

На правах рукописи

**СИНЁВ
ВАСИЛИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ**

**КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ
АТЕРОСКЛЕРОЗЕ**

1.5.22. – Клеточная биология

1.5.7. – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского".

Научные руководители: доктор медицинских наук
Антон Ювенальевич Постнов

кандидат биологических наук
Маргарита Александровна Сазонова

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук **Татьяна Павловна Казубская**
старший научный сотрудник лаборатории клинической цитологии центра патоморфологии и молекулярно-генетической диагностики опухолей ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации

кандидат химических наук **Юрий Васильевич Котелевцев**
профессор Центра Нейронаук и реабилитации мозга имени В.Л.Зельмана Сколковского института науки и технологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 420012, Приволжский федеральный округ, Республика Татарстан, г.Казань, ул. Бутлерова, д.49.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета (24.1.204.02) «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д.3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" и на сайте <http://www.morfolhum.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук

Анна Михайловна Косырева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Атеросклероз и связанные с ним поражения внутренних органов (ИБС, инфаркт миокарда, нарушения кровообращения мозга, нижних конечностей, органов брюшной полости и т.п.) занимают первое место как причина заболеваемости, потери трудоспособности, инвалидности и смертности населения большинства экономически развитых стран мира, в том числе и России (**Sazonova, 2017; Mitrofanov, 2016; Sazonova, 2009; Сазонова, 2012; Temchenko, 2013**).

Различные заболевания человека, в том числе и атеросклероз, ассоциированы с некоторыми мутациями митохондриального генома (**Тодоров, 2007**). Мутации митохондриальной ДНК, чаще всего однонуклеотидные полиморфизмы, могут быть как гомо- так и гетероплазмичными, поэтому при изучении ассоциации митохондриальных мутаций с заболеваниями важна не только качественная (наличие/отсутствие мутации), но и количественная оценка мутантного аллеля митохондриального генома (**Sazonova, 2017; Mitrofanov, 2016; Sazonova, 2009**).

Митохондриальные дисфункции, предикторами которых могут являться митохондриальные мутации, приводят к развитию различных заболеваний у человека. Однонуклеотидные полиморфизмы митохондриального генома могут быть распределены в тканях и органах неравномерно (**Naue, 2015; Chinnery, 1999; Литвинова, 2015**).

Для изучения функционирования митохондрий могут быть использованы цитоплазматические гибриды в качестве клеточной модели (**Lu, 2013; Gamba, 2012; Caporali, 2013; Trimmer, 2009; Gustafson, 2000; Jun, 1996; Trounce, 1994**). Основой для изучения атеросклероза на клеточной модели может быть моноцитоподобная клеточная линия, так как моноциты являются одним из ключевых участников процесса атерогенеза (**Sazonova, 2017; Mitrofanov, 2016; Sazonova, 2009; Егорова, 2013**). Использование митохондрий с различным уровнем гетероплазмии мутаций митохондриального генома, ассоциированных с атеросклерозом, для создания цитоплазматических гибридов может явиться наглядной клеточной моделью изучения связи мутаций митохондриального генома и процессов атерогенеза.

Степень разработанности темы исследования

Мутации митохондриального генома, как врождённые, так и накопленные в течение онтогенеза, ассоциированы с рядом заболеваний и могут являться их предикторами (**Sazonova, 2017; Mitrofanov, 2016; Chinnery, 1999; Тодоров, 2007; Мазунин, 2010; Zhelankin, 2012**).

В различных органах и тканях одного и того же человека уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома может существенно

различаться. Для определения уровня гетероплазмии применяются различные молекулярно-генетические методы, такие как ПЦР-РВ, пиросеквенирование и «секвенирование нового поколения». Согласно литературным данным, в клетках крови человека уровень гетероплазмии митохондриальных мутаций значительно ниже, по сравнению с другими типами клеток и, в частности, с буккальным эпителием (de Laat, 2012; Spyropoulos, 2013). Ряд исследователей отмечают наибольший уровень гетероплазмии мутаций мтДНК в мышцах, несколько меньший, но также достаточно высокий - в печени и клетках буккального эпителия, значительно ниже - в сердце и крови человека (de Laat, 2012; Spyropoulos, 2013; Frederiksen, 2006; Li, 2015; Calloway, 2000; Matthews, 1994).

Митохондриальные дисфункции и их ассоциации с различными заболеваниями человека, такими как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, ВИЧ, вирус герпеса человека 8 типа, синдром MELAS, атрофия зрительных нервов Лебера, синдром Ли, могут изучаться на цитоплазматических гибридах (цибридах) (Lu, 2013, Gamba, 2012; Caporali, 2013; Trimmer, 2009; Gustafson, 2000; Jun, 1996; Trounce, 1994). Значительную часть публикаций по изучению цибридов составляют работы, в которых на данных клеточных моделях изучается связь точечных мутаций митохондриального генома с развитием патологий и их клинических проявлений. Результаты данных исследований указывают на снижение деятельности комплексов дыхательной цепи и потребления кислорода, а также уменьшение синтеза АТФ (Gamba, 2012; Caporali, 2013; Mueller, 2012; Ma, 2010; Seibel, 2008; Hayashi, 1991).

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна

1. Созданы две цибридные линии с высоким и низким уровнем гетероплазии.

2. Определено функциональное состояние митохондрий на цибридной клеточной модели.

3. Впервые определена степень гетероплазии мутаций митохондриального генома m.13513G>A, m.3256C>T, m.3336T>C, m.12315G>A и m.1555A>G в различных клетках и тканях человека.

4. Впервые определен уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома m.13513G>A, m.3256C>T, m.3336T>C, m.12315G>A и m.1555A>G в различных типах клеток крови человека.

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

Теоретическая и практическая значимость

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

Методология и методы исследования

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

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

Объективность полученных данных была подтверждена статистическим анализом результатов данных.

Положения, выносимые на защиту

1) Обнаружены отличия в уровнях клеточного дыхания и мембранного потенциала и митохондриальной массы в цитоплазматических гибридах (цибридах) с разным уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома.

2) Клетки могут адаптировать процессы дыхания для поддержания общей митохондриальной эффективности.

3) Уровень мутаций митохондриального генома в целом сопоставим в клетках и тканях человека.

4) Обнаружены отличия в уровне гетероплазмии мутации m.13513G>A между паренхимой селезенки, скелетной мускулатурой и сосочковыми мышцами миокарда.

5) Обнаружены отличия в уровне гетероплазмии между буккальным эпителием и цельной крови по мутациям m.12315G>A, m.3256C>T и m.3336T>C.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

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

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

Личный вклад автора

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

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

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в научно-исследовательской работе в лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского".

Публикации результатов работы

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

Структура и объём диссертации

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика материала

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

Описание клеточной линии ТНР-1:

- 1) Происхождение: человек, периферическая кровь, острая моноцитарная лейкемия.
- 2) Морфология: моноцитоподобная.
- 3) Дифференцировка: в макрофагоподобные клетки.

