

УДК 581.17:616–092

**МОРФОЛОГИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ СЕТИ И БАЗОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В КЛЕТКАХ С МУТАЦИЯМИ мтДНК****Е.А. Кузнецова, А.Ю. Винокуров***ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Орел, Россия*

Митохондрии выполняют центральные функции в производстве энергии в процессе метаболизма, а также в регуляции большого количества первичных клеточных процессов, таких как пролиферация клеток, регуляция апоптоза и поддержания внутриклеточного гомеостаза кальция. Они активно участвуют в биосинтетических процессах, связанных с полипептидным, аминокислотным и жировым катаболизмом, формированием и метаболизмом мочевины, органических кислот, в биосинтезе гема, железосернистых кластеров, нуклеотидов, стероидов, кардиолипина, убихинона, различных метаболитов и сигнальных молекул [1, 2]. Митохондрии в клетке представляют гигантскую митохондриальную сеть, которая находится в постоянной динамике. Состояние митохондриальной сети определяется балансом четырех динамических процессов: движением, закреплением, делением и слиянием и может быть оценено с помощью метода флуоресцентной микроскопии [3].

Особенностью молекулы мтДНК по сравнению с яДНК является высокая плотность экзонов. Это и объясняет, почему мутации в мтДНК приводят к патологии клетки. Высокая частота мутаций в мтДНК объясняется следующими причинами: мтДНК расположена вблизи митохондриальной электронтранспортной цепи; стабилизирующая роль белков в комплексе с мтДНК существенно ниже, чем в случае гистонов яДНК; не высокой эффективностью системы репарации мтДНК [4, 5]. Заболевания, вызванные мутациями мтДНК, обладают уникальными характеристиками, связанными с биологией митохондрий. Во-первых, они наследуются по материнской линии из-за передачи митохондрий от яйцеклетки к зиготе. Во-вторых, клинические симптомы прогрессируют с возрастом. Эта особенность обусловлена накоплением патогенной мтДНК в определенных тканях [6]. Общая численность описанных болезней митохондриального происхождения приближается к 400. По фенотипу в основном они выражаются в различных нейродегенеративных и нейромышечных симптомах [7].

Как показывают литературные данные, мутации мтДНК изменяют состояние митохондриальной сети. Однако при этом публикации в основном связаны с изучением одной или двух мутаций митохондриального генома с развитием патологий и их клинических проявлений [8]. В связи с этим комплексные исследования метаболизма митохондрий с учетом комбинации мутаций с разным уровнем гетероплазмии представляет значительный интерес. Для решения данной задачи крайне важен выбор подходящих экспериментальных моделей, в качестве которых могут выступать цитоплазматические гибриды (цибриды).

Цибриды – это клеточные линии, полученные при слиянии безмитохондриальной клетки с безъядерной клеткой – донором цитоплазмы, содержащей митохондрии. Для создания стабильных линий используют уже выведенные клеточные линии, прошедшие этап дедифференцировки [9]. Путем сравнения с контрольной линией выдвигается предположение о том, что наблюдаемые различия в измеренных показателях отражают различия в мтДНК, поскольку параметры культуры клеток, обусловленные яДНК, одинаковы [10]. В том случае, если для заболевания показана роль нарушений именно мтДНК, то цибриды выступают отличным модельным объектом.

В качестве объектов настоящего исследования выступили 10 линий цибридов, имеющих мутации с различным уровнем гетероплазмии, созданных на базе клеточной линии ТНР-1.

Целью нашей работы являлось проведение анализа состояния митохондриальной сети в клетках с мутантной мтДНК с учётом сочетания мутаций и степенью их гетероплазмии

Исследования проводили с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss AG, Германия) с использованием флуоресцентных зондов TMRM и Fluor4 AM. Регистрируемая величина интенсивности флуоресценции TMRM определялась величиной митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\psi_m$ ): чем выше  $\Delta\psi_m$ , тем больше TMRM накапливается в митохондриях, тем выше величина интенсивности флуоресценции. Для оценки морфологии митохондриальной сети получали конфокальные изображения клеток в высоком разрешении с последующей обработкой в программе Fiji.

Для оценки величины митохондриальной массы использовали одновременную загрузку клеток зондами TMRM и Fluo4. Измерение объема локализации первого позволяло оценить общее содержание в клетке митохондрий, а второго – всего объема клетки. Митохондриальную массу рассчитывали как долю общего содержания митохондрий от объема клетки.

