ЧИСЛО КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МОНОЦИТАХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

Герасимова Е.В.[1],
Богатырева А.И.[1,2],
Попкова Т.В.[1],
Герасимова Д.А.[3]

[1] ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии имени В.А. Насоновой, 115522, Российская Федерация, Москва, Каширское шоссе, 34а.
[2] Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», 117418, Российская Федерация, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.
[3] Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 119048, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER IN MONOCYTES AND PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

Gerasimova E.V.[a],
Bogatyreva A.I.[a,b],
Popkova T.V.[a],
Gerasimova D.A.[c]

[a]V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Russian Federation, Moscow, 115522, 34A, Kashirskoye shose

[b] Research institute of human morphology Russian National Research Center of Surgery named after B.V. Petrovsky, Russian Federation, Moscow, 1174183, Tsyurupy St.

[c] I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Russian Federation, Moscow, 119048, 8/2 Trubetskaya St.

Резюме.

Клетки врожденного иммунитета являются важными участниками воспалительных и фиброзных процессов при системной склеродермии (ССД). В патогенезе ССД задействованы иммунные клетки, в первую очередь макрофаги, в основе нарушений которых лежит митохондриальная дисфункция клеток. В качестве суррогатного маркера митохондриальной дисфункции клеток используется число копий митохондриальной ДНК (мтДНК).

Цель исследования — оценить количество копий мтДНК в CD14+ моноцитах и во всех популяциях клеток, циркулирующих в крови, у больных ССД по сравнению со здоровым контролем.

Материалы и методы: В исследование были включены 25 пациентов с ССД (22 женщины и 3 мужчин, медиана возраста 49 [43; 57] лет и длительности заболевания 4,6 [1,0; 9,6] лет) и 25 человек без аутоиммунных или хронических воспалительных заболеваний, сопоставимых по возрасту и полу. Большинство пациентов (80%) имели ограниченную форму ССД. Больные ССД не получали противоревматическую терапию. ДНК выделяли из CD14+-моноцитов и цельной крови. Абсолютное число копий мтДНК измеряли с помощью цифровой ПЦР. Величину числа копий мтДНК на клетку, использованную для анализа, рассчитывали как соотношение копий мтДНК и яДНК.

Результаты. Установлено, что у больных ССД количество копий мтДНК в CD14+-моноцитах было выше (108 [60 - 162] против 72 [59 - 79], p=0,01), а показатель всех популяций клеток, циркулирующих в крови, не различался по сравнению с контрольной группой (109 [72-171] и 128 [85 - 227], p=0,17). Выявилена негативная связь количества копий мтДНК с длительностью заболевания и позитивная - с ЛПС-стимулированной секрецией IL-6 культивируемыми CD14 + моноцитами.

Выводы: Результаты исследования позволяют предположить, что увеличение числа копий мтДНК в CD14+ моноцитах является возможным механизмом поддержания сниженной функции дефектных митохондрий в моноцитах пациентов с ССД, связанной с развитием и прогрессированием ССД.

Ключевые слова: ДНК, митохондрии, моноциты, системная склеродермия, аутоиммунитет, воспаление.

Abstract

Innate immune cells are important participants in inflammatory and fibrotic processes in systemic scleroderma (SSc). The pathogenesis of SSc involves immune cells, primarily macrophages, whose disorders are based on mitochondrial cell dysfunction. Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number is used as a surrogate marker of mitochondrial cell dysfunction.

The aim of the study was to evaluate the number of mtDNA copies in CD14+ monocytes and in all cell populations circulating in the blood in patients with SSc compared to healthy controls.

Materials and methods: The study included 25 patients with SSc (22 women and 3 men, median age 49 [43; 57] years and disease duration 4.6 [1.0; 9.6] years) and 25 people without autoimmune diseases or chronic inflammatory diseases matched by age and gender. The majority of patients (80%) had a limited form of SSc. All study participants did not receive antirheumatic therapy. DNA was isolated from CD14+ monocytes and whole blood. Absolute mtDNA copy number was measured using digital PCR. The number of mtDNA copies per cell used for analysis was calculated as the ratio of mtDNA and nDNA copies.

