

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА ИНБРЕДНЫХ МЫШЕЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

© 2024 г. Ю.Л. Бабурина*, И.В. Одинокова*, Р.Р. Крестинин*, А.И. Звягина*,
Л.Д. Сотникова*, О.В. Крестинина*,#

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 27.03.2024 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

Развитие сахарного диабета, одного из наиболее распространенных метаболических заболеваний в развитом мире, связано с нарушением секреции инсулина или с резистентностью клеток к действию этого гормона (диабет 1 и 2 типа соответственно). В обоих случаях общим патологическим изменением является повышение уровня глюкозы в крови — гипергликемия, что в конечном итоге может привести к серьезному поражению органов и тканей организма. Считается, что митохондрии являются одной из основных мишеней диабета на внутриклеточном уровне. В настоящем исследовании мы изучили функциональное состояние митохондрий сердца инбредных мышей линии C57BL/Ks-db+/+m, несущих рецессивный ген *diabetes-db* (диабетические мыши). Проведен гистологический анализ левого желудочка сердца диабетических и контрольных мышей. В образцах ткани сердца диабетических мышей наблюдалось увеличение интенсивности окраски эозином, что подразумевает повреждение структуры цитоплазматических белков. Кроме того, было показано, что дыхательный контроль и емкость Ca^{2+} в митохондриях диабетических мышей снижались по сравнению с контрольными. Были проанализированы изменения в митохондриальной динамике и митофагии в этих условиях.

Ключевые слова: сахарный диабет, митохондриальная дисфункция, митохондрии сердца мыши, Ca^{2+} -емкость.

DOI: 10.31857/S0006302924060062, EDN: NLUUQB

На сегодняшний день заболевание сахарным диабетом является самой распространенной эндокринной патологией во многих странах мира. Общая численность пациентов с сахарным диабетом на территории Российской Федерации, состоящих на диспансерном учете по данным «Федерального Регистра сахарного диабета» на 1 января 2023 года составляет 4 962 762 (3.31% населения РФ). Из них сахарный диабет 1 типа — 5.58%, сахарный диабет 2 типа — 92.33%, другие типы сахарного диабета — 2.08% [1]. Митохондрии играют важную роль в процессах передачи энергии, передачи сигналов и путей гибели кле-

ток, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями [2] и являются одной из основных мишеней диабета на внутриклеточном уровне. Сахарный диабет является важным фактором риска развития патологий сердца. Сердечная дисфункция у больных сахарным диабетом обусловлена множеством патологических механизмов. Эти механизмы связаны с повреждением митохондрий, которое может быть основной причиной патофизиологии диабетической болезни сердца [3].

Общепризнано, что ионы Ca^{2+} являются универсальным регулятором многих внутриклеточных процессов. Важной функцией митохондрий является поддержание низкой концентрации Ca^{2+} внутри клеток. При высокой концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле происходит его поглощение митохондриями. Поглощенный Ca^{2+} быстро транспортируется в митохондрии и хранится в матриксе, что считается важным для регуляции

Сокращения: мПТР — митохондриальная пора неспецифической проницаемости (mitochondrial permeability transition pore), Mfn1 и Mfn2 — митофузины 1 и 2, OPA1 — белок атрофии зрительного нерва 1, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, МСМ — митохондрии сердца мыши, PINK1 — PTEN-индуцированная киназа 1, GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, DRP1 — родственный динамину белок 1.

гомеостаза Ca^{2+} в условиях стресса. Избыточное накопление Ca^{2+} в митохондриях приводит к открытию Ca^{2+} -чувствительной неспецифической поры (мРТР — mitochondrial permeability transition pore) во внутренней мембране и инициации гибели клеток [4]. Было показано, что митохондрии сердца диабетических крыс были более чувствительны к индукции мРТР, чем митохондрии контрольных животных [5].

Митохондрии подвергаются постоянным процессам слияния и деления при этом изменяя свою форму и размер. Эти процессы характеризуют митохондриальную динамику и необходимы для удовлетворения метаболических потребностей клетки. Слияние опосредуется митофузинами 1 (Mfn1) и 2 (Mfn2) и белком атрофии зрительного нерва 1 (OPA1), тогда как деление — динамин-связанным белком 1 (Drp1) и некоторыми другими белками [6]. Исследования митохондриальной динамики при сахарном диабете ограничены, но есть убедительные доказательства того, что динамика митондрий изменяется в кардиомиоцитах, обработанных высоким содержанием глюкозы в диабетическом сердце. Так, было показано, что высокий уровень глюкозы индуцирует образование коротких и небольших митондрий в клетках кардиомиоцитов линии H9C2 [7]. При ингибировании деления митондрий K38A, доминантно-негативным мутантом Drp1, снижаются продукция АФК и гибель клеток, индуцированные глюкозой. Следовательно, фрагментированные митондрии более чувствительны к высокой токсичности глюкозы [8].

Процесс избирательного разрушения митондрий путем аутофагии представляет собой митофагию. Митофагия необходима живой клетке для поддержания качества митондрий и гомеостаза путем удаления ненужных или дисфункциональных митондрий. Кроме того, митофагия также защищает от апоптоза и от повреждения клеток токсичными веществами [9]. Развитие и прогрессирование диабета и его осложнений у человека и животных приводит к подавлению митондриального биогенеза и митофагии. В результате количество здоровых митондрий в клетке уменьшается, а доля поврежденных увеличивается. Эти изменения лежат в основе общей митондриальной дисфункции и нарушений при диабете [9].

В настоящем исследовании мы изучили изменение функционального состояния митондрий сердца инбредных мышей линии C57BL/Ks—db+/+m, несущих рецессивный ген *diabetes-db*. Был проведен гистологический анализ срезов левого желудочка, исследованы изменения содержания ферментов аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), тропонина I и миогло-

бина. Проанализированы изменения дыхательной активности митондрий, транспорта Ca^{2+} , емкости Ca^{2+} , а также митондриальной динамики в наших экспериментальных условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Использовали линию инбредных мышей C57BL/Ks—db+/+m в возрасте 4-х месяцев. Инбридинг Fn +8, генотип a, db+/+m. Мыши этой линии несут рецессивный ген *diabetes-db*, 8-я группа сцепления, 4-я хромосома (опытная мышь). Ген *db* в гомозиготном состоянии вызывает диабет, что сопровождается аномальным ожирением. Содержание сахара в крови высокое, уровень утилизации глюкозы снижен. Дефицита инсулина нет. Оба пола диабетиков бесплодны. Ген *m-misty* — рецессивный, осветляющий окраску маркер оппозитивной хромосомы, не несущий гена *db*. Окрас шерсти черный. В качестве контроля применяли линию инбредных мышей C57BL/6J в возрасте 4-х месяцев. Данная инбредная линия мышей является стандартной линией для поддержания мутаций. Применяется в качестве эталона для сравнения с особенностями других линий в исследовании культур тканей, загрязнения атмосферы, гематологии, химиотерапии рака, радиации, питания. Окрас шерсти — черный. Генотип — a, H-2b. В исследовании использовали по 8 мышей каждой линии из питомника «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России. Все животные содержались в одинаковых условиях в виварии ИТЭБ РАН, в помещении с контролируемой температурой и освещением ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-часовой световой цикл). Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра OneTouch Select Plus (LifeScan, Швейцария).

