. 25, таб. 9).

Обнаружено, что исходное содержание общего холестерина во всех исследуемых линиях клеток статистически значимо не отличалось. С другой стороны, в клетках контрольной линии THP-1, инкубированных с ЛПНП атеросклеротических больных, содержание холестерина возрастало в 1,15 раз (p<0,01), 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 (p<0,001) и 1,26 раз (p<0,001) соответственно по сравнению с клетками, не инкубированными с ЛПНП.

Тем не менее, значения содержания общего холестерина в обеих цибридных 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 цибридных линиях (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023a; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2024; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022).

Клеточная линия и инкубация с ЛПНП	Содержание холестерина на клетку (мкг/мг общего белка),	<i>p</i> (one-way ANOVA) vs THP-1		
	mean \pm SD			
THP-1	$36,81 \pm 5,53$	—		
ТНР-1 + ЛПНП	$42,22 \pm 5,11$	** (p<0,01)		
TC-HSMAM1	$38,84 \pm 6,28$	ns (p>0,05)		
TC-HSMAM1 + ЛПНП	$50,38 \pm 6,23$	*** (p<0,001)		
Cas9-TC-HSMAM1	$41,94 \pm 6,12$	ns (p>0,05)		
Cas9-TC-HSMAM1 + ЛПНП	$52,72 \pm 7,81$	*** (p<0,001)		

Таблица 9. Сводные данные по содержанию холестерина в клетках, дифференцированных в макрофаги



Рисунок 25. Анализ содержания холестерина клетками линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и цибридов Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), ** *p*<0,01, *** *p*<0,001. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

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

Оценку регуляции внутриклеточного липидного обмена проводили по уровню экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты липидного метаболизма: митохондриальную ацетил-КоА-ацетилтрансферазу 1 (ACAT1), катализирующую образование ацетоацетил-КоА; лизосомальную липазу (LIPA), участвующую в гидролизе эфиров холестерина и триглицеридов в лизосомах; синтазу жирных кислот (FASN), катализирующую синтез насыщенных жирных кислот; гидролазу эфира холестерина 1 (CES1), также известную как карбоксилэстераза 1, и нейтральную гидролазу сложных эфиров холестерина 1 (NCEH1), ответственных за гидролиз эфиров холестерина. Уровни экспрессии генов в цибридных клетках рассчитывались относительно их уровней в контрольных клетках линии THP-1 (рис. 26).

Анализ экспрессии выявил снижение базальных уровней всех изучаемых генов в клетках линии TC-HSMAM1 по сравнению с контрольной линией THP-1. 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 (p<0,05).

В результате инкубации контрольных клеток THP-1 с атерогенными ЛПНП наблюдалось значительное повышение экспрессии генов ACAT1, LIPA, CES1 (p<0,001) и NCEH1 (p<0,05), а также снижение экспрессии FASN (p<0,001) по сравнению с базальными уровнями. В цибридах TC-HSMAM1 инкубация с ЛПНП приводила к увеличению экспрессии ACAT1 (p<0,001) и FASN (p<0,05), 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* (*p*<0,05) и *ACAT1* (*p*<0,001), и снижением экспрессии *FASN* (*p*<0,05) по сравнению с базальными уровнями, тогда как экспрессия *NCEH1* и *CES1* оставалась неизменной.

Комплексная экспрессии генов, оценка кодирующих ключевые ферменты липидного метаболизма, в клетках цибридных 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. 26). 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 цибридах, 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 26. Анализ экспрессии генов, регулирующих липидный метаболизм (ACAT1, FASN, LIPA, CES1 и NCEH1), в условиях инкубации с ЛПНП клеток линий THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), * *p*<0,05, *** *p*<0,001, # *p*<0,05 и ### *p*<0,001 (относительно THP-1). Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

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

Регуляция апоптоза в клетках цибридных линий оценивалась по экспрессии таких генов, кодирующих Bcl-2 ассоциированный X белок (*BAX*), регулятор апоптоза Bcl-2 (*BCL2*), каспазу 3 (*CASP3*), каспазу 9 (*CASP9*) и фактор активации апоптотической протеазы 1 (*APAF1*). Уровни экспрессии генов в цибридных клетках рассчитывались относительно экспрессии генов в контрольных клетках линии THP-1.

Наблюдается статистически значимое увеличение экспрессии генов BCL2, CASP3 и APAF1 в клетках цибридной линий TC-HSMAM1 в 1,62 (p<0,05), 2,72 (p<0,001) и 2,12 (p<0,001) раз соответственно по сравнению с контрольными клетками THP-1 (рис. 27). Кроме того, в клетках линии TC-HSMAM1 наблюдается снижение экспрессии BAX (p<0,01) и CASP9 (p<0,001) 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 (p<0,01) и 4,08 (p<0,001) раз соответственно, а также снижение экспрессии *CASP3* в 1,34 (p<0,01) раза по сравнению с неотредактированными клетками. В ходе анализа экспрессии генов *BCL2* и *APAF1* не выявлено статистически значимых различий между двумя линиями цибридных клеток (рис. 27). 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 (p<0,001) (рис. 28). В клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается тенденция к повышению соотношения *BAX/BCL2* относительно TC-HSMAM1 (p<0,05), однако значение данного показателя остается ниже уровня, выявленного в контрольных клетках, в 1,94 раза (p<0,001).



Рисунок 27. Оценка экспрессии генов, ассоциированных с апоптозом, в клетках линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), * *p*<0,05, ** *p*<0,01, *** *p*<0,001. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.



Рисунок 28. Соотношение уровней экспрессий генов *BAX/BCL2* клеток линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, * *p*<0,05, *** *p*<0,001. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

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).

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

Регуляцию процессов пролиферации цибридных клеток оценивали по экспрессии гена, кодирующего ядерный антиген пролиферирующих клеток (*PCNA*). Для оценки регуляции клеточного цикла анализировали экспрессию генов, кодирующих циклин B1 (*CCNB1*) и циклин D1 (*CCND1*). Уровни экспрессии генов в цибридных клетках рассчитывались относительно экспрессии генов в контрольных клетках линии THP-1.

Установлено, что в клетках TC-HSMAM1 экспрессия *PCNA*, *CCNB1* и *CCND1* увеличена в 2,19 (*p*<0,001), 2,73 (*p*<0,001) и 3,71 (*p*<0,001) раза соответственно по сравнению с клетками линии THP-1 (рис. 29).

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 (p<0,001) и 2,69 (p<0,001) раз соответственно. В то же время, было обнаружено, что экспрессия гена *CCNB1* статистически значимо от контрольных клеток не отличалась (рис. 29).

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.



Рисунок 29. Оценка экспрессии генов, опосредующих пролиферативную активность моноцитоподобных клеток линии THP-1, цибридов TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1. Mean ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), *** *p*<0,001. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

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).

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

Синтетическую активность ФМА-дифференцированных макрофагальных клеток оценивали по экспрессии гена, кодирующего субъединицу 1 коллагена 6 типа (*COL6A1*). Регуляцию транскрипции в клетках оценивали по экспрессии генов, кодирующих субъединицу А РНК-

полимеразы 1 типа (*POLR1A*) и субъединицу А РНК-полимеразы 3 типа (*POLR3A*). Уровни экспрессии генов в цибридных клетках рассчитывались относительно экспрессии генов в контрольных клетках линии THP-1.

Обнаружено, что экспрессия генов *POLR1A* и *COL6A1* в клетках цибридной линии TC-HSMAM1 статистически значимо увеличивается в 1,54 (p<0,001) и 2,41 (p<0,001) раз соответственно по сравнению с THP-1, тогда как экспрессия *POLR3A* снижается (рис. 30).

После удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A в клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается увеличение экспрессии гена *POLR3A* в 2,07 (p<0,001) раз по сравнению с контрольной линией клеток THP-1, тогда как экспрессия гена *POLR1A* статистически значимо снижалась (p<0,01) (рис. 30). 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.

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).



Рисунок 30. 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 ± SD, ns – нет значимости (*p*>0,05), ** *p*<0,01, *** *p*<0,001. Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в сочетании с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Неоднократно была показана возможность использования технологий на основе CRISPR/Cas9 для редактирования митохондриальных генов (Bian W. P. et al., 2019; Hussain S. R. A. et al., 2021; Loutre R. et al., 2018). Ранее в нашей лаборатории был сконструирован вектор MitoCas9, способный вызывать двуцепочечные разрывы в мтДНК в области последовательности гена *MT-CYB*, кодирующего цитохром b (Sukhorukov V. N. et al., 2020). Наиболее эффективным способом доставки редактирующей конструкции к клеткам являются катионные липосомы. Недавно было показано, что маннозил-содержащие адресные катионные липосомы M6 являются эффективными кислот системами доставки нуклеиновых В сложно трансфецируемые дендритные клетки и моноцитарные клетки (Sukhorukov V. N. et al., 2020; Марков О. В. et al., 2017). Для улучшения фьюзогенных свойств, такие липосомы содержат липид-помощник DOPE, который способствует высвобождению нуклеиновых кислот из эндосом в цитоплазму (Михеев А. А. et al., 2020).

Ранее была выявлена связь ряда мутаций в генах, кодируемых мтДНК, в том числе m.15059G>A (*MT-CYB*), с атеросклерозом (Dabravolski S. A. *et al.*, 2022; Sobenin I. А., 2013; Баринова В. А. et al., 2015; Сазонова М. А. et al., 2014; Синёв В. В. et al., 2021). В целях изучения связи данной мутаций с клеточными механизмами, ассоциированными с атеросклерозом, была создана линия цитоплазматических гибридов TC-HSMAM1, посредством слияния безмитохондриальных моноцитоподобных клеток ТНР-1 с тромбоцитами, содержащими мутантный митохондриальный геном и использованными в качестве клеток-доноров митохондрий (Sazonova M. A. et al., 2018; Sazonova М. D. et al., 2021; Синёв В. В. et al., 2017). Данная клеточная линия цитоплазматических гибридов была использована в настоящей работе для выявления роли мутации m.15059G>A в гене MT-CYB в формировании проатеросклеротического фенотипа моноцитов и макрофагов.

122

В настоящем исследовании была успешно показана эффективность разработанного ранее вектора MitoCas9 в удалении из цибридных клеток копий мтДНК, содержащих мутацию m.15059G>A в гене MT-CYB. В результате трансфекции клеток линии TC-HSMAM1 вектором MitoCas9 было мутационного фона образования выявлено снижение вследствие двуцепочечных разрывов в области гена MT-CYB (Sukhorukov V. N. et al., 2021; Sukhorukov V. N. et al., 2024). Полученные данные согласуются с данными исследований, проведенных с использованием систем редактирования митохондриального генома, основанных на CRISPR/Cas9, по снижению копий целевой мтДНК и уровней ее транскриптов (Bian W. P. et al., 2019; Hussain S. R. A. et al., 2021; Khotina V. A. et al., 2022; Khotina V. A. et al., 2023; Loutre R. et al., 2018; Sukhorukov V. N. et al., 2021). С помощью разработанного ранее подхода по удалению колец мтДНК, несущих мутацию m.15059G>A в гене MT-CYB, в настоящем исследовании было достигнуто значительное снижение гетероплазмии данной мутации (Sukhorukov V. N. et al., 2021; Sukhorukov V. N. et al., 2021; Sukhorukov V. N. et al., 2022; Sukhorukov V. N. et al., 2024). Кроме того, путем Т7ЕІ-анализа было выявлено формирование гетеродуплексов в участках мтДНК, соответствовавших целевым сайтам для нуклеазы Cas9 вектора MitoCas9, использованного для трансфекции. Наличие гетеродуплексов в местах ДЦР свидетельствует об успешном проведении редактирования мтДНК (Sukhorukov V. N. et al., 2024).

Более того, для подтверждения разрезания мтДНК в сайте мутации m.15059G>A вектором MitoCas9 в клетках линии TC-HSMAM1, было дополнительно проведено секвенирование последовательности мтДНК клеток цибрид по методу Сенгера (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022). Так, было установлено, что последовательность мтДНК в клетках Cas9-TC-HSMAM1, трансфецированных PHK-комплексом MitoCas9, содержит гомологичный участок вектора MitoCas9 в области гена *MT-CYB* (рис. 31), который мог попасть в митохондрии во время трансфекции (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022). На основании вместе взятых результатов было выдвинуто предположение, что

участок вектора MitoCas9, вероятно, встраивается в месте разрыва мтДНК в области гена МТ-СҮВ с помощью механизмов репарации, которые могут реализовываться в митохондриальном геноме. Возможность встраивания участка редактирующих конструкций в область разрезания двуцепочечной мтДНК ранее обнаруживалась в других исследованиях, что согласуется с полученными в настоящей работе результатами (Bian W. P. et al., 2019). митохондрий образования Вероятно, при деградации вследствие двуцепочечных разрывов в мтДНК, происходит активация репарации мтДНК путем механизма ММЕЈ. Подтверждения существования данного механизма репарации в митохондриальном геноме обнаруживаются в литературе (Tadi S. K. et al., 2016; Wang B. et al., 2021).

120	130	140	145	150	160	170	180	190
CGGCCGCCAGTG	GCTGGAAT	CAGGCTT	ATG	AGACGCCCTAG	CACGTACT	GCCTCAT		CCCTCGGT
VCGGCCGCCAGTG VCGGCCGCCAGTG VCGGCCGCCAGTG VCGGCCGCCAGTG VCGGCCGCCAGTG	TGCTGGAATT TGCTGGAATT TGCTGGAATT TGCTGGAATT TGCTGGAATT	CAGGCTT CAGGCTT CAGGCTT CAGGCTT CAGGCTT	CATG CATG CATG CATG CATG	AGACGCCTAG AGACGCCCTAG A <mark>A</mark> AG AGAC CAAAA G AGACGCCTAG	CACGTACT CACGTACT CACGTACT CACGTACT	CGCCTCAT CGCCTCAT CGCCTCAT CGCCTCAT CGCCTCAT		CCTCGGT CCTCGGT CCTCGGT CCTCGGT CCTCGGT
	5G G	CAAAAAA	ACAC ACAC	GTCGAGAGCGG TCGAGAGCGG/ SniperCas9	A <mark>T</mark> GAAGAA A T GAAGAA	A AGAAGA		

Рисунок 31. Результат выравнивания последовательностей мтДНК, разрезанных вектором MitoCas9, полученных с помощью секвенирования по методу Сенгера (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022).

Как показывают исследования, успешность редактирования митохондриальных генов должна подтверждаться сохранением эффекта в течение нескольких генераций клеток и уровнем их жизнеспособности (Zekonyte U. *et al.*, 2021). В ходе двухнедельного эксперимента было подтверждено сохранение эффекта редактирования митохондриального гена цитохрома b, что также согласуется с данными других исследований (Khotina V. A. *et al.*, 2024; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022; Zekonyte U. *et al.*, 2021).

Кроме того, обнаруживалось значительное снижение жизнеспособности клеток на 1 сутки после трансфекции вектором MitoCas9, которая к 7 суткам

восстанавливалась до значений, сходных с контрольными клетками, не подвергавшимися трансфекции (Khotina V. A. *et al.*, 2024). Подобное снижение жизнеспособности клеток связано с гибелью клеток вследствие удаления значительной части митохондриальных колец. Восстановление клеточной популяции происходит за счет клеток, чей митохондриальный геном был поврежден в меньшей степени. Полученные в настоящей работе данные согласуются с ранее опубликованными результатами (Antón Z. *et al.*, 2021).

Предполагается, что митохондриальная дисфункция, вызванная повреждением митохондрий или нарушением функции белков ЭТЦ, вносит вклад в развитие возрастных патологий, в том числе атеросклероза, на клеточном уровне (Ciccarelli G. et al., 2023; McGuire P. J., 2019; Маркин А. М. et al., 2020; Толстик Т. В. et al., 2023). В связи с этим, в настоящем исследовании были поставлены задачи по оценке митохондриальной функции клеток, в которых была удалена мтДНК, несущая мутацию m.15059G>A в гене *МТ-СҮВ*. В частности, было оценено влияние мутации m.15059G>A на ΑФК изменение митохондриального $\Delta \Psi$ т, генерацию И продуктов энергетический метаболизм перекисного окисления липидов, моноцитоподобных цибридных клеток, а также процесс удаления митохондрий в клетках, называемый митофагией. Данные параметры позволяют получить представление об изменениях в клеточной биоэнергетике и функции, связанных с митохондриальной дисфункцией.

 $\Delta \Psi$ т является важным показателем здоровой функции митохондрий. Одним из широко признанных последствий наличия патогенных мутаций в генах, кодирующих митохондриальные белки ЭТЦ, является снижение уровня $\Delta \Psi$ т (McKenzie M. *et al.*, 2007; Szczepanowska J. *et al.*, 2012). В настоящей работе мы наблюдали значительное увеличение уровня $\Delta \Psi$ т в клетках Cas9-TC-HSMAM1 по сравнению с цибридами TC-HSMAM1, несущих мутацию m.15059G>A (Khotina V. A. *et al.*, 2024). Поддержание $\Delta \Psi$ т чрезвычайно важно для нормальной функции митохондрий, в частности как для импорта белков, так и для транспорта ионов через внутреннюю митохондриальную мембрану, а также для поглощения дыхательных субстратов (Szczepanowska J. et al., 2012). Изменения в $\Delta \Psi$ m, в частности снижение, могут указывать на ранние стадии митохондриальной дисфункции, которые предшествуют явным изменениям в клеточной функции (Liu S. et al., 2021). Снижение уровня $\Delta \Psi$ m активирует адаптивные клеточные реакции, направленные на перенастройку метаболизма и устранение деполяризованных митохондрий. Полученные в настоящей работе результаты согласуются с другими исследованиями, которые демонстрируют снижение уровней $\Delta \Psi$ m в клетках с мутациями в генах мтДНК, кодирующих комплексы дыхательной цепи (Khotina V. A. et al., 2024; McKenzie M. et al., 2007).

Окислительно-восстановительный статус клеток и митохондрий определяется балансом между такими процессами, как генерация АФК и активация механизма антиоксидантной защиты (Kang J., Pervaiz S., 2012; Ribas V., García-Ruiz C., Fernández-Checa J. C., 2014). Данный баланс регулируется различными факторами, такими как метаболический статус митохондрий, ΔΨm, работа комплексов ЭТЦ, клеточная антиоксидантная система и динамика митохондрий. Наличие мутаций в митохондриальных генах, кодирующих белки, служащие важными структурными компонентами ЭТЦ, может приводить к увеличению продукции АФК (Hahn A., Zuryn S., 2019; Shokolenko I. N., 2014). В настоящей работе наблюдалось повышение продукции АФК и образования продуктов перекисного окисления липидов у цибридов, несущих мутацию m.15059G>A в MT-CYB, по сравнению с клетками, в которых мутантная мтДНК была удалена. Несмотря на то, что изменение уровня АФК не было значительным, оно было статистически значимым. Цитохром b, кодируемый геном МТ-СҮВ, представляет собой интегральный мембранный белок, играющий решающую роль в сборке комплекса III. Было обнаружено, что мутации МТ-СҮВ способствуют усилению продукции АФК (Hahn A., Zuryn S., 2019). В частности, такие мутации, как m.14787-14791del и m.15642-15662del в МТ-СҮВ, связаны с повышенным производством H_2O_2 в клетках (Dasgupta S. *et al.*, 2008; Rana M.

et al., 2000). Нарушение сборки комплекса III ЭТЦ может препятствовать потоку электронов от убихинола, что приводит к нежелательному восстановлению молекулярного кислорода до супероксида и последующей деградации до H_2O_2 (Hahn A., Zuryn S., 2019). Полученные в настоящей работе результаты согласуются с данными других исследований, поскольку не все мутации в гене *MT-CYB* приводят к существенному увеличению производства АФК (Khotina V. A. *et al.*, 2024). Например, недавно было показано, что у мышей с мутацией m.15124A>G в *cytb* не было выявлено существенных различий в выработке митохондриального супероксида и клеточного супероксида при неизмененных уровнях АТФ (Kretzschmar C. *et al.*, 2016).