Results. It was found that in patients with SSc, the number of mtDNA copies in CD14+ monocytes was higher (108 [60 - 162] vs. 72 [59 - 79], p = 0.01), and the indicator of all cell populations circulating in the blood did not differ in compared

with the control group (109 [72-171] and 128 [85 - 227], p=0.17). A negative relationship was found between the number of mtDNA copies and the duration of the disease, and a positive relationship with LPS-stimulated IL-6 secretion by cultured CD14+ monocytes.Conclusions: The study results suggest that increase of mtDNA copy number in CD14+ monocytes is a possible mechanism to maintain the reduced function of defective mitochondria in monocytes from patients with SSc associated with the development and progression of SSc.

Key words: DNA, mitochondrial, monocytes, systemic sclerosis, autoimmunity, inflammation.

Введение.

Системная склеродермия (ССД), или прогрессирующий системный склероз, представляет собой системное заболевание соединительной ткани, характеризующееся генерализованным фиброзом кожи и внутренних органов. При ССД отмечается триада признаков: иммунная дисфункция, фиброз и васкулопатия. Из множества иммунных клеток, вовлеченных в патогенез ССД, ключевую роль играют макрофаги [18]. Дисфункция макрофагов при ССД характеризуется активацией клеток с последующей выработкой цитокинов и рекрутированием других иммунных клеток, обуславливающими хронизацию воспаления [8]. С другой стороны, секреция профибротических молекул макрофагами и активация фибробластов приводят к развитию фиброза [4].

Митохондриальная дисфункция может обуславливать нарушения работы иммунной системы. В частности, происходят нарушение электрон-транспортной цепи и увеличение активных форм кислорода, влияющее на секрецию провоспалительных цитокинов и приводящее к активации и миграции иммунных клеток в очаги воспаления [20]. Изменения количества мтДНК могут приводить к усилению окислительного стресса и способствовать и развитию воспаления [12]. Ряд исследований показали, что число копий мтДНК у пациентов с аутоиммунными ревматическими заболеваниями отличается от здоровых доноров и связано с активностью воспаления [9, 16].

Целью данного исследования было изучение копийности мтДНК в CD14+ моноцитах и всех клеток, циркулирующих в крови больных ССД и практически здоровых лиц, и оценить связь количества копий мтДНК с провоспалительным статусом моноцитов.

Материалы и методы: В исследование были включены 25 пациентов с ССД и 25 практически здоровых человек без аутоиммунных или хронических воспалительных заболеваний, сопоставимых по возрасту и полу. Критериями исключения были возраст младше 20 лет и старше 70 лет; наличие сахарного диабета, онкологических заболеваний, декомпенсированной почечной или

печеночной недостаточности, хронической сердечно-сосудистой недостаточности III-IV класса по NYHA. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренной версией 2013 г. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом НИИ ревматологии им. Насоновой 10 февраля 2022 г. Все участники предоставили письменное информированное согласие об участии в исследовании.

В таблице 1 представлены общая характеристика и клинико-лабораторные проявления ССД.

Таблица 1. Общая характеристика и клинико-лабораторные проявления у пациентов с ССД.

У большинства пациентов (80%) диагностирована ограниченная форма ССД. Пациенты с ССД не получали терапию противоревматическими препаратами.

Моноциты CD14+ выделяли из образцов цельной крови стандартным методом выделения лейкоцитарной фракции в градиенте фиколла с последующим отбором клеток CD14+ методом магнитной сепарации на колонках (MilteNY Biotec, США) с использованием парамагнитных наночастиц (MilteNY Biotec, США). Выделение ДНК из CD14+-моноцитов и цельной крови проводили с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells («Евроген», Россия) по протоколу производителя. Концентрацию и чистоту полученной ДНК определяли с помощью прибора BIOSPEC-NANO spectrophotometer (Shimadzu, Япония).

Копийность мтДНК и яДНК определяли методом цифровой ПЦР на приборе QIAcuity Eight (Qiagen, Германия). Для амплификации использовали праймеры («Синтол», Россия) и реакционную смесь QuantiFast SYBR Green Master Mix («Qiagen», Германия). ПЦР проводили в течение 42 циклов, с

предварительной денатурацией в течение 2 минут при 95°C для первого цикла, следующие 40 циклов включали денатурацию в течение 15 секунд при 95°C, отжиг в течение 30 секунд при 60°C и элонгацию в течение 30 секунд. при 72°C финальный цикл (продление температуры) длился 5 минут при 40°C. Для каждого тестируемого образца реакцию ПЦР проводили не менее трех раз. ПЦР-реакции проводили в общем объеме 12 мкл с использованием 5 мкл геномной ДНК, 0,4 мкл прямого и обратного праймеров, 4 мкл QuantiFast SYBR Green Master Mix и 2,2 мкл деионизированной воды.