Гистологический анализ. Для гистологического анализа верхнюю половину сердца (желудочки) отрезали скальпелем от целого сердца сразу после извлечения из грудной полости и быстро промывали холодным фосфатно-солевым буфером для удаления крови. Затем образцы фиксировали в нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч при комнатной температуре по стандартной методике. После завершения фиксации фрагменты трижды отмывали от избытка фосфатов в дистиллированной воде и погружали в среду О.К.Т. Compound Tissue Tek (Sakura, Япония) на 12 ч при температуре 4°C . Серии поперечных срезов толщиной 9 мкм были изготовлены с использованием криотома Shandon 620E (Thermo Fisher Sci., США) с шагом 30 мкм. Каждую серию из трех последовательных срезов окрашивали гематоксилином и эозином и с помощью дифференциального трихромного метода окрашивания по Массону. Для получения общей картины повреждений тканей сердца были сняты гистопограммы на мик-

роскопической станции Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) с использованием программного обеспечения Nis Elements AR4.13.05 (Build 933).

Выделение митохондрий сердца мышей. Митохондрии сердца мыши (МСМ) выделяли путем дифференцированного центрифугирования. Сердце измельчали и гомогенизировали в среде, содержащей 75 мМ сахарозы (S7903, Sigma, США), 10 мМ трис-НСl (рН 7.4), 225 мМ маннита (M4125, Sigma, США), 0.5 мМ ЭДТА (E9884, Sigma, США), 0.5 мМ ЭГТА (E3889, Sigma, США) и 0.1% бычьего сывороточного альбумина (A6003, Sigma, США). Затем гомогенат центрифугировали при 1000 g в течение 10 минут. Полученный супернатант (с митохондриями) осаждали при 8500 g в течение 10 мин. Осадок, содержащий митохондрии, промывали средой выделения без ЭДТА, ЭГТА и бычьего сывороточного альбумина при 8500 g в течение 10 мин. Полученный осадок суспендировали в той же среде. Все процедуры проводили при температуре 4°C. Концентрацию белка в митохондриях, которая составляла 20–30 мг/мл, определяли методом Брэдфорда.

Измерение дыхательной активности митохондрий. Скорости потребления кислорода измеряли в термостатируемой ячейке, в которую вмонтированы O₂-электрод Кларка (Clark-type electrode) [10]. Митохондрии инкубировали в среде, содержащей 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 7.4, содержащем 120 мМ KCl, 2 мМ KН₂РO₄. В качестве дыхательных субстратов 5 мМ глутамата и 5 мМ малата использовали. Концентрация митохондриального белка в среде составляла 0.5 мг/мл. Скорости потребления кислорода в состояниях 2 (V₂), 3 (V₃) и 4 (V₄) определяли после добавления 200 мкМ АДФ к МСМ. Скорость разобщения окислительного фосфорилирования (V_u) измеряли после добавления 2,4-динитрофенола и оценивали, как число нг-атомов O, потребляемых митохондриями в минуту на мг белка. Дыхательный контроль рассчитывали, как соотношение V₃ к V₄. Измерения проводили в закрытой ячейке.

Приготовление тканевых образцов. Тканевые образцы готовили, как описано в работах [10, 11]. 6–7 мг ткани левого желудочка сердца отрезали и помещали ледяной буфер (RIPA-буфер с коктейлем протеаз), гомогенизировали и перемешивали

на орбитальном шейкере в течение 2 ч при температуре 4°C. Полученные образцы центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин при 4°C. Концентрацию белка в полученных образцах определяли по методу Брэдфорда. Аликвоты тканевой суспензии из каждой экспериментальной группы солибутилизовали в буфере Лэммли (Bio-Rad, США).

Электрофорез и вестерн-блоттинг. Приготовленные образцы по 20 мкг наносили на каждую линию и разделяли методом электрофореза в 12.5% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) осуществляли методом вестерн-блоттинга. Мембраны окрашивали антителами к АЛТ, АСТ, ЛДГ, тропонину I и миоглобину. Все антитела – от компании Abcam (Великобритания). Мембраны окрашивали антителами к родственному динамину белку 1 (DRP1, Elabscience, США), Mfn2 (Elabscience, США), OPA1 (Cloud-Clone Corp., США), PTEN-индуцированной киназе 1 (PINK1, Cusabio, США), Parkin (Cusabio, США). Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу (GAPDH, SantaCruz, США) использовали для нормирования количества белка в тканевых образцах.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный анализ (по Стьюденту–Ньюману–Кеулсу).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сначала мы измерили вес животных и уровень глюкозы в крови мышей исследуемых групп (табл. 1). Вес опытных мышей на 58% увеличился по сравнению с контрольными, а уровень глюкозы повышался в три раза.

Далее был проведен гистологический анализ гистотопограмм поперечных срезов желудочков сердца в исследуемых группах животных. (рис. 1). Выраженные изменения гистоархитектоники и структуры ткани сердца экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой обнаружены не были. Более того, дифференциальный гистохимический анализ на коллагеновые волокна не выявил признаков фибротических изменений ткани для всех групп. Детальное изуче-

Таблица 1. Характеристики массы тела и уровня глюкозы в крови используемых инбредных мышей

Животные	Масса, г	Глюкоза, ммоль/л
Инбредная мышь C57BL/6J	29.03 ± 3.66	10.59 ± 1.49
Инбредная мышь C57BL/Ks–db+/+m	45.84 ± 5.94*	35.99 ± 11.19*

Примечание. * – $p < 0.01$.