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

Образцы различных типов клеток и тканей человека были получены от государственных клинических и научных учреждений (таблица 1).

Таблица 1

Количество образцов различных типов клеток и тканей человека.

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

Создание цитоплазматических гибридов (цибридов)

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

Создание безмитохондриальных (rho0) клеток

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

Для создания безмитохондриальных клеточных линий (rho0) в нашей лаборатории использовали стандартную методику М. Кинга и Г. Аттарди.

Получение гибридных культур

Использовалась методика «ПЭГ-слияния», которая позволяет создавать цитоплазматические гибриды путем их слияния с тромбоцитами, выступающими в качестве клеток-доноров митохондрий (Рисунок 1).

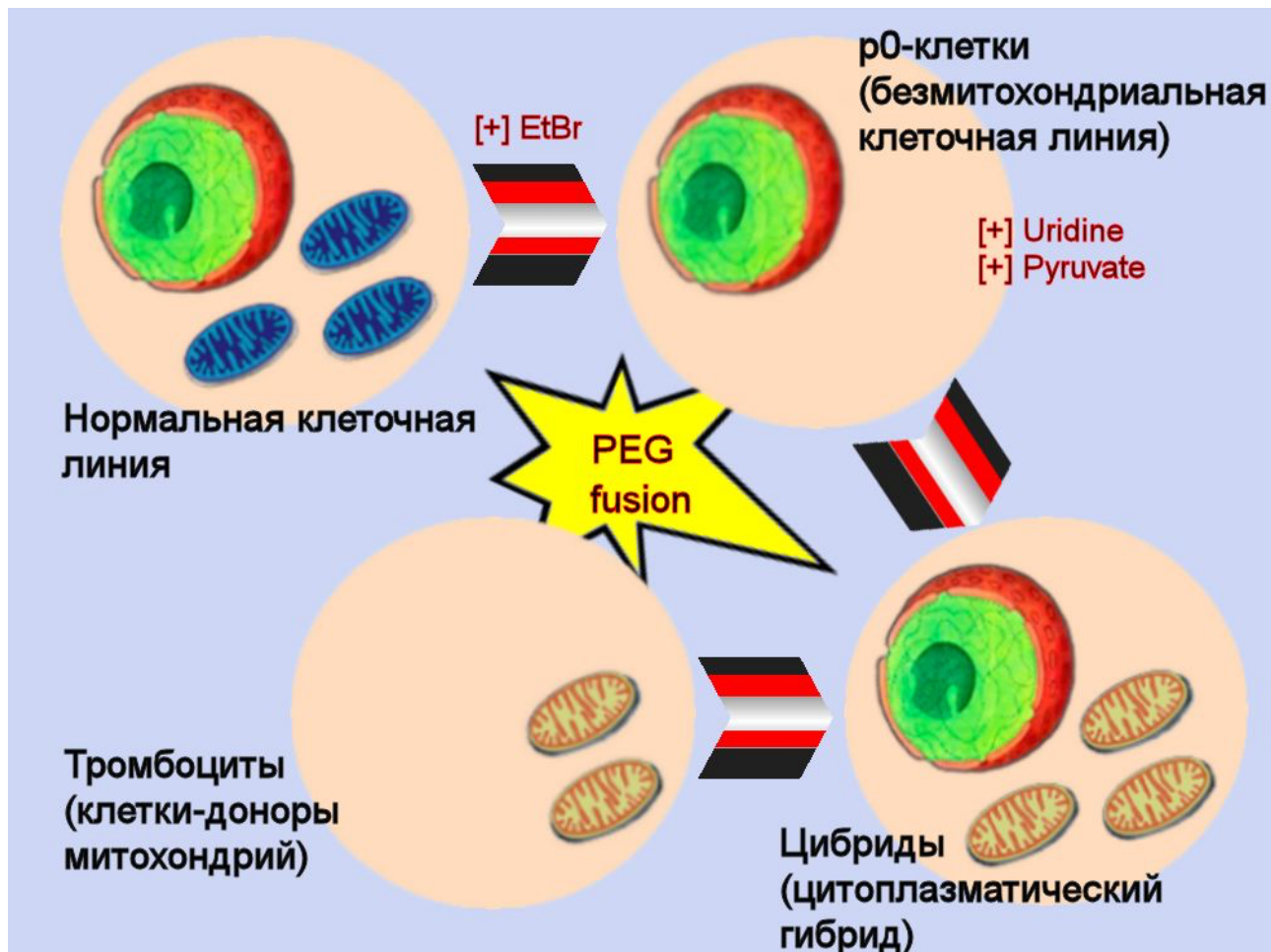


Рис.1. Схема создания цитоплазматических гибридов.
Схема изготовлена с помощью программы Adobe Photoshop CC.

Проверка безмитохондриальных ($\rho 0$) клеток и гибридных культур

Все культуры были проверены на копийность митохондриального генома и, соответственно, была подтверждена либо «безмитохондриальность» ($\rho 0$ -клетки), либо наличие митохондрий (гибриды) с помощью проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (Евроген). Контролем выступала нативная культура клеток ТНР-1.

Измерение мембранного потенциала и совокупной массы митохондрий с помощью конфокальной микроскопии

Используемое оборудование: Микроскоп Zeiss LSM710 с камерой LSMT-РМТ.

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

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

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

Измерение клеточного дыхания

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

При постановке эксперимента были использованы вещества, представленные в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика и последовательность веществ, используемых для измерения клеточного дыхания

Вещество	Концентрация	Производитель	Действие	Последовательность добавки
Сукцинат	1 мМ	Sigma-Aldrich	Субстрат цикла Кребса и фермента дыхательной цепи сукцинатдегидрогеназы (митохондриальный ферментный комплекс II)	(1)
Олигомицин А	1 мкМ	Sigma-Aldrich	Блокирует протонный канал (F ₀ в комплексе V) и не дает протонам возвращаться в матрикс. Поэтому АТФ-синтаза (F ₁) теряет способность синтезировать АТФ.	(2)
FCCP (карбонилцианид-4-трифторметоксифенилгидразон)	1 мкМ	Sigma-Aldrich	Разобщитель окислительного фосфорилирования. Липофильное вещество, способное принимать протоны и переносить их через внутреннюю мембрану митохондрий минуя V комплекс (его протонный канал).	(3)
Калия цианид	1 М	Sigma-Aldrich	Ингибируют цитохром-С-оксидазу, тем самым блокируя перенос электронов в дыхательной цепи.	(4)

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

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

Определение биоэнергетического профиля осуществляли в соответствии с схемой, представленной на рисунке 2.