Для определения количества копий мтДНК и нДНК использовали праймеры F MT-ND4, R MT-ND4, F NCOA3, R NCOA3. Нуклеотидная последовательность F MT-ND4: 5'-ccattctcctcctatccctcaac-3', R MT-ND4: 5'-108 cacaatctgatgttttggttaaactatattt-3', F NCOA3: 5'-gagtttcctggacaaatgag-3', R NCOA3: 5'-109 cattgtttcatatctctggcg- 3 '. Праймеры были выбраны на основе литературных данных [2, 10]. Величину числа копий мтДНК на клетку, использованную для анализа, рассчитывали как соотношение копий мтДНК и яДНК [15]. Исследователи не знали о групповом статусе и клинических характеристиках участников исследования.

Результаты. Абсолютное число копий мтДНК CD14+ моноцитов было достоверно выше в группе больных ССД (108 [60-162]) по сравнению с контрольной группой (72 [6059-79], p=0,03) (рисунок 1), тогда как абсолютное число копий мтДНК всех популяций клеток, циркулирующих в крови, достоверно не различалось (109 [72-171] и 1287 [7085-225227], p=0,39).

Место для рисунка 1

Рисунок 1. Число копий мтДНК в CD14+ моноцитах и цельной крови пациентов с ССД и здоровых участников исследования. (a) количественное определение мтДНК моноцитов CD14+; (b) количественная оценка мтДНК всех популяций клеток, циркулирующих в крови.

При анализе связи числа копий мтДНК в CD14+ моноцитах с клинико-лабораторными характеристиками пациентов с ССД была обнаружена обратная корреляция числа копий мтДНК с длительностью заболевания (R=-0,420, p=0,037). Ассоциаций количества копий мтДНК в цельной крови с клиническими характеристиками пациентов с ССД не было обнаружено. Более высокое число копий мтДНК в CD14 + моноцитах было связано с повышенной ЛПС-стимулированной секрецией IL-6 культивируемыми CD14 + моноцитами участников исследования с ССД (R = 0,569, p = 0,006).

Обсуждение. Показана связь числа копий мтДНК с развитием сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и метаболических заболеваний (Ashar et al., 2017; Ding et al., 2023; S. Y. Yang et al., 2021). Известно, что при большинстве этих заболеваний, ассоциированных с митохондриальной дисфункцией, число копий мтДНК снижено по сравнению со здоровым контролем [5, 12]. Было обнаружено, что количество копий мтДНК негативно связано с развитием метаболического синдрома, сахарного диабета 2 типа [7] и хронической болезни почек [11].

Предыдущее исследование количества копий мтДНК в периферической крови пациентов с ССД показало, что количество копий мтДНК было ниже у пациентов с ССД по сравнению со здоровыми участниками исследования [13]. Исследования количества копий мтДНК при других ревматических заболеваниях показали противоречивые результаты. В частности, при системной красной волчанке (СКВ) количество копий мтДНК в плазме было увеличено в 8,8 раза по сравнению с контрольной группой [9]. Рост числа циркулирующей мтДНК, в отличие от числа копий ядерной ДНК, было отмечено у больных СКВ даже в случае ремиссии заболевания, и оказалось более тесно связанным с активностью СКВ, чем признанные маркеры активности заболевания (уровни комплемента, титры антител к двухцепочечной ДНК). Исследование пациентов с другим аутоиммунным заболеванием - синдромом Шегрена, показало уменьшение количества копий

мтДНК и увеличение экспрессии генов, связанных с митохондриальной динамикой, в периферической крови по сравнению со здоровыми субъектами [3].

Важным результатом исследования стала связь более длительного течения ССД с меньшим количеством копий мтДНК. Предположительно, это может происходить за счет элиминации дисфункциональных митохондрий. Поврежденные митохондрии могут вызвать гибель клеток, после чего высвобождение мтДНК способствует усилению системного воспаления за счет активации иммунных клеток [6]

В моноцитах больных с меньшей длительностью ССД увеличение количества митохондрий может быть следствием компенсаторного механизма, необходимого для поддержания сниженной функции дефектных митохондрий, который угасает при длительном течении заболевания [6].