Для возбуждения флуоресценции Fluo4 использовали лазер с длиной волны 488 нм, а TMRM – 561 нм. Общее количество клеток исследованных линий составляло не менее 50.

На рисунке 1 приведены результаты определения морфологии митохондриальной сети с мутациями мтДНК.

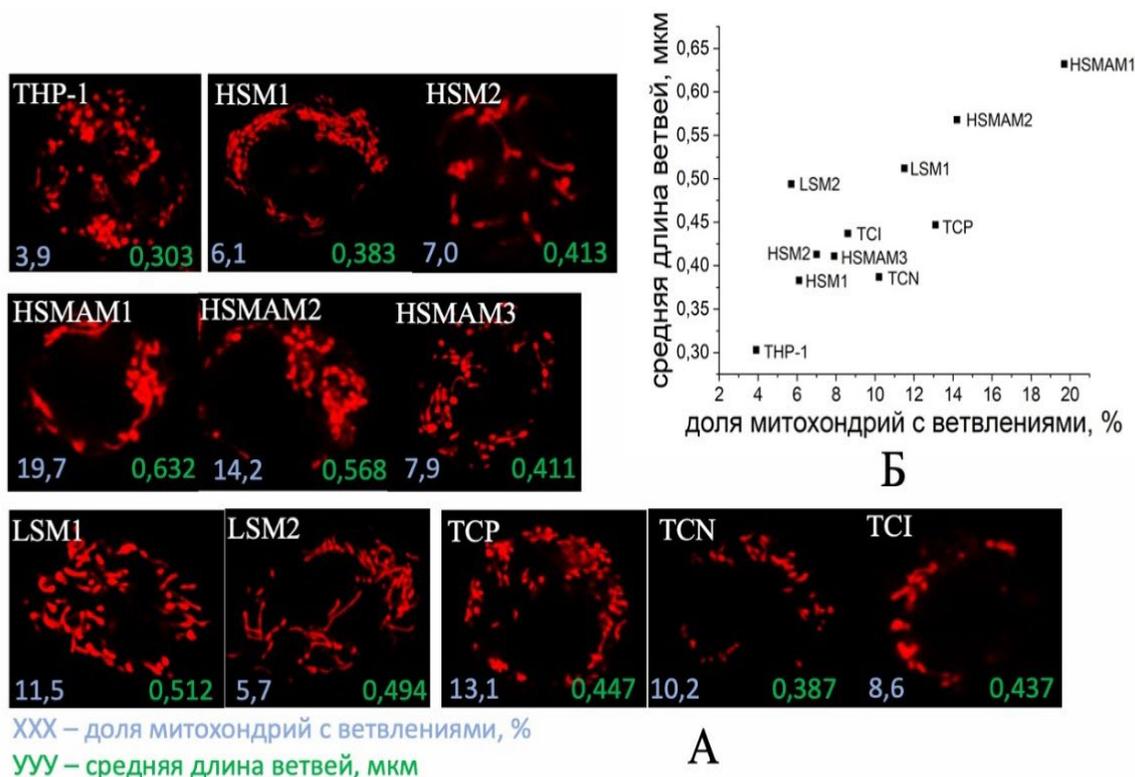


Рисунок 1 – Морфология митохондриальной сети с мутациями мтДНК (А – конфокальные изображения клеток цбридов, Б – взаимосвязь доли митохондрий с ветвлениями и средней длины ветвей митохондрий)

В клеточных линиях цбридов с мутациями наблюдается изменение морфологии митохондрий. Форма митохондрий заметно изменяется. Для отдельных линий с мутациями обнаружена неоднородная интенсивность флуоресценции. Имеются участки с более разветвленной структурой митохондриальной сети. Средняя длина ветвей в цбридной линии THP-1 составляет 0,30 мкм, в то время как у всех других линий цбридов она больше (0,375–0,625 мкм). Наиболее длинные ветви митохондрий характерны для цбридной линии HSMAM1. Эта линия также имеет наибольшую долю митохондрий с ветвлениями по сравнению с линией THP-1 (20 %). Для пар цбридных линий HSM1 и TCN, HSM2 и HSMAM3 характерна идентичная средняя длина ветвей (0,38 и 0,42 мкм). Вероятно, это связано с одновременно высоким уровнем мутаций субъединиц 2 комплекса I (g13513a) и комплекса III (g15059a).

На рисунке 2 представлено влияние мутации мтДНК на величины мембранного потенциала и митохондриальной массы цбридов.