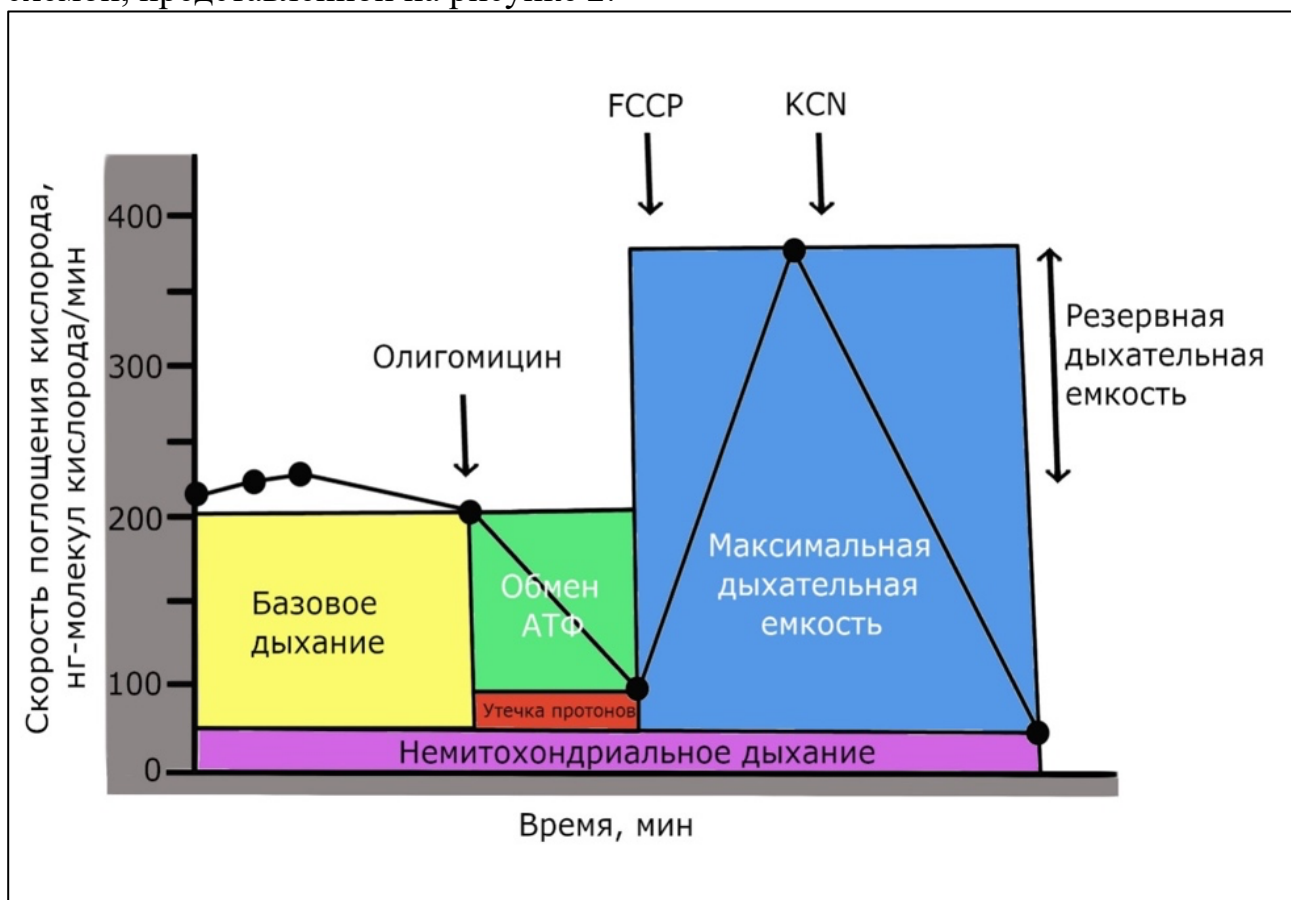


Рис.2. Схема биоэнергетического профиля дыхания.
Схема изготовлена с помощью программы GIMP 2.10.14.

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

Общая митохондриальная эффективность. Сводный показатель, предложенный Valu K. Chackos соавторами. Отражает положительные аспекты биоэнергетической функции (резервная емкость и дыхание, связанное с АТФ) и сопоставляет их с потенциально вредными аспектами (немитохондриальное потребление кислорода и утечка протонов). Определяется по формуле: $\text{Общая митохондриальная эффективность} = \log(\text{Обмен АТФ} + \text{Резервная дыхательная емкость}) / (\text{Немитохондриальное дыхание} + \text{Утечка протонов})$.

Методика выделения различных фракций клеток крови на двойном градиенте плотности фиколла-урографина

Методика состоит из последовательных этапов центрифугирования крови и отбора различных фракций. Принцип разделения клеток крови в градиенте плотности основан на различиях в величине их плавучей плотности.

Для разделения лимфоидных клеток человека используют градиент плотности, равный 1,077 г/см³. Чтобы выделить фракцию нейтрофилов, необходимо наслоить второй градиент плотности, равный 1,119 г/см³.

Разделение фракции моноцитов/лимфоцитов с использованием магнитных наночастиц высокой аффинности

Фракцию моноцитов/лимфоцитов разделяли с использованием магнитных частицы к CD14 (MiltenyiBiotecGmbH, Германия).

Выделение ДНК методом фенол-хлороформной экстракции

Использовали стандартную методику выделения ДНК с помощью фенол-хлороформной экстракции.

Метод полимеразной цепной реакции

В рамках данной работы ПЦР была проведена с целью амплификации короткоцепочечных участков мтДНК, для достижения необходимого количества копий ампликонов, достаточного для дальнейшего анализа этих участков с помощью пиросеквенирования.

Метод лонг-полимеразной цепной реакции и электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в агарозном геле использовали для детекции митохондриальной ДНК в безмитохондриальных (rho0) клетках и цитоплазматических гибридах.

Пиросеквенирование

Пиросеквенирование короткоцепочечных ампликонов, полученных при проведении ПЦР, проводилось для детекции нуклеотидной последовательности данных фрагментов и оценки уровня гетероплазии в исследуемых позициях мтДНК.

Количественное определение уровня гетероплазии мутаций митохондриального генома

Количественная оценка мутантного аллеля заключалась в расчете уровней гетероплазии мутаций мтДНК с использованием значений высоты пиков пираграмм образцов нашей выборки в исследуемой области одноцепочечного ПЦР-фрагмента митохондриального генома. Использовалась методика М.А. Сазоновой.

Методы статистической обработки данных

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

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета Prism версии 9.1.0 (GraphPadSoftware, США).

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

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Создание безмитохондриальной клеточной линии на основе культуры ТНР-1

В ходе данного исследования была получена безмитохондриальная клеточная линия (ТУ-520) на основе культуры ТНР-1.

Для проверки полученной культуры на безмитохондриальность проводилась лонг-ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов ПЦР и определение копийности ДНК с помощью красителя SYBR.

Создание цитоплазматических гибридов на основе безмитохондриальной клеточной линии

На базе клеточной линии ТУ-520 были созданы гибридные линии, несущие определенную мутационную нагрузку (Таблица 3).

Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в цельной крови пациентов МГУ

Образец	Суммарная мутационная нагрузка	m.3336T>C	m.1555A>G	m.3256C>T	m.13513G>A	m.12315G>A
ТС-НSM1	Высокий уровень гетероплазии	0	0	50	24	44
ТС-LSM1	Низкий уровень гетероплазии	5	17	15	19	0

Красным шрифтом отмечен уровень гетероплазии мтДНК превышающий пороговое значение.

Для проверки полученных гибридных культур проводилась лонг-ПЦР с последующим электрофоретическим разделением продуктов ПЦР и определение копийности ДНК с помощью красителя SYBR.

Согласно полученным результатам по созданию безмитохондриальной клеточной линии (rho0), удалось получить линию клеток - ТУ-520 с меньшим в 91 раз количеством копий митохондриальной ДНК по сравнению с нативной линией ТНР-1. Примечательно, что при проведении электрофоретического разделения продуктов лонг-ПЦР, цельного участка мтДНК (≈ 8000 н.п.) в культуре ТУ-520 детектировано не было, что может свидетельствовать о нарушении целостности митохондриальной молекулы ДНК, и невозможности кодирования важных белковых субъединиц ферментов (**Sazonova, 2011**). Проведенная далее конфокальная микроскопия наглядно показала невозможность детектирования свечение красителя TMRM в культуре ТУ-520, что в целом согласуется с данными о значительном снижении копий мтДНК в безмитохондриальной линии. В гибридных линиях, напротив, видно, что уровень свечения красителя TMRM на достаточном уровне, как и в культуре ТНР-1. Следовательно, можно утверждать о положительных результатах создания гибридных линий.

Уровень мембранного потенциала

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

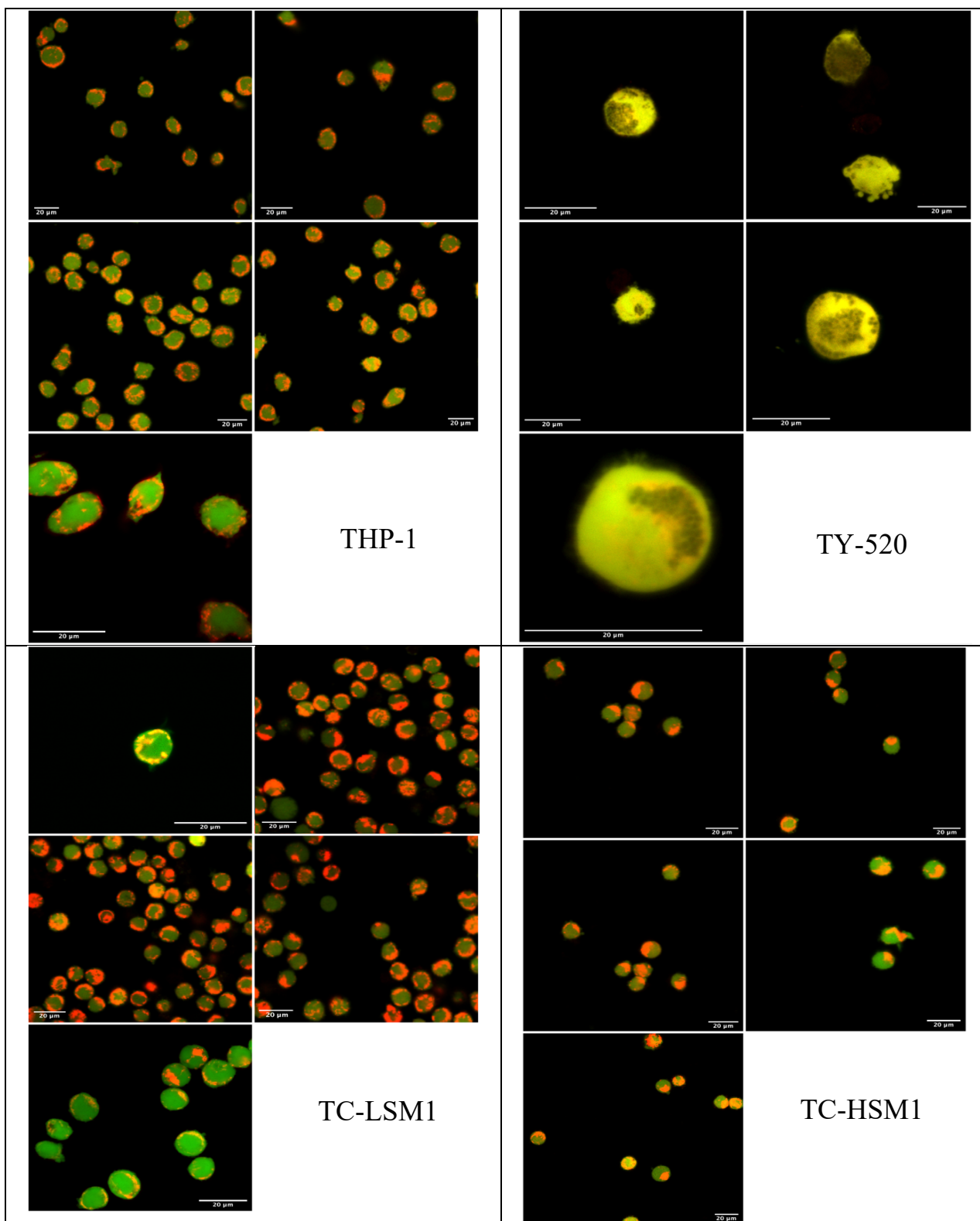


Рис. 6. Микрофотографии нативной (THP-1), безмитохондриальной (TY-520), гибридной с низким суммарным уровнем гетероплазии (TC-LSM1) и гибридной с высоким суммарным уровнем гетероплазии (TC-HSM1) линий. **Митохондрии – свечение в красном спектре.** Краситель: TMRM – потенциал-зависимый катионный краситель, который накапливается в митохондриях. **Цитоплазма – свечение в зеленом спектре.** Краситель: Calcein – мембранопроницаемый краситель для мечения живых клеток.

Из рисунка 6 следует, что в безмитохондриальной культуре (TY-520) невозможно детектировать свечение красителя TMRM, а следовательно, и митохондрии на том же уровне, что и в культуре ТНР-1. Если митохондрии в культуре TY-520 и есть, то определить их локализацию и функциональную активность не предоставляется возможным, во всяком случае, с помощью конфокальной микроскопии. В цибридных линиях, напротив, уровень свечения красителя TMRM на достаточном уровне и, как и в культуре ТНР-1, позволяет определить локализацию митохондрий в клетке.

