

УДК 577.352.4

ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРА КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОГО K⁺-КАНАЛА NS1619 НА ФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В СЕРДЦЕ ДИСТРОФИН-ДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ

© 2023 М.В. Дубинин^{1*}, В.С. Старинец², Ю.А. Челядникова¹, Н.В. Белослудцева²,
И.Б. Михеева², Д.К. Пенкина¹, А.Д. Игошкина¹, Е.Ю. Таланов²,
И.И. Киреев³, Д.Б. Зоров³, К.Н. Белослудцев^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет»,
424000 Республика Марий Эл, Йошкар-Ола; электронная почта: dubinin1989@gmail.com

² ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
192290 Пушкино, Московская обл., Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 13.11.2022

После доработки 15.01.2023

Принята к публикации 15.01.2023

Дистрофин-дефицитная врожденная мышечная дистрофия (дистрофия Дюшенна) характеризуется нарушением ионного гомеостаза, важную роль в котором играют митохондрии. В настоящей работе на модели дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей выявлено снижение эффективности транспорта ионов калия и общего содержания этого иона в митохондриях сердца. Оценено влияние на структуру и функцию органелл и состояние сердечной мышцы хронического введения производного бензимидазола NS1619, являющегося активатором Ca²⁺-активируемого K⁺-канала большой проводимости (mitoBK_{Ca}). Показано, что NS1619 способствует улучшению транспорта K⁺ и увеличению содержания иона в митохондриях сердца *mdx*-мышей, однако это не связано с изменением уровня белка mitoBK_{Ca} и экспрессии кодирующего его гена. Действие NS1619 сопровождается снижением интенсивности окислительного стресса, оцененного по уровню продуктов перекисного окисления липидов (МДА-продуктов), и нормализацией ультраструктуры митохондрий в сердце *mdx*-мышей. Кроме того, нами выявлены положительные изменения в ткани, выражающиеся в снижении уровня фиброза в сердце дистрофин-дефицитных животных, получавших NS1619. Отмечено, что NS1619 не оказывал существенного влияния на структуру и функцию митохондрий сердца животных «дикого типа». Обсуждаются механизмы влияния NS1619 на функцию митохондрий сердца мышей в условиях мышечной дистрофии Дюшенна и перспективы применения подхода для коррекции данной патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дистрофия Дюшенна, сердце, митохондрии, NS1619, кальций-активируемый калиевый канал, BK_{Ca}.

DOI: 10.31857/S0320972523020045, EDN: QFYBNW

ВВЕДЕНИЕ

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) — наиболее распространенная среди 9 типов наследственных мышечных дистрофий. Эта рецессивная, сцепленная с X-хромосомой, нервно-мышечная патология встречается в среднем у 1 из 3500 новорожденных мальчи-

ков, крайне редко клинические проявления обнаруживаются у гетерозиготных девочек [1, 2]. Отличительной чертой этого заболевания является прогрессирующая мышечная слабость, которая характерна уже для ранних этапов развития патологии. С возрастом развивается дыхательная недостаточность, когнитивная дисфункция, а также кардиомиопатия [3].

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ДНФ — 2,4-динитрофенол; МДА — малоновый диальдегид; МДД — мышечная дистрофия Дюшенна; мтДНК — митохондриальная ДНК; яДНК — ядерная ДНК; МРТ-пора — переходная пора проницаемости митохондрий; mitoBK_{Ca} — митохондриальный, активируемый ионами Ca²⁺, калиевый канал.

* Адресат для корреспонденции.

Более чем у 90% пациентов мужского пола, страдающих МДД, в возрасте 18 лет наблюдаются признаки сердечной недостаточности [4], которая на поздних этапах чаще всего становится основной причиной смерти [4–6].

Известно, что мутации в одном из самых больших и сложно организованных генов человека, дистрофине, являются причиной МДД. Кодированный этим геном одноименный белок играет ключевую роль в обеспечении связи цитоскелета мышечных клеток с внеклеточным матриксом, поддерживая структурную целостность ткани и ее функциональную активность, и его отсутствие сопровождается прогрессирующей дестабилизацией мышечного волокна [3]. Это проявляется в многочисленных вторичных нарушениях и, прежде всего, в развитии окислительного стресса, нарушениях гомеостаза Ca^{2+} и продукции АТФ [7]. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что важную роль в развитии этих процессов играет митохондриальная дисфункция. Действительно, известно, что при дистрофии Дюшенна для митохондрий скелетных мышц характерно снижение активности окислительного фосфорилирования, гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), а также нарушение способности аккумулировать большое количество ионов кальция в матриксе вследствие снижения устойчивости органелл к индукции МРТ-поры (переходной поры проницаемости митохондрий) и перестройки кальций-транспортных систем [8–14]. Подобные изменения наблюдаются и в митохондриях сердца [15–17]. В то же время на ранних этапах развития МДД, когда дисфункция биоэнергетического аппарата скелетных мышц уже ярко выражена, в митохондриях сердца, напротив, отмечаются адаптационные явления, которые проявляются в увеличении эффективности окислительного фосфорилирования и улучшении способности транспортировать и удерживать ионы кальция в матриксе органелл [18–21]. Тем не менее это сопровождается гипертрофией сердца и электрофизиологическими нарушениями [21]. При этом нами было показано, что модуляция митохондриальной функции с помощью ингибитора МРТ-поры алиспоривира (неиммуносупрессорный аналог циклоспорина А) приводит к некоторому улучшению показателей функции сердечной мышцы и устранению гипертрофии [21].

Одной из возможных терапевтических мишеней для коррекции митохондриальных дисфункций является гомеостаз ионов калия. Нарушение функционирования K^+ -каналов митохондрий играет важную роль в разви-

тии миопатий и, в частности, дилатационной кардиомиопатии различной этиологии [22–24], которая характерна также для мышечной дистрофии Дюшенна. Более того, недавно нами выявлено снижение эффективности транспорта ионов калия и общего уровня этого иона в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей [25, 26]. Известно, что внутренняя мембрана митохондрий содержит целый ряд переносчиков K^+ [27]. Более того, согласно последним представлениям, транспорт ионов калия в митохондриях может осуществляться с участием АТФ-синтазы [28–30]. Учитывая значительное нарушение функционирования кальций-зависимых процессов, в настоящей работе мы уделили внимание митохондриальному, активируемому ионами кальция, калиевому каналу ($\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$), чья активация обладает кардиопротекторным эффектом и защищает клетки от избыточного производства АФК и митохондриальной дисфункции [31]. Действительно, ранее было показано, что активация $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, вызванная производным бензимидазола NS1619, защищает клетки сердца при ишемии/реперфузии [32]. В настоящей работе мы оценили влияние этого агента на состояние сердечной мускулатуры дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей и функциональную активность митохондрий сердца, включая интенсивность окислительного фосфорилирования, скорость транспорта и уровень ионов калия, устойчивость к индукции кальций-зависимой МРТ-поры, интенсивность окислительного стресса и ультраструктуру органелл. Ранее нами было показано, что NS1619 улучшает структуру и функционирование митохондрий скелетных мышц *mdx*-мышей и смягчает развитие деструктивных процессов в ткани [26]. Результаты настоящей работы подтверждают положительное влияние этого агента и на сердечную патологию при МДД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с использованием животных. В работе использованы 8-недельные дистрофин-дефицитные мыши линии C57BL/10ScSn-Dmdmdx и мыши линии C57BL/10 дикого типа. Животные были приобретены в НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино). Мыши были разделены на 4 группы ($n = 10$ в каждой группе): 1) мыши дикого типа (контроль); 2) контроль + NS1619; 3) *mdx*-мыши и 4) *mdx*-мыши, получавшие NS1619 (*mdx* + NS1619). NS1619 (5 мг/мл,

«Sigma-Aldrich», США) растворяли в смеси этанола и стерильного физиологического раствора (7,4 : 92,6 (v/v)) и вводили в объеме 150–200 мкл (0,5 мг/кг массы тела) на мышь внутрибрюшинно ежедневно в течение 4 недель. Контрольные группы получали инъекции растворителя в те же сроки и в том же объеме.

Гистологическое исследование. Для изучения степени выраженности гистологических изменений образцы ткани сердца (по 3 образца в каждой экспериментальной группе) фиксировали в нейтральном забуференном 10%-ном формалине и пропитывали в парафине. Парафиновые блоки разрезали на микротоме МС-2 («Точмедприбор», Украина) на серийные срезы толщиной 5 мкм. Предметные стекла, полученные из каждого образца, окрашивали гематоксилином по Ван-Гизону (HvG) [26]. Исследования препаратов проводили с использованием системы визуализации EVOS M5000 («Thermo Fisher Scientific», США). Все гистологические изображения были проанализированы с использованием программного обеспечения ImageJ. Уровень фиброза в сердцах мышей оценивали как процентную долю участков, окрашенных HvG (розовые), которые содержали коллаген и другие элементы соединительной ткани в общей области ткани на гистологических предметных стеклах; при этом анализировали не менее 10 срезов для каждого образца органа.