Выявленная в нашей работе ассоциация повышенной ЛПС-стимулированной секреции IL-6 с более высоким количеством копий мтДНК в CD14 + моноцитах позволяет предположить важную роль митохондриальной дисфункции в провоспалительной активации моноцитов при ССД. Несколько недавних исследований числа копий мтДНК, митохондриальной гетероплазмии и митофагии при других аутоиммунных ревматических заболеваниях показывают, что митохондриальная дисфункция принимает участие в активации врожденной иммунной системы в патогенезе данных заболеваний [14, 17].

Выводы: Увеличение числа копий мтДНК в CD14+ моноцитах является возможным механизмом поддержания сниженной функции дефектных митохондрий в моноцитах пациентов с ССД, связанной с развитием и прогрессированием ССД.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, грант N 22-15-00199.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Общая характеристика и клинико-лабораторные проявления у пациентов с ССД.
Table 1 General characteristics, clinical and laboratory manifestations of SSc patients.

Характеристика / Characteristics	**Пациенты ССД / SSc patients** (n=25)
Возраст, года / Age, years	49 [43; 57]
Пол, жен/муж / Gender, f/m, n (%)	22 (88)/3 (12)
Длительность заболевания, годы / Disease duration, years	4,6 [1,0; 9,6]
Форма ССД / types of SSc, n (%): Лимитированная / Limited Диффузная / Diffuse	 20 (80) 5 (20)
Индекс активности, баллы / Activity index, points	2,1 [0,8; 2,8]
Проявления ССД / SSc manifestations, n (%) Утолщение кожи пальцев / Skin thickening of the fingers: Склередема / Scleredema Склеродактилия /Sclerodactyly	 20 (80) 8 (32)
Дигитальная ишемия / Digital ischemia: дигитальные язвочки / digital sores дигитальные рубчики / digital scars	 9 (36) 12 (48)
Телеангиэктазии / Telangiectasia	11 (44)
Феномен Рейно / Raynaud's phenomenon	20 (80)
Капилляроскопические изменения / Abnormal nailfold capillaries	21 (84)
Артриты / Arthritis	8 (32)
Легочная артериальная гипертензия / Pulmonary arterial hypertension Интерстициальное поражение легких / Interstitial lung disease	3 (12) 5 (20)
Поражение сердца / Heart damage	8 (32)
ССД-аутоантитела / SSc related autoantibodies, n (%): Антитела к топоизомеразе 1 / Anti-topoisomerase I autoantibodies	 8 (32)
Антицентромерные антитела / Anticentromere autoantibodies	12 (48)

Антитела к рибонуклеопротеину (РНП) / Anti-ribonucleoprotein (RNP) antibodies.	2 (8)

РИСУНКИ

Рисунок 1. Число копий мтДНК в CD14+ моноцитах и цельной крови пациентов с ССД и здоровых участников исследования.

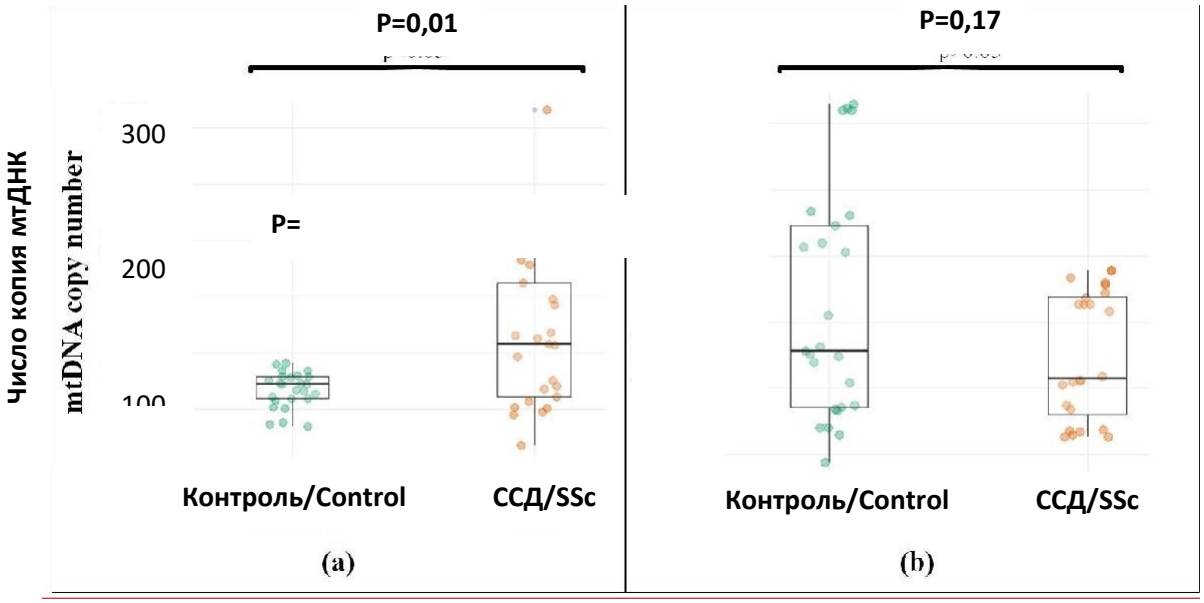
(a) Количественное определение мтДНК моноцитов CD14+;