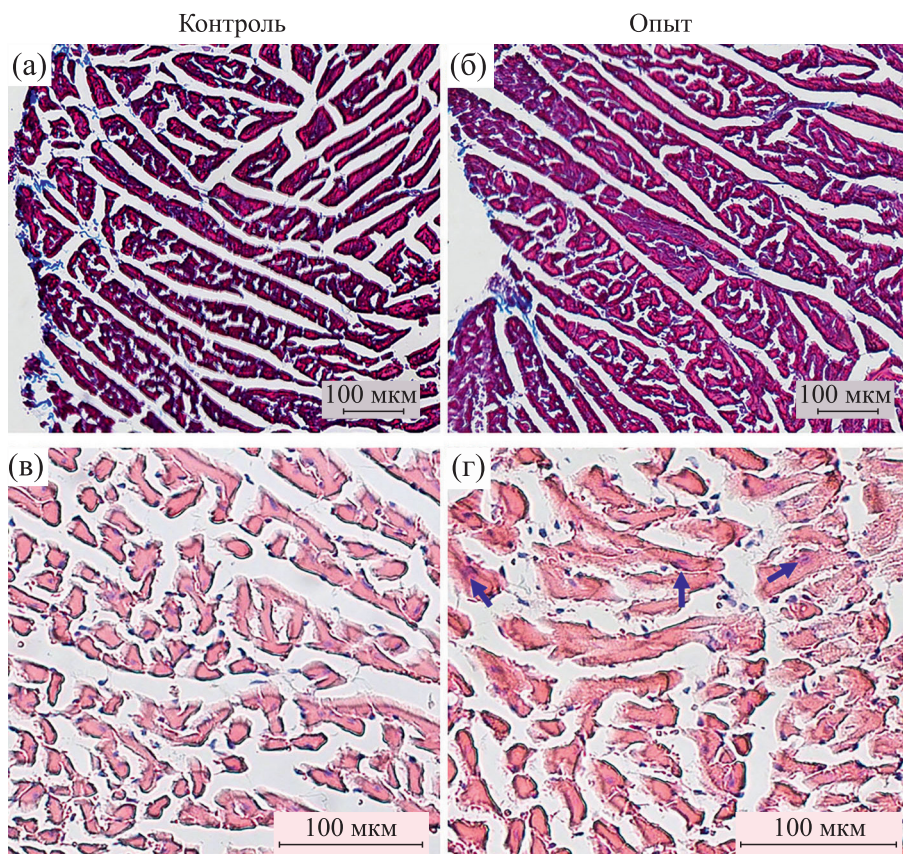


Рис. 1. Результаты гистологического исследования структуры желудочков сердца контрольных ((а) и (в)) и диабетических мышей ((б) и (г)) — световая микроскопия, масштаб 100 мкм. (а) и (б): фрагменты гистотопограмм субэндокардиальной зоны желудочков, окраска трихром по Массону (мышечные волокна/миофибриллы — малиновый цвет, соединительная ткань/фиброз — синий цвет) при 4-кратном увеличении; (в) и (г) — фрагменты субперикардиальной зоны желудочков, окраска гематоксилином и эозином (ядра клеток — фиолетовый цвет, эритроциты — красный цвет, цитоплазма клеток — розовый цвет) при 10-кратном увеличении, синими стрелками обозначено эозинофильное насыщение цитоплазмы клеток.

ние состояния миофибрилл и кардиомиоцитов проводили с использованием окраски гематоксилином и эозином. Контрольная группа образцов характеризовалась нормальной гладкой структурой миофибрилл с одиночными, овальными и центрально расположенными ядрами кардиомиоцитов. Однако в экспериментальной группе образцов было обнаружено, что миофибриллы субперикардиальной зоны сердца дезорганизованы, а у некоторых кардиомиоцитов наблюдалось увеличение интенсивности окраски эозином цитоплазмы клеток в сравнении с контрольной группой, что подразумевает повреждение структуры цитоплазматических белков.

Затем мы исследовали содержание белков (рис. 2), таких как АЛТ, АСТ, тропонин I, ЛДГ и миоглобин, в тканевых лизатах с целью выявления нарушения функционирования сердца при диабете. На рис. 2 показаны вестерн-блоты исследуемых белков и представлено количественное соотношение белковых полос после норми-

рования их по GAPDH (контроль белковой нагрузки). Обнаружено, что содержание АЛТ снижалось на 60%, АСТ — на 23%, тропонин I — на 40%, ЛДГ — на 55% и миоглобина — на 30%. Снижение содержания белков в тканевых лизатах у мышей с диабетом свидетельствует о нарушении функционирования сердца.

Далее было изучено изменение функционального состояния митохондрий, изолированных из мышечной ткани контрольной и опытной групп. С этой целью измеряли дыхательную активность митохондрий в состояниях 2 (V2), 3 (V3), 4 (V4) и разобщение окислительного фосфорилирования (Vu) (рис. 3), а также скорость входа Ca^{2+} в митохондрии после его первой и второй добавки ($\text{V}_{\text{in1}}^{\text{Ca}^{2+}}$, $\text{V}_{\text{in2}}^{\text{Ca}^{2+}}$) и Ca^{2+} -емкость (рис. 4). На рис. 3а показаны кривые митохондриального дыхания в наших экспериментальных условиях. Оценка скорости потребления кислорода в различных состо-