Электронная микроскопия. Для электронной микроскопии отбирали кусочки сердца (левый желудочек, два образца в каждой группе). Образцы фиксировали в течение 2 ч в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида в 0,1 М PBS (pH 7,4) и 4 ч – в 2%-ном растворе тетраоксида осмия, обезвоживали в возрастающих концентрациях спирта и ацетона и заливали в эпоновую смолу. Из полученных эпоновых блоков получали ультратонкие срезы (60–70 нм), используя ультрамикротом Leica EM UC6 («Leica», Германия), которые впоследствии контрастировали раствором уранилацетата и цитратом свинца. Электронно-микроскопическую визуализацию проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 («JEOL», Япония) на базе ЦКП «Субдифракционная микроскопия» НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Для каждой группы животных фотографировали не менее 40 непересекающихся полей зрения при увеличении 5000×. В результате получали электронно-микроскопические образцы (файл с расширением tif, 2808 × 2264 пикселей, 16 бит), которые анализировали с помощью программ-

ного обеспечения Image Tool 3.0. Для морфометрического анализа выбирали только такие митохондрии, через которые срез проходил по их короткой оси. Использовали рутинный способ измерения, требующий ручного контурирования поперечных сечений митохондрий по их наружной мембране [33]. Всего для анализа было отобрано до 200 профилей поперечных сечений митохондрий для каждой группы животных. Статистический анализ результатов проводили с помощью стандартного пакета программ GraphPad Prism 7.

Выделение митохондрий и оценка функциональных параметров. Сразу после извлечения сердца и отбора образцов для вышеуказанных исследований проводили выделение митохондрий общепринятым методом дифференциального центрифугирования, детальная методика и состав сред выделения приведены в предыдущих работах [19, 21]. Полученная суспензия митохондрий содержала 15–20 мг/мл митохондриального белка, концентрацию которого определяли по Бредфорду [34]. Скорость потребления O_2 митохондриями оценивали с помощью респирометра высокого разрешения Oxygraph-2k («Oroboros Instruments», Австрия) [35]. Среда инкубации содержала 120 мМ KCl, 5 мМ NaH_2PO_4 , 2,5 мМ малата калия, 2,5 мМ глутамата калия и 10 мМ Hepes/КОН (pH 7,4). Уровень липидных перекисей оценивали по взаимодействию с тиобарбитуровой кислотой [36]. Транспорт K^+ в митохондриях определяли по скорости 2,4-динитрофенол (ДНФ)-индуцированного выхода K^+ из органелл с помощью K^+ -селективного электрода, а общее содержание K^+ в митохондриях определялось путем последующей солиubilизации 0,1%-ным (w/v) Triton X-100 [26]. Среда инкубации содержала 180 мМ сахарозы, 70 мМ маннита, 5 мМ NaH_2PO_4 , 1 мкг/мл олигомицина и 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4). Концентрация митохондриального белка составляла 0,25 мг/мл. Поглощение Ca^{2+} митохондриями регистрировали с помощью колориметрического индикатора арсеназо III и планшетного спектрофотометра Tecan Spark 10M («Tecan», Швейцария) [12]. Среда инкубации содержала 210 мМ маннита, 70 мМ сахарозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 2,5 мМ малата, 2,5 мМ глутамата, 10 мМ ЭГТА, 50 мкМ арсеназо III и 10 мМ Hepes/КОН (pH 7,4). Суммарное количество добавленных ионов Ca^{2+} (пульсовые добавки 5 мкМ $CaCl_2$ каждые 90 с), вызывающее их спонтанное высвобождение из митохондрий вследствие индукции МРТ-поры, отражало кальциевую емкость органелл.

ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии гена, кодирующего mitoBK_{Ca}, определяли

методом ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции [26]. Тотальную РНК получали из 100 мг ткани сердца с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора QuantStudio 1 («Thermo Fisher Scientific») с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген»), где в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя используется SYBR Green II. Выбор и анализ ген-специфичных праймеров проводили с использованием Primer-BLAST [37] (последовательность олигонуклеотидов представлена в табл. 1). Нормирование проводили относительно гена *Rplp2*. Проводили вычисление параметра $2^{-\Delta Ct}$, где значение ΔCt рассчитывали по формуле $\Delta Ct = Ct$ (исследуемый ген) – Ct (*Rplp2*) [38].

Количественная оценка митохондриальной ДНК. Тотальную ДНК (ядерную (ядДНК) и митохондриальную (мтДНК)) выделяли из 10 мг ткани сердца с использованием набора ДНК-Экстран 2 («Синтол», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для проведения реакции использовали 1 нг общей ДНК. Оценку содержания мтДНК в ткани сердца проводили методом ПЦР, как описано ранее [39], и выражали как отношение мтДНК/ядДНК. В анализе оценивали уровни транскрипции гена *ND4*, кодируемого митохондриальным геномом, и гена *GAPDH*, кодируемого ядерным геномом (последовательность олигонуклеотидов представлена в табл. 1), что дает возможность оценить отношение количества копий мтДНК к количеству копий яДНК.

Иммуноблоттинг. Экстракты общего белка готовили из 10 мг замороженной сердечной мышцы. Для недопущения деградации белков использовали коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma-Aldrich», США) в концентрациях 100 мкл/мл, а также PMSF (1 мМ), Na_3VO_4 (1 мМ), ЭГТА (1 мМ) и ЭДТА (1 мМ). Белки выделяли с использованием буфера RIPA («Millipore», США). Quick Start Bradford Protein Assay («Bio-Rad», США) использовали

для количественного определения содержания белка. Образцы разводили в буфере Лэммли («Bio-Rad») с последующим электрофоретическим разделением в 12,5%-ном SDS-ПААГ (10 мкг белка на дорожку) и переносом на нитроцеллюлозную мембрану («Amersham», Германия). После блокирования обезжиренным молоком мембраны инкубировали с соответствующими первичными антителами. Использовали поликлональные антитела anti-KCNMA1 («Thermo Fisher Scientific») и anti-COX IV («Abcam», США). Вторичные антитела были конъюгированы с пероксидазой хрена («Cell Signaling technology Inc.», США). Активность пероксидазы определяли с помощью хемилюминесцентных реагентов ECL («Pierce», США). Относительные уровни обнаруженных белков визуализировали с помощью системы LI-COR («LI-COR», США) с последующей нормализацией на уровень COX IV. Измерения оптической плотности проводили с помощью программного обеспечения LI-COR Image Studio.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью GraphPad Prism 8.0.1 и однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Для последующего сравнения средних дисперсионного комплекса использовали тест Tukey. Результаты представляли в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

NS1619 улучшает транспорт ионов калия и увеличивает содержания K^+ в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных мышей. Недавно нами было показано, что в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей отмечается снижение эффективности транспорта ионов калия и общего содержания ионов калия в матриксе [25, 26]. В настоящей работе подобная картина выявлена и в случае

Таблица 1. Список ген-специфичных праймеров

Ген	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>BKca-DEC</i>	GGTTTACAGATGAGCCGGATA	CATCTTCAACTTCTCTGATTGG
<i>Rplp2</i>	CGGCTCAACAAGGTCATCAGTGA	AGCAGAAACAGCCACAGCCCCAC
<i>Nd4</i>	ATTATTATTACCCGATGAGGGAACC	ATTAAGATGAGGGCAATTAGCAGT
<i>Gapdh</i>	GTGAGGGAGATGCYCAGTGT	CTGGCATTGCTCTCAATGAC