Митохондрии играют центральную роль в производстве энергии в клетке путем процесса окислительного фосфорилирования. Мутации в мтДНК могут привести к нарушению данного процесса, что может изменять энергетический баланс клетки и влиять на ее жизнеспособность И функциональность. В связи с этим, в качестве дополнительного критерия митохондриальной дисфункции был выбран оценки анализ биоэнергетического профиля цибридов, который оценивался по скорости потребления кислорода клетками в условиях добавления ингибиторов окислительного фосфорилирования, таких как олигомицин А, FCCP и антимицин A (Chacko B. K. et al., 2014; Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2024; Khotina V. A. et al., 2023).

Выявлено, что цибриды TC-HSMAM1 и клетки Cas9-TC-HSMAM1 характеризуются сходным уровнем базального дыхания. Таким образом, наличие мутации m.15059G>A не оказывает значительного влияния на общее поглощение клетками кислорода. Необходимо отметить, что базальное дыхание не может объективно характеризовать функционирование ЭТЦ. Как увеличение, так и уменьшение данного параметра могут быть обусловлены различными причинами, включая физиологическое состояние клеток, степень связи уровня потребления кислорода с синтезом АТФ и разобщением дыхания митохондрий (Divakaruni A. S., Jastroch M., 2022). В связи с тем, что данная

мутация находится в гене, кодирующем белок цитохром b, который является одним из основных компонентов комплекса III дыхательной цепи, она может оказывать влияние на эффективность окислительного фосфорилирования (James A. M., Murphy M. P., 2002). Детальное исследование последнего может быть выполнено путем анализа параметров биоэнергетического профиля.

Ранее в ходе анализа митохондриального биоэнергетического профиля было выявлено значительное увеличение таких параметров, как немитохондриальное потребление кислорода и утечка протонов, у цибридов TC-HSMAM1 по сравнению с клетками линии THP-1, которые использовались в качестве здорового контроля (Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2023). Это свидетельствует о том, что в цибридах TC-HSMAM1 имеет место снижение как общего уровня митохондриального дыхания, так и доли потребляемого кислорода, связанной с синтезом АТФ. Увеличение утечки может быть связано как повреждением протонов с внутренней митохондриальной мембраны или комплексов ЭТЦ, так и увеличением активности разобщающего белка митохондрий (Chacko B. K. et al., 2014; Hill В. G. et al., 2012). В совокупности, это может приводить к увеличению продукции митохондриями АФК, которые выступают одним из составляющих компонентов патогенеза атеросклероза (Nowak W. N. et al., 2017). В свою очередь, увеличение немитохондриального потребления кислорода в клетках может быть связано с активностью ферментов, связанных с воспалением, липоксигеназы таких как циклооксигеназы, И NADPH-оксидазы И сверхпродукцией АФК в цитозоле, оказывающих влияние в том числе и на состояние митохондрий, в значительной степени усугубляя развитие дисфункции органелл (Chacko B. K. et al., 2014; Dranka B. P. et al., 2010; Hill B. G. et al., 2012). Удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A в гене MT-*СҮВ*, приводило к снижению данных параметров в клетках Cas9-TC-HSMAM1 по сравнению с линией TC-HSMAM1 (Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2024; Khotina V. A. et al., 2023). Таким образом, в клетках с отредактированным митохондриальным геномом происходило снижение

обоих показателей, которые свидетельствовали о развитии митохондриальной дисфункции в цибридной линии TC-HSMAM1.

Общее биоэнергетическое здоровье моноцитоподобных клеток было оценено с помощью ранее предложенного ИБЗ, который позволяет оценить общую митохондриальную эффективность клеток (Chacko B. K. et al., 2014). Снижение значения ИБЗ в цибридах линии TC-HSMAM1 относительно контрольных клеток ТНР-1, которое было показано ранее, можно объяснить высокими уровнями утечки протонов и немитохондриального дыхания (Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2023). Это может указывать на наличие дефектов в ЭТЦ, что приводит к менее эффективному синтезу АТФ в митохондриях (Chacko B. K. et al., 2014). Действительно, нарушения в комплексе III, в состав которого входит цитохром b, могут привести к общей дисфункции митохондрий, в частности снижению митохондриального дыхания, уменьшению производства АТФ и повышенной утечке протонов (James A. M., Murphy M. P., 2002). В то же время в случае клеток линии Cas9-TC-HSMAM1 происходит увеличение данного параметра по сравнению с TC-HSMAM1 за счет, прежде всего, уменьшения уровня немитохондриального дыхания и, соответственно, снижения негативного влияния на митохондрии связанных с этим параметром стрессовых факторов (Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2024; Khotina V. A. et al., 2023).

Считается, что метаболические и биоэнергетические нарушения, связанные с развитием окислительного стресса и митохондриальной дисфункции, лежат в основе механизмов развития хронических заболеваний, в том числе атеросклероза (Chacko B. K. *et al.*, 2014). Кроме того, митохондрии за счет выполнения важнейших биоэнергетических функций, не только координируют клеточный гомеостаз, но и позволяют регулировать активацию иммунных клеток, играющих ключевую роль в патогенезе атеросклероза (Chacko B. K. *et al.*, 2014; Hill B. G. *et al.*, 2012; James A. M., Murphy M. P., 2002). Кроме того, известно, что нарушение биоэнергетической функции митохондрий тесно связано с активацией митофагии. Так, исследования показали, что Pink1 и Parkin, вовлеченные в регуляцию митофагии, являются высоко чувствительным к изменениям потенциала митохондриальной мембраны (Hill B. G. et al., 2012; Kondapalli C. et al., 2012). Недостаточная экспрессия Parkin может привести как к нарушению динамики митохондрий, так и к нарушению их биоэнергетической функции (Peker N. et al., 2018). подгруппа была идентифицирована ГМК Кроме того, недавно В атеросклеротических бляшках, которые характеризовались повышенной митохондриальной дисфункцией, вызванной повреждением мтДНК, сниженным окислительным фосфорилированием и митохондриальным дыханием, а также повышенной экспрессией PINK1 (Docherty C. K. et al., 2018).

проатерогенная Таким образом, митохондриальная мутация m.15059G>A гене MT-CYB оказывает В негативное влияние на биоэнергетический профиль митохондрий в моноцитах за счет повышенного немитохондриального дыхания, утечки протонов и сниженной общей митохондриальной эффективности Редактирование клеток. митохондриального генома, приводящее к удалению данной мутации, позволяет в значительной степени увеличить уровень биоэнергетического здоровья и общей митохондриальной эффективности клеток. Полученные в настоящей работе результаты согласуются с данными коллег, И свидетельствуют о том, что нахождение в атеросклеротических поражениях нарушениями клеток, которые характеризуются биоэнергетики И митохондриального дыхания, может способствовать развитию атеросклероза (Docherty C. K. et al., 2018).

Стоит отметить, что поддержание биоэнергетической функции митохондрий требует сбалансированного равновесия между динамикой и биогенезом митохондрий (Prajapat S. K. *et al.*, 2023). Митохондриальная дисфункция макрофагов атеросклеротических поражений, опосредованная наличием мутаций в митохондриальном геноме, влияет на реализацию процессов деления и слияния митохондрий, а также активность митофагии

(Dabravolski S. A. *et al.*, 2022; Markin A. M. *et al.*, 2021). Нарушения процессов митофагии способствуют прогрессирующей гибели клеток, клеточному стрессу и генерации АФК, что в конечном итоге может приводить к развитию окислительного стресса, апоптоза и некроза клеток атеросклеротических бляшек, вследствие чего происходит образование некротического ядра и дестабилизация бляшки (Xu M. *et al.*, 2024). Наиболее перспективным методом исследования уровня митофагии в клетках показывает себя конфокальная микроскопия с использованием флуоресцентных красителей к митохондриям и лизосомам (Dolman N. J. *et al.*, 2013).

Проявления митохондриальной дисфункции в отношении активности митофагии в клетках линий цибридов TC-HSMAM1 и цибридов Cas9-TC-HSMAM1 после удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A оценивалась по колокализации митохондрий и лизосом. В отличии от контрольной линии клеток THP-1, в клетках линии TC-HSMAM1 наблюдалось явление, называемое дефектной митофагией, которая выражается в сниженной колокализации митохондрий и лизосом в клетке при добавлении разобщителя цепи окислительного фосфорилирования FCCP, индуцирующего процессы митофагии. Полученные в настоящем исследовании результаты согласуются с данными коллег, показывающими изменения уровня митофагии в цибридных клетках, несущих проатерогенные мутации, по сравнению с клетками линии THP-1 (Sukhorukov V. N. *et al.*, 2023; Zhuravlev A. D. *et al.*, 2022). Удаление мтДНК с мутацией m.15059G>A в гене *MT-CYB* в клетках TC-HSMAM1 способствует восстановлению уровня митофагии до значений, которые наблюдаются у контрольных клеток THP-1.

Известно, что FCCP способствует активации PINK1/Parkinопосредованного пути митофагии (Han R. *et al.*, 2023; Kondapalli C. *et al.*, 2012). С целью валидации полученных в рамках настоящего исследования данных по оценке активации митофагии в клетках с помощью конфокальной микроскопии, была оценена экспрессия таких генов, как *PINK1*, *PRKN* и *MAP1LC3B*. Последний является маркером формирования аутофагосом. Обнаружено, что в цибридах TC-HSMAM1 наблюдается сниженная экспрессия *MAP1LC3B* по сравнению с контрольными клетками THP-1 и цибридами Cas9-TC-HSMAM1 в условиях стимуляции митофагии с помощью FCCP в цибридах, несущих мутацию m.15059G>A в гене *MT-CYB*, не приводит к изменению экспрессии *PINK1* и *PRKN*. В свою очередь, экспрессия данных генов в клетках Cas9-TC-HSMAM1 значительно увеличена по сравнению с TC-HSMAM1. В совокупности, это может свидетельствовать об активации PINK1/Parkin-опосредованного пути митофагии в клетках с удаленной мутантной мтДНК.

Таким образом можно заключить, что мутация m.15059G>A может негативно влиять на процессы активации митофагии в моноцитах, приводя к дефектной митофагии, которая сопровождаться может дальнейшим нарушением функциональных свойств клеток формированием И проатеросклеротического фенотипа. Результаты некоторых исследований демонстрируют, что нарушение активации митофагии, возникающее под воздействием внешних агентов или вызванное наличием мутаций в ядерном геноме, часто сопровождаются сниженной активностью комплекса III дыхательной цепи митохондрий (Lou Y. et al., 2021; Martín-Maestro P. et al., 2019). В настоящем исследовании предполагается обратная связь, когда снижение активности комплекса III может способствовать проявлению дефектной митофагии в клетках. Свидетельство связи мутаций мтДНК с нарушением процессов утилизации дисфункциональных митохондрий было продемонстрировано исследовании, где мутация m.12338T>C В В митохондриальном гене MT-ND5 приводила к снижению активности комплекса I и нарушению митофагии в клетках (Zhang J. et al., 2018).

Понимание того, как митохондриальная дисфункция в моноцитах и макрофагах способствует развитию атеросклероза, может способствовать раскрытию механизмов данного заболевания и обнаружению новых потенциальных мишеней для терапевтического вмешательства. Известно, что митохондриальная дисфункция может инициировать апоптоз через активацию каспаз и высвобождение проапоптотических факторов, таким образом оказывая влияние на регуляцию на клеточной смерти и выживаемости (Banoth B., Cassel S. L., 2018; James A. M., Murphy M. P., 2002; Xu M. *et al.*, 2024). Кроме того, поскольку моноциты играют ключевую роль в воспалительных реакциях, митохондриальная дисфункция в этих клетках может способствовать воспалительным процессам, которые способствуют атерогенезу. В связи с этим, необходимо получить комплексное представление о влиянии проатерогенной мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* не только на митохондриальную функцию, но и на основные функции моноцитов и макрофагов.

С целью изучения связи мутации m.15059G>A в гене *MT-CYB* с изменением функций моноцитоподобных клеток, была проведена оценка основных параметров, характеризующих формирование проатеросклеротичского фенотипа моноцитов и макрофагов, таких как, воспалительный статус клеток, внутриклеточное накопление холестерина (липоидоз) и регуляция липидного метаболизма, активность апоптоза, а также синтетическая и пролиферативная активность клеток (Bobryshev Y. V. *et al.*, 2016; Patterson M. T. *et al.*, 2000; Sobenin I. A. *et al.*, 2015; Sobenin I. A., 2017).

Моноциты/макрофаги субпопуляцию представляют клеток, участвующих в иммунном ответе организма. Кроме того, хорошо известно, что они участвуют в реализации воспалительных процессов, которые вносят значительный вклад в развитие атеросклеротических поражений (Chistiakov D. A. et al., 2019; Murray P. J. et al., 2014; Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016; Yunna C. *al.*. 2020). Для выявления влияния мутации m.15059G>A et на провоспалительный ответ моноцитов, была проанализирована базальная и индуцированная ЛПС секреция цитокинов клетками линий THP-1, TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1.

Были выявлены значимые различия в профиле иммунного ответа между цибридами линии TC-HSMAM1 и контрольными клетками THP-1, что,

133

вероятно, связано с наличием значительного числа мутаций в мтДНК цибридов TC-HSMAM1 (Sazonova M. A. *et al.*, 2018). Полученные данные согласуются с результатами коллег (Bezsonov E. E. *et al.*, 2021; Zhuravlev A. D. *et al.*, 2021). Кроме того, в настоящей работе обнаружены сходства в базовой выработке провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и CCL2 (MCP-1) линиями TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1, что говорит об их сходном профиле иммунного ответа (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A. *et al.*, 2023а). Тем не менее, было обнаружено, что после удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A происходит снижение продукции клетками цитокина ФНО α до уровня, сходного с контрольными клетками THP-1.

Хорошо известно, что в ответ на ЛПС происходит поляризация макрофагов по провоспалительному фенотипу (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016). В ходе анализа провоспалительной активации клеток в ответ на стимуляцию с помощью ЛПС была выявлена сниженная секреция провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО α в клетках TC-HSMAM1 по сравнению с клетками линии THP-1. В то же время, секреция данных цитокинов клетками Cas9-TC-HSMAM1 не отличается от контрольных клеток (Khotina V. A. *et al.*, 2023a). Таким образом, можно сделать вывод, что мутация m.15059G>A вероятно связана с изменением воспалительного статуса клеток за счет увеличенной базальной секреции ФНО α , а также сниженной секреции ФНО α и ИЛ-1 β в условиях провоспалительной стимуляции.

Кроме того, установлено, что клетки TC-HSMAM1 демонстрируют неспособность формировать эндотоксиновую (иммунную) толерантность при повторной стимуляции с использованием ЛПС (Khotina V. A. *et al.*, 2023). Проявление эндотоксиновой толерантности характеризуется снижением иммунного ответа моноцитов при повторных воздействиях ЛПС на клетки, что приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов (Ifrim D. C. *et al.*, 2014; Netea M. G., 2013). В свою очередь, клетки Cas9-TC-HSMAM1, а также контрольные клетки линии THP-1 проявляют адекватный ответ на стимуляцию ЛПС, который заключался в увеличении секреции ФНОα после

первой стимуляции ЛПС и снижении секреции данного цитокина после повторной стимуляции. Наблюдаемое явление подтверждает проявление эндотоксиновой толерантности в моноцитах. Таким образом, присутствие мутации m.15059G>A в мтДНК моноцитов может оказывать негативное влияние на иммунную толерантность, препятствуя разрешению воспаления и способствуя его хронизации. Полученные в настоящей работе результаты согласуются с предыдущими исследованиями, выявившими корреляцию некоторых гетероплазматических мутаций мтДНК с провоспалительной активацией моноцитов у пациентов с атеросклерозом (Orekhov A. N. et al., 2015). Более того, полученные результаты согласуются с данными о возможной связи проатерогенных мутаций мтДНК с неспособностью моноцитов к формированию иммунной толерантности (Orekhov A. N. et al., 2020). Дисфункция митохондрий В моноцитоподобных клетках, сопровождающаяся нарушением активации митофагии, предположительно, атеросклероз-ассоциированными мутациями мтДНК, вызванной может приводить развитию непрерывного провоспалительного к ответа. Утверждается, что данное явление характеризуется повышенной базальной секрецией CCL2, ИЛ-8 и ФНОа, а также нарушением толерантного воспалительного ответа при повторной провоспалительной стимуляции (Orekhov A. N. et al., 2024). Таким образом, результаты настоящего исследования показывают, что удаление из моноцитоподобных клеток мтДНК, содержащей m.15059G>A мутацию, приводит к восстановлению как алекватной активации митофагии, так и восстановлению иммунной толерантности в ответ на провоспалительную стимуляцию (Khotina V. A. et al., 2024; Orekhov A. N. et al., 2023; Sukhorukov V. N. et al., 2023; Sukhorukov V. N. et al., 2024).

Не менее важным процессом, который опосредует воспалительные реакции и участвует в развитии атеросклероза, является избыточная активация NLRP3-инфламмасомы (Lu N. *et al.*, 2022). Активация NLRP3-инфламмасомы приводит к активации каспазы-1 и высвобождению воспалительных

135

цитокинов, таких как ИЛ-1β и ИЛ-18, что впоследствии вызывает развитие пироптоза. Для оценки активации NLRP3-инфламмасомы в цибридных клетках до и после удаления мтДНК, несущей патологическую мутацию, анализировалась экспрессия инфламмасома-ассоциированных генов, кодирующих каспазу-1, ИЛ-1β и NLRP3 в условиях стимуляции клеток с помощью ЛПС.

Было показано увеличение базальной экспрессии генов *IL1B* и *NLRP3* в клетках цибридной линии TC-HSMAM1 по сравнению с контрольными клетками THP-1. В то же время, в клетках Cas9-TC-HSMAM1 после удаления патогенной мутации наблюдается снижение экспрессии генов *CASP1* и увеличение экспрессии *IL1B* по сравнению с клетками THP-1. Однако, в клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается снижение базальной экспрессии всех исследуемых генов по сравнению с TC-HSMAM1. Полученные данные по увеличению базальной экспрессии *IL1B* в цибридных клетках до и после удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A согласуются с результатами анализа базальной скреции ИЛ-1 β клетками данных линий (Khotina V. A. *et al.*, 2023b; Khotina V. A. *et al.*, 2023b).