(b) Количественная оценка мтДНК всех популяций клеток, циркулирующих в крови.

Figure 1. mtDNA copy number in CD14+ monocytes and whole blood of SSc patients and healthy participants.

(a) Quantitative determination of mtDNA of CD14+ monocyte;

(b) Quantitative determination of mtDNA of all cell populations circulating in the blood.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Герасимова Елена Владимировна, к.м.н., старший научный сотрудник отдела системных ревматических заболеваний НИИР им. В.А.Насоновой, г. Москва, 115522, Российская Федерация, Москва, Каширское шоссе, 34а.
Телефон +7 – 905-538-03-99, e-mail: gerasimovaev@list.ru

Gerasimova Elena V., PhD, Senior researcher of department of systemic rheumatic diseases V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Russian Federation, 34A, Kashirskoye shose, Moscow 115522.
+7 – 905-538-03-99, e-mail: gerasimovaev@list.ru

Блок 2. Информация об авторах

Богатырева Анастасия Ильинична, м.н.с. отдела системных ревматических заболеваний НИИР им. В.А.Насоновой, г. Москва, 115522, Российская Федерация, Москва, Каширское шоссе, 34а.
М.н.с. Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», 117418, Российская Федерация, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.
Bogatyreva Anastacia I., junior researcher of department of systemic rheumatic diseases V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia, 34A, Kashirskoye shose, Moscow 115522.
junior researcher Research institute of human morphology Russian National Research Center of Surgery named after B.V. Petrovsky, Russian Federation, Moscow, 1174183, Tsyurupy St.

Попкова Татьяна Валентиновна, д.м.н., начальник отдела системных ревматических заболеваний НИИР им. В.А.Насоновой, г. Москва, 115522, Российская Федерация, Москва, Каширское шоссе, 34а.

Popkova Tatiana V., PhD, Head of the department of systemic rheumatic diseases V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Russian Federation, 34A, Kashirskoye shose, Moscow 115522.

Герасимова Дарья Александровна, м.н.с. Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, 119048, Российская Федерация, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Gerasimova Daria A., junior researcher of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Russian Federation, Moscow, 119048, 8/2 Trubetskaya St.

Блок 3. Метаданные статьи

ЧИСЛО КОПИЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В МОНОЦИТАХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИЕЙ

MITOCHONDRIAL DNA COPY NUMBER IN MONOCYTES AND PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:
Митохондриальная ДНК при системной склеродермии
Mitochondrial DNA in systemic sclerosis

Ключевые слова: ДНК, митохондрии, моноциты, системная склеродермия, аутоиммунитет, воспаление.
Key words: DNA, mitochondrial, monocytes, systemic sclerosis, autoimmunity, inflammation.