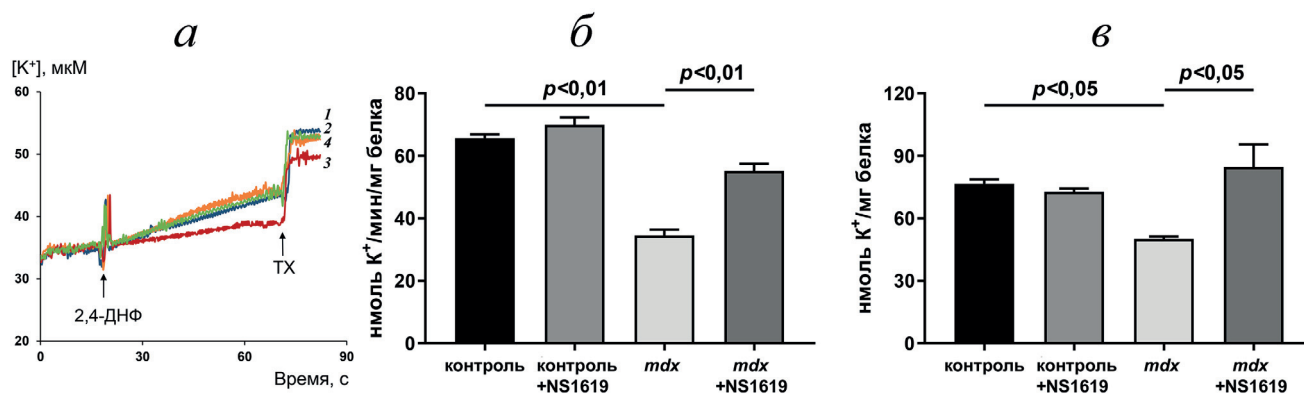


Рис. 1. Влияние NS1619 на скорость транспорта и уровень K^+ в митохондриях сердца экспериментальных групп мышей. *a* – ДНФ-индуцированный выход K^+ из митохондрий сердца мышей группы контроль (кривая 1), контроль + NS1619 (кривая 2), *mdx* (кривая 3) и *mdx* + NS1619 (кривая 4), измеренный при помощи K^+ -селективного электрода. Представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. Максимальный выход K^+ из митохондрий индуцирован внесением Triton X-100 (TX). Скорость ДНФ-индуцированного выхода ионов калия из митохондрий сердца мышей (*б*) и общий уровень иона (*в*). Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$)

митохондрий сердца (рис. 1, *a*). Можно видеть, что в митохондриях, выделенных из сердца *mdx*-мышей, обнаруживается достоверное (в 1,9 раза) снижение скорости выхода K^+ в ответ на добавление ДНФ (рис. 1, *б*) по сравнению с митохондриями сердца мышей дикого типа. В этом случае общий уровень K^+ снижался в 1,5 раза по сравнению с контролем, и это снижение также было статистически значимым (рис. 1, *в*). Мы оценили влияние активатора $mitoBK_{Ca}$ NS1619 на скорость транспорта и содержание ионов калия в митохондриях двух групп мышей. Установлено, что этот агент не влияет на скорость транспорта и общий уровень K^+ в митохондриях мышей дикого типа. В то же время в митохондриях сердца мышей группы *mdx* + NS1619 наблюдается достоверное увеличение как скорости транспорта K^+ , так и общего уровня этого иона.

NS1619 в микромолярных концентрациях является активатором $mitoBK_{Ca}$ [40]. Мы оценили, связано ли влияние этого агента на скорость транспорта и содержание ионов калия с изменением уровня $mitoBK_{Ca}$ в митохондриях сердца и экспрессии кодирующего его гена. Известно, что митохондриальный BK-канал в сердце кодируется сплайс-вариантом (VEDEC) гена *Kcnma1*, содержащего информацию о структуре цитоплазматического BK_{Ca} -канала [41]. Из рис. 2, *a* видно, что уровень экспрессии гена VEDEC не различается в сердечной мускулатуре *mdx*-животных и мышей дикого типа, при этом NS1619 не оказывает влияния на этот параметр. Эти результаты подтверждаются данными иммуноблоттинга – уровень $mitoBK_{Ca}$, оцененный в изолированных митохондриях (вследствие наличия BK-каналов цитоплазма-

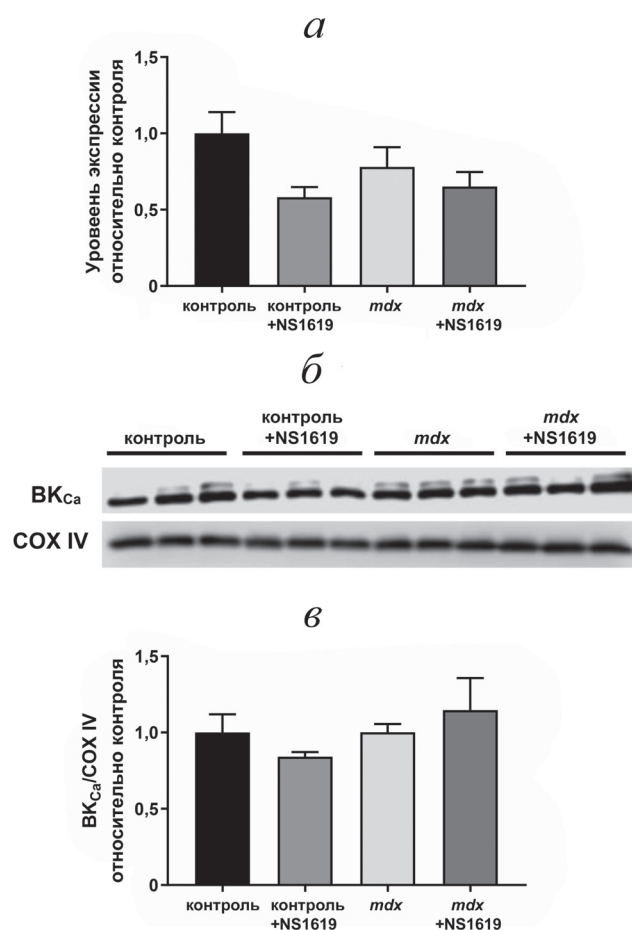


Рис. 2. Влияние NS1619 на уровень $mitoBK_{Ca}$ в сердце мышей. *a* – Относительный уровень мРНК *BK-VEDEC* (кодирует $mitoBK_{Ca}$) в сердце экспериментальных животных. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$). *б* – Данные иммуноблоттинга $mitoBK_{Ca}$ и COX IV, полученные на изолированных митохондриях сердца мышей. *в* – Относительное содержание $mitoBK_{Ca}$ в митохондриях сердца мышей. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 3$)

тической и ядерной мембран в гомогенате ткани), также не различается между экспериментальными группами животных (рис. 2, б и в). Таким образом, снижение эффективности транспорта K^+ и общего уровня иона в митохондриях сердца *mdx*-мышей не связано с изменением уровня mitoBK_{Ca} в органеллах; и увеличение скорости транспорта и уровня этого иона в митохондриях под действием NS1619 также не является следствием изменения уровня белка.

NS1619 не влияет на дыхание митохондрий сердца *mdx*-мышей и кальциевую емкость, но снижает уровень перекисного окисления липидов. В следующей части работы мы оценили влияние NS1619 на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца экспериментальных групп мышей. Ранее нами было показано, что митохондрии сердца молодых *mdx*-мышей возрастом до 12 недель характеризуются увеличением параметров дыхания и окислительного фосфорилирования [21]. Такая же картина обнаруживается и в настоящей работе (табл. 2). Можно видеть, что в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных животных, окисляющих субстраты комплекса I дыхательной цепи — 2,5 мМ глутамат и 2,5 мМ малат, наблюдается увеличение скорости ADP-стимулированного дыхания (состояние 3) в 1,9 раза, а также максимальной скорости дыхания в присутствии разобщителя ДНФ (состояние 3U_{ДНФ}) в 1,8 раза по сравнению с митохондриями из животных дикого типа. Это также сопровождается увеличением параметров дыхательного контроля и ADP/O в 1,3 раза. При этом NS1619 не оказывает влияния на изучаемые параметры дыхания органелл как в группе дистрофин-дефицитных животных, так и у мышей дикого типа.

Ранее было показано, что кардиопротекторное действие NS1619, обусловленное активацией mitoBK_{Ca}, может быть связано с увеличением устойчивости митохондрий сердца к индукции кальций-зависимой МРТ-поры, а также снижением интенсивности окислительного стресса [41, 42]. Митохондрии сердца *mdx*-мышей обладают большей кальциевой емкостью, что позволяет сделать вывод о большей устойчивости митохондрий этих животных к открытию МРТ-поры (рис. 3, а). Это, как предположено нами ранее, может способствовать адаптации тканей сердца к перегрузке ионами кальция, наблюдаемой вследствие дисфункции саркоплазматического ретикула — основного депо ионов кальция в кардиомиоцитах [19]. С другой стороны, ранее нами была отмечена гиперпродукция АФК и продуктов перекисного окисления липидов в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных животных [19, 21]. В настоящей работе мы также выявили достоверное увеличение продукции одного из маркеров окислительного стресса, малонового диальдегида (МДА), в митохондриях сердца *mdx*-мышей по сравнению с животными дикого типа (рис. 3, б). В этом случае в митохондриях сердца мышей, получавших NS1619, наблюдается тенденция к снижению кальциевой емкости, а в митохондриях контрольных животных этот показатель, напротив, достоверно увеличивается. При этом нами выявлено достоверное снижение уровня МДА-продуктов в митохондриях сердца мышей группы *mdx* + NS1619, что говорит об антиоксидантном влиянии этого агента.