В условиях стимуляции клеток с помощью ЛПС, в цибридах ТС-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается увеличение экспрессии IL1B по сравнению с THP-1, тогда как, экспрессия гена *CASP1* значительно снижена (Khotina V. A. et al., 2023; Khotina V. A. et al., 2023b; Khotina V. A. et al., 2023b). Однако, полученные результаты не согласуются с данными по усилению секреции ИЛ-18. Тем не менее, существуют данные, подтверждающие, что процессинг предшественника ИЛ-1β (про-ИЛ-1β) каспазой-1 в зрелый ИЛ-1β последующее внеклеточное высвобождение являются И его двумя раздельными и частично независимыми событиями в моноцитах человека, что не противоречит результатам настоящего исследования (Galliher-Beckley A. J. et al., 2013). Кроме того, в клетках Cas9-TC-HSMAM1 экспрессия NLRP3 значительно увеличивается по сравнению с цибридами TC-HSMAM1 и THP-1, что также не приводит к значительному усилению секреции ИЛ-1β.

Вероятно, продолжительная стимуляция ЛПС приводит к независимой от экспрессии *NLRP3* секреции ИЛ-1 β , что не противоречит раннее опубликованным данным (Hong S., Yu J. W., 2018). Ряд исследований свидетельствует о том, что секреция ИЛ-1 β действительно может происходить независимо от каспазы-1 и NLRP3, а за счет активации каспазы-8 и NLRC4 (Eltom S. *et al.*, 2014; Stammler D. *et al.*, 2015).

Таким образом, можно заключить, что мутация m.15059G>A также может быть ассоциирована с усилением провоспалительного ответа и формированием NLRP3-инфламмасомы в связи с повышенной базальной экспрессией генов *NLRP3* и *IL1B*.

Хорошо известно, что на начальных стадиях формирования атеросклеротических поражений основную роль играет дифференцировка макрофагов бляшек в пенистые клетки, что обусловлено избыточным накоплением клетками холестерина ЛПНП с последующим нарушением его внутриклеточной утилизации (Хотина В. А. *et al.*, 2020). Кроме того, недавно было установлено, что митохондриальная дисфункция усугубляет данный процесс, способствуя нарушению внутриклеточного метаболизма липидов (Lee S. J. *et al.*, 2013; Sanda G. M. *et al.*, 2021).

Обнаружено, что цибриды TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 содержат больше внутриклеточного холестерина по сравнению с контрольной клеточной линией THP-1 (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022). При проведении анализа содержания внутриклеточного холестерина в условиях добавления ЛПНП обе цибридные клеточные линии в большей степени накапливают холестерин ЛПНП по сравнению с клеточной линией THP-1. Однако не было выявлено значимых отличий в уровне накопления холестерина ЛПНП у клеток до удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A в гене *MT-CYB* и после. Основываясь на результатах настоящего исследования, можно предположить, что мутация m.15059G>A не влияет на внутриклеточное накопление холестерина в макрофагах, однако может быть вовлечена в модуляцию внутриклеточного липидного метаболизма (Хотина В. A. *et al.*, 2020).

Для уточнения изменений в метаболизме липидов макрофагов после удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A был проведен анализ экспрессии генов, кодирующих ферменты, участвующие во внутриклеточном липидном обмене, таких как ацетил-КоА-ацетилтрансфераза 1, лизосомальная липаза, синтаза жирных кислот, гидролаза эфиров холестерина 1 и нейтральная гидролаза сложных эфиров холестерина 1 (Igarashi M. *et al.*, 2010; Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023; Remmerie A., Scott C. L., 2018; Sukhorukov V. N. *et al.*, 2022; Хотина В. A. *et al.*, 2020)

продемонстрировано Было влияние мутации m.15059G>A на экспрессию гена FASN в цибридах TC-HSMAM1. Экспрессия данного гена достоверно снижалась в цибридах Cas9-TC-HSMAM1. Таким образом, можно сделать вывод, что мутация m.15059G>A может быть связана с изменением внутриклеточного синтеза жирных кислот (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023; Sukhorukov V. N. et al., 2022; Хотина В. А. et al., 2020). Ряд исследований свидетельствует о связи процесса синтеза жирных кислот и развитием атеросклероза (Chen Y. et al., 2022; Schneider J. G. et al., 2010). Так, снижение экспрессии гена Fasn в макрофагах у мышей связано с уменьшением площади атеросклеротических поражений. Кроме того, ранее была установлена связь мутации m.15059G>A с атеросклеротическими бляшками в аорте человека (Sobenin I. A. et al., 2013). Увеличение экспрессии FASN в цибридах TC-HSMAM1 по сравнению с контрольными клетками THP-1 и клетками Cas9-TC-HSMAM1, вероятно, объясняет обнаруженные в настоящей работе корреляции. Хорошо известно, что на начальных стадиях формирования атеросклеротических поражений основную роль играет дифференцировка макрофагов бляшек в пенистые клетки, что обусловлено избыточным поглощением ЛПНП и нарушением внутриклеточного метаболизма липидов (Sukhorukov V. N. et al., 2020). В свою очередь, формирование пенистых клеток в атеросклеротических поражениях может быть тесно связано с

митохондриальной дисфункцией, способствующей нарушению внутриклеточного метаболизма липидов (Lee S. J. *et al.*, 2013). В связи с этим, присутствие в атеросклеротических поражениях макрофагов с патогенными мутациями мтДНК может усугублять развитие и течение атеросклероза человека.

Известно, что на протяжении всего атерогенеза наблюдается увеличение активности апоптоза как в стареющих сосудистых клетках, так и в ГМК и макрофагах, населяющих атеросклеротические бляшки и формирующих некротическое ядро (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016). Тем не менее, функциональные последствия данного процесса заметно отличаются на ранних и поздних стадиях развития атеросклеротических поражений (Tabas I., 2009). Так, усиление апоптоза макрофагов на ранних стадиях развития атеросклероза приводит К замедлению прогрессирования атеросклеротических поражении (Arai S. et al., 2005). В свою очередь, замедленный апоптоз макрофагов на начальных стадиях атерогенеза способствует накоплению клеток в пораженных участках и ускоряет прогрессирование атеросклероза (Liu J. et al., 2005). На поздних стадиях развития атеросклеротических поражений усиление апоптоза макрофагов может быть вызвано наличием свободного холестерина, жирных кислот или ЛПНП (Tabas I., Bornfeldt K. E., 2016).

В качестве основных маркеров апоптоза были выбраны Bcl-2 ассоциированный X белок, регулятор апоптоза Bcl-2, каспаза 3, каспаза 9 и фактор активации апоптотической протеазы 1 (Martinet W. *et al.*, 2019). Выявлено снижение экспрессии генов *BAX* и *CASP9*, а также увеличение экспрессии *BCL2*, *CASP3* и *APAF1* в клетках цибридной линии TC-HSMAM1 по сравнению с контрольными клетками THP-1 (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b). Таким образом, в клетках цибридов, несущих мутацию в гене *MT-CYB*, наблюдается независимая от каспазы 9 и APAF1 экспрессия *CASP3*. Вероятно, в данном случае увеличение экспрессии *CASP3* может быть связано с активацией каспазы 8 (Orning P., Lien E., 2021).

Кроме того, существуют данные, свидетельствующие о том, что взаимодействие ФНО α с рецептором TNFRI приводит к активации каспазы 8 и каспазы 3 (Shuh M. *et al.*, 2013). В рамках настоящего исследования было показано, что клетки TC-HSMAM1 характеризуются повышенной базальной секрецией данного цитокина (Khotina V. A. *et al.*, 2023). Вероятно, в данном случае может наблюдаться аутокринный механизм действия секретируемого ФНО α на цибридные клетки.

После удаления мтДНК с мутацией m.15059G>A в цибридных клетках обнаруживается увеличение экспрессии всех исследуемых генов, за исключением *BAX*, по сравнению с контрольными клетками THP-1. В то же время, по сравнению с клетками, несущими патогенную мутацию, в Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается снижение экспрессии *CASP3*, а также увеличение экспрессии *BAX* и *CASP9*. Таким образом, в клетках Cas9-TC-HSMAM1 выявляется нормальная регуляция экспрессии *CASP3*, которая зависит от активации каспазы 9 и APAF1, в отличие от цибридов TC-HSMAM1 (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b).

Кроме того, в клетках Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается увеличение соотношения *BAX/BCL2* по сравнению с цибридами TC-HSMAM1 (Khotina V. A. *et al.*, 2023; Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b). Снижение соотношения *BAX/BCL2* может свидетельствовать о невосприимчивости клеток к апоптозу, что является негативной характеристикой в контексте атерогенеза на ранних стадиях (Khodapasand E. *et al.*, 2015). Вероятно, наличие в ранних атеросклеротических поражениях клеток, характеризующихся сниженным апоптозом, может способствовать усилению течения атеросклероза (Tabas I., 2009).

На основании полученных данных можно заключить, что мутация m.15059G>A в митохондриальном геноме может быть связана с увеличением экспрессии *CASP3* и снижением экспрессии *CASP9* и *BAX* в макрофагальных клетках. В целом, полученные результаты согласуются с исследованиями о наличии в атеросклеротических поражениях человека и мышей макрофагов с

увеличенной активностью апоптоза, связанного с активацией каспазы-3 и каспазы-9 (Nhan T. Q. *et al.*, 2003; Nhan T. Q. *et al.*, 2005; Slevin M. *et al.*, 2006). Несмотря на то, что удаление мтДНК с мутацией m.15059G>A в цибридах способствует снижению экспрессии *CASP3* и увеличению экспрессии *BAX*, экспрессия других генов, опосредующих активацию апоптоза, значительно увеличена по сравнению с контрольной линией THP-1.

В маркеров пролиферативной качестве основных активности моноцитоподобных были выбраны гены, регулирующие клеток пролиферацию И клеточный цикл, такие как ядерный антиген пролиферирующих клеток, циклин B1 и циклин D1 (Fuster J. J. et al., 2010; Malumbres M., Barbacid M., 2005; Tan X. et al., 2017). Обнаружено, что в клетках линий TC-HSMAM1 и Cas9-TC-HSMAM1 наблюдается увеличение экспрессии генов *PCNA* и *CCND1* по сравнению с контрольной линией клеток ТНР-1. Однако, удаление мутации m.15059G>A в клетках приводило к снижению экспрессии гена *CCNB1*. Общеизвестно, что циклин B1 и циклин D1 участвуют в регуляции митотического деления клеток (Malumbres M., Barbacid M., 2005). Так, циклин B1 контролирует переход из поздней стадии G2 в М-фазу, тогда как циклин D1 – прогрессию фазы G1 в S-фазу. Недавно было показано, что экспрессия гена CCNB1 имеет умеренную корреляцию с экспрессией маркеров, связанных с пролиферацией и миграцией иммунных клеток, в частности, моноцитов (Zou Y. et al., 2020). В свою очередь, экспрессия гена CCND1 тесно связана с регуляцией адгезии и подвижности иммунных клеток (Neumeister P. et al., 2003). Полученные в совокупности данные свидетельствуют об увеличении пролиферации моноцитов, несущих патологические мутации в митохондриальном геноме. Вероятно, дисфункция цитохрома b, вызванная мутацией m.15059G>A, может способствовать усилению пролиферативной активности клеток и усилению их миграции за счет увеличения экспрессии циклина B1 (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b; Khotina V. A. et al., 2023a). В целом, наши результаты согласуются с более ранними данными анализа пролиферации клеток атеросклеротических

поражений (Rajamannan N. M. *et al.*, 2002; Rekhter M. D., Gordon D., 1995). Кроме того, ряд исследований свидетельствует о связи повышенной пролиферации клеток с развитием воспаления в атеросклеротических бляшках (Tang J. *et al.*, 2015; Wang Y. *et al.*, 2020).

Синтетическая активность макрофагов опосредованно вносит вклад в формирование атеросклеротических поражений. В качестве маркеров синтетической активности макрофагов были выбраны гены, кодирующие ферменты, участвующие в регуляции транскрипции белков, такие как субъединица А РНК-полимеразы 1 типа, субъединица А РНК-полимеразы 3 типа, а также коллагена (субъединица 1 коллагена 6 типа) (Paule M. R., White R. J., 2000; Schnoor M. *et al.*, 2008; Witherel C. E. *et al.*, 2021). Несмотря на то, что общепринятым считается участие макрофагов в разрушении ВКМ за счет секреции металлопротеиназ, было установлено, что они также способны и к продукции ВКМ за счет экспрессии коллагена 6 типа (Schnoor M. *et al.*, 2008).

Исследование синтетической активности моноцитоподобных клеток показало, что в цибридах TC-HSMAM1 наблюдается увеличение экспрессии генов *POLR1A* и *COL6A1* по сравнению с контрольной линией клеток THP-1. Удаление мтДНК с мутацией m.15059G>A в гене MT-CYB в цибридах сопровождалось снижением экспрессии генов POLR1A и COL6A1 по сравнению с исходной линией TC-HSMAM1, в то время как экспрессия POLR3A была увеличена (Khotina V. A., Sukhorukov V. N., 2023b; Khotina V. A. et al., 2023a). Известно, что РНК-полимеразы 1 типа регулирует синтез таких pPHK, как 18S, 5.8S и 28S, тогда как PHK-полимеразы 3 типа опосредует синтез 5S pPHK и тPHK (Paule M. R., White R. J., 2000). Значительное снижение экспрессии генов, кодирующих данные ферменты, вероятно, может приводить рибосом менее нарушению сборки эффективному И синтезу К внутриклеточных белков.

Согласно полученным в настоящей работе данным, можно заключить, что наличие мутации m.15059G>A в митохондриальном геноме макрофагов, вероятно, вносит некоторый вклад в продукцию ВКМ и синтез pPHK (Bywater

М. J. *et al.*, 2013; Witherel C. E. *et al.*, 2021). В то же время, показано, что удаление патогенной мутации приводит к значительному увеличению экспрессии РНК-полимеразы III, которая может быть тесно связана с секрецией некоторых цитокинов и активностью фагоцитоза макрофагов (Graczyk D. *et al.*, 2015).

Таким образом, в настоящей работе было продемонстрировано, что мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB*, кодирующем митохондриальный цитохром b, играет значительную роль в нарушении митохондриальной функции, влияя на биоэнергетические И иммунные функции В моноцитоподобных клетках (рис. 32). Эти способствуют изменения формированию проатеросклеротического фенотипа клеток, проявляющегося в усилении провоспалительного ответа, изменении липидного метаболизма и активации апоптоза. Наши результаты показали, что удаление мтДНК с мутацией m.15059G>A в гене MT-CYB способствует восстановлению митохондриальной функции, нормализации митофагии, снижению окислительного стресса, восстановлению воспалительного ответа моноцитоподобных клеток на внешние стимулы, а также нормализации пролиферации и апоптоза. Таким образом, результаты данного исследования подчеркивают участие митохондриальной дисфункции в формировании фенотипа проатерогенного моноцитов И макрофагов, a также ee потенциальную роль в патогенезе атеросклероза. Кроме того, наши результаты демонстрируют перспективность использования редактирования мтДНК для изучения молекулярно-генетических аспектов клеточных дисфункций и могут служить основой для разработки новых терапевтических стратегий их коррекции.

143



Рисунок 32. Удаление мутантной мтДНК улучшает митохондриальную функцию в цибридных моноцитоподобных клетках TC-HSMAM1 с мутацией в гене *MT-CYB*
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее было показано, что мутация m.15059G>A в гене *MT-CYB* ассоциирована с атеросклеротическими поражениями аорты человека. Настоящее исследование выявило, что наличие мутации m.15059G>A в митохондриальном геноме в значительной степени связано с развитием митохондриальной дисфункции в моноцитах/макрофагах, которая сопровождалась нарушением воспалительного ответа, изменениями в липидном метаболизме, изменением активации апоптоза, а также в регуляции синтетической функции и пролиферативной активности клеток.

Обнаружено, что наличие мутации m.15059G>A в митохондриальном геноме приводит к снижению мембранного потенциала митохондрий, повышению продукции АФК и нарушению биоэнергетической функции моноцитоподобных клеток. что сопровождается увеличением немитохондриального утечкой протонов И снижением дыхания, митохондриальной эффективности. Удаление из клеток мтДНК, несущей данную мутацию, значительно улучшало митохондриальную функцию, подчеркивая таким образом ее влияние на развитие митохондриальной дисфункции. Вероятно, мутация m.15059G>A в гене MT-CYB, за счет увеличения продукции АФК и развития окислительного стресса, может способствовать инициации и прогрессированию атеросклероза.

Кроме того, установлена связь мутации m.15059G>A с дефектной митофагией и развитием хронического воспаления. Было показано, что присутствие мутации m.15059G>A в мтДНК нарушает воспалительный ответ моноцитоподобных клеток, негативно влияя на секрецию ΦΗΟα И способность формировать эндотоксиновую толерантность в ответ на стимуляцию бактериальным ЛПС, а также способствуя изменению профиля экспрессии генов CASP1, NLRP3 и IL1B, связанных с инфламмасомным комплексом. В свою очередь, дефектная митофагия приводит к накоплению усугубляя поврежденных митохондрий, клеточную дисфункцию И

145

хроническое воспаление. Удаление мтДНК, несущей мутацию m.15059G>A, в настоящем исследовании восстановливало способность моноцитоподобных клеток к нормальной активации митофагии.

Об ассоциации мутации m.15059G>A с изменением внутриклеточного метаболизма липидов может свидетельствовать увеличение экспрессии *FASN* после инкубации с ЛПНП в ФМА-дифференцированных макрофагах, из которых мтДНК, несущая данную мутацию, была удалена. Кроме того, полученные результаты могут свидетельствовать о связи данной мутации с усилением апоптоза макрофагов, а также с изменением регуляции синтетической функции и пролиферативной активности моноцитов/макрофагов, что проявляется повышенной экспрессией генов *CCNB1*, *POLR1A* и *COL6A1*.

Таким образом, настоящее исследование демонстрирует, что мутация m.15059G>A в митохондриальном геноме моноцитов/макрофагов, играет важную роль в развитии проатеросклеротического фенотипа иммунных клеток. За счет участия в развитии митохондриальной дисфункции и индукции окислительного стресса данная мутация может способствовать инициации атерогенеза, поддерживая хроническое воспаление и ускоряя прогрессирование атеросклероза.

выводы

1. Мутация m.15059G>A в гене MT-СҮВ вносит вклад в развитие митохондриальной дисфункции моноцитоподобных В 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 ФНОα, а также сниженной секрецией ФНОα и ИЛ-1β 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-инфламмасомы.

3. Мутация m.15059G>A в гене *MT-СҮВ* 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*.

147

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 СОКРАЩЕНИЙ

- ΔΨm мембранный потенциал митохондрий
- АСАТ1 ацетил-КоА-ацетилтрансфераза 1
- **АРАF1** фактор, активирующий апоптотические протеазы 1
- ВАХ ассоциированный Х белок
- BCL2 регулятор апоптоза Bcl-2
- САЅР1 каспаза-1
- САЅРЗ каспаза-3
- **САЅР9** каспаза-9
- **ССNB1** циклин В1
- **ССND1** циклин D1
- **CES1** гидролаза эфиров холестерина 1, карбоксилэстераза 1
- СОСА1 субъединица 1 коллагена 6 типа
- **DPBS** фосфатно-солевой буферный раствор Дюльбекко
- FASN синтетаза жирных кислот
- **FCCP** карбонилцианид-4-трифторметокси-фенилгидразон
- LIPА холестеринэстераза, лизосомальная липаза
- NCEH1 нейтральная гидролаза сложных эфиров холестерина 1
- NLRP3 криопирин, основной компонент инфламмасом типа NLRP3
- РСNА ядерный антиген пролиферирующих клеток
- **POLR1A** субъединица А РНК-полимеразы 1 типа
- **POLR3A** субъединица А РНК-полимеразы 3 типа
- **sgPHK** гидовая РНК
- АФК активные формы кислорода
- ВКМ внеклеточный матрикс
- ИБЗ индекс биоэнергетического здоровья
- ИЛ интерлейкин

- ЛПНП липопротеиды низкой плотности
- ЛПС бактериальный липополисахарид
- мРНК матричная РНК
- МСК механизм микрогомологичного соединения концов
- мтДНК митохондриальная ДНК
- рРНК рибосомная РНК
- тРНК транспортная РНК
- ΦMA форбол-12-миристат-13-ацетат
- $\Phi HO\alpha$ фактор некроза опухоли α
- цкПЦР цифровая капельная полимеразная цепная реакция
- ЭТС эмбриональная телячья сыворотка
- ЭТЦ электрон-транспортная цепь

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аронов Д. М., Лупанов В. П. Некоторые аспекты патогенеза атеросклероза / Аронов Д. М., Лупанов В. П. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2011. – Т. 2. – № 1. – С. 48–56.