Уровень мембранного потенциала в культуре TC-LSM1 (низкий уровень гетероплазии) в 1,9 раз выше, чем в культуре TC-HSM1 (высокий уровень гетероплазии). $P=0,01$

Митохондриальная масса в культуре TC-LSM1 (низкий уровень гетероплазии) в 1,6 раз выше, чем в культуре TC-HSM1 (высокий уровень гетероплазии). $P=0,09$

Уровень мембранного потенциала в цибридных линиях (интенсивность свечения красителя TMRM) в культуре с низкой мутационной нагрузкой (TC-LSM1), значимо превышал аналогичный уровень в культуре с высокой мутационной нагрузкой (TC-HSM1). Так же был выше уровень митохондриальной массы в культуре TC-LSM1 по сравнению с TC-HSM1. Данные могут свидетельствовать о более высокой митохондриальной плотности в цибридной линии с низким уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома (**Gan, 2014**). Снижение уровней мембранного потенциала, митохондриальной массы, а также наличие мутаций мтДНК может привести к ухудшению способности к слиянию и делению митохондрий и, как следствие, к недостаточной эффективности дыхания для удовлетворения потребностей клетки (**Chen, 2007**).

Оценка митохондриальной дисфункции

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

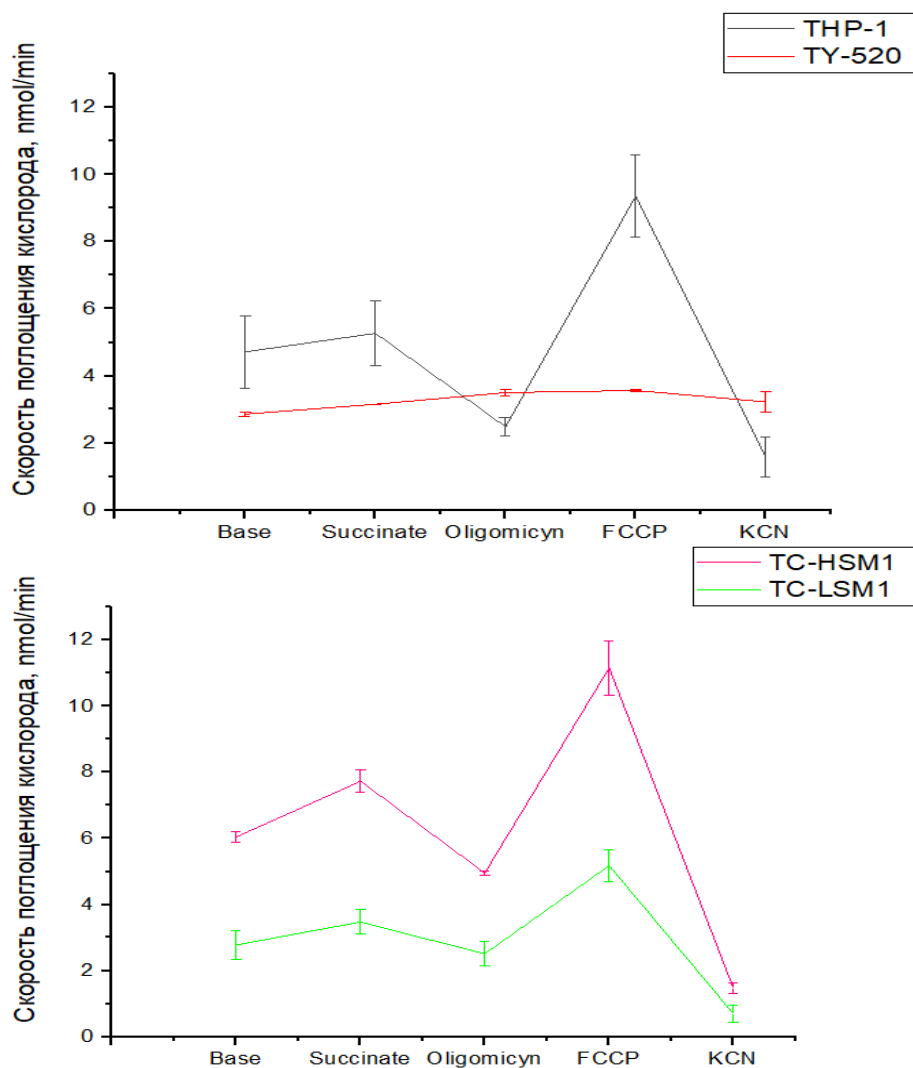


Рис. 7. Клеточное дыхание нативной (ТНР-1), безмитохондриальной (ТУ-520), гибридных с низким уровнем гетероплазии (ТС-LSM1) и высоким уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома (ТС-НСМ1) линий.

На рисунке 7 видно, что безмитохондриальная линия (ТУ-520) не реагирует на различные добавки. Уровень скорости поглощения кислорода не меняется, в отличие от нативной линии (ТНР-1). Полученные результаты согласуются с рядом аналогичных исследований (Herst, 2008; Shen, 2003; Brar, 2012).

Клеточное дыхание в гибридных линиях было хорошо детектируемо, по ряду показателей, например базовое дыхание в культуре ТС-НСМ1 даже превышало аналогичный показатель в культуре ТНР-1. Следует отметить, что создаваемые гибридные линии, несущие более высокие уровни гетероплазии мутаций митохондриального генома, в основном, в научных работах, имеют более низкий уровень базового дыхания (Nunes, 2015; Li, 2015; Cruz-Bermúdez, 2015).

Далее был проведен анализ биоэнергетического профиля нативной (ТНР-1), безмитохондриальной (ТУ-520) и гибридных (ТС-LSM1 и ТС-НСМ1) линий.

Таблица 4

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

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

Из таблицы 4 следует, что дыхание культуры ТУ-520 находится на уровне нулевых значений. На внесение каких-либо добавок культура не реагирует.

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

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

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

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

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

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

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

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

В настоящем исследовании получены данные об уровне гетероплазии мутаций митохондриального генома в различных типах клеток крови человека. Средние значения уровня гетероплазии, выраженные в процентах, каждой из рассматриваемых мутаций, со стандартной ошибкой среднего, представлены на рисунке 3.

А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A и Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C