NS1619 нормализует ультраструктуру митохондрий сердца *mdx*-мышей. Известно, что нарушение функционирования митохондрий при

Таблица 2. Влияние NS1619 на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий сердца экспериментальных животных

Животные (<i>n</i> = 4)	Состояние 3	Состояние 4	Состояние 3U _{ДНФ}	ДК, отн.ед.	ADP/O, отн.ед.
	нмоль O ₂ /мин/мг белка митохондрий				
Контроль	41,0 ± 4,4	17,0 ± 2,1	41,2 ± 3,7	2,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Контроль+NS1619	48,6 ± 4,3	19,0 ± 1,8	41,6 ± 2,6	2,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1
<i>mdx</i>	78,2 ± 8,5*	24,3 ± 2,7	72,7 ± 10,4*	3,2 ± 0,1*	2,1 ± 0,1*
<i>mdx</i> + NS1619	75,6 ± 9,9*	23,7 ± 3,5	70,8 ± 8,9*	3,3 ± 0,1*	2,3 ± 0,1*

Примечание. Состав среды инкубации: 120 мМ KCl, 5 мМ NaH₂PO₄, 10 мМ Hepes/KOH (pH 7,4). В качестве субстрата использовали 2,5 мМ глутамат и 2,5 мМ малат. Дыхание митохондрий в состоянии 3 инициировалось добавлением 200 мкМ ADP. Митохондриальное дыхание в состоянии 3U_{ДНФ} инициировалось 50 мкМ ДНФ. ДК — дыхательный контроль, оцененный как соотношение дыхания в состояниях 3 и 4. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего. * p < 0,05 против контрольных животных.

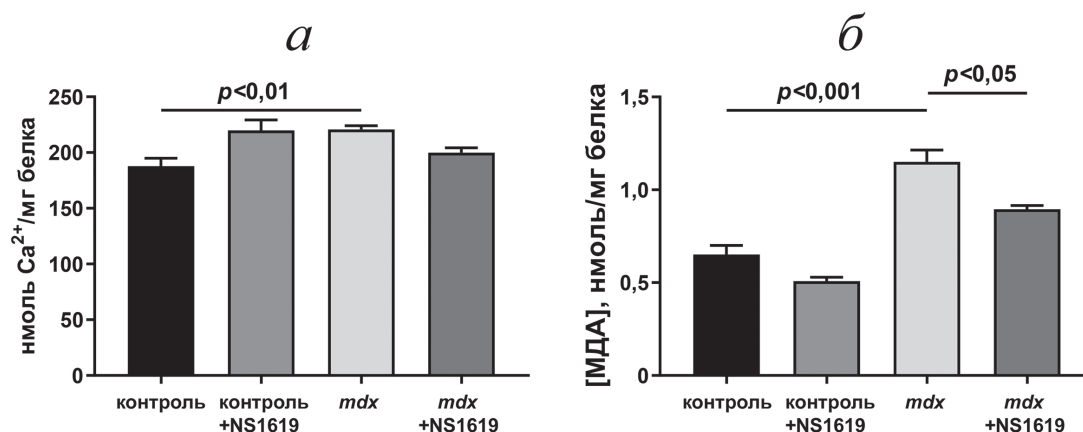


Рис. 3. Влияние NS1619 на кальциевую емкость, $n = 4$ (а) и уровень МДА-продуктов, $n = 3$ (б) в митохондриях сердца мышей. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего

дистрофии Дюшенна также сопровождается изменением их ультраструктуры, что характерно как для тканей скелетных мышц, так и для сердца [19, 21]. На рис. 4 представлены микрофотографии кардиомиоцитов четырех экспериментальных групп животных при малом и большом увеличении. В контрольной группе большая часть митохондрий имела продолговатую или овальную форму. Они были ориентированы вдоль продольной оси клетки и располагались между миофибриллами. Основная часть митохондрий имела четко очерченную наружную мембрану, электронно-плотный матрикс и многочисленные параллельно ориентированные плотно упакованные кристы (рис. 4, б и рис. П1, а в Приложении). Между собой митохондрии соединялись хорошо выраженными межмитохондриальными контактными структурами. Структура межфибриллярных митохондриальных компартментов группы контроль + NS1619 была сходна с группой контроля (рис. 4, г и рис. П1, б в Приложении). В кардиомиоцитах группы *mdx* обнаруживались митохондрии со значительным разнообразием ультраструктурной организации. В этих клетках митохондрии с электронно-плотным матриксом отсутствовали. Митохондрии характеризовались нерегулярной организацией митохондриальных крист и локальными зонами просветленного матрикса (рис. 4, е и рис. П1, в в Приложении). В области соединения митохондрий межмитохондриальные контакты были слабо выражены.

В свою очередь, межфибриллярные митохондрии в группе *mdx* + NS1619 имели структуру, приближающуюся к структуре митохондрий контрольной группы (рис. 4, з и рис. П1, г в Приложении). Можно отметить, что количество митохондрий в исследуемых полях зрения изменяется лишь в группе *mdx* + NS1619, в этом случае нами отмечено достоверное увеличение

их числа по сравнению с другими группами животных (рис. 5, а). В то же время содержание мтДНК в сердце не различается между всеми экспериментальными группами (рис. 5, в). Мы также оценили влияние NS1619 на размер митохондрий сердца мышей (рис. 5, б). Можно видеть, что животные контрольной группы и мыши *mdx* не различаются по периметру органелл. При этом NS1619 оказывает противоположное влияние на этот параметр, увеличивая его в сердце мышей дикого типа и, напротив, снижая в кардиомиоцитах *mdx*-мышей.

NS1619 снижает уровень фиброза в сердце *mdx*-мышей. Известно, что при МДД функциональная мышечная ткань замещается соединительной тканью — развивается фиброз, что характерно как для скелетной мускулатуры, так и для сердца [43]. Действительно, гистологический анализ по окрашиванию гематоксилином по Ван-Гизону показывает (рис. 6), что для сердца *mdx*-мышей характерно достоверное увеличение площади соединительной ткани по сравнению с животными дикого типа, что свидетельствует о более интенсивном развитии фиброза. Мы оценили, влияют ли митохондриальные эффекты NS1619 на состояние ткани сердца дистрофин-дефицитных мышей. Результаты показывают, что для *mdx*-мышей, получавших NS1619, характерно достоверное снижение площади фиброза до уровня контрольных животных (рис. 6). Таким образом NS1619 может смягчать развитие патологии, способствуя снижению интенсивности фиброза в сердце *mdx*-мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мышечная дистрофия Дюшенна является одной из наиболее распространенных нейромышечных патологий, которая характеризуется