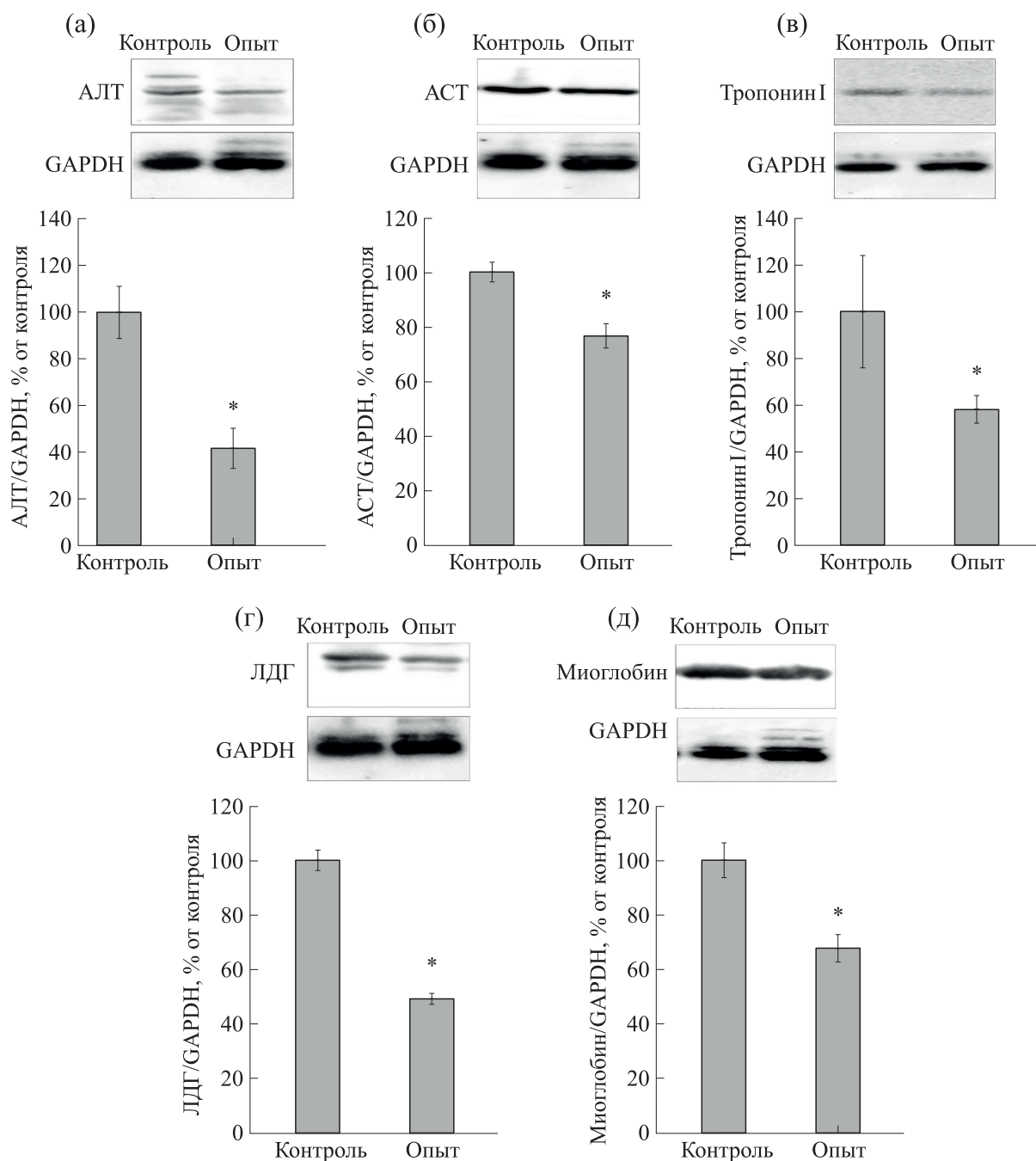


Рис. 2. Изменение содержания АЛТ, АСТ, тропонина I, ЛДГ и миоглобина в тканевых лизатах сердца контрольных и диабетических мышей. Белки экстрагировали и подвергали вестерн-блоттингу. GAPDH использовали для контроля белковой нагрузки. В верхней части — иммуноокрашивание антителами к АЛТ, АСТ, тропонину I, ЛДГ и миоглобину, в нижней части — количественная оценка иммуноокрашивания с помощью компьютерной денситометрии, данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение в серии из четырех независимых экспериментов. * — Достоверная разница в уровне белка по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

яниях представлена на рис. 36. Скорость потребления кислорода в МСМ опытной группы снижалась в V2 на 40%, в V3 ~ на 60%, V4 ~ на 50% и V_и ~ на 55% по сравнению с МСМ контрольной группы. Несмотря на то, что скорости потребления кислорода во всех состояниях в митохондри-

ях сердца из опытных мышей снижались по сравнению с контрольными, дыхательный контроль также уменьшался на 37%, однако не был драматично низким и составлял 3.38, тогда как у МСМ, изолированных из контрольной группы, дыхательный контроль равнялся 5.36.