Раздел Объединенный иммунологический форум 2024
Количество страниц текста – 5

 10.46235/1028-7221-16744-MDC

Количество таблиц – 1
Количество рисунков – 1
Дата поступления: 29.03.2024

 ISSN 1028-7221 (Print)
ISSN 2782-7291 (Online)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1.	Ashar FN, Zhang Y, Longchamps RJ, Lane J, Moes A, Grove ML, Mychaleckyj JC, Taylor KD, Coresh J, Rotter JI, Boerwinkle E, Pankratz N, Guallar E, Arking DE. Association of Mitochondrial DNA Copy Number With Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiol*. 2017;2(11):1247-1255	Ashar FN, Zhang Y, Longchamps RJ, Lane J, Moes A, Grove ML, Mychaleckyj JC, Taylor KD, Coresh J, Rotter JI, Boerwinkle E, Pankratz N, Guallar E, Arking DE. Association of Mitochondrial DNA Copy Number With Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiol*. 2017;2(11):1247-1255	doi:10.1001/JAMACARDIO.2017.3683.
2.	Bai RK, Wong LJC. Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease. *J Mol Diagn*. 2005;7(5):613-622.	Bai RK, Wong LJC. Simultaneous Detection and Quantification of Mitochondrial DNA Deletion(s), Depletion, and Over-Replication in Patients with Mitochondrial Disease. *J Mol Diagn*. 2005;7(5):613-622.	doi:10.1016/S1525-1578(10)60595-8.
3.	De Benedittis G, Latini A, Colafrancesco S, Priori R, Perricone C, Novelli L, Borgiani P, Ciccacci C. Alteration of Mitochondrial DNA Copy Number and Increased Expression Levels of Mitochondrial Dynamics-Related Genes in Sjögren's Syndrome. *Biomedicines*. 2022;10(11):2699.	De Benedittis G, Latini A, Colafrancesco S, Priori R, Perricone C, Novelli L, Borgiani P, Ciccacci C. Alteration of Mitochondrial DNA Copy Number and Increased Expression Levels of Mitochondrial Dynamics-Related Genes in Sjögren's Syndrome. *Biomedicines*. 2022;10(11):2699.	doi:10.3390/biomedicines10112699
4.	Brown M, O'Reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic	Brown M, O'Reilly S. The immunopathogenesis of fibrosis in systemic	doi:10.1111/cei.13238

	sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(3):310-321	sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(3):310-321	
5.	Ding X, Fang T, Pang X, Pan X, Tong A, Lin Z, Zheng S, Zheng N. Mitochondrial DNA abnormalities and metabolic syndrome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023;11:1153174.	Ding X, Fang T, Pang X, Pan X, Tong A, Lin Z, Zheng S, Zheng N. Mitochondrial DNA abnormalities and metabolic syndrome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2023;11:1153174.	doi:10.3389/fcell.2023.1153174
6.	Faas MM, de Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(10):165845	Faas MM, de Vos P. Mitochondrial function in immune cells in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020;1866(10):165845	doi:10.1016/j.bbadis.2020.165845.
7.	Fazzini F, Lamina C, Raftopoulou A, Koller A, Fuchsberger C, Pattaro C, Del Greco FM, Döttelmayer P, Fendt L, Fritz J, Meiselbach H, Schönherr S, Forer L, Weissensteiner H, Pramstaller PP, Eckardt KU, Hicks AA, Kronenberg F. Association of mitochondrial DNA copy number with metabolic syndrome and type 2 diabetes in 14 176 individuals. *J Intern Med*. 2021;290(1):190-202.	Fazzini F, Lamina C, Raftopoulou A, Koller A, Fuchsberger C, Pattaro C, Del Greco FM, Döttelmayer P, Fendt L, Fritz J, Meiselbach H, Schönherr S, Forer L, Weissensteiner H, Pramstaller PP, Eckardt KU, Hicks AA, Kronenberg F. Association of mitochondrial DNA copy number with metabolic syndrome and type 2 diabetes in 14 176 individuals. *J Intern Med*. 2021;290(1):190-202.	doi:10.1111/joim.13242
8.	Fullard N, O'Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):511-517	Fullard N, O'Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2015;37(5):511-517	doi:10.1007/S00281-015-0503-7/METRICS