2. Баринова В. А. Анализ уровня гетероплазмии мутации митохондриального генома G15059A гена СуtВ в липофиброзных бляшках интимы аорты человека / Баринова В. А., Синёв В. В., Рыжкова А. И., Трубинов С. С., Желанкин А. В., Митрофанов К. Ю., Орехов А. Н., Постнов А. Ю., Собенин И. А., Сазонова М. А. // Атеросклероз и дислипидемии. – 2015. – Т. 1. – № 18. – С. 47–51.

 Ганковская Л. В. Возраст-ассоциированные заболевания: роль инфламмасомного комплекса / Ганковская Л. В., Артемьева О. В., Греченко В.
 В., Насаева Е. Д., Хасанова Е. М. // Иммунология. – 2023. – Т. 44. – № 5. – С. 640–652.

 Ломов Н. А. Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas при геномном редактировании / Ломов Н. А., Вьюшков В. С., Петренко А. П., Сыркина М. С., Рубцов М. А. // Молекулярная биология. – 2019. – Т. 53. – № 6. – С. 982–997.

5. Максимов В. Н. Сравнительный анализ количества копий митохондриальной ДНК в ткани миокарда при внезапной сердечной и несердечной смерти / Максимов В. Н., Гуражева А. А., Орлов П. С., Малютина С. К., Иванова А. А., Максимова С. В., Родина И. А., Хамович О. В., Новосёлов В. П. // Атеросклероз. – 2019. – Т. 15. – № 3. – С. 36–41.

6. Максимов В. Н., Гуражева А. А., Максимова Ю. В. Количество копий митохондриальной ДНК лейкоцитов как маркер предрасположенности к ишемической болезни сердца и внезапной сердечной смерти / Максимов В. Н., Гуражева А. А., Максимова Ю. В. // Атеросклероз. – 2018. – Т. 14. – № 3. – С. 64–69.

 Маркин А. М. Влияние воспаления и мутаций митохондриального генома на клеточные механизмы атерогенеза / Маркин А. М., Маркина Ю. В., Толстик Т. В., Богатырева А. И., Собенин И. А., Орехов А. Н. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2020. – Т. 9. – № 4. – С. 80–87.
 Михеев А. А. Катионные липосомы как средства доставки нуклеиновых кислот / Михеев А. А., Шмендель Е. В., Жестовская Е. С., Назаров Г. В., Маслов М. А. // Тонкие химические технологии. – 2020. – Т. 15. – № 1. – С. 7– 27.

9. Никифоров Н. Г. Активация макрофагов при атеросклерозе. Сообщение 1: активация макрофагов в норме и в атеросклеротическом поражении / Никифоров Н. Г., Корниенко В. Ю., Карагодин В. П., Орехов А. Н. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2015. – № 3. – С. 128–131.

10. Орехов А. Н. Атеросклероз. Молекулярно-клеточные механизмы атерогенеза человека; антиатеросклеротическая терапия / Орехов А. Н. – Германия : Palmarium Academic Publishing, 2013.– ISBN 978-3-659-98213-2. – 544 с.

11. Сазонова М. А. Мозаичность интимы аорты по митохондриальным мутациям G15059A и G14846A гена цитохрома В при атеросклеротических поражениях у человека / Сазонова М. А., Синёв В. В., Баринова В. А., Рыжкова А. И., Желанкин А. В., Митрофанов К. Ю., Постнов А. Ю., Собенин И. А., Орехов А. Н. // Патогенез. – 2014. – Т. 12. – № 2. – С. 51–57.

12. Синёв В. В. Клеточная модель митохондриальной дисфункции при атеросклерозе : специальность 1.5.22. – «Клеточная биология», 1.5.7. «Генетика» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата Василий биологических наук / Синёв Владимирович; «Научноисследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского». – Москва, 2022. – 26 с. – Место защиты: «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского».

Синёв В. В. Уровень гетероплазмии некоторых мутаций гена МТ-СҮВ у женщин с бессимптомным атеросклерозом сонных артерий / Синёв В. В., Чичёва М. М., Баринова В. А., Рыжкова А. И., Зелиный Р. И., Карагодин В. П., Постнов А. Ю., Собенин И. А., Орехов А. Н., Сазонова М. А. // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 8. – С. 951–957.

14. Синёв В. В. Создание цибридных линий с различным суммарным уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома / Синёв В. В., Сазонова М. А., Рыжкова А. И., Галицына Е. В., Постнов А. Ю., Орехов А. Н., Собенин И. А. // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – № 3. – С. 224–225.

15. Синёв В. В. Новый маркер старения человека: уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома / Синёв В. В., Рыжкова А. И., Сазонова М. Д., Дорощук Н. А., Кириченко Т. В., Карагодин В. П., Орехов А. Н., Собенин И. А., Сазонова М. А. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65. – № 2. – С. 4–9.

16. Судаков Н. Митохондриальная дисфункция при атеросклерозе и инфаркте миокарда: молекулярные и цитохимические маркеры / Судаков Н., Клименков И., Катышев А., Никифоров С., Гольдберг О., Пушкарев Б., Лепехова С., Апарцин К., Константинов Ю. // Acta Biomedica Scientifica. – 2016. – Т. 1. – № 3(2). – С. 131–134.

17. Судаков Н. П. Митохондриальная дисфункция в механизмах атерогенеза
/ Судаков Н. П., Никифоров С. Б., Константинов Ю. М., Лепехова С. А., Панкратов Е. В. // Acta Biomedica Scientifica. – 2007. – Т. 54. – № 2. – С. 119–123.

 Татевосян А. С., Алексеенко С. Н., Бунякин А. В. Митохондриальные аспекты атерогенеза / Татевосян А. С., Алексеенко С. Н., Бунякин А. В. // Кардиологический вестник. – 2023. – Т. 18. – № 1. – С. 5–13.

153

Толстик Т. В. Роль дисфункции митохондрий в патогенезе воспалительных заболеваний и атеросклероза / Толстик Т. В., Кириченко Т. В., Богатырева А. И., Маркина Ю. В., Маркин А. М., Козлов С. Г. // Атеросклероз и Дислипидемии. – 2023. – № 3 (52). – С. 10–17.

20. Фадеев Г. А. Воспалительные механизмы в генезе атеросклероза / Фадеев Г. А., Фатыхов Р. Г., Цибулькин Н. А., Михопарова О. Ю., Ощепкова О. Б. // Вестник современной клинической медицины. – 2020. – Т. 13. – № 6. – С. 62–67.

 Хотина В. А. Метаболизм холестерина в макрофагах / Хотина В. А., Сухоруков В. Н., Каширских Д. А., Собенин И. А., Орехов А. Н. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2020. – Т. 9. – № 2. – С. 91–101.

22. Шварц Я. Ш., Чересиз Е. А. Фиброзный процесс при атеросклерозе / Шварц Я. Ш., Чересиз Е. А. // Атеросклероз. – 2011. - T. 7. - № 2. - C. 57-66.23. Abate M. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence / Abate M., Festa A., Falco M., Lombardi A., Luce A., Grimaldi A., Zappavigna S., Sperlongano P., Irace C., Caraglia M., Misso G. // Seminars in Cell and Developmental Biology. – 2020. - T. 98. - C. 139-153.

24. Abdolmaleki F. Atherosclerosis and immunity: A perspective / Abdolmaleki F., Gheibi Hayat S. M., Bianconi V., Johnston T. P., Sahebkar A. // Trends in Cardiovascular Medicine. $-2019. - T. 29. - N_{\odot} 6. - C. 363-371.$

25. Andreu A. L. A nonsense mutation (G15059A) in the cytochrome b gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria / Andreu A. L., Bruno C., Dunne T. C., Tanji K., Shanske S., Sue C. M., Krishna S., Hadjigeorgiou G. M., Shtilbans A., Bonilla E., DiMauro S. // Annals of Neurology. – 1999. – T. 45. – \mathbb{N}° 1. – C. 127–130.

26. Antón Z. Mitochondrial import, health and mtDNA copy number variability seen when using type II and type V CRISPR effectors / Antón Z., Mullally G., Ford H. C., Kamp M. W. van der, Szczelkun M. D., Lane J. D. // Journal of Cell Science. $-2021. - T. 133. - N_{2} 18. - C. 1-16.$

27. Arai S. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spa/Api6 in atherosclerosis development / Arai S., Shelton J. M., Chen M., Bradley M. N., Castrillo A., Bookout A. L., Mak P. A., Edwards P. A., Mangelsdorf D. J., Tontonoz P., Miyazaki T. // Cell Metabolism. $-2005. - T. 1. - N_{2} 3. - C. 201-213.$

28. Arauna D. Natural Bioactive Compounds As Protectors Of Mitochondrial Dysfunction In Cardiovascular Diseases And Aging /Arauna D., Furrianca M., Espinosa-Parrilla Y., Fuentes E., Alarcón M., Palomo I. // Molecules. – 2019. – T. 24. – № 23. – C. 1–21.

29. Atchison L. A Tissue Engineered Blood Vessel Model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Using Human iPSC-derived Smooth Muscle Cells / Atchison L., Zhang H., Cao K., Truskey G. A. // Scientific Reports. $-2017. - T. 7. - N_{2} 1$.

30. Bacman S. R. MitoTALEN reduces mutant mtDNA load and restores tRNAAla levels in a mouse model of heteroplasmic mtDNA mutation / Bacman S. R., Kauppila J. H. K., Pereira C. V., Nissanka N., Miranda M., Pinto M., Williams S. L., Larsson N. G., Stewart J. B., Moraes C. T. // Nature Medicine. -2018. - T. 24. $- N_{2} 11. - C$. 1696–1700.

31. Bacman S. R. Manipulation of mitochondrial genes and mtDNA heteroplasmy /Bacman S. R., Gammage P. A., Minczuk M., Moraes C. T. // Methods in Cell Biology : Academic Press. – 2020. C. 441–487.

Baidžajevas K. Macrophage polarisation associated with atherosclerosis differentially affects their capacity to handle lipids / Baidžajevas K., Hadadi É., Lee B., Lum J., Shihui F., Sudbery I., Kiss-Tóth E., Wong S. C., Wilson H. L. // Atherosclerosis. – 2020. – T. 305. – C. 10–18.

Banoth B., Cassel S. L. Mitochondria in innate immune signaling / Banoth B.,
 Cassel S. L. // Translational Research. – 2018. – T. 202. – C. 52–68.

34. Bennett M. R., Sinha S., Owens G. K. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis / Bennett M. R., Sinha S., Owens G. K. // Circulation research. –
2016. – T. 118. – № 4. – C. 692.

35. Bezsonov E. E. Role of mitochondria in pro-inflammatory response of monocytes and macrophages. / Bezsonov E. E., Sinyov V. V., Nikiforov N., Zhuravlev A. D., Orekhov A. N. // Atherosclerosis. – 2021. – T. 331. – C. 82.

36. Bian W. P. Knock-In Strategy for Editing Human and Zebrafish Mitochondrial DNA Using Mito-CRISPR/Cas9 System / Bian W. P., Chen Y. L., Luo J. J., Wang C., Xie S. L., Pei D. S. // ACS Synthetic Biology. $-2019. - T. 8. - N_{\odot} 4. - C. 621-632.$

37. Bobryshev Y. V. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis:
Pathophysiology and Transcriptome Analysis / Bobryshev Y. V., Ivanova E. A.,
Chistiakov D. A., Nikiforov N. G., Orekhov A. N. // BioMed Research International.
2016. – T. 2016. – C. 1–13.

Boogert M. A. W. N-Glycosylation Defects in Humans Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Through Increased Low-Density Lipoprotein Receptor Expression / Boogert M. A. W. Van Den, Larsen L. E., Ali L., Kuil S. D., Chong P. L. W., Loregger A., Kroon J., Schnitzler J. G., Schimmel A. W. M., Peter J., Levels J. H. M., Steenbergen G., Morava E., Dallinga-Thie G. M., Wevers R. A., Kuivenhoven J. A., Hand N. J., Zelcer N., Rader D. J., Stroes E. S. G., Lefeber D. J., Holleboom A. G. // Circulation. – 2019. – T. 140. – № 4. – C. 280–292.

39. Boyle J. J. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype / Boyle J. J., Harrington H. A., Piper E., Elderfield K., Stark J., Landis R. C., Haskard D. O. // The American journal of pathology. -2009. - T. 174. $- N_{2} 3. - C. 1097-1108.$

40. Boyle J. J. Heme induces heme oxygenase 1 via Nrf2: role in the homeostatic macrophage response to intraplaque hemorrhage / Boyle J. J., Johns M., Lo J., Chiodini A., Ambrose N., Evans P. C., Mason J. C., Haskard D. O. // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. $-2011. - T. 31. - N_{2} 11. - C.$ 2685–2691.

41. Boyle J. J. Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection / Boyle J.

J., Johns M., Kampfer T., Nguyen A. T., Game L., Schaer D. J., Mason J. C., Haskard D. O. // Circulation Research. $-2012. - T. 110. - N_{2} 1. - C. 20-33.$

42. Brown M. D. Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation / Brown M. D., Trounce I. A., Jun A. S., Allen J. C., Wallace D. C. // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – T. 275. – N_{2} 51. – C. 39831–39836.

43. Butler J. M. DNA Extraction Methods / Butler J. M. // Advanced Topics in Forensic DNA Typing. – 2012. – C. 29–47.

44. Bywater M. J. Dysregulation of the basal RNA polymerase transcription apparatus in cancer / Bywater M. J., Pearson R. B., McArthur G. A., Hannan R. D. // Nature Reviews Cancer 2013 13:5. -2013. -T. 13. $-N_{2}$ 5. -C. 299–314.

45. Cao Q. Circular RNAs in the pathogenesis of atherosclerosis / Cao Q., Guo Z., Du S., Ling H., Song C. // Life sciences. – 2020. – T. 255.

46. Carlson-Stevermer J. Assembly of CRISPR ribonucleoproteins with biotinylated oligonucleotides via an RNA aptamer for precise gene editing / Carlson-Stevermer J., Abdeen A. A., Kohlenberg L., Goedland M., Molugu K., Lou M., Saha K. // Nature Communications 2017 8:1. – 2017. – T. 8. – N 1. – C. 1–13.

47. Chacinska A. Distinct Forms of Mitochondrial TOM-TIM Supercomplexes Define Signal-Dependent States of Preprotein Sorting / Chacinska A., Laan M. van der, Mehnert C. S., Guiard B., Mick D. U., Hutu D. P., Truscott K. N., Wiedemann N., Meisinger C., Pfanner N., Rehling P. // Molecular and Cellular Biology. – 2010. – T. $30. - N_{2} 1. - C. 307 - 318.$

48. Chacko B. K. The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. / Chacko B. K., Kramer P. A., Ravi S., Benavides G. A., Mitchell T., Dranka B. P., Ferrick D., Singal A. K., Ballinger S. W., Bailey S. M., Hardy R. W., Zhang J., Zhi D., Darley-Usmar V. M. // Clinical Science. – 2014. – T. 127. – N_{2} 6. – C. 367–373.

49. Chanput W., Mes J. J., Wichers H. J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach / Chanput W., Mes J. J., Wichers H. J. // International immunopharmacology. $-2014. - T. 23. - N_{2} 1. - C. 37-45.$

50. Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes / Chazotte B. // Cold Spring Harbor protocols. $-2011. - T. 2011. - N \ge 8. - C. 990-992.$

51. Chen J. Recent Progress in in vitro Models for Atherosclerosis Studies / Chen
J., Zhang X., Millican R., Lynd T., Gangasani M., Malhotra S., Sherwood J., Hwang
P. T., Cho Y., Brott B. C., Qin G., Jo H., Yoon Y., Jun H.-W. // Frontiers in
Cardiovascular Medicine. – 2022. – T. 8. – C. 1–23.

52. Chen Y. Eukaryotic initiation factor 6 repression mitigates atherosclerosis progression by inhibiting macrophages expressing Fasn / Chen Y., Wang Z., Xian X., Zhuang Y., Chang J., Zhan X., Han X., Chen Q., Yang Z., Chen R. // IUBMB life. $-2023. - T.75. - N_{\odot} 5. - C.440-452.$

53. Chen Z. Toll-Like Receptor 4 Mediated Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Foam Cell Formation in Vascular Smooth Muscle Cells via Src and Sirt1/3 Pathway / Chen Z., Xue Q., Cao L., Wang Y., Chen Y., Zhang X., Xiao F., Yang Y., Hayden M. R., Liu Y., Yang K. // Mediators of inflammation. – 2021. – T. 2021. – C. 1–17.

54. Chesner L. N. DNA-protein crosslinks are repaired via homologous recombination in mammalian mitochondria / Chesner L. N., Essawy M., Warner C., Campbell C. // DNA Repair. – 2021. – T. 97. – C. 103026.

55. Chinetti-Gbaguidi G., Colin S., Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis / Chinetti-Gbaguidi G., Colin S., Staels B. // Nature reviews. Cardiology. $-2015. - T. 12. - N_{2} 1. - C. 10-17.$

56. Chistiakov D. A. Immune-inflammatory responses in atherosclerosis: The role of myeloid cells / Chistiakov D. A., Kashirskikh D. A., Khotina V. A., Grechko A. V., Orekhov A. N. // Journal of Clinical Medicine. – 2019. – T. 8. – № 11.

57. Cho D. H., Kim J. K., Jo E. K. Mitophagy and innate immunity in infection / Cho D. H., Kim J. K., Jo E. K. // Molecules and Cells. -2020. - T. 43. - N 1. - C. 10–22.

58. Chomyn A. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts / Chomyn A., Martinuzzi A., Yoneda M., Daga A., Hurko O., Johns D., Lai S. T., Nonaka I., Angelini C., Attardi G. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – T. 89. – N_{2} 10. – C. 4221–4225.

59. Chrétien D. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C / Chrétien D., Bénit P., Ha H. H., Keipert S., El-Khoury R., Chang Y. T., Jastroch M., Jacobs H. T., Rustin P., Rak M. // PLoS Biology. $-2018. - T. 16. - N \ge 1. - C. 1-17.$ 60. Ciccarelli G. Mitochondrial Dysfunction: The Hidden Player in the Pathogenesis of Atherosclerosis? / Ciccarelli G., Conte S., Cimmino G., Maiorano P., Morrione A., Giordano A. // International Journal of Molecular Sciences. $-2023. - T. 24. - N \ge 2. - C. 1086.$

61. Comte C. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome / Comte C., Tonin Y., Heckel-Mager A. M., Boucheham A., Smirnov A., Auré K., Lombès A., Martin R. P., Entelis N., Tarassov I. // Nucleic acids research. $-2013. - T. 41. - N_{\rm O} 1. - C. 418-433.$

62. Dabravolski S. A. The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Cardiovascular Diseases / Dabravolski S. A., Khotina V. A., Sukhorukov V. N., Kalmykov V. A., Mikhaleva L. M., Orekhov A. N. // International journal of molecular sciences. $-2022. - T. 23. - N_{2} 2. - C. 1-16$.