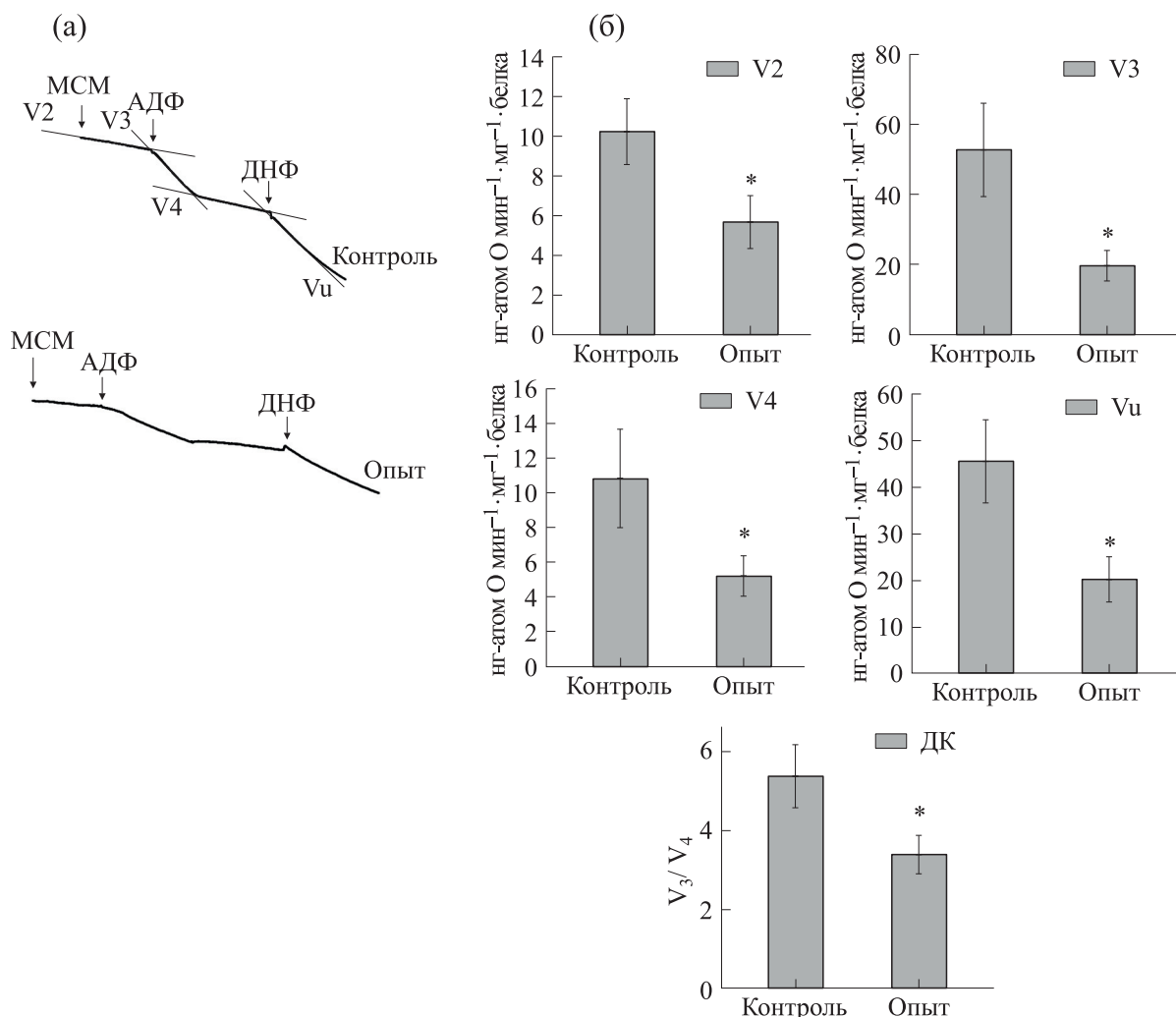


Рис. 3. Изменение дыхательной активности в митохондриях сердца контрольных и диабетических мышей. МСМ инкубировали в стандартной среде, как описано в разделе «Материалы и методы». (а) — Кривые дыхательной активности; (б) — количественный анализ скорости дыхания митохондрий в состояниях V2, V3, V4, Vu и дыхательного контроля (как соотношения V3 к V4). Данные восьми независимых экспериментов представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * — Достоверная разница в по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

На рис. 4а показано изменение потоков Ca^{2+} в МСМ в наших экспериментальных условиях. Ca^{2+} добавляли к митохондриям до достижения пороговой концентрации Ca^{2+} , что отражало Ca^{2+} -емкость митохондрий. Как видно из рис. 4а, выход Ca^{2+} из митохондрий в контрольных условиях наблюдали после четвертой добавки, тогда как при диабете выход Ca^{2+} происходил после третьей добавки. На рис. 4б показаны количественные изменения скорости входа Ca^{2+} в МСМ после первой ($V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in1}}$) и второй ($V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in2}}$) добавок. $V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in1}}$ не отличались как в контрольной, так и в опытной группах животных, тогда как $V_{\text{Ca}^{2+}}^{\text{in2}}$ в опытной группе была ниже почти на

50% по сравнению с контрольной. На рис. 4в показано изменение емкости Ca^{2+} в МСМ животных контрольной и опытной групп. Емкость Ca^{2+} в МСМ опытной группы снижалась на 40% по сравнению с контрольной.

На рис. 5 показано изменение содержания белков, ответственных за слияние (OPA1, Mfn2) и деление (DRP1) митохондрий, а также представлены результаты по изменению маркеров митофагии, таких как PINK1 и Parkin. Эксперименты проводили на гомогенате диабетических и контрольных мышей. На рис. 5 в верхней части показаны вестерн-блоты OPA1 (рис. а), DRP1 и Mfn2 (рис. 5б), PINK1 и Parkin (рис. 5в). В нижних частях на рис. 5 показаны количественные изменения, представленные как отношения оптической

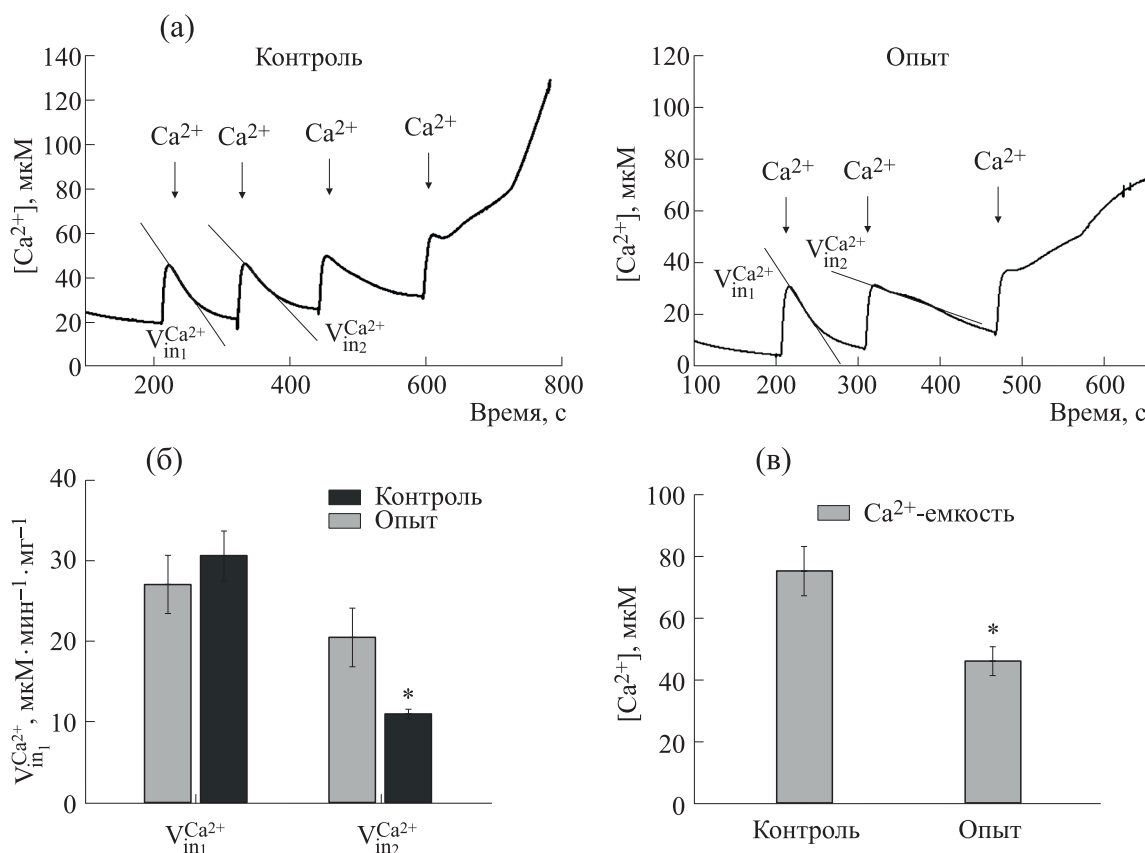


Рис. 4. Изменение транспорта Ca^{2+} и Ca^{2+} -емкости в митохондриях сердца контрольных и диабетических мышей. (а) — Изменение транспорта Ca^{2+} в МСМ контрольных и диабетических мышей; (б) — количественное изменение скоростей входа Ca^{2+} после его первой и второй добавки; (в) — количественное изменение Ca^{2+} -емкости в митохондриях сердца контрольных и диабетических мышей. Данные восьми независимых экспериментов представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * — Достоверная разница в по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