9.	Giaglis S, Daoudlarian D, Voll RE, Kyburz D, Venhoff N, Walker UA. Circulating mitochondrial DNA copy numbers represent a sensitive marker for diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. *RMD Open*. 2021;7(3):e002010.	Giaglis S, Daoudlarian D, Voll RE, Kyburz D, Venhoff N, Walker UA. Circulating mitochondrial DNA copy numbers represent a sensitive marker for diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. *RMD Open*. 2021;7(3):e002010.	doi:10.1136/RMDOPEN-2021-002010.
10.	Gu F, Chauhan V, Kaur K, Brown WT, LaFauci G, Wegiel J, Chauhan A. Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Transl Psychiatry*. 2013;3(9):e299	Gu F, Chauhan V, Kaur K, Brown WT, LaFauci G, Wegiel J, Chauhan A. Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. *Transl Psychiatry*. 2013;3(9):e299	doi:10.1038/TP.2013.68
11.	Malik AN. Mitochondrial DNA - novel mechanisms of kidney damage and potential biomarker. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2023;32(6):528-536.	Malik AN. Mitochondrial DNA - novel mechanisms of kidney damage and potential biomarker. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2023;32(6):528-536.	doi:10.1097/MNH.0000000000000922
12.	Malik AN, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*. 2013;13(5):481-492	Malik AN, Czajka A. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*. 2013;13(5):481-492	doi:10.1016/J.MITO.2012.10.011
13.	Movassaghi S, Jafari S, Falahati K, Ataei M, Sanati MH, Jadali Z. Quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood of patients	Movassaghi S, Jafari S, Falahati K, Ataei M, Sanati MH, Jadali Z. Quantification of mitochondrial DNA damage and copy number in circulating blood of patients with	doi:10.1016/J.ABD.2019.11.003.

	with systemic sclerosis by a qPCR-based assay. *An Bras Dermatol*. 2020;95(3):314-319	systemic sclerosis by a qPCR-based assay. *An Bras Dermatol*. 2020;95(3):314-319	
14.	Quintero-González DC, Muñoz-Urbano M, Vásquez G. Mitochondria as a key player in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2022;55(8):497-505	Quintero-González DC, Muñoz-Urbano M, Vásquez G. Mitochondria as a key player in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2022;55(8):497-505	doi:10.1080/08916934.2022.2112181
15.	Shoop WK, Gorsuch CL, Bacman SR, Moraes CT. Precise and simultaneous quantification of mitochondrial DNA heteroplasmy and copy number by digital PCR. *J Biol Chem*. 2022;298(11):102574	Shoop WK, Gorsuch CL, Bacman SR, Moraes CT. Precise and simultaneous quantification of mitochondrial DNA heteroplasmy and copy number by digital PCR. *J Biol Chem*. 2022;298(11):102574	doi:10.1016/J.JBC.2022.102574
16.	Svendsen AJ, Tan Q, Jakobsen MA, Thyagarajan B, Nygaard M, Christiansen L, Mengel-From J. White blood cell mitochondrial DNA copy number is decreased in rheumatoid arthritis and linked with risk factors. A twin study. *J Autoimmun*. 2019;96:142-146.	Svendsen AJ, Tan Q, Jakobsen MA, Thyagarajan B, Nygaard M, Christiansen L, Mengel-From J. White blood cell mitochondrial DNA copy number is decreased in rheumatoid arthritis and linked with risk factors. A twin study. *J Autoimmun*. 2019;96:142-146.	doi:10.1016/J.JAUT.2018.09.008
17.	Veale DJ, Orr C, Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):343-354	Veale DJ, Orr C, Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):343-354	doi:10.1007/s00281-017-0633-1

18.	Yang S, Zhao M, Jia S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2023;14:1080310.	Yang S, Zhao M, Jia S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2023;14:1080310.	doi:10.3389/fimmu.2023.1080310
19.	Yang SY, Castellani CA, Longchamps RJ, Pillalamarri VK, O'rourke B, Guallar E, Arking DE. Blood-derived mitochondrial DNA copy number is associated with gene expression across multiple tissues and is predictive for incident neurodegenerative disease. *Genome Res*. 2021;31(3):349-358.	Yang SY, Castellani CA, Longchamps RJ, Pillalamarri VK, O'rourke B, Guallar E, Arking DE. Blood-derived mitochondrial DNA copy number is associated with gene expression across multiple tissues and is predictive for incident neurodegenerative disease. *Genome Res*. 2021;31(3):349-358.	doi:10.1101/gr.269381.120
20.	Zank DC, Bueno M, Mora AL, Rojas M. Idiopathic pulmonary fibrosis: Aging, mitochondrial dysfunction, and cellular bioenergetics. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5(10).	Zank DC, Bueno M, Mora AL, Rojas M. Idiopathic pulmonary fibrosis: Aging, mitochondrial dysfunction, and cellular bioenergetics. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5(10).	doi:10.3389/fmed.2018.00010