

# ЦИБРИДНЫЕ ЛИНИИ НА ОСНОВЕ ТНР-1 С РАЗЛИЧНЫМ МИТОХОНДРИАЛЬНЫМ ГЕНОМОМ ИМЕЛИ РАЗНЫЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ

Журавлев А.Д.<sup>1,2</sup>, Верховова С.С.<sup>1,2</sup>, Кубекина М.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ  
«Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

<sup>3</sup> Центр коллективного пользования и Центр высокоточного редактирования и генетических технологий  
для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук», Москва, Россия

**Резюме.** Большинство возрастных заболеваний человека сопровождается хроническим воспалением. Современные исследования направлены на изучение принципов формирования иммунного ответа. До сих пор не известны причины, по которым локальная воспалительная реакция не может разрешиться и переходит в вялотекущую хроническую форму. Врожденный иммунитет первым отвечает на вторжение патогенов. Важной составляющей воспалительной реакции является секреция иммунными клетками провоспалительных цитокинов, таких как TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL2. Это необходимо для рекрутирования в очаг воспаления иммунокомпетентных клеток. Чтобы избежать гибели клеток в результате высоких концентраций цитокинов и, как следствие, повреждения ткани, существует механизм толерантности врожденного иммунитета. Толерантность врожденного иммунитета заключается в снижении секреции провоспалительных цитокинов в ответ на повторное влияние патогена. Известно, что в формировании иммунного ответа важную роль играют митохондрии. Следовательно, нарушения в функционировании митохондрий могут приводить к нарушениям иммунного ответа. Чтобы избежать накопления дефектных митохондрий в клетке, существует контроль качества митохондрий. Митофагия, являясь специализированной формой аутофагии, очищает клетку от дисфункциональных митохондрий. Ранее нашей лаборатории удалось разработать цибриды. Это линии, которые были получены на основе моноцитарной клеточной линии ТНР-1, в которой предварительно убрали митохондрии. Чтобы получить цибриды, получившиеся безъядерные клетки ТНР-1 кокультивировали с тромбоцитами от пациентов. Таким образом, цибриды несут в себе ядерный геном ТНР-1 и митохондриальный геном пациента. В нашем исследовании мы решили изучить способность клеток, несущих разный митохондриальный геном, генерировать провоспалительный ответ, а также формировать толерантность в дальнейшем. Для этого мы выбрали модель толерантности

---

**Адрес для переписки:**

Журавлев Александр Дмитриевич  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей  
патологии и патофизиологии»  
125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.  
Тел.: 8 (985) 791-71-98.  
E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

**Address for correspondence:**

Alexander D. Zhuravlev  
Institute of General Pathology and Pathophysiology  
8 Baltiyskaya St  
Moscow  
125315 Russian Federation  
Phone: +7 (985) 791-71-98.  
E-mail: Zhuravel17@yandex.ru

---

**Образец цитирования:**

А.Д. Журавлев, С.С. Верховова, М.В. Кубекина  
«Цибридные линии на основе ТНР-1 с различным  
митохондриальным геномом имели разный  
провоспалительный ответ» // Российский  
иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 139-144.  
doi: 10.46235/1028-7221-16781-TCC

© Журавлев А.Д. и соавт., 2024  
Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

**For citation:**

A.D. Zhuravlev, S.S. Verkhova, M.V. Kubekina "THP1-  
based cybrid cells with various mtDNA mutations differ by  
the ability to form inflammatory response", Russian Journal  
of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024,  
Vol. 27, no. 2, pp. 139-144.  
doi: 10.46235/1028-7221-16781-TCC

© Zhuravlev A. D. et al., 2024  
The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16781-TCC

к экдотоксину. Толерантность к эндотоксину или липополисахариду определяется как резистентное, противовоспалительное состояние в ответ на вторичную дозу липополисахариду после первичного воздействия. Таким образом, мы дважды стимулировали цибридные линии липополисахаридом и после этого оценивали секреции цитокинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, CCL2 с помощью ИФА. Цибриды демонстрировали два уровня провоспалительного ответа: высокий и низкий. Более того, цибриды с высоким провоспалительным ответом либо формировали, либо не формировали толерантность при повторной стимуляции. В результате исследования мы установили, что клетки, различающиеся по митохондриальному геному, отличались друг от друга по своему иммунному ответу. Будущие исследования улучшат наше понимание механизмов участия митохондрий в патологических процессах. Вероятно, что исследования недостаточной митофагии и роли определенных мутаций мтДНК в ее развитии принесут многообещающие результаты.