плотности белковых полос исследуемых белков к оптической плотности GAPDH. Как видно из рисунка, наблюдалось снижение OPA1 и Mfn2 приблизительно на 80 и 30% соответственно, тогда как содержание DRP1 увеличивалось на 50% в гомогенате диабетических мышей по сравнению с контрольными. Содержание PINK1 в гомогенате диабетических мышей снижалось на 40%, а Parkin — на 50% по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальная дисфункция и окислительный стресс тесно связаны с сердечно-сосудистыми, нейродегенеративными и возрастными расстройствами. Сердечно-сосудистые заболевания часто встречаются у пациентов с диабетом и исследования показали, что риск сердечной недостаточности увеличивается у пациентов с диабетом. Хотя фактическая основа повышенного риска сердечной недостаточности является многофакторной, все больше данных свидетельствуют о том, что дисбаланс в функционировании ми-

тохондрий и связанный с ним окислительный стресс играют важную роль в этом процессе [12]. В настоящем исследовании было изучено функциональное состояние митохондрий сердца инбредных мышей линии C57BL/Ks-db+/+m с рецессивным геном *diabetes-db*.

Известно, что цитоплазматическая вакуолизация представляет собой морфологическое изменение, наблюдаемое в клетках млекопитающих после воздействия различного вида возбудителей или искусственных низкомолекулярных соединений, которое как правило сопровождается гибелью клеток [13]. Ранее было показано, что на срезах тканей сердца крыс с сахарным диабетом, индуцированным стрептозотоцином (40 мг/кг) наблюдалось увеличение интенсивности окраски эозином в некоторых клетках [14]. Считается, что ухудшение функционального состояния митохондрий, приводящее к митохондриальной дисфункции может стимулировать цитоплазматическую вакуолизацию в клетке, что в конечном счете может привести к набуханию и слиянию эндоплазматического ретикулума и/или мито-

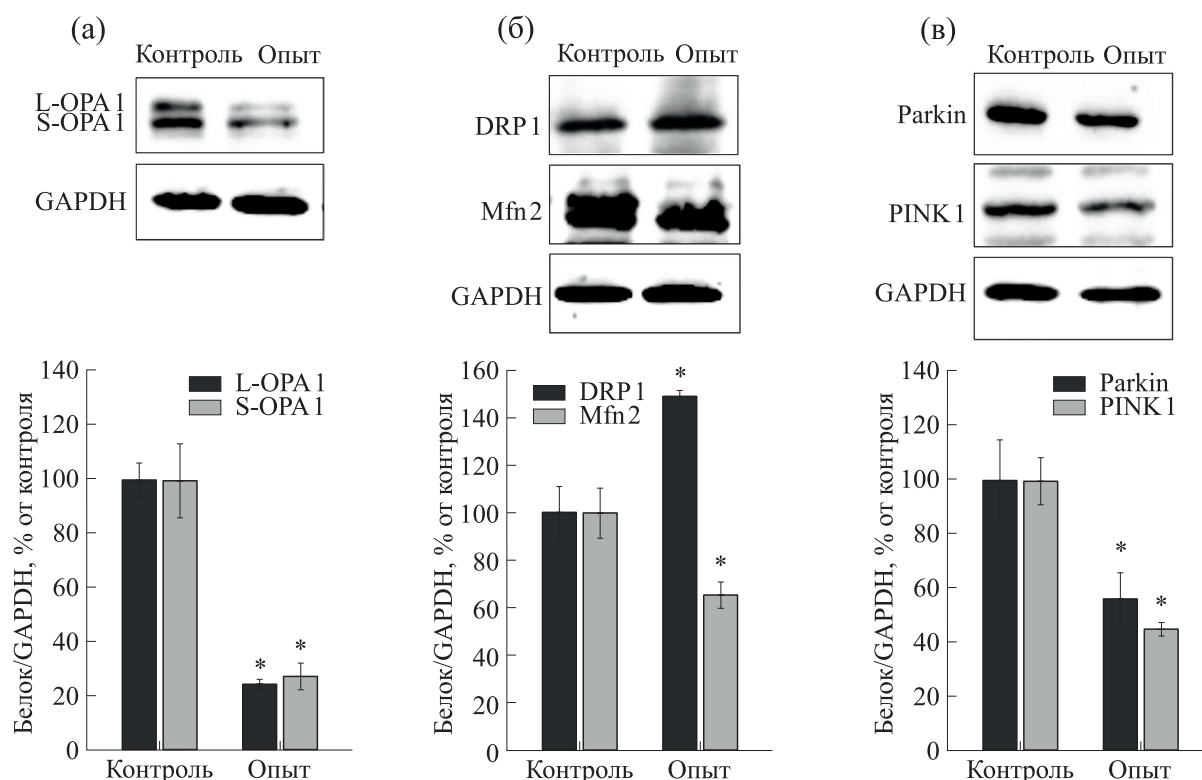


Рис. 5. Изменение содержания OPA1, Mfn2, DRP1, PINK1 и Parkin в гомогенатах ткани сердца контрольных и диабетических мышей. GAPDH использовали как контроль белковой нагрузки. (а) Иммуноокрашивание антителами к OPA1, снизу: количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии; (б) иммуноокрашивание антителами к DRP1 и Mfn2, снизу: количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии; (в) сверху: иммуноокрашивание антителами к PINK1 и Parkin, снизу: количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии. Данные четырех независимых экспериментов представлены как среднее \pm стандартное отклонение. * — Достоверная разница в уровне белка по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

хондрий [15]. В наших экспериментальных условиях, в срезах ткани сердца левого желудочка у инбредных мышей с рецессивным геном *diabetes-db* было замечено увеличение интенсивности окраски эозином цитоплазматических белков, что подразумевает повреждение их структуры, тогда как в образцах контрольных мышей такого эффекта не наблюдалось. Вероятно, повреждения ткани сердца происходили по большей части на клеточном уровне, который не выявлялся при гистологическом анализе. Кроме того, наблюдалось снижение содержания белков, таких как АЛТ, АСТ, ЛДГ, тропонина I и миоглобина в тканевых лизатах диабетических мышей, что говорит о повреждении ткани сердца в наших экспериментальных условиях.