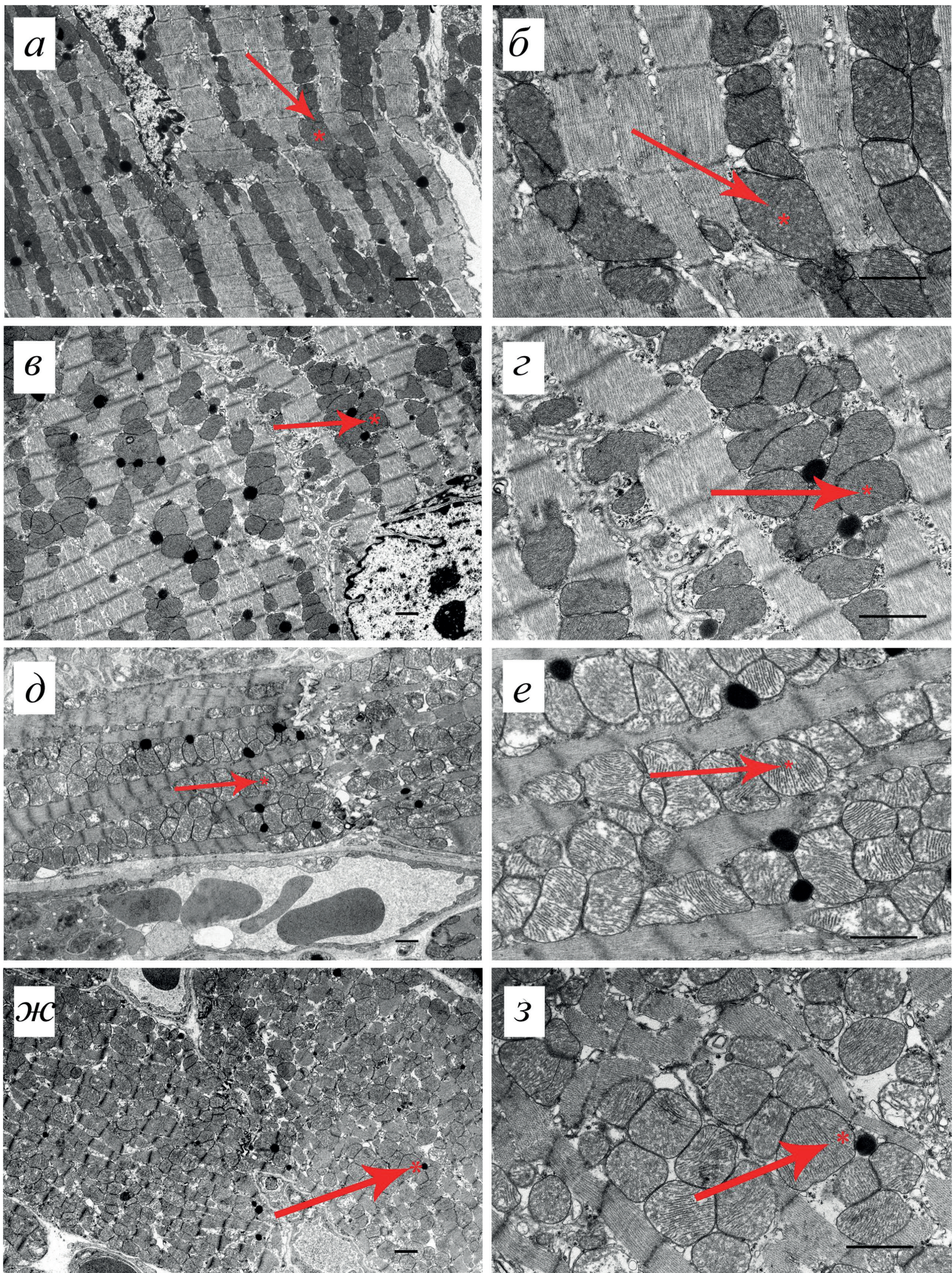


Рис. 4. Типичные электронные микрофотографии (при малом и большом увеличении) митохондриального аппарата кардиомиоцитов мышей группы контроль (а и б), контроль + NS1619 (в и г), *mdx* (д и е) и *mdx* + NS1619 (ж и з). Стрелками отмечена межфибрилярная популяция митохондрий. Звездочкой отмечены одни и те же митохондрии при малом и большом увеличении. Шкала – 1 мкм

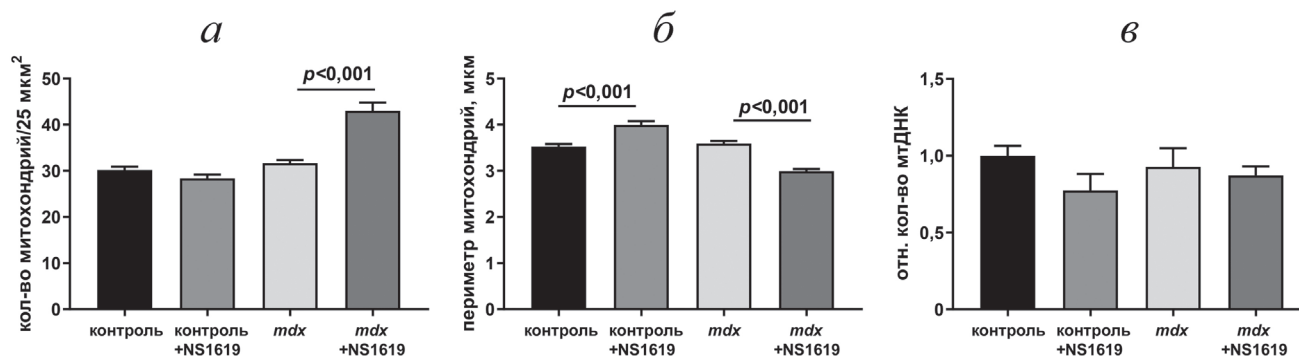


Рис. 5. Влияние NS1619 на количество митохондрий (а), периметр органелл (б) и уровень мтДНК относительно яДНК (в) в сердце экспериментальных групп мышей. Количество исследуемых полей зрения в группах — не менее 40 (а и б). Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего ($n = 6$)

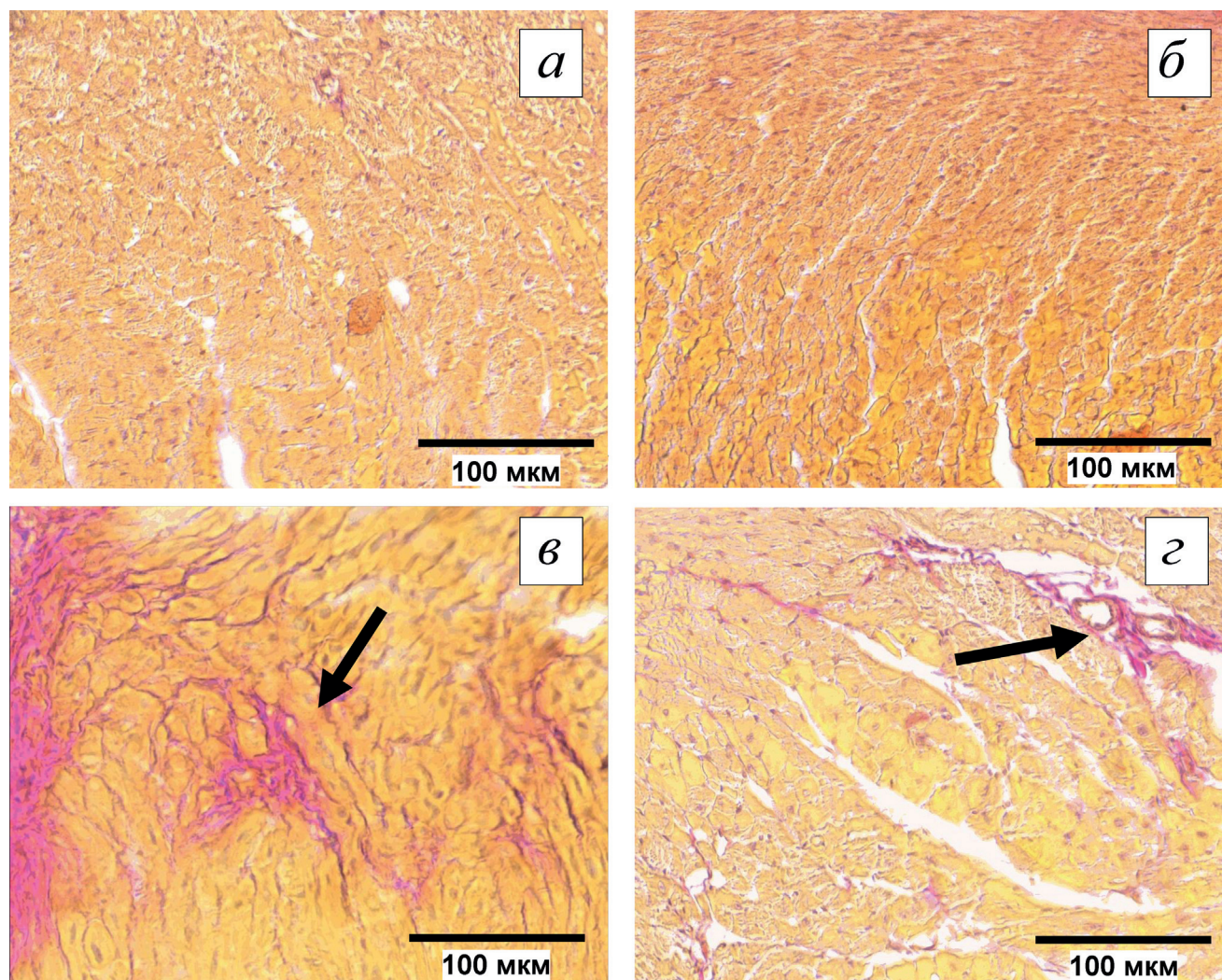
быстро прогрессирующей мышечной слабостью и истощением вследствие дегенерации скелетной мускулатуры и ее замещением соединительной тканью. Основными причинами смерти пациентов, страдающих этой патологией, являются дыхательная и сердечная недостаточность [1–6]. В условиях отсутствия эффективной и безопасной генной терапии, позволяющей восстановить нормальную экспрессию дистрофина, основное внимание уделяется коррекции вторичных эффектов МДД, прежде всего нарушения Ca^{2+} -гомеостаза, ассоциированного с увеличением уровня АФК, характеризующих наличие окислительного стресса, а также хронического воспаления и фиброза [7].