63. Dahal S., Dubey S., Raghavan S. C. Homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks operates in mammalian mitochondria / Dahal S., Dubey S., Raghavan S. C. // Cellular and Molecular Life Sciences. -2018. - T. 75. $- N_{\odot} 9. - C$. 1641–1655.

64. Dasgupta S. Mitochondrial cytochrome B gene mutation promotes tumor growth in bladder cancer / Dasgupta S., Hoque M. O., Upadhyay S., Sidransky D. // Cancer research. $-2008. - T. 68. - N_{2} 3. - C. 700-706.$

65. Dash B. C. Tissue-Engineered Vascular Rings from Human iPSC-Derived Smooth Muscle Cells / Dash B. C., Levi K., Schwan J., Luo J., Bartulos O., Wu H., Qiu C., Yi T., Ren Y., Campbell S., Rolle M. W., Qyang Y. // Stem Cell Reports. $-2016. - T. 7. - N_{2} 1. - C. 19-28.$

66. Deng H. New Classification of Macrophages in Plaques: a Revolution / Deng
H., Sun Y., Zeng W., Li H., Guo M., Yang L., Lu B., Yu B., Fan G., Gao Q., Jiang
X. // Current Atherosclerosis Reports. – 2020. – T. 22. – № 8. – C. 1–9.

67. Divakaruni A. S., Jastroch M. A practical guide for the analysis, standardization, and interpretation of oxygen consumption measurements / Divakaruni A. S., Jastroch M. // Nature metabolism. – 2022. – T. 4. – № 8. – C. 978.
68. Docherty C. K. Impaired mitochondrial respiration in human carotid plaque atherosclerosis: A potential role for Pink1 in vascular smooth muscle cell energetics / Docherty C. K., Carswell A., Friel E., Mercer J. R. // Atherosclerosis. – 2018. – T. 268. – C. 1–11.

69. Dolman N. J. Tools and techniques to measure mitophagy using fluorescence microscopy / Dolman N. J., Chambers K. M., Mandavilli B., Batchelor R. H., Janes M. S. // Autophagy. – 2013. – T. 9. – № 11. – C. 1653–1662.

70. Domschke G., Gleissner C. A. CXCL4-induced macrophages in human atherosclerosis / Domschke G., Gleissner C. A. // Cytokine. – 2019. – T. 122. – C. 154141.

71. Dranka B. P., Hill B. G., Darley-Usmar V. M. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species / Dranka B. P., Hill B. G., Darley-Usmar V. M. // Free radical biology & medicine. – 2010. – T. 48. – № 7. – C. 905–914.

72. Dumont A. Mitochondria orchestrate macrophage effector functions in atherosclerosis / Dumont A., Lee M. K., Barouillet T., Murphy A., Yvan-Charvet L. // Molecular Aspects of Medicine. – 2021. – T. 77. – C. 100922.

73. Dyken S. J. Van, Locksley R. M. Interleukin-4- and Interleukin-13-Mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease / Dyken

S. J. Van, Locksley R. M. // Annual Review of Immunology. – 2013. – T. 31. – C. 317–343.

74. Eltom S. TLR4 activation induces IL-1 β release via an IPAF dependent but caspase 1/11/8 independent pathway in the lung / Eltom S., Belvisi M. G., Yew-Booth L., Dekkak B., Maher S. A., Dubuis E. D., Jones V., Fitzgerald K. A., Birrell M. A. // Respiratory Research. – 2014. – T. 15. – No 1. – C. 87–99.

75. Esper R. J. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal / Esper R. J.,
Nordaby R. A., Vilariño J. O., Paragano A., Cacharrón J. L., Machado R. A. //
Cardiovascular Diabetology. – 2006. – T. 5. – C. 4.

76. Faas M. M., Vos P. de. Mitochondrial function in immune cells in health and disease / Faas M. M., Vos P. de // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. $-2020. - T. 1866. - N \ge 10. - C. 165845.$

77. Fairhead M. SpyAvidin hubs enable precise and ultrastable orthogonal nanoassembly / Fairhead M., Veggiani G., Lever M., Yan J., Mesner D., Robinson C. V., Dushek O., Merwe P. A. Van Der, Howarth M. // Journal of the American Chemical Society. -2014. -T. 136. $-N_{2}$ 35. -C. 12355-63.

78. Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: Overview of the pathway / Falkenberg M. // Essays in Biochemistry. – 2018. – T. 62. – № 3. – C. 287–296.

79. Feil S. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophagelike cells during atherogenesis / Feil S., Fehrenbacher B., Lukowski R., Essmann F., Schulze-Osthoff K., Schaller M., Feil R. // Circulation research. – 2014. – T. 115. – N 7. – C. 662–667.

80. Feng R. Nrf2 activation drive macrophages polarization and cancer cell epithelial-mesenchymal transition during interaction / Feng R., Morine Y., Ikemoto T., Imura S., Iwahashi S., Saito Y., Shimada M. // Cell Communication and Signaling. $-2018. - T. 16. - N_{\rm O} 1. - C. 1-12$.

81. Finn A. V. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques / Finn A. V., Nakano M., Polavarapu R., Karmali V., Saeed O., Zhao X. Q., Yazdani S., Otsuka F., Davis T., Habib A.,

Narula J., Kolodgie F. D., Virmani R. // Journal of the American College of Cardiology. -2012. - T. 59. - N 2. - C. 166-177.

82. Fontana G. A., Gahlon H. L. Mechanisms of replication and repair in mitochondrial DNA deletion formation / Fontana G. A., Gahlon H. L. // Nucleic Acids Research. $-2020. - T. 48. - N \ge 20. - C. 11244 - 11258.$

83. Fuster J. J. Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies / Fuster J. J., Fernández P., González-Navarro H., Silvestre C., Nabah Y. N. A., Andrés V. // Cardiovascular Research. – 2010. – T. 86. – № 2. – C. 254–264.

84. Galliher-Beckley A. J. Caspase-1 activation and mature interleukin-1 β release are uncoupled events in monocytes / Galliher-Beckley A. J., Lan L.-Q., Aono S., Wang L., Shi J. // World Journal of Biological Chemistry. – 2013. – T. 4. – No 2. – C. 30.

85. Gammage P. A. Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs / Gammage P. A., Gaude E., Haute L. Van, Rebelo-Guiomar P., Jackson C. B., Rorbach J., Pekalski M. L., Robinson A. J., Charpentier M., Concordet J. P., Frezza C., Minczuk M. // Nucleic Acids Research. – 2016. – T. 44. – № 16. – C. 7804–7816.

86. Gammage P. A. Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo / Gammage P. A., Viscomi C., Simard M. L., Costa A. S. H., Gaude E., Powell C. A., Haute L. Van, McCann B. J., Rebelo-Guiomar P., Cerutti R., Zhang L., Rebar E. J., Zeviani M., Frezza C., Stewart J. B., Minczuk M. // Nature Medicine. $-2018. - T. 24. - N_{2} 11. - C. 1691-1695.$

87. Gammage P. A., Haute L. Van, Minczuk M. Engineered mtZFNs for manipulation of human mitochondrial DNA heteroplasmy / Gammage P. A., Haute L. Van, Minczuk M. // Methods in Molecular Biology. – 2016. – T. 1351. – C. 145–162.

88. Gammage P. A., Moraes C. T., Minczuk M. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-Ized / Gammage P. A., Moraes C. T., Minczuk M. // Trends in Genetics. – 2018. – T. 34. – № 2. – C. 101–110.

89. Gao S. Recent Progress of Chronic Stress in the Development of Atherosclerosis / Gao S., Wang X., Meng L. B., Zhang Y. M., Luo Y., Gong T., Liu D. P., Chen Z. G., Li Y. J. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2022. – T. 2022.

90. Gimbrone M. A., García-Cardeña G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis /Gimbrone M. A., García-Cardeña G. // Cardiovascular Pathology. – 2013. – T. 22. – № 1. – C. 9.

91. Gkikas I., Palikaras K., Tavernarakis N. The Role of Mitophagy in Innate Immunity / Gkikas I., Palikaras K., Tavernarakis N. // Frontiers in immunology. – 2018. – T. 9. – N_{2} 5. – C. 1–15.

92. Glanz V. Y. The role of mitochondria in cardiovascular diseases related to atherosclerosis / Glanz V. Y., Sobenin I. A., Grechko A. V., Yet S. F., Orekhov A. N. // Frontiers in Bioscience - Elite. $-2020. - T. 12. - N_{\odot} 1. - C. 102-112.$

93. Gonzalez-Freire M. Associations of peripheral artery disease with calf skeletal muscle mitochondrial DNA heteroplasmy / Gonzalez-Freire M., Moore A. Z., Peterson C. A., Kosmac K., McDermott M. M., Sufit R. L., Guralnik J. M., Polonsky T., Tian L., Kibbe M. R., Criqui M. H., Li L., Leeuwenburgh C., Ferrucci L. // Journal of the American Heart Association. – 2020. – T. 9. – № 7. – C. 1–20.

94. Gonzalez-Guerra A. Sustained Elevated Blood Pressure Accelerates Atherosclerosis Development in a Preclinical Model of Disease / Gonzalez-Guerra A., Roche-Molina M., García-Quintáns N., Sánchez-Ramos C., Martín-Pérez D., Lytvyn M., Nicolás-Hernández J. de, Rivera-Torres J., Arroyo D. F., Sanz-Rosa D., Bernal J. A. // International journal of molecular sciences. – 2021. – T. 22. – № 16. – C. 1–11.

95. Gorabi A. M. Implications of microRNAs in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Prospects for Therapy / Gorabi A. M., Ghanbari M., Sathyapalan T., Jamialahmadi T., Sahebkar A. // Current drug targets. -2021. - T.22. $- N_{2} 15. - C. 1738-1749.$ 96. Graczyk D., White R. J., Ryan K. M. Involvement of RNA Polymerase III in Immune Responses / Graczyk D., White R. J., Ryan K. M. // Molecular and cellular biology. $-2015. - T. 35. - N_{2} 10. - C. 1848-1859.$

97. Gu B., Posfai E., Rossant J. Efficient generation of targeted large insertions by microinjection into two-cell-stage mouse embryos / Gu B., Posfai E., Rossant J.
// Nature biotechnology. – 2018. – T. 36. – № 7. – C. 632–637.

98. Gu S. Base editors: Expanding the types of DNA damage products harnessed for genome editing / Gu S., Bodai Z., Cowan Q. T., Komor A. C. // Gene and Genome Editing. -2021. - T. 1. - C. 100005.

99. Gustafsson C. M., Falkenberg M., Larsson N. G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA / Gustafsson C. M., Falkenberg M., Larsson N. G. // Annual Review of Biochemistry. – 2016. – T. 85. – C. 133–160.

100. Gutierrez-Mariscal F. M. Coenzyme Q10 Supplementation for the Reduction of Oxidative Stress: Clinical Implications in the Treatment of Chronic Diseases / Gutierrez-Mariscal F. M., Larriva A. P. A. De, Limia-Perez L., Romero-Cabrera J. L., Yubero-Serrano E. M., López-Miranda J. // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – № 21. – C. 1–19.

101. Hahn A., Zuryn S. Mitochondrial Genome (mtDNA) Mutations that Generate Reactive Oxygen Species / Hahn A., Zuryn S. // Antioxidants. – 2019. – T. 8. – №
9.

102. Han R. PINK1-PRKN mediated mitophagy: differences between in vitro and in vivo models / Han R., Liu Y., Li S., Li X. J., Yang W. // Autophagy. -2023. - T. 19. $- N_{2} 5. - C. 1396-1405.$

103. Hashimoto M. MitoTALEN: A General Approach to Reduce Mutant mtDNA Loads and Restore Oxidative Phosphorylation Function in Mitochondrial Diseases / Hashimoto M., Bacman S. R., Peralta S., Falk M. J., Chomyn A., Chan D. C., Williams S. L., Moraes C. T. // Molecular Therapy. – 2015. – T. 23. – № 10. – C. 1592–1599.

104. Havel R. J., Eder H. A., Bragon J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. / Havel R.

J., Eder H. A., Bragon J. H. // The Journal of clinical investigation. – 1955. – T. 34. – № 9. – C. 1345–1353.

105. Heidari M. M. Mutation analysis of the mitochondrial tRNA genes in Iranian coronary atherosclerosis patients / Heidari M. M., Derakhshani M., Sedighi F., Foruzan-Nia S. K. // Iranian Journal of Public Health. $-2017. - T. 46. - N \ge 10. - C.$ 1379–1385.

106. Heidari M. M. Novel Point Mutations in Mitochondrial MT-CO2 Gene May Be Risk Factors for Coronary Artery Disease / Heidari M. M., Mirfakhradini F. S., Tayefi F., Ghorbani S., Khatami M., Hadadzadeh M. // Applied Biochemistry and Biotechnology. -2020. - T. 191. - N 3. - C. 1326-1339.

107. Hill B. G. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy / Hill B. G., Benavides G. A., Lancaster J. J. R., Ballinger S., Dell'Italia L., Zhang J., Darley-Usmar V. M. // Biological chemistry. -2012. - T. 393. $- N_{\rm O} 12. - C. 1485-1512.$

108. Hong S., Yu J. W. Prolonged exposure to lipopolysaccharide induces NLRP3independent maturation and secretion of interleukin (IL)-1 β in macrophages / Hong S., Yu J. W. // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2018. – T. 28. – N_{2} 1. – C. 115-121.

109. Hsu S. P., Lee W. Sen. Effects of female sex hormones on the development of atherosclerosis / Hsu S. P., Lee W. Sen // The Chinese journal of physiology. – 2020. – T. $63. - N_{\odot} 6. - C. 256-262.$

110. Hu H. The alterations of mitochondrial DNA in coronary heart disease / Hu
H., Lin Y., Xu X., Lin S., Chen X., Wang S. // Experimental and Molecular
Pathology. – 2020. – T. 114. – C. 104412.

Huang X. Recent Advances in Improving Gene-Editing Specificity through CRISPR-Cas9 Nuclease Engineering / Huang X., Yang D., Zhang J., Xu J., Chen Y. E. // Cells. – 2022. – T. 11. – № 14. – C. 1–15.

112. Hussain S. R. A. Adapting CRISPR/Cas9 System for Targeting Mitochondrial Genome / Hussain S. R. A., Yalvac M. E., Khoo B., Eckardt S., McLaughlin K. J. // Frontiers in Genetics. – 2021. – T. 12. – C. 1–10.

113. Ifrim D. C. Trained immunity or tolerance: Opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors / Ifrim D. C., Quintin J., Joosten L. A. B., Jacobs C., Jansen T., Jacobs L., Gow N. A. R., Williams D. L., Meer J. W. M. Van Der, Netea M. G. // Clinical and Vaccine Immunology. $-2014. - T. 21. - N_{2} 4. - C. 534-545.$

114. Igarashi M. The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages / Igarashi M., Osuga J., Uozaki H., Sekiya M., Nagashima S., Takahashi M., Takase S., Takanashi M., Li Y., Ohta K., Kumagai M., Nishi M., Hosokawa M., Fledelius C., Jacobsen P., Yagyu H., Fukayama M., Nagai R., Kadowaki T., Ohashi K., Ishibashi S. // Circulation Research. – 2010. – T. 107. – № 11. – C. 1387–1395.

115. OligoAnalyzer Tool - Primer analysis and Tm Calculator : сайт. – Integrated
DNA Technologies - IDT. – URL:
https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer (дата обращения: 12.07.2023).
– Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст: электронный.

116. Ishikawa T. Mitochondrial transgene expression via an artificial mitochondrial DNA vector in cells from a patient with a mitochondrial disease / Ishikawa T., Somiya K., Munechika R., Harashima H., Yamada Y. // Journal of Controlled Release. -2018. - T. 274. - C. 109-117.

117. James A. M., Murphy M. P. How mitochondrial damage affects cell function / James A. M., Murphy M. P. // J. Biomed. Sci. 2002. T. 9. № 6. C. 475–487.

118. Jebari-Benslaiman S. Pathophysiology of Atherosclerosis / Jebari-Benslaiman
S., Galicia-García U., Larrea-Sebal A., Olaetxea J. R., Alloza I., Vandenbroeck K.,
Benito-Vicente A., Martín C. // International Journal of Molecular Sciences. – 2022.
– T. 23. – № 6. – C. 1–38.

119. Jinnouchi H. Diversity of macrophage phenotypes and responses in atherosclerosis / Jinnouchi H., Guo L., Sakamoto A., Torii S., Sato Y., Cornelissen A., Kuntz S., Paek K. H., Fernandez R., Fuller D., Gadhoke N., Surve D., Romero M., Kolodgie F. D., Virmani R., Finn A. V. // Cellular and molecular life sciences. -2020. - T. 77. - № 10. - C. 1919-1932.

120. Kadl A. Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2 / Kadl A., Meher A. K., Sharma P. R., Lee M. Y., Doran A. C., Johnstone S. R., Elliott M. R., Gruber F., Han J., Chen W., Kensler T., Ravichandran K. S., Isakson B. E., Wamhoff B. R., Leitinger N. // Circulation Research. – 2010. – T. 107. – N_{2} 6. – C. 737–746.

121. Kamenisch Y. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging / Kamenisch Y., Fousteri M., Knoch J., Thaler A. K. Von, Fehrenbacher B., Kato H., Becker T., Dollé M. E. T., Kuiper R., Majora M., Schaller M., Horst G. T. J. Van Der, Steeg H. Van, Röcken M., Rapaport D., Krutmann J., Mullenders L. H., Berneburg M. // Journal of Experimental Medicine. – 2010. – T. 207. – № 2. – C. 379–390.

122. Kang J., Pervaiz S. Mitochondria: Redox metabolism and dysfunction / Kang J., Pervaiz S. // Biochemistry Research International. – 2012. – T. 2012. – C. 1–14. 123. Kastaniotis A. J. Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology / Kastaniotis A. J., Autio K. J., Kerätär J. M., Monteuuis G., Mäkelä A. M., Nair R. R., Pietikäinen L. P., Shvetsova A., Chen Z., Hiltunen J. K. // Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2017. – T. 1862. – № 1. – C. 39–48.

124. Katayama T. A mitochondrial delivery system using liposome-based nanocarriers that target myoblast cells / Katayama T., Kinugawa S., Takada S., Furihata T., Fukushima A., Yokota T., Anzai T., Hibino M., Harashima H., Yamada Y. // Mitochondrion. – 2019. – T. 49. – C. 66–72.

125. Khodapasand E. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? / Khodapasand E., Jafarzadeh N., Farrokhi F., Kamalidehghan B., Houshmand M. // Iranian Biomedical Journal. – 2015. – T. 19. – \mathbb{N} 2. – C. 69–75.

126. Khotina V. A. Challenges of mitochondrial DNA editing in mammalian cells: focus on treatment of cardiovascular disease / Khotina V. A., Ekta M. B., Baig M.