Исследования некоторых лабораторий показали, что дыхательная функция и синтез АТФ подавляются в митохондриях, изолированных из диабетических животных. Было обнаружено, что соотношение АДФ/О и скорость АДФ-стимулированного дыхания снижались в митохондриях животных с разными моделями диабета [16, 17].

Согласно результатам, представленным в настоящем исследовании, скорости субстрат-зависимого дыхания, АДФ-стимулированное дыхание и скорость дыхания в состоянии после истощения избытка АДФ у диабетических мышей снижались по сравнению с таковыми параметрами в митохондриях контрольных мышей. Более того, дыхательный контроль митохондрий диабетических мышей был ниже, чем у контрольных. Все это предполагает ухудшение функционального состояния митохондрий у диабетических мышей.

Многочисленные исследования показали, что митохондрии сердца диабетических крыс более чувствительны к индукции мРТР, чем митохондрии контрольных животных [5, 18, 19]. Мы наблюдали, что Ca^{2+} -емкость в митохондриях диабетических мышей снижалась, по сравнению с контрольными. Митохондрии мышей с геном *diabetes-db* были более чувствительны к Ca^{2+} . Это может быть связано с развитием окислительного стресса, что, в свою очередь, может быть основной причиной развития кардиомиопатии при сахарном диабете [5].

Появляется все больше доказательств того, что изменение передачи сигналов инсулина в клетках может способствовать изменению содержания белков, ответственных за слияние митохондрий, и структуры митохондриальной сети. Было показано, что экспрессия Mfn2 и OPA1 были значительно снижена во многих тканях у животных с диабетом [20–22], тогда как деление митохондрий наоборот усиливалось, при этом наблюдалась повышенная экспрессия DRP1 и FIS1 [23–25]. Действительно, мы обнаружили, что в гомогенате, полученном из диабетических мышей содержание Mfn2 и OPA1 снижалось по сравнению с контрольными образцами, тогда как уровень DRP1 повышался в этих условиях. Функциональный статус митофагии и специфические механизмы ее регуляции в диабетическом сердце до конца не изучены. Однако известно, что содержание белков PINK1 и Parkin снижается во многих тканях животных с диабетом, включая сердце [26, 27]. Это позволяет предположить, что митофагия ингибируется в сердце с диабетом. В настоящем исследовании мы наблюдали снижение маркеров митофагии у мышей, несущих рецессивный ген *diabetes-db*, по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили функциональное состояние митохондрий сердца у инбредных мышей линии C57BL/Ks-db⁺/+m, несущих рецессивный ген *diabetes-db*. Мы показали, что в условиях диабета наблюдались изменения ткани сердца, проявляющиеся в увеличение интенсивности окраски эозином в некоторых клетках. Наблюдалось снижение содержания ряда белков (АЛТ, АСТ, ЛДГ, тропонина I и миоглобина) в тканевых лизатах сердца диабетических мышей, что предполагает повреждение сердечной мышцы при диабете. В митохондриях, изолированных из диабетических мышей снижались дыхательные активности, вследствие чего снижался и дыхательный контроль. Скорость входа Ca²⁺ в митохондрии после второй добавки Ca²⁺ у диабетических мышей замедлялась, а сами митохондрии были более чувствительны к Ca²⁺, что приводило к снижению Ca²⁺-емкости. У диабетических мышей слияние митохондрий замедлялось, тогда как деление усиливалось, при этом наблюдалось снижение митофагии. Исходя из вышеизложенного, мы предполагаем, что, поскольку снижается содержание маркеров митофагии, поврежденные митохондрии не удаляются, а накапливаются в митохондриальной сети, вследствие этого функциональное состояние митохондрий ухудшается, что приводит к снижению дыхательного контроля и устойчивости митохондрий к Ca²⁺. При этом развивается митохондри-

альная дисфункция, которая, как полагают, является одной из основных причин развития связанных с диабетом сердечно-сосудистых заболеваний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-00224-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Протокол исследований был утвержден Комиссией по биологической безопасности и этике при ИТЭБ РАН (протокол № 4/2024 от 18 марта 2024 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И. И., Шестакова М. В., Викулова О. К., Железнякова А. В., Исаков М. А., Сазонова Д. В. и Мокрышева Н. Г. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010 – 2022 гг. *Сахарный диабет*, **26** (2), 104–123 (2023). DOI: 10.14341/DM13035
2. Huss J. M. and Kelly D. P. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J. Clin. Invest.*, **115** (3), 547–555 (2005). DOI: 10.1172/JCI24405
3. Schilling J. D. The mitochondria in diabetic heart failure: from pathogenesis to therapeutic promise. *Antioxid. Redox Signal.*, **22** (17), 1515–1526 (2015). DOI: 10.1089/ars.2015.6294
4. Halestrap A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **46** (6), 821–831 (2009). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021
5. Riojas-Hernandez A., Bernal-Ramirez J., Rodriguez-Mier D., Morales-Marroquin F. E., Dominguez-Barragan E. M., Borja-Villa C., Rivera-Alvarez I., and Garcia-Rivas G., Altamirano J., Garcia N. Enhanced oxidative stress sensitizes the mitochondrial permeability transition pore to opening in heart from Zucker Fa/fa rats with type 2 diabetes. *Life Sci.*, **141**, 32–43 (2015). DOI: 10.1016/j.lfs.2015.09.018
6. Loson O. C., Song Z., Chen H., and Chan D. C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in

- mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell*, **24** (5), 659–667 (2013). DOI: 10.1091/mbc.E12-10-0721
7. Yu T., Jhun B. S., and Yoon Y. High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission. *Antioxid. Redox Signal.*, **14** (3), 425–437 (2011). DOI: 10.1089/ars.2010.3284
 8. Yu T., Sheu S. S., Robotham J. L., and Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.*, **79** (2), 341–351 (2008). DOI: 10.1093/cvr/cvn104
 9. Yang X., Pan W., Xu G., and Chen L. Mitophagy: A crucial modulator in the pathogenesis of chronic diseases. *Clin. Chim. Acta*, **502**, 245–254 (2020). DOI: 10.1016/j.cca.2019.11.008
 10. Крестинин Р. Р., Бабурина Ю. Л., Одинокова И. В., Сотникова Л. Д. и Крестинина О. В. Действие атаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс при сердечной недостаточности. *Биофизика*, **67** (5), 917–925 (2022). DOI: 10.31857/S0006302922050088
 11. Baburina Y., Krestinin R., Odinkova I., Fadeeva I., Sotnikova L., and Krestinina O. The identification of prohibitin in the rat heart mitochondria in heart failure. *Biomedicines*, **9** (12), 1793 (2021). DOI: 10.3390/biomedicines9121793
 12. Verma S. K., Garikipati V. N. S., and Kishore R. Mitochondrial dysfunction and its impact on diabetic heart. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.*, **1863** (5), 1098–1105 (2017). DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.08.021
 13. Shubin A. V., Demidyuk I. V., Komissarov A. A., Rafieva L. M., Kostrov S. V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, **7** (34), 55863–55889 (2016). DOI: 10.18632/oncotarget.10150
 14. Karabulut D., Akin A., Kaymak E., Öztürk E., and Sayan M. Histological examination of rat heart tissue with chronic diabetes. *Exp. Appl. Med. Sci.*, **1** (1), 17–22 (2020). DOI.org/10.46871/eams.2020.2
 15. Schoeman R., Beukes N., and Frost C. Cannabinoid combination induces cytoplasmic vacuolation in MCF-7 breast cancer cells. *Molecules*, **25** (20), 4682 (2020). DOI: 10.3390/molecules25204682
 16. Bombicino S. S., Iglesias D. E., Mikusic I. A. R., D'Annunzio V., Gelpi R. J., Boveris A., and Valdez L. B. Diabetes impairs heart mitochondrial function without changes in resting cardiac performance. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **81** (Pt B), 335–345 (2016). DOI: 10.1016/j.biocel.2016.09.018
 17. Koentges C., Konig A., Pfeil K., Holscher M. E., Schnick T., Wende A. R., Schrepper A., Cimolai M. C., Kersting S., Hoffmann M. M., Asai J., Osterholt M., Odening K. E., Doenst T., Hein L., Abel E. D., Bode C., and Bugger H. Myocardial mitochondrial dysfunction in mice lacking adiponectin receptor 1. *Basic Res. Cardiol.*, **110** (4), 37 (2015). DOI: 10.1007/s00395-015-0495-4
 18. Itoh T., Kouzu H., Miki T., Tanno M., Kuno A., Sato T., Sunaga D., Murase H., and Miura T. Cytoprotective regulation of the mitochondrial permeability transition pore is impaired in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **53** (6), 870–879 (2012). DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.10.001
 19. Oliveira P. J., Seica R., Coxito P. M., Rolo A. P., Palmeira C. M., Santos M. S., and Moreno A. J. Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats. *FEBS Lett.*, **554** (3), 511–514 (2003). DOI: 10.1016/s0014-5793(03)01233-x
 20. Hu L., Ding M., Tang D., Gao E., Li C., Wang K., Qi B., Qiu J., Zhao H., Chang P., Fu F., and Li Y. Targeting mitochondrial dynamics by regulating Mfn2 for therapeutic intervention in diabetic cardiomyopathy. *Theranostics*, **9** (13), 3687–3706 (2019). DOI: 10.7150/thno.33684
 21. Peyravi A., Yazdanpanahi N., Nayeri H., and Hosseini S. A. The effect of endurance training with crocin consumption on the levels of MFN2 and DRP1 gene expression and glucose and insulin indices in the muscle tissue of diabetic rats. *J. Food Biochem.*, **44** (2), e13125 (2020). DOI: 10.1111/jfbc.13125
 22. Jezek P. and Dlaskova A. Dynamic of mitochondrial network, cristae, and mitochondrial nucleoids in pancreatic β -cells *Mitochondrion*, **49**, 245–258 (2019). DOI: 10.1016/j.mito.2019.06.007
 23. Yu J., Maimaitili Y., Xie P., Wu J. J., Wang J., Yang Y. N., Ma H. P., and Zheng H., High glucose concentration abrogates sevoflurane post-conditioning cardioprotection by advancing mitochondrial fission but dynamin-related protein 1 inhibitor restores these effects. *Acta Physiol. (Oxford)*, **220** (1), 83–98 (2017). DOI: 10.1111/apha.12812
 24. Liu R., Jin P., Yu L., Wang Y., Han L., Shi T., and Li X. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle. *PLoS One*, **9** (3), e92810 (2014). DOI: 10.1371/journal.pone.0092810
 25. Liu P., Lin H., Xu Y., Zhou F., Wang J., Liu J., Zhu X., Guo X., Tang Y., and Yao P. Frataxin-mediated PINK1-Parkin-dependent mitophagy in hepatic steatosis: The Protective effects of quercetin. *Mol. Nutr. Food Res.*, **62** (16), e1800164 (2018). DOI: 10.1002/mnfr.201800164
 26. Tang Y., Liu J., and Long J. Phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1 and Parkin in diabetic heart: Role of mitophagy. *J. Diabetes Investig.*, **6** (3), 250–255 (2015). DOI: 10.1111/jdi.12302
 27. Xu X., Kobayashi S., Chen K., Timm D., Volden P., Huang Y., Gulick J., Yue Z., Robbins J., Epstein P. N., and Liang Q. Diminished autophagy limits cardiac injury in mouse models of type 1 diabetes. *J. Biol. Chem.*, **288** (25), 18077–18092 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M113.474650

Investigation of the Functional State of Heart Mitochondria in Inbred Mice with Type 2 Diabetes Mellitus

Y.L. Baburina*, I.V. Odinkova*, R.R. Krestinin*, A.I. Zvyagina*,
L.D. Sotnikova*, and O.V. Krestinina*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Diabetes mellitus is considered one of the most common metabolic diseases in the developed world and is associated either with impaired insulin secretion or with cell resistance to the action of this hormone (type 1 and 2 diabetes, respectively). In both cases, the common pathological change is an increase in blood glucose levels — hyperglycemia, which can ultimately cause serious damage to organs and tissues of the body. Mitochondria are believed to be one of the main targets of diabetes at the intracellular level. The present study addressed the functional state of mitochondria in the C57BL/Ks—db+/+m inbred mice carrying the recessive *diabetes-db* gene (diabetic mice). Histological analyses of the left ventricle of the hearts from diabetic and control mice were performed. In cardiac tissue samples from diabetic mice, an increase in the intensity of the eosin stain was observed implying that the structure of cytoplasmic proteins was distorted. In addition, it was shown that respiratory control and Ca^{2+} capacity in the mitochondria of diabetic mice decreased compared to controls. Changes in mitochondrial dynamics and mitophagy under these conditions were analyzed.

Keywords: diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction, mouse heart mitochondria, Ca^{2+} capacity