В качестве одной из мишеней для терапии МДД рассматриваются митохондрии. Это неудивительно, так как развитие патологии скелетных мышц сопровождается существенным нарушением структуры и функции этих органелл, в том числе регуляции ионного гомеостаза [8–14]. Показано, что нормализация гомеостаза Ca^{2+} в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей путем увеличения кальциевой емкости и восстановления чувствительности к индукции кальций-зависимой МРТ-поры способствует смягчению деструктивных процессов в скелетной мускулатуре животных [10, 44, 45]. Подобная картина выявлена нами недавно и в случае митохондриального гомеостаза ионов калия. Было установлено, что митохондрии скелетных мышц *mdx*-мышей характеризуются снижением эффективности транспорта K^+ через внутреннюю мембрану органелл, а также снижением общего содержания иона [25, 26]. В этом случае применение активатора $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ NS1619 способствовало нормализации этих параметров, и такой эффект сопровождался улучшением ультраструктуры органелл, снижением интенсивности окис-

лительного стресса и деструктивных процессов в скелетной мускулатуре животных [26]. Однако встает вопрос: насколько эффективна такая терапия при коррекции сердечной патологии? Для ответа на него мы оценили влияние NS1619 на функционирование и структуру митохондрий сердца мышей *mdx*, представляющих собой приближенную патологическую модель болезни Дюшенна и состояние органа в эксперименте *in vivo* путем сравнения нормальных и трансгенных животных в условиях нормы и коррекции.

Как показано в настоящей работе, в митохондриях сердца *mdx*-мышей, так же как в митохондриях скелетных мышц, наблюдается достоверное снижение скорости транспорта и содержания K^+ в матриксе (рис. 1), а применение NS1619 приводит к улучшению этих параметров в митохондриях. При этом такое изменение не связано с изменением уровня белка $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ и/или экспрессии гена, кодирующего этот белок (рис. 2). Это позволяет предположить, что наблюдаемые изменения митохондриального гомеостаза K^+ в кардиомиоцитах *mdx*-мышей могут быть обусловлены изменением активности имеющихся белковых субъединиц $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ или же влиянием этого агента на другие переносчики ионов калия во внутренней митохондриальной мембране, что мы не можем исключить. Интересно, что в случае скелетных мышц *mdx*-мышей ранее нами выявлено снижение экспрессии гена, кодирующего $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, которое устранялось NS1619 [26]. Это указывает на выраженное развитие патологии на уровне скелетных мышц *mdx*-мышей, которое отражает изменения на генном уровне.

Интересно отметить, что, несмотря на снижение скорости транспорта и содержания K^+ в митохондриях сердца *mdx*-мышей нами вновь отмечено ускорение дыхания и



д

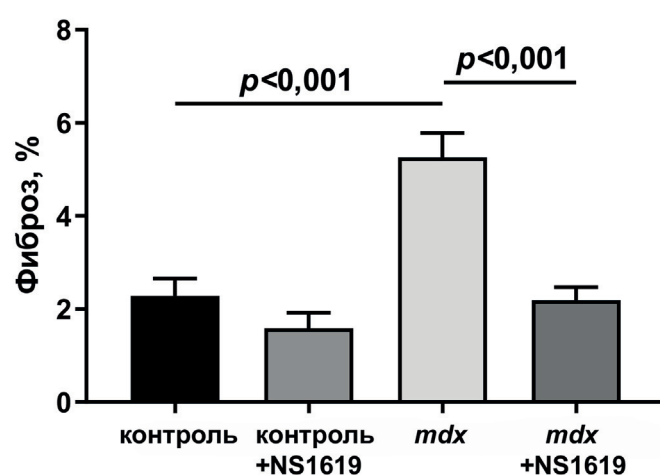


Рис. 6. Типичные гистологические изображения ткани сердца (для сравнения представлены участки левого желудочка) мышей группы контроль (а), контроль + NS1619 (б), *mdx* (в) и *mdx* + NS1619 (г). Отдельные участки соединительной ткани розового цвета отмечены стрелкой. На панели д представлены количественные данные, демонстрирующие уровень фиброза в сердце экспериментальных групп мышей, который оценивали, как процентное отношение площади окрашивания гематоксилином по Ван-Гизону к общей площади ткани, при этом для каждого образца анализировали не менее 10 срезов. Представлены средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего

окислительного синтеза АТФ по сравнению с митохондриями контрольных животных (табл. 2), что наблюдалось и в предыдущих работах [19, 21]. Это также сопровождается увеличением способности митохондрий сердца транспортировать и удерживать ионы кальция в матриксе органелл (рис. 3, а). Ранее нами и другими коллективами было показано, что такая картина может маскировать дисфункцию биоэнергетического аппарата кардиомиоцитов при развитии мышечной дистрофии [17–21]. При этом можно видеть, что в условиях *in vivo* NS1619 не влияет на параметры дыхания и окислительного фосфорилирования, а также кальциевую емкость митохондрий сердца обеих групп мышей.

Известно, что улучшение калиевого гомеостаза митохондрий, в том числе путем активации $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$, способствует снижению продукции АФК митохондриями и снижает интенсивность окислительного стресса [31]. Важно отметить, что такие эффекты описаны для активатора $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ NS1619, и они, как предполагается, лежат в основе известного кардиопротекторного действия этого агента и достигаются уже при однократном введении препарата [32, 46]. Недавно нами показано, что хроническое введение NS1619 приводит к снижению уровня АФК в митохондриях скелетных мышц дистрофин-дефицитных мышей [26]. В настоящей работе мы выяснили, что такой эффект наблюдается и в случае митохондрий сердца — уровень МДА, одного из маркеров окислительного стресса, повышенный при дистрофии Дюшенна, достоверно снижается в митохондриях сердца дистрофин-дефицитных животных, получавших NS1619 (рис. 3, б).

Наряду с улучшением митохондриального гомеостаза K^+ и снижением уровня продуктов перекисного окисления, что можно интерпретировать как снижение уровня окислительного стресса, применение NS1619 также сопровождается тенденцией к улучшению ультраструктуры органелл *mdx*-животных, о чем свидетельствуют данные электронной микроскопии сердечной мускулатуры (рис. 4 и рис. П1 в Приложении). Положительное влияние этого агента на структуру митохондрий отмечено нами ранее и в случае патологии скелетных мышц [26]. В сердечной ткани *mdx*-мышей действие NS1619 также сопровождалось достоверным увеличением количества митохондрий и снижением периметра органелл (рис. 5). Это можно трактовать как неканоническое увеличение митохондриальной фрагментации, которое, в отличие от показанных ранее случаев положительной ассоциации

фрагментации и окислительного стресса, в данных условиях сопровождается уменьшением выраженности окислительного стресса, ассоциированного с фрагментацией.

В предыдущей работе мы показали, что в целом благоприятное влияние NS1619 на структуру и функцию митохондриального аппарата скелетных мышц *mdx*-мышей способствует снижению интенсивности дегенеративных процессов в скелетной мускулатуре и уровня фиброза [26]. Можно видеть, что в случае сердечной мышцы дистрофин-дефицитных мышей также наблюдается достоверное увеличение площади, занимаемой соединительной тканью, по сравнению со здоровыми животными (рис. 6), однако различия не столь выражены, как в случае скелетных мышц, что в целом соответствует данным литературы [47] и подтверждает тезис об отсроченном развитии деструктивных явлений в тканях сердца. Тем не менее и в этом случае действие NS1619 сопровождается достоверным снижением уровня фиброза в сердце *mdx*-мышей до уровня животных дикого типа (рис. 6).

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что активатор $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ NS1619, наряду с облегчением патологии скелетных мышц дистрофин-дефицитных *mdx*-мышей, также способствует улучшению состояния сердечной мышцы. Это, по всей видимости, также обусловлено активацией транспорта ионов калия в митохондриях сердца, что ведет к снижению продукции АФК органеллами и улучшению их ультраструктуры. Важно отметить практически полное отсутствие влияния NS1619 на структуру и функцию митохондрий сердца животных дикого типа, что может свидетельствовать об отсутствии серьезных побочных эффектов такой терапии. Наряду с этим, следует понимать, что эффекты NS1619 могут быть обусловлены также его влиянием на BK -каналы, расположенные в ядерной и цитоплазматической мембране [31], которые имеют схожие биофизические свойства и роль которых в развитии патологий, включая дистрофию Дюшенна, только предстоит исследовать. Кроме того, важной задачей является выяснение влияния этого агента на функциональные параметры работы сердца при МДД, что позволит подтвердить перспективность его применения для коррекции кардиомиопатии.