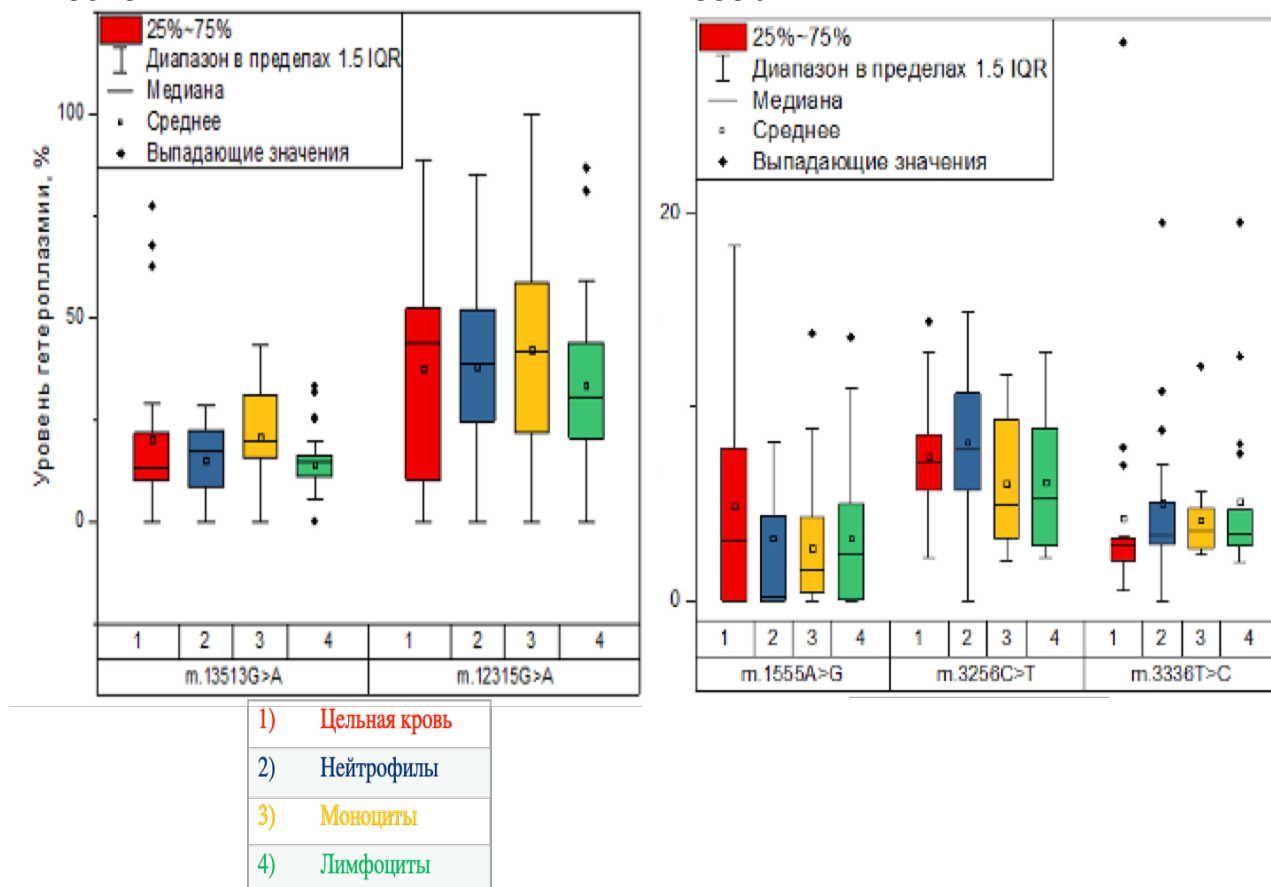


Рис.3. Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в различных типах клеток крови человека от 41 донора: А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A, Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C.

Далее была проведена статистическая обработка полученных данных с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона.

Достоверными считали различия при 95% уровне значимости. Согласно статистическим данным, значимыми являются различия между нейтрофилами и моноцитами по мутациям m.13513G>A и m.3256C>T, нейтрофилами и лимфоцитами по мутации m.3256C>T, а также между моноцитами и лимфоцитами по мутации m.13513G>A. Как указывает ряд авторов, гранулоциты имеют более высокую внутриклеточную гетерогенность мтДНК (большее количество мутаций митохондриального генома), по сравнению с лимфоцитами и CD34+ клетками (Pyle, 2007). На основании этого было выдвинуто предположение, что уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома в гранулоцитах также будет выше по сравнению с другими форменными элементами крови. Полученные результаты об уровне гетероплазмии мутаций m.12315G>A, m.13513G>A, m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C в нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах показали, что данная тенденция наблюдается по мутации m.3256C>T, где уровень гетероплазмии в нейтрофилах выше аналогичного уровня в моноцитах и лимфоцитах; по мутациям m.12315G>A и m.13513G>A, где уровень гетероплазмии в нейтрофилах выше аналогичного уровня в лимфоцитах; и по мутациям m.1555A>G и m.3336T>C, где уровень гетероплазмии в нейтрофилах выше аналогичного уровня в моноцитах. Одинаковый уровень гетероплазмии в нейтрофилах и лимфоцитах был зафиксирован по мутациям m.1555A>G и m.3336T>C. Однако значимые отличия наблюдаются только по мутации m.3256C>T. Между моноцитами и лимфоцитами также есть разница в уровне гетероплазмии по мутациям m.12315G>A и m.13513G>A (выше в моноцитах) и по мутациям m.1555A>G и m.3336T>C (выше в лимфоцитах). При этом значимые отличия наблюдаются только по мутации m.13513G>A.

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

Проанализирован уровень гетероплазмии мутаций митохондриального генома в цельной крови и буккальном эпителии. Средние значения уровня гетероплазмии, выраженные в процентах, каждой из рассматриваемых мутаций со стандартной ошибкой среднего, представлены на рисунке 4.

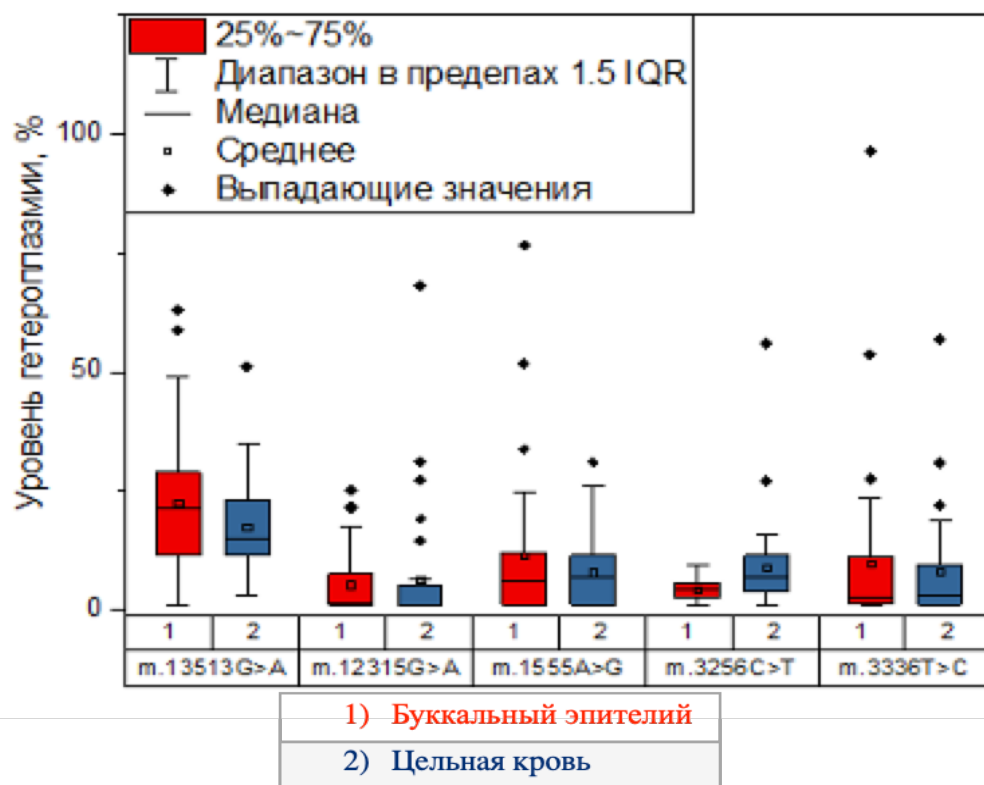


Рис.4. Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в цельной крови и буккальном эпителии от 134 доноров.