S., Wu W. K., Grechko A. V., Sukhorukov V. N. // Vessel Plus. – 2022. – T. 6. – № 65. – C. 1–20.

127. Khotina V. A. Impaired mitochondrial respiration of monocytes: a potential role of atherosclerosis-associated mutation m.15059G>A in the Cytochrome b gene in cell energetics / Khotina V. A., Sinyov V. V., Lee A. A., Kalmykov A. V., Sukhorukov V. N. // Proceedings of The 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, September 8–9, 2023. – C. 52.

128. Khotina V. A. Mutation m.15059G>A in Cytb gene associated with macrophage pro-inflammatory cytokines production / Khotina V. A., Zhuravlev A. D., Sukhorukov V. N., Sobenin I. A., Sazonova M. A. // Atherosclerosis. – 2023. – T. 379. – Supplement 1. – C. 19–20.

129. Khotina V. A. Atherosclerosis-associated m.15059G>A mutation in Cytochrome B gene: the role in TNF α secretion and immune tolerance formation by monocytes / Khotina V. A., Zhuravlev A. D., Bagheri-Ekta M., Sukhorukov V. N. // Proceedings of The 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, September 8–9, 2023. – C. 51.

130. Khotina V. A. Correlation between atherosclerosis-associated mutation in Cytochrome B gene and NLRP3 inflammasome activation in macrophages / Khotina V. A., Zhuravlev A. D., Lee A. A., Kalmykov A. V., Sukhorukov V. N. // Proceedings of The 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, September 8–9, 2023. – C. 53.

131. Khotina V. A. Creation of Mitochondrial Disease Models Using Mitochondrial DNA Editing / Khotina V. A., Vinokurov A. Y., Bagheri Ekta M., Sukhorukov V. N., Orekhov A. N. // Biomedicines. -2023. - T. 11. - N 2. - C. 1-28.

132. Khotina V. A. Mitochondrial Dysfunction Associated with mtDNA Mutation: Mitochondrial Genome Editing in Atherosclerosis Research / Khotina V. A., Vinokurov A. Y., Sinyov V. V., Zhuravlev A. D., Popov D. Y., Sukhorukov V. N., Sobenin I. A., Orekhov A. N. // Current Medicinal Chemistry. – 2024. – T. 31. – C. 1–19.

133. 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 / Khotina V. A., Bagheri-Ekta M., Sukhorukov V. N. // Proceedings of The 16th Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease Congress 2023 (APSAVD2023), Kuala Lumpur, Malaysia, September 8–9, 2023. – C. 54.

134. 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 / Khotina V. A., Sinyov V. V., Sukhorukov V. N. // Cardiovascular Innovations and Applications. -2023. -T. 8. - Supplement 1. - C. 13.

135. Khotina V. A., Sukhorukov V. N. Nonsense mutation in mitochondrial CYTB gene and macrophage lipid metabolism / Khotina V. A., Sukhorukov V. N. // Atherosclerosis. – 2023a. – T. 379. – Supplement 1. – C. 65.

136. 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 / Khotina V. A., Sukhorukov V. N. // Cardiovascular Innovations and Applications. – 2023b. – T. 8. – Supplement 1. – C. 12–13.

137. 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 / Khotina V. A., Sukhorukov V. N., Sobenin I. A. // Atherosclerosis. – 2023a. – T. 379. – Supplement 1. – C. 20.

138. Khotina V. A., Sukhorukov V. N., Sobenin I. A. Association of mutation in the mtDNA Cytb gene with macrophage proliferation and synthetic activity /

Khotina V. A., Sukhorukov V. N., Sobenin I. A. // Atherosclerosis. – 2023b. – T. 379. – Supplement 1. – C. 29.

139. 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 / Khotina V. A., Zhuravlev A. D., Sukhorukov V. N. // Cardiovascular Innovations and Applications. – 2023a. – T. 8. – Supplement 1. – C. 12.

140. 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 / Khotina V. A., Zhuravlev A. D., Sukhorukov V. N. // Cardiovascular Innovations and Applications. – 2023b. – T. 8. – Supplement 1. – C. 13.

141. Kirichenko T. V. Data on association of mitochondrial heteroplasmy with carotid intima-media thickness in subjects from Russian and Kazakh populations / Kirichenko T. V., Ragino Y. I., Voevoda M. I., Urazalina S. J., Khasanova Z. B., Orekhova V. A., Sinyov V. V., Sazonova M. A., Orekhov A. N., Sobenin I. A. // Data in Brief. -2020. - T. 29. - C. 1-7.

142. Kirichenko T. V. Impact of mitochondrial DNA mutations on carotid intimamedia thickness in the Novosibirsk region / Kirichenko T. V., Ryzhkova A. I., Sinyov V. V., Sazonova M. D., Orekhova V. A., Karagodin V. P., Gerasimova E. V., Voevoda M. I., Orekhov A. N., Ragino Y. I., Sobenin I. A., Sazonova M. A. // Life. $-2020. - T. 10. - N_{\odot} 9. - C. 1-9.$

143. Kleinstiver B. P. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects / Kleinstiver B. P., Pattanayak V., Prew M. S., Tsai S. Q., Nguyen N. T., Zheng Z., Joung J. K. // Nature. – 2016. – T. 529. – № 7587. – C. 490–495.

144. Koga Y. Analysis of cybrids harboring MELAS mutations in the mitochondrial tRNALeu(UUR) gene / Koga Y., Davidson M., Schon E. A., King M. P. // Muscle & Nerve. $-1995. - T. 18. - N \ge 14 S. - C. 119-123.$

145. Kondapalli C. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65 / Kondapalli C., Kazlauskaite A., Zhang N., Woodroof H. I., Campbell D. G., Gourlay R., Burchell L., Walden H., MacArtney T. J., Deak M., Knebel A., Alessi D. R., Muqit M. M. K. // Open Biology. $-2012. - T. 2. - N \ge 5. - C. 120080.$

146. Kornfeld O. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species at the Heart of the Matter: New Therapeutic Approaches for Cardiovascular Diseases / Kornfeld O. S., Hwang S., Disatnik M. H., Chen C. H., Qvit N., Mochly-Rosen D. // Circulation research. $-2015. - T. 116. - N_{2} 11. - C. 1783.$

147. Kretzschmar C. Polymorphisms of the murine mitochondrial ND4, CYTB and COX3 genes impact hematopoiesis during aging / Kretzschmar C., Roolf C., Timmer K., Sekora A., Knübel G., Escobar H. M., Fuellen G., Ibrahim S. M., Tiedge M., Baltrusch S., Jaster R., Köhling R., Junghanss C. // Oncotarget. – 2016. – T. 7. – N_{2} 46. – C. 74460.

148. Kukat C. Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid / Kukat C., Davies K. M., Wurm C. A., Spåhr H., Bonekamp N. A., Kühl I., Joos F., Polosa P. L., Park C. B., Posse V., Falkenberg M., Jakobs S., Kühlbrandt W., Larsson N. G. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – T. 112. – N_{2} 36. – C. 11288–11293.

149. Lee J. Using Sniper-Cas9 to Minimize Off-target Effects of CRISPR-Cas9 Without the Loss of On-target Activity Via Directed Evolution / Lee J., Jung M. H., Jeong E., Lee J. K. // Journal of Visualized Experiments. $-2019. - T. 2019. - N_{\odot}$ 144. -C. 59202.

150. Lee J. K. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity / Lee J. K., Jeong E., Lee J., Jung M., Shin E., Kim Y. Hoon, Lee K., Jung I., Kim D., Kim S., Kim J. S. // Nature communications. $-2018. - T. 9. - N_{\odot} 1. - C. 1-10.$

151. Lee S. J. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress / Lee S. J., Zhang J., Choi A. M. K., Kim H. P. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. -2013. - T. 2013. - C. 1-10.

152. Liang Y. The Mechanisms of the Development of Atherosclerosis in Prediabetes / Liang Y., Wang M., Wang C., Liu Y., Naruse K., Takahashi K. // International journal of molecular sciences. $-2021. - T. 22. - N_{\odot} 8. - C. 1-15.$

153. Libby P. Atherosclerosis / Libby P., Buring J. E., Badimon L., Hansson G. K.,
Deanfield J., Bittencourt M. S., Tokgözoğlu L., Lewis E. F. // Nature Reviews
Disease Primers 2019 5:1. – 2019. – T. 5. – № 1. – C. 1–18.

154. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis / Libby P. // Nature. – 2021. – T. 592. – № 7855. – C. 524–533.

155. Linton M. F. Macrophage Apoptosis and Efferocytosis in the Pathogenesis of Atherosclerosis / Linton M. F., Babaev V. R., Huang J., Linton E. F., Tao H., Yancey P. G. // Circulation journal. – 2016. – T. 80. – № 11. – C. 2259–2268.

156. Liu J. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice / Liu J., Thewke D. P., Su Y. R., Linton M. F., Fazio S., Sinensky M. S. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. $-2005. - T. 25. - N_{2} 1. - C. 174-179.$

157. Liu S. OXPHOS deficiency activates global adaptation pathways to maintain mitochondrial membrane potential / Liu S., Liu S., He B., Li L., Li L., Wang J., Cai T., Chen S., Jiang H. // EMBO reports. – 2021. – T. 22. – № 4. – C. 51606.

158. Lou Y. Antimony exposure promotes bladder tumor cell growth by inhibiting PINK1-Parkin-mediated mitophagy / Lou Y., Ma C., Liu Z., Shi J., Zheng G., Zhang C., Zhang Z. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2021. – T. 221. – C. 112420.

159. Louis K. S., Siegel A. C. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods / Louis K. S., Siegel A. C. // Methods in Molecular Biology : Humana Press Inc., 2011. C. 7–12.

160. Loutre R. Anti-replicative recombinant 5S rRNA molecules can modulate the mtDNA heteroplasmy in a glucose-dependent manner / Loutre R., Heckel A. M., Jeandard D., Tarassov I., Entelis N. // PLoS ONE. $-2018. - T. 13. - N_{2} 6. - C. 1-20.$

161. Loutre R. Can Mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and Contra / Loutre R., Heckel A. M., Smirnova A., Entelis N., Tarassov I. // IUBMB Life. – 2018. – T.
70. – № 12. – C. 1233–1239.

162. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. / Lowry O.
H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // The Journal of biological chemistry.
- 1951. - T. 193. - № 1. - C. 265–275.

163. Lu M., Gursky O. Aggregation and fusion of low-density lipoproteins in vivo and in vitro / Lu M., Gursky O. // Biomolecular concepts. – 2013. – T. 4. – № 5. – C. 501–518.

164. Lu N. NLRP3-Mediated Inflammation in Atherosclerosis and Associated Therapeutics / Lu N., Cheng W., Liu D., Liu G., Cui C., Feng C., Wang X. // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – T. 10. – C. 1–16.

165. Lyamzaev K. G. MitoCLox: A Novel Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe for Tracing Lipid Peroxidation / Lyamzaev K. G., Sumbatyan N. V., Nesterenko A. M., Kholina E. G., Voskoboynikova N., Steinhoff H. J., Mulkidjanian A. Y., Chernyak B. V. // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2019. – T. 2019. – C. 1–11.

166. Lyublinskaya O. G. Redox environment in stem and differentiated cells: A quantitative approach / Lyublinskaya O. G., Ivanova J. S., Pugovkina N. A., Kozhukharova I. V., Kovaleva Z. V., Shatrova A. N., Aksenov N. D., Zenin V. V., Kaulin Y. A., Gamaley I. A., Nikolsky N. N. // Redox biology. – 2017. – T. 12. – C. 758–769.

167. Malumbres M., Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases / Malumbres M., Barbacid M. // Trends in Biochemical Sciences. – 2005. – T. 30. – № 11. – C. 630–641.

168. Man J. J., Beckman J. A., Jaffe I. Z. Sex as a Biological Variable in Atherosclerosis / Man J. J., Beckman J. A., Jaffe I. Z. // Circulation research. – 2020.
– T. 126. – № 9. – C. 1297.

169. Markin A. M. Disturbance of mitochondrial dynamics and mitochondrial therapies in atherosclerosis / Markin A. M., Khotina V. A., Zabudskaya X. G.,

Bogatyreva A. I., Starodubova A. V., Ivanova E., Nikiforov N. G., Orekhov A. N. // Life. – 2021. – T. 11. – № 2. – C. 1–19.

170. Markov O. V. The use of mannose-containing liposomal compositions for the production of antitumor dendritic cell vaccines / Markov O. V., Mironova N. L., Maslov M. A., Shmendel E. V., Zenkova M. A. // Biotechnology – to future medicine. Novosibirsk, 2017. C. 75.

171. Martín-Maestro P. Autophagy induction by Bexarotene promotes mitophagy in Presenilin 1 familial Alzheimer's disease iPSC-derived neural stem cells / Martín-Maestro P., Sproul A., Martinez H., Paquet D., Gerges M., Noggle S., Starkov A. A.
// Molecular neurobiology. – 2019. – T. 56. – № 12. – C. 8220.

172. Martinet W. Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis
/ Martinet W., Coornaert I., Puylaert P., Meyer G. R. Y. De // Front. Pharmacol. –
2019. – T. 10. – C. 1–18.

173. Martinez F. O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment / Martinez F. O., Gordon S. // F1000prime reports. $-2014. - T. 6. - N_{2} 13. - C. 1-13.$

174. Masucci J. P. In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys)gene: two genotypes produce similar phenotypes / Masucci J. P., Davidson M., Koga Y., Schon E. A., King M. P. // Molecular and Cellular Biology. $-1995. - T. 15. - N_{\odot} 5. - C. 2872-2881.$

175. Matam K. Evidence for the presence of somatic mitochondrial DNA mutations in right atrial appendage tissues of coronary artery disease patients / Matam K., Shaik N. A., Aggarwal S., Diwale S., Banaganapalli B., Al-Aama J. Y., Elango R., Rao P., Hasan Q. // Molecular Genetics and Genomics. $-2014. - T. 289. - N_{\rm P} 4. - C. 533-540.$

176. Mbantenkhu M. Mgm101 is a Rad52-related protein required for mitochondrial DNA recombination / Mbantenkhu M., Wang X., Nardozzi J. D., Wilkens S., Hoffman E., Patel A., Cosgrove M. S., Chen X. J. // Journal of Biological Chemistry. $-2011. - T. 286. - N_{\odot} 49. - C. 42360-42370.$

177. McGuire P. J. Mitochondrial dysfunction and the aging immune system / McGuire P. J. // Biology. $-2019. - T. 8. - N_{2} 2.$

178. McKenzie M. Mitochondrial ND5 Gene Variation Associated with Encephalomyopathy and Mitochondrial ATP Consumption / McKenzie M., Liolitsa D., Akinshina N., Campanella M., Sisodiya S., Hargreaves I., Nirmalananthan N., Sweeney M. G., Abou-Sleiman P. M., Wood N. W., Hanna M. G., Duchen M. R. // Journal of Biological Chemistry. $-2007. - T. 282. - N_{\odot} 51. - C. 36845-36852.$

179. Mercer J. R. DNA Damage Links Mitochondrial Dysfunction to Atherosclerosis and the Metabolic Syndrome / Mercer J. R., Cheng K. K., Figg N., Gorenne I., Mahmoudi M., Griffin J., Vidal-Puig A., Logan A., Murphy M. P., Bennett M. // Circulation research. $-2010. - T. 107. - N \ge 8. - C. 1021.$

180. Mok B. Y. A bacterial cytidine deaminase toxin enables CRISPR-free mitochondrial base editing / Mok B. Y., Moraes M. H. de, Zeng J., Bosch D. E., Kotrys A. V., Raguram A., Hsu F. S., Radey M. C., Peterson S. B., Mootha V. K., Mougous J. D., Liu D. R. // Nature. – 2020. – T. 583. – № 7817. – C. 631–637.

181. Moroni L. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine / Moroni L., Burdick J. A., Highley C., Lee S. J., Morimoto Y., Takeuchi S., Yoo J. J. // Nature Reviews Materials. $-2018. - T. 3. - N_{2} 5. - C. 21-37.$

182. Mougiakos I. Characterizing a thermostable Cas9 for bacterial genome editing and silencing / Mougiakos I., Mohanraju P., Bosma E. F., Vrouwe V., Finger Bou M., Naduthodi M. I. S., Gussak A., Brinkman R. B. L., Kranenburg R. Van, Oost J. Van Der // Nature Communications. – 2017. – T. 8. – N_{2} 1.

183. Murray P. J. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines / Murray P. J., Allen J. E., Biswas S. K., Fisher E. A., Gilroy D. W., Goerdt S., Gordon S., Hamilton J. A., Ivashkiv L. B., Lawrence T., Locati M., Mantovani A., Martinez F. O., Mege J. L., Mosser D. M., Natoli G., Saeij J. P., Schultze J. L., Shirey K. A., Sica A., Suttles J., Udalova I., van Ginderachter J. A., Vogel S. N., Wynn T. A. // Immunity. $-2014. - T. 41. - N_{2} 1. - C. 14-20.$

184. Murugan K. CRISPR-Cas12a has widespread off-target and dsDNA-nicking effects / Murugan K., Seetharam A. S., Severin A. J., Sashital D. G. // Journal of Biological Chemistry. – 2020. – T. 295. – № 17. – C. 5538–5553.

185. Mustafa M. F. Pathogenic mitochondria DNA mutations: Current detection tools and interventions / Mustafa M. F., Fakurazi S., Abdullah M. A., Maniam S. // Genes. $-2020. - T. 11. - N \ge 2. - C. 192.$

186. Nadesalingam A. Hypertonic saline suppresses NADPH oxidase-dependent neutrophil extracellular trap formation and promotes apoptosis / Nadesalingam A., Chen J. H. K., Farahvash A., Khan M. A. // Frontiers in Immunology. – 2018. – T. 9. – C. 1–18.

187. Nakahara T. Coronary Artery Calcification: From Mechanism to Molecular Imaging / Nakahara T., Dweck M. R., Narula N., Pisapia D., Narula J., Strauss H.
W. // JACC. Cardiovascular imaging. – 2017. – T. 10. – № 5. – C. 582–593.

188. Netea M. G. Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence / Netea M. G. // European Journal of Clinical Investigation. $-2013. - T. 43. - N_{2} 8. - C. 881-884.$

189. Neumeister P. Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages / Neumeister P., Pixley F. J., Xiong Y., Xie H., Wu K., Ashton A., Cammer M., Chan A., Symons M., Stanley E. R., Pestell R. G. // Molecular Biology of the Cell. – 2003. – T. 14. – N_{2} 5. – C. 2005–2015.

190. Nhan T. Q. The p17 cleaved form of caspase-3 is present within viable macrophages in vitro and in atherosclerotic plaque / Nhan T. Q., Liles W. C., Chait A., Fallon J. T., Schwartz S. M. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. $-2003. - T. 23. - N_{\odot} 7. - C. 1276-1282.$

191. Nhan T. Q., Liles W. C., Schwartz S. M. Role of caspases in death and survival of the plaque macrophage / Nhan T. Q., Liles W. C., Schwartz S. M. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. $-2005. - T. 25. - N_{\odot} 5. - C.$ 895–903.