Установлено, что мутации мтДНК влияют на базовые показатели митохондриального метаболизма: мембранный потенциал клеток и митохондриальную массу.

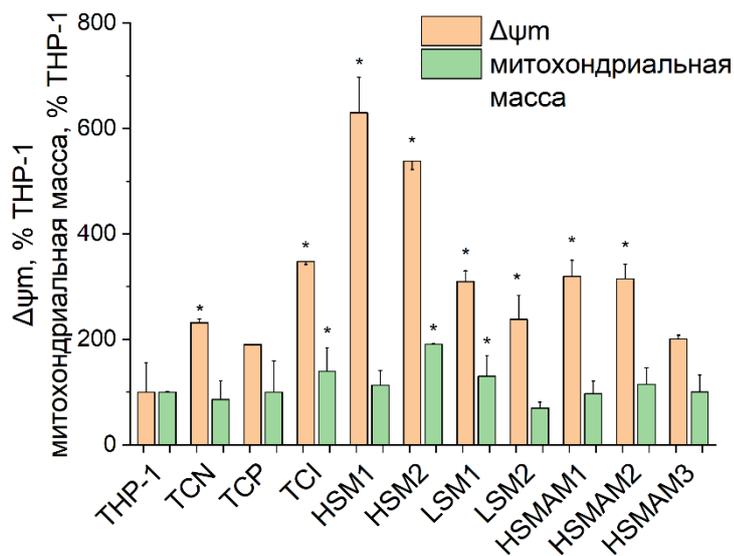


Рисунок 2 – Величины митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\psi_m$ ) и митохондриальной массы линий гибридов

4. изменение митохондриальной массы в основном коррелирует с величиной  $\Delta\psi_m$  за исключением линий с отсутствием или низким уровнем гетероплазии мутаций a1555g, g15059a, t3336c и c5178a.

*Исследования проведены в рамках выполнения Гранта РФФ № 22-15-00317.*

### Литература

- Rossmann M.P., Dubois S.M., Agarwal S., Zon L.I. Mitochondrial function in development and disease. *Disease Models & Mechanisms*, 2021. V.14. – dmm048912. doi:10.1242/dmm.048912
- Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human radiation and disease. *Cell*, 2015. – V. 163(1). – P. 33–38. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.067
- Sara Spadini, Gabriella Racchetti, Alice Adiletta, Jacopo Lamanna, AndreaStefano, Moro Mattia, Ferro Vincenzo, Zimarino Antonio, Malgaroli Tilokani et al. A novel integrated approach to estimate the mitochondrial content of neuronal cells and brain tissues // *Journal of Neuroscience Methods* 2021. – V. 363, 109351
- Larsen, N.B., Rasmussen, M., and Rasmussen, L.J. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? // *Mitochondrion* 2005. – 5, 89–108.
- David C. Chan Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development // *Cell*. – 2006, 125. DOI 10.1016/j.cell.2006.06.010
- Dimauro, S., Davidzon, G. Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine*, 2005. – V. 37 – P. 222–232.
- Riederer, P., Danielczyk W., Grünblatt E. Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease // *Neurotoxicology*. – 2004. – T. 25. – №. 1–2. – С. 271–277.
- Синев В.В. Клеточная модель митохондриальной дисфункции при атеросклерозе. Дис...к.б.н., М., 2022. – 105 с.
- Синёв В.В., Сазонова М.А. Изучение митохондриальной дисфункции с помощью цитоплазматических гибридов // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. – 2017. – Т. 61. – № 2. – С. 92–97.
- Wilkins H.M. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies / H.M. Wilkins, S.M. Carl // *Redox biology*. – 2014. – T. 2. – С. 619–631.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что:

1. более разветвлённые митохондриальные сети с удлинёнными органеллами обусловлены одновременно высоким уровнем мутаций субъединиц 2 и 5 комплекса I (c5178a, g12315a, g13513a), комплекса III (g15059a) и гена ТРНК<sup>Leu</sup> (c3256t).

2. мутации в генах 12S рРНК и ТРНК<sup>Leu</sup> (del652g и c3256t) приводят к образованию укороченных и слабоветвленных митохондрий.

3. величина  $\Delta\psi_m$  как интегральный показатель состояния митохондрий определяется совокупным влиянием всех рассмотренных мутаций с наибольшим вкладом повреждений генов комплекса I, 12S рРНК и ТРНК<sup>Leu</sup>.