*Ключевые слова:* цитокины, митохондрии, хроническое воспаление, цибриды, толерантность врожденного иммунитета, митофагия

## THP1-BASED CYBRID CELLS WITH VARIOUS mtDNA MUTATIONS DIFFER BY THE ABILITY TO FORM INFLAMMATORY RESPONSE

Zhuravlev A.D.<sup>a, b</sup>, Verkhova S.S.<sup>a, b</sup>, Kubekina M.V.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Most age-related human diseases are accompanied by chronic inflammation. Modern research is aimed at studying the principles of the formation of the immune response. The reasons why the local inflammatory reaction cannot be resolved and becomes a sluggish chronic form are still unknown. Immune cells secrete cytokines in response to pathogens. To avoid cell death as a result of high concentrations of cytokines and resulting tissue damage, there is a mechanism of innate immune tolerance. Innate immune tolerance involves a decrease in the secretion of proinflammatory cytokines in response to repeated exposure to a pathogen. It is known that mitochondria play an important role in the formation of the immune response. Consequently, impaired mitochondrial function can lead to impaired immune response. To control the quality of mitochondria in the cell, there is a mechanism – mitophagy. Previously, we have created cybrid lines based on the monocytic cell line THP-1. Cybrids were obtained by fusion of THP-1 cells (mitochondria were removed) with platelets from patients. Each of the cybrid lines had the THP-1 nuclear genome and an individual patient's mitochondrial genome. In our study, we decided to study the ability of cells carrying different mitochondrial genomes to generate a proinflammatory response, as well as to form tolerance in the future. For this purpose, we chose a model of endotoxin tolerance. Thus, we stimulated the cybrid lines twice with lipopolysaccharide and then assessed the secretion of the cytokines TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and CCL2 using ELISA. The cybrids demonstrated two levels of proinflammatory response: high and low. Moreover, cybrids with a high proinflammatory response either did or did not develop tolerance upon repeated stimulation. In our study, cells that differed from each other only in mitochondrial genome demonstrated three types of reactions upon the induction of immune tolerance to LPS. Future studies will improve our understanding of the mechanisms of mitochondrial involvement in pathological processes. It is likely that studies of deficient mitophagy and the role of certain mtDNA mutations in its development will yield promising results.

*Keywords:* cytokines, mitochondria, chronic inflammation, cybrids, innate immune tolerance, mitophagy

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00339.

## Введение

Воспаление — это защитная реакция иммунитета на патоген или повреждение. Одним из важных проявлений воспалительной реакции является секреция иммунными клетками провоспалительных цитокинов, таких как  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ,  $CCL2$ . Это необходимо для рекрутирования в очаг воспаления иммунокомпетентных клеток и активации механизмов устранения патогена [10]. Чтобы избежать апоптоза клеток в результате высоких концентраций цитокинов и, как следствие, повреждения ткани, существует механизм толерантности врожденного иммунитета. Толерантность представляет собой механизм, при котором происходит снижение секреции провоспалительных цитокинов иммунокомпетентных клеток при повторных воздействиях патогена и способствует разрешению воспаления [2]. Если воспаление не может разрешиться, то оно перетекает в хроническое состояние [7].