Далее была проведена статистическая обработка полученных данных с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона.

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

Согласно литературным данным, в различных органах и тканях одного и того же человека уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома может существенно различаться. При этом в клетках крови человека уровень гетероплазии митохондриальных мутаций оказался значительно ниже, по сравнению с другими типами клеток и, в частности, с буккальным эпителием (**de Laat, 2012; Spyropoulos, 2013**). Проведенное в данной работе исследование показало, что согласующиеся с литературными данными различия уровня гетероплазии между буккальным эпителием и клетками крови установлены по мутациям m.12315G>A и m.3336T>C. Однако, по мутациям m.13513G>A, m.1555A>G и m.3256C>T уровень гетероплазии в цельной крови оказался выше, чем в буккальном эпителии.

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

В настоящей работе получены данные об уровне гетероплазии мутаций митохондриального генома в интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре. Средние значения уровня гетероплазии, выраженные в процентах, каждой из рассматриваемых мутаций, со стандартной ошибкой среднего, представлены на рисунке 5.

А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A и Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C

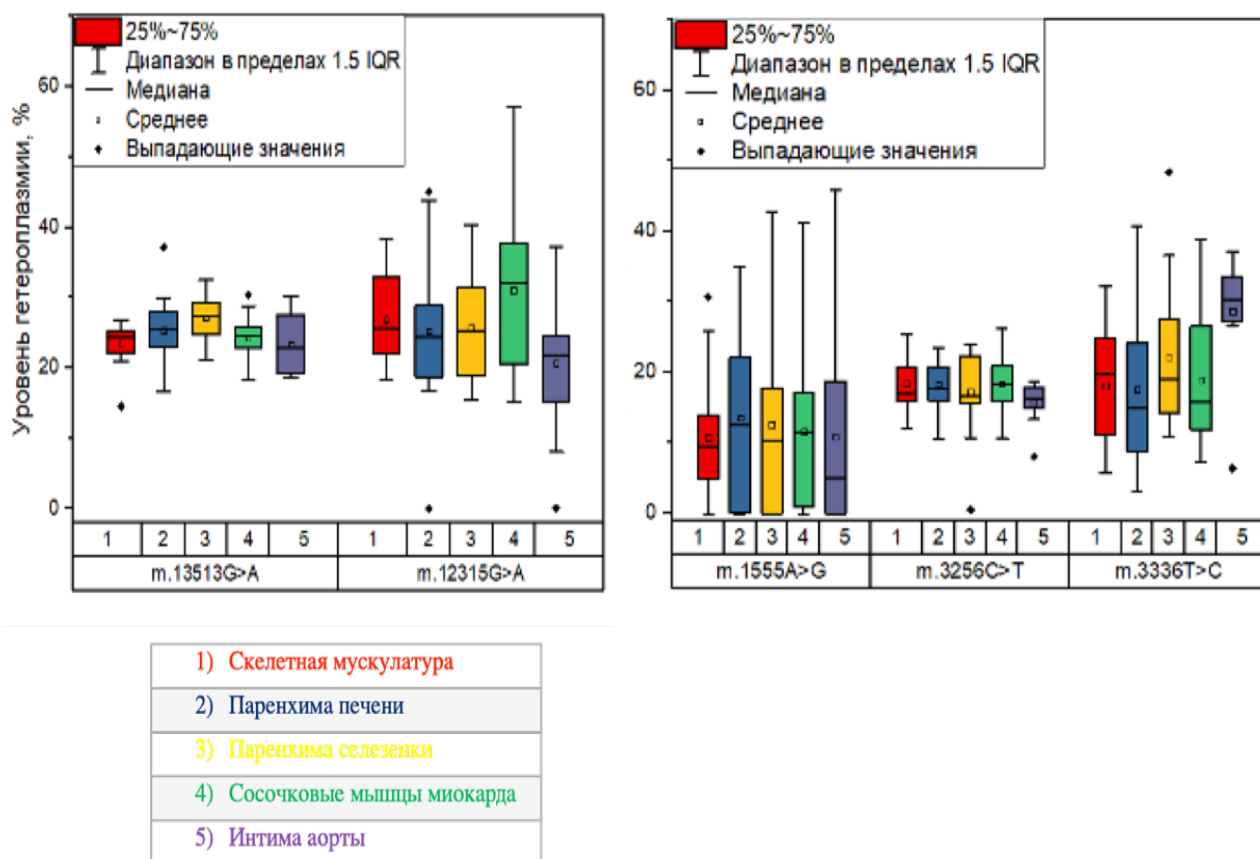


Рис.5. Уровень гетероплазии мутаций митохондриального генома в интима аорты, сосочковых мышцах миокарда, паренхиме печени, паренхиме селезенки и скелетной мускулатуре 21 донора: А) Мутации m.12315G>A и m.13513G>A, Б) Мутации m.1555A>G, m.3256C>T и m.3336T>C.

Далее была проведена статистическая обработка полученных данных с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона.

Достоверными считали различия при 95% уровне значимости. Согласно статистическим данным, значимыми является различия между скелетной

мускулатурой и паренхимой селезенки, а также паренхимой селезенки и сосочковыми мышцами миокарда по мутации m.13513G>A.

По литературным данным, наибольший уровень гетероплазмии мутаций мтДНК наблюдался в мышцах, несколько меньший, но также достаточно высокий - в печени и клетках буккального эпителия, значительно ниже - в сердце и крови человека (Frederiksen, 2006; Li, 2015; Calloway, 2000; Matthews, 1994). В нашем исследовании уровень гетероплазмии оказался выше в скелетной мускулатуре, по сравнению с паренхимой печени, по мутациям m.12315G>A и m.3256C>T, но ниже по мутациям m.13513G>A и m.1555A>G. По мутации m.3336T>C средний уровень гетероплазмии одинаков для скелетной мускулатуры и паренхимы печени. Сопоставляются с литературными данными результаты более высокой мутационной нагрузки в скелетной мускулатуре, по отношению к сердцу, по мутации m.3256C>T. При этом уровень гетероплазмии по другим мутациям имеет противоположную тенденцию или, как в случае с мутацией m.13513G>A, имеет равные значения. Что касается различий в уровне гетероплазмии между паренхимой печени и сосочковыми мышцами миокарда, то при анализе мутаций m.13513G>A и m.1555A>G подтвердились литературные данные о том, что в печени мутационная нагрузка выше по отношению к сердцу, а по мутациям m.12315G>A и m.3336T>C, наоборот, в печени уровень гетероплазмии мтДНК ниже, чем в сердце. По мутации m.3256C>T средние значения уровня гетероплазмии не отличаются.