Вклад авторов. М.В. Дубинин и К.Н. Белослудцев — концепция и руководство работой; М.В. Дубинин, В.С. Старинец, Ю.А. Че-

лядникова, Н.В. Белослудцева, И.Б. Михеева, Д.К. Пенкина, А.Д. Игошкина, Е.Ю. Таланов, И.И. Киреев — проведение экспериментов; М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев, Д.Б. Зоров — обсуждение результатов исследования; М.В. Дубинин — написание текста; М.В. Дубинин, К.Н. Белослудцев, Д.Б. Зоров — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10006).

Благодарности. Электронная микроскопия образцов выполнена при поддержке Программы развития МГУ (ПНР 5.13) и Центра коллективного пользования «Субдиф-

ракционная микроскопия» НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работу с лабораторными животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и с принципами Хельсинкской декларации (2000). Все протоколы были одобрены Комиссией по биологической безопасности и биоэтике МарГУ (протокол № 1/2021 от 18.10.2021).

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Emery, A. E. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases — A world survey, *Neuromuscul. Disord.*, **1**, 19-29, doi: 10.1016/0960-8966(91)90039-u.
- Mavrogeni, S., Markousis-Mavrogenis, G., Papa-vasiliou, A., and Kolovou, G. (2015) Cardiac involvement in Duchenne and Becker muscular dystrophy, *World J. Cardiol.*, **7**, 410-414, doi: 10.4330/wjc.v7.i7.410.
- Ignatieva, E., Smolina, N., Kostareva, A., and Dmitrieva, R. (2021) Skeletal muscle mitochondria dysfunction in genetic neuromuscular disorders with cardiac phenotype, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7349, doi: 10.3390/ijms22147349.
- Kamdar, F., and Garry, D. J. (2016) Dystrophin-deficient cardiomyopathy, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **67**, 2533-2546, doi: 10.1016/j.jacc.2016.02.081.
- D'Amario, D., Amodeo, A., Adorisio, R., Tiziano, F. D., Leone, A. M., Perri, G., Bruno, P., Massetti, M., Ferlini, A., Pane, M., Niccoli, G., Porto, I., D'Angelo, G. A., Borovac, J. A., Mercuri, E., and Crea, F. (2017) A current approach to heart failure in Duchenne muscular dystrophy, *Heart*, **103**, 1770-1779, doi: 10.1136/heartjnl-2017-311269.
- Ware, S. M. (2017) Genetics of paediatric cardiomyopathies, *Curr. Opin. Pediatr.*, **29**, 534-540, doi: 10.1097/MOP.0000000000000533.
- Angelini, G., Mura, G., and Messina, G. (2022) Therapeutic approaches to preserve the musculature in Duchenne muscular dystrophy: The importance of the secondary therapies, *Exp. Cell Res.*, **410**, 112968, doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112968.
- Rybalka, E., Timpani, C., Cooke, M. B., Williams, A., and Hayes, A. (2014) Defects in mitochondrial ATP synthesis in dystrophin-deficient mdx skeletal muscles may be caused by complex I insufficiency, *PLoS One*, **9**, e115763, doi: 10.1371/journal.pone.0115763.
- Vila, M. C., Rayavarapu, S., Hogarth, M., van der Meulen, J. H., Horn, A., Defour, A., Takeda, S., Brown, K. J., Hathout, Y., Nagaraju, K., and Jaiswal, J. K. (2017) Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy, *Cell Death Differ.*, **24**, 330-342, doi: 10.1038/cdd.2016.127.
- Schiavone, M., Zulian, A., Menazza, S., Petronilli, V., Argenton, F., Merlini, L., Sabatelli, P., and Bernardi, P. (2017) Alisporivir rescues defective mitochondrial respiration in Duchenne muscular dystrophy, *Pharmacol. Res.*, **125**, 122-131, doi: 10.1016/j.phrs.2017.09.001.
- Hughes, M. C., Ramos, S. V., Turnbull, P. C., Rebalka, I. A., Cao, A., Monaco, C. M., Varah, N. E., Edgett, B. A., Huber, J. S., Tadi, P., Delfinis, L. J., Schlattner, U., Simpson, J. A., Hawke, T. J., and Perry, C. G. R. (2019) Early myopathy in Duchenne muscular dystrophy is associated with elevated mitochondrial H₂O₂ emission during impaired oxidative phosphorylation, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **10**, 643-661, doi: 10.1002/jcsm.12405.
- Dubinina, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Mikheeva, I. B., Sharapov, M. G., and Belosludtsev, K. N. (2020) Duchenne muscular dystrophy is associated with the inhibition of calcium uniport in mitochondria and an increased sensitivity of the organelles to the calcium-induced permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165674, doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165674.
- Dubinina, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Belosludtseva, N. V., and Belosludtsev, K. N. (2020) The effect of deflazacort treatment on the functioning of skeletal muscle mitochondria in Duchenne muscular dystrophy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8763, doi: 10.3390/ijms21228763.
- Mareedu, S., Million, E. D., Duan, D., and Babu, G. J. (2021) Abnormal calcium handling in

- Duchenne muscular dystrophy: mechanisms and potential therapies, *Front. Physiol.*, **12**, 647010, doi: 10.3389/fphys.2021.647010.
15. Zhang, W., ten Hove, M., Schneider, J. E., Stuckey, D. J., Sebag-Montefiore, L., Bia, B. L., Radda, G. K., Davies, K. E., Neubauer, S., and Clarke, K. (2008) Abnormal cardiac morphology, function and energy metabolism in the dystrophic mdx mouse: An MRI and MRS study, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **45**, 754-760, doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.09.125.
 16. Kyrychenko, V., Poláková, E., Janíček, R., and Shirokova, N. (2015) Mitochondrial dysfunctions during progression of dystrophic cardiomyopathy, *Cell Calcium*, **58**, 186-195, doi: 10.1016/j.ceca.2015.04.006.
 17. Willi, L., Abramovich, I., Fernandez-Garcia, J., Agranovich, B., Shulman, M., Milman, H., Baskin, P., Eisen, B., Michele, D. E., Arad, M., Binah, O., and Gottlieb, E. (2022) Bioenergetic and metabolic impairments in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes generated from Duchenne muscular dystrophy patients, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 9808, doi: 10.3390/ijms23179808.
 18. Ascah, A., Khairallah, M., Daussin, F., Bourcier-Lucas, C., Godin, R., Allen, B. G., Petrof, B. J., Rosiers, C. D., Burelle, Y. (2011) Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **300**, H144-H153, doi: 10.1152/ajpheart.00522.2010.
 19. Dubinin, M. V., Talanov, E. Y., Tenkov, K. S., Starinets, V. S., Mikheeva, I. B., and Belosludtsev, K. N. (2020) Transport of Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent permeability transition in heart mitochondria in the early stages of Duchenne muscular dystrophy, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148250, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148250.
 20. Angebault, C., Panel, M., Lacôte, M., Rieusset, J., Lacampagne, A., and Fauconnier, J. (2021) Metformin reverses the enhanced myocardial SR/ER-mitochondria interaction and impaired complex I-driven respiration in dystrophin-deficient mice, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 609493, doi: 10.3389/fcell.2020.609493.
 21. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Talanov, E. Y., Mikheeva, I. B., Belosludtseva, N. V., Serov, D. A., Tenkov, K. S., Belosludtseva, E. V., and Belosludtsev, K. N. (2021) Effect of the non-immunosuppressive MPT pore inhibitor alisporivir on the functioning of heart mitochondria in dystrophin-deficient mdx mice, *Biomedicines*, **9**, 1232, doi: 10.3390/biomedicines9091232.
 22. Bienengraeber, M., Olson, T. M., Selivanov, V. A., Kathmann, E. C., O'Coilain, F., Gao, F., Karger, A. B., Ballew, J. D., Hodgson, D. M., Zingman, L. V., Pang, Y. P., Alekseev, A. E., and Terzic, A. (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating, *Nat. Genet.*, **36**, 382-387, doi: 10.1038/ng1329.
 23. Farid, T. A., Nair, K., Massé, S., Azam, M. A., Maguy, A., Lai, R. F., Umapathy, K., Dorian, P., Chauhan, V., Varró, A., Al-Hesayen, A., Waxman, M., Nattel, S., and Nanthakumar, K. (2011) Role of KATP channels in the maintenance of ventricular fibrillation in cardiomyopathic human hearts, *Circ. Res.*, **109**, 1309-1318, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.232918.
 24. Graciotti, L., Becker, J., Granata, A. L., Procopio, A. D., Tessarollo, L., and Fulgenzi, G. (2011) Dystrophin is required for the normal function of the cardio-protective K(ATP) channel in cardiomyocytes, *PLoS One*, **6**, e27034, doi: 10.1371/journal.pone.0027034.
 25. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Belosludtseva, N. V., Mikheeva, I. B., Chelyadnikova, Y. A., Penkina, D. K., Vedernikov, A. A., and Belosludtsev, K. N. (2022) The effect of uridine on the state of skeletal muscles and the functioning of mitochondria in Duchenne dystrophy, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10660, doi: 10.3390/ijms231810660.
 26. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Belosludtseva, N. V., Mikheeva, I. B., Chelyadnikova, Y. A., Igoshkina, A. D., Vafina, A. B., Vedernikov, A. A., and Belosludtsev, K. N. (2022) BK_{Ca} activator NS1619 improves the structure and function of skeletal muscle mitochondria in Duchenne dystrophy, *Pharmaceutics*, **14**, 2336, doi: 10.3390/ijms231810660.
 27. Checchetto, V., Leanza, L., De Stefani, D., Rizzuto, R., Gulbins, E., and Szabo, I. (2021) Mitochondrial K^{+} channels and their implications for disease mechanisms, *Pharmacol. Ther.*, **227**, 107874, doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107874.
 28. Zorov, D. B. (2022) A window to the potassium world. The evidence of potassium energetics in the mitochondria and identity of the mitochondrial ATP-dependent K^{+} channel, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 683-688, doi: 10.1134/S0006297922080016.
 29. Juhaszova, M., Kobrinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2021) ATP Synthase K^{+} - and H^{+} -fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K^{+} -“Uniporter” function: I. Characterization of ion fluxes, *Function (Oxf)*, **3**, zqab065, doi: 10.1093/function/zqab065.
 30. Juhaszova, M., Kobrinsky, E., Zorov, D. B., Nuss, H. B., Yaniv, Y., Fishbein, K. W., de Cabo, R., Montoliu, L., Gabelli, S. B., Aon, M. A., Cortassa, S., and Sollott, S. J. (2022) ATP synthase K^{+} - and H^{+} -fluxes drive ATP synthesis and enable mitochondrial K^{+} -“Uniporter” function: II. Ion and ATP synthase flux regulation, *Function (Oxf)*, **3**, zqac001, doi: 10.1093/function/zqac001.
 31. González-Sanabria, N., Echeverría, F., Segura, I., Alvarado-Sánchez, R., and Latorre, R. (2021) BK in double-membrane organelles: A biophysical, pharmacological, and functional survey, *Front. Physiol.*, **12**, 761474, doi: 10.3389/fphys.2021.761474.
 32. Wang, X., Yin, C., Xi, L., and Kukreja, R. C. (2004) Opening of Ca^{2+} -activated K^{+} channels triggers