Современные исследования направлены на изучение роли митохондрий в развитии хронического воспаления [1, 9]. Функциональная активность клеток, участвующих в иммунном ответе, зависит от работы митохондрий. Митохондрии представляют собой полуавтономные органеллы, обладающие собственной митохондриальной ДНК (мтДНК). Мутации в мтДНК происходят чаще из-за близости к активным формам кислорода, кольцевой структуры, несовершенной репарации [5]. Поэтому клетке необходимо своевременно устранять поврежденные органеллы. Контроль качества митохондрий осуществляется несколькими механизмами, одним из которых является митофагия. Митофагия обеспечивает селективное удаление поврежденных митохондрий. Снижение эффективности митофагии приводит к накоплению дефектных митохондрий, что в дальнейшем может привести к повышенному уровню секреции провоспалительных цитокинов и, как следствие, чрезмерному воспалению [3, 11].

Удобной моделью для изучения функциональной значимости митохондрий являются цитоплазматические гидриды (цибриды). Цибриды были созданы нашей лабораторией ранее, для этого безмитохондриальные клетки ТНР-1 слили с тромбоцитами от пациентов. Таким образом, все цибриды несут единый ядерный геном и уникальный митохондриальный геном [6].

**Целью настоящего исследования** было изучение способности цибридных линий, несущих разный митохондриальный геном, генерировать провоспалительный ответ, а также формировать толерантность.

## Материалы и методы

Для изучения взаимосвязи между мутациями мтДНК и воспалительным ответом были выбраны цибридные линии. Для получения цибридных линий на ТНР-1 воздействовали бромистым этидием для угнетения митохондрий. После того, как в клетках не осталось митохондрий, они культивировались с тромбоцитами от пациентов с хроническими заболеваниями. Особенность этих линий в том, что у них единый ядерный геном. Цибридные линии были получены нашей лабораторией ранее [6].

Для воспалительной реакции и толерантности к липополисахариду (LPS) цибридные линии высевали в стерильные 6-луночные планшеты по две лунки в концентрации 1 млн клеток/мл по 2 мл в каждую лунку. В одну из лунок к клеткам добавляли LPS в концентрации 1 мкг/мл. Клетки с LPS инкубировали в течение 4 ч в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °C (95% воздуха и 5%  $CO_2$ ). Через 4 ч клетки откручивали при 300 g в течение 5 мин, отмывали при помощи PBS, добавляли 2 мл RPMI-1640 (10% сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) и высевали по 1 мл в 24-луночный планшет. Затем добавляли в одну из лунок LPS в концентрации 1 мкг/мл. Клетки с LPS инкубировали в течение 20 ч в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °C (95% воздуха и 5%  $CO_2$ ). Спустя 20 ч образцы культуральной среды отбирали в пробирки, центрифугировали в течение 5 минут при 300 g. Супернатант отбирали в отдельные пробирки для оценки секреции панели цитокинов методом ИФА с использованием реагентов R&D Systems. Проведение ИФА согласно протоколу анализа. Оптическую плотность калибраторов и исследуемых образцов измеряли на планшетном ридере CLARIOstar.

Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения SPSS Statistics 26.

## Результаты и обсуждение

Мы решили оценить способность исследуемых клеточных линий генерировать провоспалительный ответ при стимуляции LPS, а также дальнейшую способность клеток формировать иммунную толерантность.



цию по IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 и не формировали толерантность по TNF $\alpha$ , IL-8. LSM2 формировала толерантность по TNF $\alpha$  и по CCL2, не формировала толерантность по IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8. HSMAM3 формировала толерантность по TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и не формировала по IL-8, CCL2. HSMAM1, TC-522, TCP-521 формировали по CCL2, и не формировали по TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8.

Таким образом, клетки, различающиеся по митохондриальному геному, качественно отличались по типу воспалительной реакции.

Ранее группа ученых провела клиническое исследование и показала, что у пациентов с мутациями или делециями в мтДНК секреция провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  лейкоцитами была выше в ответ на LPS [4]. Можно предположить, что ответственным за накопление мутация мтДНК могло быть нарушение в митофагии. Более того, было показано, что нарушения в секреции PINK1 и/или PARKIN, ключевых белков митофагии, также вело к повышенному содержанию IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 [8].