Полученные результаты в большинстве своем говорят о несущественном отличии уровне гетероплазмии в разных типах клеток и тканях человека. Однако, при проведении анализа во всех представленных выборках, все же были обнаружены достоверные различия в уровне гетероплазмии по тем или иным мутациям. Уровень гетероплазмии, в среднем по выборкам, был относительно мал.

Отличия были выявлены между буккальным эпителием и цельной кровью по 3 мутациям, между нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами по 2 мутациям и скелетной мускулатурой, паренхимой селезенки и сосочковыми мышцами миокарда по 1 мутации. Следует отметить, что по мутации 1555A>G ни в одной из исследуемых выборок значимых отличий выявлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

На первом этапе исследований мы задумались над созданием клеточной модели, которая бы позволила нам ответить на вопрос о том, на какие именно процессы функционирования клеток влияют различные мутации митохондриального генома. В настоящей работе были созданы 2 клеточные

линии (цитоплазматические гибриды) с разным уровнем гетероплазии двух мутаций митохондриального генома (высоким и низким). Цитоплазматическая гибридная (цибридная) линия с высоким уровнем гетероплазии мутаций митохондриального генома имеет более высокие показатели клеточного дыхания и более низкие показатели мембранного потенциала, по сравнению с культурой с низким уровнем гетероплазии этих мутаций мтДНК. Полученные линии имеют одинаковую общую митохондриальную эффективность и сводный показатель исследованного биоэнергетического профиля клеточного дыхания.

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

ВЫВОДЫ

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

Список работ, опубликованных автором по теме диссертации

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и учёной степени доктора наук

1. Сазонова М.А., **Синёв В.В.**, Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорощук Н.А., Кириченко Т.В., Орехов А.Н., Собенин И.А. Создание цибридных культур, содержащих мутацию митохондриального генома m.1555A>G (ген MT-RNR1), имеющую протективный эффект при атеросклерозе. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2021. Т. 65. № 4. С. 121-127.
2. Сазонова М.А., **Синёв В.В.**, Рыжкова А.И., Сазонова М.Д., Дорощук Н.А., Кириченко Т.В., Карагодин В.П., Орехов А.Н., Собенин И.А. Создание цибридных клеточных культур, содержащих однонуклеотидную замену в гене MT-TL2, ассоциированную с атеросклерозом. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2020. Т. 64. № 4. С. 140-147.
3. Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A., **Sinyov V.V.**, Khasanova Z.B., Shkurat T.P. Creation of cybrid cultures containing mtDNA mutations m.12315G>A and m.1555G>A, associated with atherosclerosis. // Biomolecules. 2019. Т. 9. № 9. С. 499.
4. **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. Potential use of buccal epithelium for genetic diagnosis of atherosclerosis using mtDNA mutations. // Vessel Plus. 2017. Т. 1. С. 145-150.
5. **Синёв В.В.**, Маляр Н.Л., Косогорова С.А., Постнов А.Ю., Орехов А.Н., Собенин И.А., Сазонова М.А. Вариабельность митохондриального генома в различных типах клеток крови человека. // Международный научно-исследовательский журнал. 2013. № 12-3 (19). С. 58-61.

Другие публикации (обзорные статьи)

1. Sazonova M.A., **Sinyov V.V.**, Postnov A.Y., Sobenin I.A., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Melnichenko A.A., Orekhov A.N. Cybrid models of pathological cell processes in different diseases. // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018. Т. 2018. С. 4647214.
2. **Синёв В.В.**, Карагодин В.П., Собенин И.А., Постнов А.Ю., Сазонова М.А., Орехов А.Н. Мутационная нагрузка митохондриального генома в различных органах и тканях человека. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017. Т. 61. № 1. С. 114-120.
3. **Синёв В.В.**, Сазонова М.А., Карагодин В.П., Рыжкова А.И., Галицына Е.В., Мельниченко А.А., Демакова Н.А., Шкурят Т.П., Собенин И.А., Орехов А.Н. Изучение митохондриальной дисфункции с помощью цитоплазматических гибридов. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2017. Т. 61. № 2. С. 92-97.

Другие публикации (материалы конференций)

1. 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. Cybrid culture with mtDNA mutation M. 5178C> A, linked with atherosclerosis: Obtaining and analysis. // *Atherosclerosis*. 2021. Т. 331, С. e99.
2. Sazonova M.A., Sazonova M.D., **Sinyov V.V.**, Ryzhkova A.I., Kirichenko T.V., Doroschuk N.A., Karagodin V.P., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of cybrid culture with mtDNA mutation M. 14846G> A. // *Atherosclerosis*. 2021. Т. 331, С. e98.
3. **Sinyov V.V.**, Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Doroschuk A.D., Karagodin V.P., Sobenin I.A., Orekhov A.N., Sazonova M.A. The influence of the mutational burden of mitochondrial genome on cellular respiration. // *Atherosclerosis*. 2020. Т. 315, С. e228
4. **Sinyov V.V.**, Ryzhkova A.I., Sazonova M.D., Khasanova Z.B., Doroschuk N.A., Nikitina N.A., Sobenin I.A., Orekhov A.N., Sazonova M.A. Variability of heteroplasmy of some mitochondrial genome mutations in different human tissues. // *Atherosclerosis*. 2019. Т. 287. С. e164.
5. **Sinyov V.V.**, Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Doroshchuk A.D., Kuzmin A.V., Sazonova M., Khasanova Z.B., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Cellular respiration in cytoplasmic hybrids with different heteroplasmy levels of mitochondrial genome mutations. // *Atherosclerosis*. 2018. Т. 275. С. e254.
6. **Sinyov V.V.**, Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Galitsyna E.V., Zhelankin A.V., Mitrofanov K.Y., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Creation of cybrid cultures containing mitochondrial genome mutation M.12315G > A, associated with atherosclerosis. // *Atherosclerosis*. 2017. Т. 263. С. e201.
7. **Синёв В.В.**, Баринаова В.А., Рыжкова А.И., Трубинов С.С., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Сазонова М.А. Уровень гетероплазии некоторых мутаций митохондриального генома в различных лейкоцитах человека. // *Вопросы неотложной кардиологии 2014: от науки к практике. Сборник тезисов VII Всероссийского форума. Министерство здравоохранения Российской Федерации*". 2014. С. 45.
8. **Синёв В.В.**, Баринаова В.А., Рыжкова А.И., Трубинов С.С., Митрофанов К.Ю., Желанкин А.В., Постнов А.Ю., Собенин И.А., Сазонова М.А. Вариабельность гетероплазии некоторых мутаций митохондриального генома человека в клетках мезенхимального и эпидермального происхождения. // *Вопросы неотложной кардиологии 2014: от науки к практике. Сборник тезисов VII Всероссийского форума. Министерство здравоохранения Российской Федерации*". 2014. С. 45.
9. **Sinyov V.V.**, Sazonova M.A., Ryzhkova A.I., Postnov A.Y., Orekhov A.N., Sobenin I.A. Heteroplasmy level of five mitochondrial mutations in different types of leucocytes in human blood. // *Atherosclerosis*. 2014. Т. 23. С. e220.