192. Nicholls T. J., Gustafsson C. M. Separating and Segregating the Human Mitochondrial Genome / Nicholls T. J., Gustafsson C. M. // Trends in Biochemical Sciences. $-2018. - T. 43. - N_{2} 11. - C. 869-881.$

193. Nicholls T. J., Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA / Nicholls T. J., Minczuk M. // Experimental Gerontology. – 2014. – T. 56. – C. 175–181.

194. Nicolson G. L. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Disease: Treatment With Natural Supplements / Nicolson G. L. // Integrative Medicine: A Clinician's Journal. -2014. - T. 13. - N = 4. - C. 35.

195. Nowak W. N. Reactive Oxygen Species Generation and Atherosclerosis / Nowak W. N., Deng J., Ruan X. Z., Xu Q. // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. $-2017. - T. 37. - N \le 5. - C. 41-52.$

196. Omasanggar R. Mitochondrial DNA mutations in Malaysian female breast cancer patients / Omasanggar R., Yu C. Y., Ang G. Y., Emran N. A., Kitan N., Baghawi A., Ahmad A. F., Abdullah M. A., Teh L. K., Maniam S. // PLoS ONE. – $2020. - T. 15. - N_{\odot} 5. - C. 0233461.$

197. Orekhov A. N. Susceptibility of monocytes to activation correlates with atherogenic mitochondrial DNA mutations / Orekhov A. N., Zhelankin A. V., Kolmychkova K. I., Mitrofanov Ky., Kubekina M. V., Ivanova E. A., Sobenin I. A. // Experimental and Molecular Pathology. $-2015. - T. 99. - N_{2} 3. - C. 672-676.$

198. Orekhov A. N. Mitochondrion as a Selective Target for the Treatment of Atherosclerosis: Role of Mitochondrial DNA Mutations and Defective Mitophagy in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Chronic Inflammation / Orekhov A. N., Poznyak A. V., Sobenin I. A., Nikifirov N. N., Ivanova E. A. // Current Neuropharmacology. – 2019. – T. 18. – N 11. – C. 1064–1075.

199. Orekhov A. N. Role of phagocytosis in the pro-inflammatory response in LDL-induced foam cell formation; a transcriptome analysis / Orekhov A. N., Nikiforov N. G., Sukhorukov V. N., Kubekina M. V., Sobenin I. A., Wu W. K., Foxx K. K., Pintus S., Stegmaier P., Stelmashenko D., Kel A., Gratchev A. N.,

Melnichenko A. A., Wetzker R., Summerhill V. I., Manabe I., Oishi Y. // International Journal of Molecular Sciences. $-2020. - T. 21. - N_{2} 3. - C. 817.$

200. Orekhov A. N. Possible Role of Mitochondrial DNA Mutations in Chronification of Inflammation: Focus on Atherosclerosis / Orekhov A. N., Nikiforov N. N., Ivanova E. A., Sobenin I. A. // Journal of Clinical Medicine. - 2020. - T. 9. - No 4. - C. 978.

201. Orekhov A. N. The Role of Mitochondrial Mutations in Chronification of Inflammation: Hypothesis and Overview of Own Data / Orekhov A. N., Nikiforov N. G., Omelchenko A. V., Sinyov V. V., Sobenin I. A., Vinokurov A. Y., Orekhova V. A. // Life. – 2022. – T. 12. – N_{2} 8. – C. 1–15.

202. Orekhov A. N. Role of Mitochondria in the Chronification of Inflammation:
Focus on Dysfunctional Mitophagy and Mitochondrial DNA Mutations / Orekhov
A. N., Summerhill V. I., Khotina V. A., Popov M. A., Uzokov J. K., Sukhorukov V.
N. // Gene Expression. – 2023. – T. 22. – № 4. – C. 329–344.

203. Orekhov A. N. Defective Mitophagy Impairs Response to Inflammatory Activation of Macrophage-Like Cells / Orekhov A. N., Zhuravlev A. D., Vinokurov A. Y., Nikiforov N. G., Omelchenko A. V, Sukhorukov V. N., Sinyov V. V, Sobenin I. A. // Current medicinal chemistry. – 2025. – T. 32. – № 1. – C. 111–122.

204. Orning P., Lien E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity / Orning P., Lien E. // Journal of Leukocyte Biology. -2021. - T.109. $- N_{2} 1. - C. 121-141.$

205. Orr J., Adamson G., Lindgren F. Preparative Ultracentrifugation and Analytic Ultracentrifugation of Plasma Lipoproteins / Orr J., Adamson G., Lindgren F. // Lipoproteins. – 1990. – C. 1–43.

206. Ott M., Amunts A., Brown A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis / Ott M., Amunts A., Brown A. // Annual Review of Biochemistry.
2016. – T. 85. – C. 77–101.

207. Parthasarathy S. Oxidized Low-Density Lipoprotein / Parthasarathy S.,
Raghavamenon A., Garelnabi M. O., Santanam N. // Methods in Molecular Biology.
- 2010. - T. 610. - C. 403.

208. Patterson M. T., Williams J. W. Metabolic regulation of macrophage proliferation and function in atherosclerosis / Patterson M. T., Williams J. W. // Current opinion in lipidology. $-2021. - T. 32. - N_{\odot} 5. - C. 293-300.$

209. Paule M. R., White R. J. Transcription by RNA polymerases I and III / Paule M. R., White R. J. // Nucleic Acids Research. $-2000. - T. 28. - N_{2} 6. - C. 1283.$

210. Peker N. Loss of Parkin impairs mitochondrial function and leads to muscle atrophy / Peker N., Donipadi V., Sharma M., McFarlane C., Kambadur R. // American Journal of Physiology - Cell Physiology. – 2018. – T. 315. – \mathbb{N} 2. – C. 164–185.

211. Pereira C. V. mitoTev-TALE: a monomeric DNA editing enzyme to reduce mutant mitochondrial DNA levels / Pereira C. V., Bacman S. R., Arguello T., Zekonyte U., Williams S. L., Edgell D. R., Moraes C. T. // EMBO Molecular Medicine. $-2018. - T. 10. - N_{2} 9. - C. 1-11.$

212. Perez Ortiz J. M., Swerdlow R. H. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Role in pathogenesis and novel therapeutic opportunities / Perez Ortiz J. M., Swerdlow R. H. // British Journal of Pharmacology. $-2019. - T. 176. - N \ge 18. - C.$ 3489.

213. Poznyak A. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation / Poznyak A., Grechko A. V., Poggio P., Myasoedova V. A., Alfieri V., Orekhov A. N. // International journal of molecular sciences. $-2020. - T. 21. - N_{\odot} 5. - C. 1-13.$

214. Prajapat S. K., Maharana K. C., Singh S. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of endothelial dysfunction / Prajapat S. K., Maharana K. C., Singh S. // Molecular and cellular biochemistry. $-2023. - T. 479. - N \ge 8. - C. 1999-2016.$

215. Primer-BLAST. Primer designing tool : сайт. – Primer-BLAST. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on (дата обращения: 12.07.2023).

216. Protasoni M., Zeviani M. Mitochondrial structure and bioenergetics in normal and disease conditions / Protasoni M., Zeviani M. // International Journal of Molecular Sciences. -2021. - T. 22. - N 2. - C. 1-55.

217. Qin Y. Mitochondrial tRNA variants in Chinese subjects with coronary heart disease / Qin Y., Xue L., Jiang P., Xu M., He Y., Shi S., Huang Y., He J., Mo J. Q., Guan M. X. // Journal of the American Heart Association. $-2014. - T. 3. - N \ge 1. - C. 1-12.$

218. Quan Y. Mitochondrial ROS-Modulated mtDNA: A Potential Target for Cardiac Aging / Quan Y., Xin Y., Tian G., Zhou J., Liu X. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2020. – T. 2020. – C. 1–11.

219. Rajamannan N. M. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve / Rajamannan N. M., Subramaniam M., Springett M., Sebo T. C., Niekrasz M., McConnell J. P., Singh R. J., Stone N. J., Bonow R. O., Spelsberg T. C. // Circulation. – 2002. – T. 105. – N_{2} 22. – C. 2660–2665.

220. Rana M. An Out-of-Frame Cytochrome b Gene Deletion from a Patient with Parkinsonism Is Associated with Impaired Complex III Assembly and an Increase in Free Radical Production / Rana M., Coo I. De, Diaz F., Smeets H., Moraes C. T. // Ann Neurol. $-2000. - T. 48. - N \le 5. - C. 774 - 781.$

221. Randolph G. J. Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis / Randolph G. J. // Circulation research. – 2014. – T. 114. – № 11. – C. 1757–1771.

222. Reddy P. Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing / Reddy P., Ocampo A., Suzuki K., Luo J., Bacman S. R., Williams S. L., Sugawara A., Okamura D., Tsunekawa Y., Wu J., Lam D., Xiong X., Montserrat N., Esteban C. R., Liu G. H., Sancho-Martinez I., Manau D., Civico S., Cardellach F., Del Mar O'Callaghan M., Campistol J., Zhao H., Campistol J. M., Moraes C. T., Izpisua Belmonte J.C. // Cell. – 2015. – T. 161. – No 3. – C. 459–469. 223. Rekhter M. D., Gordon D. Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques. / Rekhter M. D., Gordon D. // The American Journal of Pathology. – 1995. – T. 147. – No 3. – C. 668.

224. Remmerie A., Scott C. L. Macrophages and lipid metabolism / Remmerie A.,
Scott C. L. // Cellular Immunology. – 2018. – T. 330. – C. 27–42.
225. Ribas V., García-Ruiz C., Fernández-Checa J. C. Glutathione and mitochondria / Ribas V., García-Ruiz C., Fernández-Checa J. C. // Frontiers in Pharmacology. – 2014. – T. 5. – C. 102805.

226. Riley J. S., Tait S. W. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity / Riley J. S., Tait S. W. // EMBO reports. $-2020. - T. 21. - N_{2} 4. - C. 49799.$

227. Rodrigues S. C., Cardoso R. M. S., Duarte F. V. Mitochondrial microRNAs: A putative role in tissue regeneration / Rodrigues S. C., Cardoso R. M. S., Duarte F. V. // Biology. $-2020. - T. 9. - N_{2} 12. - C. 1-18.$

228. Ropraz P. Simultaneous Study of the Recruitment of Monocyte Subpopulations Under Flow In Vitro / Ropraz P., Imhof B. A., Matthes T., Wehrle-Haller B., Sidibé A. // Journal of Visualized Experiments. – 2018. – T. 2018. – № 141.

229. Sakai M. Macrophage proliferation in atherosclerosis / Sakai M., Kobori S.,
Miyazaki A., Horiuchi S. // Current opinion in lipidology. – 2000. – T. 11. – № 5. –
C. 503–509.

230. Sanda G. M. Aggregated LDL turn human macrophages into foam cells and induce mitochondrial dysfunction without triggering oxidative or endoplasmic reticulum stress / Sanda G. M., Stancu C. S., Deleanu M., Toma L., Niculescu L. S., Sima A. V. // PloS one. $-2021. - T. 16. - N^{\circ} 1.$

231. Sazonova M. Mitochondrial genome sequencing in atherosclerosis: what's next? / Sazonova M., Shkurat T., Demakova N., Zhelankin A., Barinova V., Sobenin I., Orekhov A. // Current Pharmaceutical Design. -2016. - T. 22. - N = 3. - C. 390-396.

232. Sazonova M. A. Mosaicism of mitochondrial genetic variation in atherosclerotic lesions of the human aorta / Sazonova M. A., Sinyov V. V., Barinova V. A., Ryzhkova A. I., Zhelankin A. V., Postnov A. Y., Sobenin I. A., Bobryshev Y. V., Orekhov A. N. // BioMed Research International. – 2015. – T. 2015. – C. 1–9.

233. Sazonova M. A. Dataset of mitochondrial genome variants associated with asymptomatic atherosclerosis / Sazonova M. A., Zhelankin A. V., Barinova V. A.,

Sinyov V. V., Khasanova Z. B., Postnov A. Y., Sobenin I. A., Bobryshev Y. V., Orekhov A. N. // Data in Brief. – 2016. – T. 7. – C. 1570–1575.

234. Sazonova M. A. Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis / Sazonova M. A., Sinyov V. V., Ryzhkova A. I., Galitsyna E. V., Khasanova Z. B., Postnov A. Y., Yarygina E. I., Orekhov A. N., Sobenin I. A. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2017. – T. 2017. – C. 1–7.

235. Sazonova M. A. New markers of atherosclerosis: a threshold level of heteroplasmy in mtDNA mutations / Sazonova M. A., Ryzhkova A. I., Sinyov V. V., Galitsyna E. V., Orekhova V. A., Melnichenko A. A., Orekhov A. N., Ravani A. L., Sobenin I. A. // Vessel Plus. – 2017. – T. 1. – C. 182–191.

236. Sazonova M. A. Cybrid models of pathological cell processes in different diseases / Sazonova M. A., Sinyov V. V., Ryzhkova A. I., Galitsyna E. V., Melnichenko A. A., Postnov A. Y., Orekhov A. N., Sobenin I. A. // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2018. – T. 2018. – C. 1–6.

237. Sazonova M. A. MtDNA mutations linked with left ventricular hypertrophy / Sazonova M. A., Sinyov V. V., Ryzhkova A. I., Sazonova M. D., Khasanova Z. B., Sobenin I. A. // Vessel Plus. – 2019. – T. 3. – C. 5.

238. Sazonova M. A. Mitochondrial mutations associated with cardiac angina / Sazonova M. A., Ryzhkova A. I., Sinyov V. V., Sazonova M. D., Nikitina N. N., Shkurat T. P., Sobenin I. A., Orekhov A. N. // Vessel Plus. – 2019. – T. 3. – C. 8.

239. Sazonova M. A. Creation of cybrid cultures containing mtDNA mutations m.12315G>A and m.1555G>A, associated with atherosclerosis / Sazonova M. A., Sinyov V. V., Ryzhkova A. I., Sazonova M. D., Khasanova Z. B., Shkurat T. P., Karagodin V. P., Orekhov A. N., Sobenin I. A. // Biomolecules. $-2019. - T. 9. - N_{\odot}$ 9. - C. 499.

240. Sazonova M. D. Cybrid culture with mtDNA mutation M.5178C>A, linked with atherosclerosis: Obtaining and analysis / Sazonova M. D., Sinyov V. V., Ryzhkova A. I., Kirichenko T. V., Doroschuk N. A., Karagodin V. P., Orekhov A. N., Sobenin I. A., Sazonova M. A. // Atherosclerosis. – 2021. – T. 331. – C. 99.

241. Schneider J. G. Macrophage fatty-acid synthase deficiency decreases dietinduced atherosclerosis / Schneider J. G., Yang Z., Chakravarthy M. V., Lodhi I. J., Wei X., Turk J., Semenkovich C. F. // The Journal of biological chemistry. – 2010. – T. 285. – N_{2} 30. – C. 23398–23409.

242. Schnoor M. Production of Type VI Collagen by Human Macrophages: A New Dimension in Macrophage Functional Heterogeneity / Schnoor M., Cullen P., Lorkowski J., Stolle K., Robenek H., Troyer D., Rauterberg J., Lorkowski S. // The Journal of Immunology. $-2008. - T. 180. - N \ge 8. - C. 5707-5719.$

243. Shemiakova T. Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage in the Context of Pathogenesis of Atherosclerosis / Shemiakova T., Ivanova E., Grechko A. V., Gerasimova E. V., Sobenin I. A., Orekhov A. N. // Biomedicines. $-2020. - T. 8. - N^{\circ} 6. - C. 1-16.$

244. Shepherd D. L. Exploring the mitochondrial microRNA import pathway through Polynucleotide Phosphorylase (PNPase) / Shepherd D. L., Hathaway Q. A., Pinti M. V., Nichols C. E., Durr A. J., Sreekumar S., Hughes K. M., Stine S. M., Martinez I., Hollander J. M. // Journal of Molecular and Cellular Cardiology. – 2017. – T. 110. – C. 15–25.

245. Shoeibi S. Diagnostic and theranostic microRNAs in the pathogenesis of atherosclerosis / Shoeibi S. // Acta physiologica. $-2020. - T. 228. - N \ge 1. - C. 13353.$ 246. Shokolenko I. N. Aging: A mitochondrial DNA perspective, critical analysis and an update / Shokolenko I. N. // World Journal of Experimental Medicine. $-2014. - T. 4. - N \ge 4. - C. 46.$

247. Shuh M. Tumor necrosis factor- α : Life and death of hepatocytes during liver ischemia/reperfusion injury / Shuh M., Bohorquez H., Loss G. E., Cohen A. J. // Ochsner Journal. – 2013. – T. 13. – No 1. – C. 119–130.

248. Sinha S. Risky business: Microhomology-mediated end joining / Sinha S., Villarreal D., Shim E. Y., Lee S. E. // Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. -2016. - T. 788. - C. 17-24.

249. Sinyov V. V. Potential use of buccal epithelium for genetic diagnosis of atherosclerosis using mtDNA mutations / Sinyov V. V., Sazonova M. A., Ryzhkova

A. I., Galitsyna E. V., Melnichenko A. A., Postnov A. Y., Orekhov A. N., Grechko A. V., Sobenin I. A. // Vessel Plus. – 2017. – T. 1. – C. 145–150.

250. Slevin M. Identification of differential protein expression associated with development of unstable human carotid plaques / Slevin M., Elasbali A. B., Turu M. M., Krupinski J., Badimon L., Gaffney J. // American Journal of Pathology. – 2006.
– T. 168. – № 3. – C. 1004–1021.

251. Sobenin I. A. Mitochondrial Mutations are Associated with Atherosclerotic Lesions in the Human Aorta / Sobenin I. A., Sazonova M. A., Postnov A. Y., Bobryshev Y. V, Orekhov A. N. // Clinical and Developmental Immunology. – 2012. – T. 2012. – C. 1–5.

252. Sobenin I. A. Mutation C3256T of Mitochondrial Genome in White Blood Cells: Novel Genetic Marker of Atherosclerosis and Coronary Heart Disease / Sobenin I. A., Sazonova M. A., Ivanova M. M., Zhelankin A. V., Myasoedova V. A., Postnov A. Y., Nurbaev S. D., Bobryshev Y. V., Orekhov A. N. // PLoS ONE. – $2012. - T. 7. - N_{2} 10. - C. 46573.$

253. Sobenin I. A. Association of the level of heteroplasmy of the 15059G>A mutation in the MT-CYB mitochondrial gene with essential hypertension / Sobenin I. A. // World Journal of Cardiology. $-2013. - T. 5. - N_{2} 5. - C. 132.$

254. Sobenin I. A. Changes of mitochondria in atherosclerosis: Possible determinant in the pathogenesis of the disease / Sobenin I. A., Sazonova M. A., Postnov A. Y., Bobryshev Y. V., Orekhov A. N. // Atherosclerosis. -2013. - T. 227. $- N_{\rm P} 2. - C. 283-288.$

255. Sobenin I. A. Quantitative analysis of the expression of caspase 3 and caspase 9 in different types of atherosclerotic lesions in the human aorta / Sobenin I. A., Bobryshev Y. V., Korobov G. A., Borodachev E. N., Postnov A. Y., Orekhov A. N. // Experimental and Molecular Pathology. -2015. - T. 99. - N = 1. - C. 1-6.