## Заключение

В своем исследовании мы продемонстрировали, что клетки, различающиеся между собой только митохондриальным геномом, качественно отличались по типу воспалительной реакции. Наше исследование, безусловно, имеет ряд ограничений. Так, мы не продемонстрировали роль конкретных мутаций мтДНК в нарушениях иммунной реакции, а также не осветили механизмы этих нарушений. Однако, вероятно, митохондриальные мутации, а значит, и митохондриальная дисфункция, действительно могут лежать в основе нарушений функций иммунных клеток. Раскрытие механизмов влияния мутаций мтДНК на формирование иммунного ответа и толерантности представляется крайне перспективным направлением для разработки эффективной и безопасной терапии заболеваний воспалительного генеза.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, за возможность использования научного оборудования.

## Список литературы / References

1. Dela Cruz C.S., Kang M.J. Mitochondrial dysfunction and damage associated molecular patterns (DAMPs) in chronic inflammatory diseases. *Mitochondrion*, 2018, Vol. 41, pp. 37-44.
2. Dominguez-Andres J., Netea M.G. Long-term reprogramming of the innate immune system. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 105, no. 2, pp. 329-338.
3. Fang E.F., Hou Y., Palikaras K., Adriaanse B.A., Kerr J.S., Yang B., Lautrup S., Hasan-Olive M.M., Caponio D., Dan X., Rocktäschel P., Croteau D.L., Akbari M., Greig N.H., Fladby T., Nilsen H., Cader M.Z., Mattson M.P., Tavernarakis N., Bohr V.A. Mitophagy inhibits amyloid- $\beta$  and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.*, 2019, Vol. 22 no. 3, pp. 401-412.
4. Karan K.R., Trumpff C., Cross M., Engelstad K.M., Marsland A.L., McGuire P.J., Hirano M., Picard M. Leukocyte cytokine responses in adult patients with mitochondrial DNA defects. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2022, Vol. 100, no. 6, pp. 963-971.
5. Marian A.J. Mitochondrial genetics and human systemic hypertension. *Circ. Res.*, 2011, Vol. 108, no. 7, pp. 784-746.
6. 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. Creation of cybrid cultures containing mtDNA mutations m.12315G>A and m.1555G>A, associated with atherosclerosis. *Biomolecules*, 2019, Vol. 9, no. 9, 499. doi: 10.3390/biom9090499.
7. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 101, no. 1, pp. 107-119.
8. Sliter D.A., Martinez J., Hao L., Chen X., Sun N., Fischer T.D., Burman J.L., Li Y., Zhang Z., Narendra D.P., Cai H., Borsche M., Klein C., Youle R.J. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature*, 2018, Vol. 561, no. 7722, pp. 258-262.
9. Vaamonde-García C., López-Armada M.J. Role of mitochondrial dysfunction on rheumatic diseases. *Biochem. Pharmacol.*, 2019, Vol. 165, pp. 181-195.

10. Vacchelli E., Galluzzi L., Eggermont A., Galon J., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. Trial Watch: Immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology*, 2012, Vol. 1, no. 4, pp. 493-506.

11. Xu Y., Shen J., Ran Z. Emerging views of mitophagy in immunity and autoimmune diseases. *Autophagy*, 2020, Vol. 16, no. 1, pp. 3-17.

---

**Авторы:**

**Журавлев А.Д.** — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории ангиопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; младший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

**Верхова С.С.** — аспирант Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»; старший лаборант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

**Кубекина М.В.** — к.б.н., научный сотрудник Центра коллективного пользования и Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук», Москва, Россия

**Authors:**

**Zhuravlev A.D.**, Postgraduate Student, Junior Researcher Associate, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Junior Research Associate, Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery Moscow, Russian Federation

**Verkhova S.S.**, Postgraduate Student, Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre Of Surgery; Senior Assistant, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russian Federation

**Kubekina M.V.**, PhD (Biology), Research Associate, Core Facility Center and Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 31.03.2024  
Отправлена на доработку 05.04.2024  
Принята к печати 09.04.2024

Received 31.03.2024  
Revision received 05.04.2024  
Accepted 09.04.2024