256. Sobenin I. A. Mitochondrial DNA Damage in Atherosclerosis / Sobenin I. A.
// Genetic Polymorphisms : IntechOpen, 2017. – ISBN 978-953-51-3516-6. – 280 c.
257. Sobenin I. A. Carotid atherosclerosis-related mutations of mitochondrial DNA do not explain the phenotype of metabolic syndrome / Sobenin I. A., Salonen J. T.,

Khasanova Z. B., Sinyov V. V., Kirichenko T. V., Melnichenko A. A., Prokudina A. I., Orekhova V. A., Grechko A. V. // Vessel Plus. – 2019. – T. 3. – C. 14.

258. Sobenin I. A. Profiling of risk of subclinical atherosclerosis: Possible interplay of genetic and environmental factors as the update of conventional approach / Sobenin I. A., Myasoedova V. A., Kirichenko T. V., Orekhova V. A., Khasanova Z. B., Sinyov V. V., Melnichenko A. A., Grechko A. V., Orekhov A. N. // Vessel Plus.

- 2019. - T. 3. - C. 15.

259. Song J., Herrmann J. M., Becker T. Quality control of the mitochondrial proteome / Song J., Herrmann J. M., Becker T. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. $-2021. - T. 22. - N_{\rm P} 1. - C. 54-70.$

260. Souza-Pinto N. C. de. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria / Souza-Pinto N. C. de, Mason P. A., Hashiguchi K., Weissman L., Tian J., Guay D., Lebel M., Stevnsner T. V., Rasmussen L. J., Bohr V. A. // DNA Repair. $-2009. - T. 8. - N_{2} 6. - C. 704-719.$

261. Stammler D. Inhibition of Histone Deacetylases Permits Lipopolysaccharide-Mediated Secretion of Bioactive IL-1 β via a Caspase-1–Independent Mechanism / Stammler D., Eigenbrod T., Menz S., Frick J. S., Sweet M. J., Shakespear M. R., Jantsch J., Siegert I., Wölfle S., Langer J. D., Oehme I., Schaefer L., Fischer A., Knievel J., Heeg K., Dalpke A. H., Bode K. A. // The Journal of Immunology. – 2015. – T. 195. – No 11. – C. 5421–5431.

262. Stefanadis C. Coronary Atherosclerotic Vulnerable Plaque: Current Perspectives / Stefanadis C., Antoniou C. K., Tsiachris D., Pietri P. // Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease. – 2017. – T. 6. – N_{2} 3. – C. 005543.

263. Stein A., Kalifa L., Sia E. A. Members of the RAD52 Epistasis Group Contribute to Mitochondrial Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair in Saccharomyces cerevisiae / Stein A., Kalifa L., Sia E. A. // PLoS Genetics. -2015. - T. 11. - N 11. - C. 1005664. 264. Stremmel C., Stark K., Schulz C. Heterogeneity of Macrophages in Atherosclerosis / Stremmel C., Stark K., Schulz C. // Thrombosis and Haemostasis. $-2019. - T. 119. - N_{2} 8. - C. 1237-1246.$

265. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability / Strober W. // Current Protocols in Immunology. $-2015. - T. 111. - N_{\text{O}} 1. - C. 1-3.$

266. Sukhorukov V. N. Mutational burden of mitochondrial DNA and atherosclerosis / Sukhorukov V. N., Sobenin I. A., Sinyov V. V., Khasanova Z. B., Kalmykov V. A., Puchkov P., Shmendel E. V. // Proceedings of The 43rd Annual Scientific ELC meeting, Tutzing, Germany, September 07–10, 2020.

267. Sukhorukov V. N. Endoplasmic reticulum stress in macrophages: The vicious circle of lipid accumulation and pro-inflammatory response / Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Ekta M. B., Ivanova E. A., Sobenin I. A., Orekhov A. N. // Biomedicines. -2020. - T. 8. - N 27. - C. 1-17.

268. Sukhorukov V. N. Lipid Metabolism in Macrophages: Focus on Atherosclerosis / Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Chegodaev Y. S., Ivanova E., Soben I. A., Orekhov A. N. // Biomedicines. $-2020. - T. 8. - N_{\odot} 8. - C. 1-15.$

269. Sukhorukov V. N. Elimination of Atherosclerosis Related Mutation from Mitochondrial CytB Gene / Sukhorukov V. N., Kalmykov V. A., Khotina V. A., Shmendel E., Puchkov P., Maslov M., Sobenin I. A. // Proceedings of The 19th International Symposium on Atherosclerosis, Kyoto, Japan, October 24–27, 2021. C. 439.

270. Sukhorukov V. N. Approach to edit mitochondrial DNA mutations associated with atherosclerosis / Sukhorukov V. N., Kalmykov V. A., Khotina V. A., Sinyov V. V., Khasanova Z. B., Sobenin I. A. // Atherosclerosis. – 2021. – T. 331. – C. 70–71.

271. Sukhorukov V. N. Mitochondrial DNA CRISPR/CAS9 editing: An approach to establishing the role of mitochondrial mutations in atherogenesis / Sukhorukov V. N., Kalmykov V. A., Khotina V. A., Omelchenko A. V., Orekhova V. A., Orekhova A. N. // Atherosclerosis. – 2022. – T. 355. – C. 53.

272. Sukhorukov V. N. Dysfunctional mitophagy associated mutation in THP-1 cells / Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Zhuravlev A. D., Orekhov A. N. // Atherosclerosis. – 2023. – T. 379. – C. 46.

273. Sukhorukov V. N. Mitochondrial Genome Editing: Exploring the Possible Relationship of the Atherosclerosis-Associated Mutation m.15059G>A With Defective Mitophagy / 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. // Journal of Lipid and Atherosclerosis. -2024. - T. 13. - N = 2. - C. 166–183.

274. Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Sobenin I. A. Mutation in CytB gene associated with macrophage intracellular lipid metabolism / Sukhorukov V. N., Khotina V. A., Sobenin I. A. // Proceedings of The 11th ICoLA, Seoul, South Korea, September 15–17, 2022. – C. 1.

275. Szczepanowska J. Effect of mtDNA point mutations on cellular bioenergetics
/ Szczepanowska J., Malinska D., Wieckowski M. R., Duszynski J. // Biochimica et
Biophysica Acta - Bioenergetics. – 2012. – T. 1817. – № 10. – C. 1740–1746.

276. Szymański J. Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure / Szymański J., Janikiewicz J., Michalska B., Patalas-Krawczyk P., Perrone M., Ziółkowski W., Duszyński J., Pinton P., Dobrzyń A., Więckowski M. R. // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – T. 18. – № 7. – C. 1–24.

277. Tabas I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: Consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress / Tabas I. // Antioxidants Redox Signal. 2009. T. 11. № 9. C. 2333–2339.

278. Tabas I., Bornfeldt K. E. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis / Tabas I., Bornfeldt K. E. // Circulation Research. – 2016.
– T. 118. – № 4. – C. 653–667.

279. Tadi S. K. Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions / Tadi S. K., Sebastian

R., Dahal S., Babu R. K., Choudhary B., Raghavan S. C. // Molecular Biology of the Cell. -2016. -T. 27. -N 2. -C. 223.

280. Tan X. Identification of Key Pathways and Genes in Advanced Coronary Atherosclerosis Using Bioinformatics Analysis / Tan X., Zhang X., Pan L., Tian X., Dong P. // BioMed Research International. – 2017. – T. 2017. – C. 1–12.

281. Tang J. Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation / Tang J., Lobatto M. E., Hassing L., van der Staay S., van Rijs S. M., Calcagno C., Braza M. S., Baxter S., Fay F., Sanchez-Gaytan B. L., Duivenvoorden R., Sager H., Astudillo Y. M., Leong W., Ramachandran S., Storm G., Pérez-Medina C., Reiner T., Cormode D. P., Strijkers G. J., Stroes E. S., Swirski F. K., Nahrendorf M., Fisher E. A., Fayad Z. A., Mulder W. J. // Science Advances. – 2015. – T. 1. – № 3. – C. 1400223.

282. Tao J. Interaction Between microRNA and DNA Methylation in Atherosclerosis / Tao J., Xia L., Cai Z., Liang L., Chen Y., Meng J., Wang Z. // DNA and cell biology. $-2021. - T. 40. - N_{2} 1. - C. 101-115.$

283. Tertov V. V. Multiple-modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation: Isolation, fractionation and characterization / Tertov V. V., Sobenin I. A., Gabbasov Z. A., Popov E. G., Jaakkola O., Solakivi T., Nikkari T., Smirnov V. N., Orekhov A. N. // Laboratory Investigation. – 1992. – T. $67. - N_{2} 5. - C. 665-675.$

284. Tertov V. V. Low-density lipoprotein modification occurring in human plasma possible mechanism of in vivo lipoprotein desialylation as a primary step of atherogenic modification / Tertov V. V., Kaplun V. V., Sobenin I. A., Orekhov A. N. // Atherosclerosis. – 1998. – T. 138. – N_{2} 1. – C. 183–195.

285. Thorp E., Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis / Thorp E., Tabas I. // Journal of Leukocyte Biology. – 2009. – T. 86. – N_{2} 5. – C. 1089–1095.

286. Tolstik T. V. The Relationship between Mitochondrial Genome Mutations in Monocytes and the Development of Obesity and Coronary Heart Disease / Tolstik

T. V., Kirichenko T. V., Bogatyreva A. I., Markina Y. V., Kalmykov V. A., Markin A. M. // Frontiers in bioscience (Scholar edition). $-2024. - T. 16. - N_{2} 1. - C. 6.$

287. Tolstik T. V. The association of TNF-alpha secretion and mtDNA copy number in CD14+ monocytes of patients with obesity and CHD / Tolstik T. V., Kirichenko T. V., Markin A. M., Bogatyreva A. I., Markina Y. V., Kiseleva D. G., Shaposhnikova N. N., Starodubova A. V., Orekhov A. N. // Frontiers in molecular biosciences. -2024. - T. 11. - C. 1-9.

288. Trounce I., Neill S., Wallace D. C. Cytoplasmic transfer of the mtDNA nt 8993 T \rightarrow G (ATP6) point mutation associated with Leigh syndrome into mtDNAless cells demonstrates cosegregation with a decrease in state III respiration and ADP/O ratio / Trounce I., Neill S., Wallace D. C. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994. – T. 91. – Nº 18. – C. 8334–8338.

289. Vecoli C. Prognostic value of mitochondrial DNA4977 deletion and mitochondrial DNA copy number in patients with stable coronary artery disease / Vecoli C., Borghini A., Pulignani S., Mercuri A., Turchi S., Carpeggiani C., Picano E., Andreassi M. G. // Atherosclerosis. – 2018. – T. 276. – C. 91–97.

290. Vergani L. Introduction of heteroplasmic mitochondrial DNA (mtDNA) from a patient with NARP into two human $\rho(^{\circ})$ cell lines is associated either with selection and maintenance of NARP mutant mtDNA or failure to maintain mtDNA / Vergani L., Rossi R., Brierley C. H., Hanna M., Holt I. J. // Human Molecular Genetics. – 1999. – T. 8. – No 9. – C. 1751–1755.

291. Visscher M. Data Processing Pipeline for Lipid Profiling of Carotid Atherosclerotic Plaque with Mass Spectrometry Imaging / Visscher M., Moerman A. M., Burgers P. C., Beusekom H. M. M. Van, Luider T. M., Verhagen H. J. M., Steen A. F. W. Van der, Heiden K. Van der, Soest G. Van // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. $-2019. - T. 30. - N_{2} 9. - C. 1790.$

292. Vourakis M., Mayer G., Rousseau G. The Role of Gut Microbiota on Cholesterol Metabolism in Atherosclerosis / Vourakis M., Mayer G., Rousseau G. // International journal of molecular sciences. $-2021. - T. 22. - N_{\rm P} 15.$

293. Wang B. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis at microhomologous regions of human mitochondrial genome / Wang B., Lv X., Wang Y., Wang Z., Liu Q., Lu B., Liu Y., Gu F. // Science China Life Sciences. – 2021. – T. 64. – № 9. – C. 1463–1472.

294. Wang H., Russa M. La, Qi L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond
/ Wang H., Russa M. La, Qi L. S. // Annual Review of Biochemistry. – 2016. – T.
85. – C. 227–264.

295. Wang Y., Ruan Y., Wu S. ET-1 regulates the human umbilical vein endothelial cell cycle by adjusting the ER β /FOXN1 signaling pathway / Wang Y., Ruan Y., Wu S. // Annals of Translational Medicine. – 2020. – T. 8. – N_{2} 22. – C. 1499–1499.

296. Watson M. G. A two-phase model of early fibrous cap formation in atherosclerosis / Watson M. G., Byrne H. M., Macaskill C., Myerscough M. R. // Journal of theoretical biology. – 2018. – T. 456. – C. 123–136.

297. Wisnovsky S., Jean S. R., Kelley S. O. Mitochondrial DNA repair and replication proteins revealed by targeted chemical probes / Wisnovsky S., Jean S. R., Kelley S. O. // Nature Chemical Biology. -2016. - T. 12. - N ? - C. 567-573.298. Witherel C. E. Regulation of extracellular matrix assembly and structure by hybrid M1/M2 macrophages / Witherel C. E., Sao K., Brisson B. K., Han B., Volk S. W., Petrie R. J., Han L., Spiller K. L. // Biomaterials. -2021. - T. 269.

299. Wu Z. Mitochondrial DNA stress signalling protects the nuclear genome / Wu
Z., Oeck S., West A. P., Mangalhara K. C., Sainz A. G., Newman L. E., Zhang X.
O., Wu L., Yan Q., Bosenberg M., Liu Y., Sulkowski P. L., Tripple V., Kaech S.
M., Glazer P. M., Shadel G. S. // Nature Metabolism. – 2019. – T. 1. – № 12. – C.
1209–1218.

300. Xiang G. Temperature effect on CRISPR-Cas9 mediated genome editing / Xiang G., Zhang X., An C., Cheng C., Wang H. // Journal of Genetics and Genomics. $-2017. - T. 44. - N_{2} 4. - C. 199-205.$

301. Xu M. Effects of mitochondrial dysfunction on cellular function: Role in atherosclerosis / Xu M., Wang W., Cheng J., Qu H., Xu M., Wang L. // Biomedicine & pharmacotherapy. – 2024. – T. 174.

302. Yamada Y. MITO-Porter: A liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion / Yamada Y., Akita H., Kamiya H., Kogure K., Yamamoto T., Shinohara Y., Yamashita K., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H. // Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. – 2008. – T. 1778. – N_{2} 2. – C. 423–432.

303. Yang S. Macrophage polarization in atherosclerosis / Yang S., Yuan H. Q.,
Hao Y. M., Ren Z., Qu S. L., Liu L. S., Wei D. H., Tang Z. H., Zhang J. F., Jiang Z.
S. // Clinica Chimica Acta. – 2020. – T. 501. – C. 142–146.

304. Yang Y. Targeted elimination of mutant mitochondrial DNA in MELASiPSCs by mitoTALENs / Yang Y., Wu H., Kang X., Liang Y., Lan T., Li T., Tan T., Peng J., Zhang Q., An G., Liu Y., Yu Q., Ma Z., Lian Y., Soh B. S., Chen Q., Liu P., Chen Y., Sun X., Li R., Zhen X., Liu P., Yu Y., Li X., Fan Y. // Protein and Cell. $-2018. - T. 9. - N_{2} 3. - C. 283-297.$

305. Yasukawa T., Kang D. An overview of mammalian mitochondrial DNA replication mechanisms / Yasukawa T., Kang D. // Journal of Biochemistry. – 2018.
– T. 164. – № 3. – C. 183–193.

306. Yoo B. C. Cas9/gRNA-mediated genome editing of yeast mitochondria and Chlamydomonas chloroplasts / Yoo B. C., Yadav N. S., Orozco E. M., Sakai H. // PeerJ. $-2020. - T. 2020. - N_{\odot} 1. - C. 8362.$

307. Yunna C. Macrophage M1/M2 polarization / Yunna C., Mengru H., Lei W.,
Weidong C. // European Journal of Pharmacology. – 2020. – T. 877. – C. 173090.

308. Zakiev E. R. Lipid composition of circulating multiple-modified low-density lipoprotein / Zakiev E. R., Sukhorukov V. N., Melnichenko A. A., Sobenin I. A., Ivanova E. A., Orekhov A. N. // Lipids in health and disease. $-2016. - T. 15. - N_{\odot}$ 1.

309. Zakirov F. H. Lipid-based gene delivery to macrophage mitochondria for atherosclerosis therapy / Zakirov F. H., Zhang D., Grechko A. V., Wu W. K.,

Poznyak A. V., Orekhov A. N. // Pharmacology Research and Perspectives. – 2020. – T. 8. – № 2. – C. 00584.

310. Zaric S. S. Altered toll-like receptor 2-mediated endotoxin tolerance is related to diminished interferon β production / Zaric S. S., Coulter W. A., Shelburne C. E., Fulton C. R., Zaric M. S., Scott A., Lappin M. J., Fitzgerald D. C., Irwin C. R., Taggart C. C. // Journal of Biological Chemistry. – 2011. – T. 286. – No 34. – C. 29492–29500.

311. Zekonyte U. Mitochondrial targeted meganuclease as a platform to eliminate mutant mtDNA in vivo / Zekonyte U., Bacman S. R., Smith J., Shoop W., Pereira C. V., Tomberlin G., Stewart J., Jantz D., Moraes C. T. // Nature Communications. $-2021. - T. 12. - N \ge 1. - C. 3210$

312. Zhang J. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)-associated ND5 12338T > C mutation altered the assembly and function of complex I, apoptosis and mitophagy / Zhang J., Ji Y., Lu Y., Fu R., Xu M., Liu X., Guan M. X. // Human Molecular Genetics. $-2018. - T. 27. - N \ge 11. - C. 1999-2011.$

313. Zhang T. Interaction between adipocytes and high-density lipoprotein: new insights into the mechanism of obesity-induced dyslipidemia and atherosclerosis / Zhang T., Chen J., Tang X., Luo Q., Xu D., Yu B. // Lipids in health and disease. - 2019. - T. 18. - No 1. - C. 223.

314. Zhang Y. Research methods for animal models of atherosclerosis (Review) / Zhang Y., Fatima M., Hou S., Bai L., Zhao S., Liu E. // Molecular Medicine Reports.
- 2021. - T. 24. - № 6. - C. 871.

315. Zhu Y. Associations of mitochondrial DNA 3777-4679 region mutations with maternally inherited essential hypertensive subjects in China / Zhu Y., You J., Xu C., Gu X. // BMC medical genetics. $-2020. - T. 21. - N_{\odot} 1. - C. 105.$

316. Zhuravlev A. D. THP1-based cybrid cells with mtDNA mutations differ by the formation of innate immune tolerance / Zhuravlev A. D., Nikiforov N., Kubekina M., Markin A. M., Orekhov A. N. // Atherosclerosis. – 2021. – T. 331. – C. 85.

317. Zhuravlev A. D. The presence of mtDNA mutations in THP1-based cybrid cells affects the efficiently of FCCP-induced mitophagy / Zhuravlev A. D.,

Nikiforov N. G., Verkhova S. S., Vysokikh M., Marey M., Orekhov A. N. // Atherosclerosis. – 2022. – T. 355. – C. 54.

318. Zou Y., CDK1, CCNB1, and CCNB2 are prognostic biomarkers and correlated with immune infiltration in hepatocellular carcinoma / Zou Y., Ruan S., Liang J., Chen Z., Han H., Zhang Y., Jian Z., Lin Y., Shi N., Jin H. // Medical Science Monitor. – 2020. – T. 26. – C. 925289-1.