- early and delayed preconditioning against I/R injury independent of NOS in mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **287**, H2070-H2077, doi: 10.1152/ajpheart.00431.2004.
33. Lam, J., Katti, P., Biete, M., Mungai, M., AshShareef, S., Neikirk, K., Garza Lopez, E., Vue, Z., Christensen, T. A., Beasley, H. K., Rodman, T. A., Murray, S. A., Salisbury, J. L., Glancy, B., Shao, J., Pereira, R. O., Abel, E. D., and Hinton, A. (2021) A universal approach to analyzing transmission electron microscopy with ImageJ, *Cells*, **10**, 2177, doi: 10.3390/cells10092177.
 34. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 35. Dubinin, M. V., Semenova, A. A., Ilzorkina, A. I., Markelova, N. Y., Penkov, N. V., Shakurova, E. R., Belosludtsev, K. N., and Parfenova, L. V. (2021) New quaternized pyridinium derivatives of betulin: Synthesis and evaluation of membranotropic properties on liposomes, pro- and eukaryotic cells, and isolated mitochondria, *Chem. Biol. Interact.*, **349**, 109678, doi: 10.1016/j.cbi.2021.109678.
 36. Belosludtseva, N. V., Starinets, V. S., Pavlik, L. L., Mikheeva, I. B., Dubinin, M. V., and Belosludtsev, K. N. (2020) The effect of S-15176 difumarate salt on ultrastructure and functions of liver mitochondria of C57BL/6 mice with streptozotocin/high-fat diet-induced type 2 diabetes, *Biology*, **9**, 309, doi: 10.3390/biology9100309.
 37. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinform.*, **13**, 134, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
 38. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
 39. Quiros, P. M., Goyal, A., Jha, P., and Auwerx, J. (2017) Analysis of mtDNA/nDNA ratio in mice, *Curr. Protoc. Mouse Biol.*, **7**, 47-54, doi: 10.1002/cpmo.21.
 40. Szewczyk, A., Skalska, J., Głąb, M., Kulawiak, B., Malińska, D., Koszela-Piotrowska, I., and Kunz, W. S. (2006) Mitochondrial potassium channels: from pharmacology to function, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 715-720, doi: 10.1016/j.bbabo.2006.05.002.
 41. Singh, H., Rong, L., Bopassa, J., Meredith, A., Stefani, E., and Toro, L. (2013) MitoBK-Ca is encoded by the KCNMA1 gene, and a splicing sequence defines its mitochondrial location, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 10836-10841, doi: 10.1073/pnas.1302028110.
 42. Heinen, A., Aldakkak, M., Stowe, D. F., Rhodes, S. S., Riess, M. L., Varadarajan, S. G., and Camara, A. K. (2007) Reverse electron flow-induced ROS production is attenuated by activation of mitochondrial Ca²⁺-sensitive K⁺ channels, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H1400-H1407, doi: 10.1152/ajpheart.00198.2007.
 43. Kharraz, Y., Guerra, J., Pessina, P., Serrano, A. L., and Muñoz-Cánoves, P. (2014) Understanding the process of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 965631, doi: 10.1155/2014/965631.
 44. Wissing, E. R., Millay, D. P., Vuagniaux, G., and Molkentin, J. D. (2010) Debio-025 is more effective than prednisone in reducing muscular pathology in mdx mice, *Neuromuscul. Disord.*, **20**, 753-760, doi: 10.1016/j.nmd.2010.06.016.
 45. Dubinin, M. V., Starinets, V. S., Talanov, E. Y., Mikheeva, I. B., Belosludtseva, N. V., and Belosludtsev, K. N. (2021) Alisporivir Improves mitochondrial function in skeletal muscle of mdx mice but suppresses mitochondrial dynamics and biogenesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9780, doi: 10.3390/ijms22189780.
 46. Dai, H., Wang, M., Patel, P. N., Kalogeris, T., Liu, Y., Durante, W., and Korthuis, R. J. (2017) Preconditioning with the BKCa channel activator NS-1619 prevents ischemia-reperfusion-induced inflammation and mucosal barrier dysfunction: Roles for ROS and heme oxygenase-1, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **313**, H988-H999, doi: 10.1152/ajpheart.00620.2016.
 47. Li, Y., Zhang, S., Zhang, X., Li, J., Ai, X., Zhang, L., Yu, D., Ge, S., Peng, Y., and Chen, X. (2014) Blunted cardiac beta-adrenergic response as an early indication of cardiac dysfunction in Duchenne muscular dystrophy, *Cardiovasc. Res.*, **103**, 60-71, doi: 10.1093/cvr/cvu119.

EFFECT OF THE LARGE-CONDUCTANCE CALCIUM-DEPENDENT K⁺ CHANNEL ACTIVATOR NS1619 ON THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA IN THE HEART OF DYSTROPHIN-DEFICIENT MICE

M. V. Dubinin^{1*}, V. S. Starinets², Y. A. Chelyadnikova¹, N. V. Belosludtseva²,
I. B. Mikheeva², D. K. Penkina¹, A. D. Igoshkina¹, E. Y. Talanov², I. I. Kireev³,
D. B. Zorov³, and K. N. Belosludtsev^{1,2}

¹ *Mari State University,
424001 Yoshkar-Ola, Mari El, Russia; E-mail: dubinin1989@gmail.com*

² *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

³ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia.*

Dystrophin-deficient muscular dystrophy (Duchenne dystrophy) is characterized by impaired ion homeostasis, in which mitochondria play an important role. In the present work, using a model of dystrophin-deficient *mdx* mice, we revealed a decrease in the efficiency of potassium ion transport and the total content of this ion in heart mitochondria. We evaluated the effect of chronic administration of the benzimidazole derivative NS1619, which is an activator of the large-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channel (mitoBK_{Ca}) on the structure and function of organelles and the state of the heart muscle. It was shown that NS1619 improves K^{+} transport and increases the content of the ion in the heart mitochondria of *mdx* mice, but this is not associated with changes in the level of the mitoBK_{Ca} protein and the expression of the encoding gene. The effect of NS1619 was accompanied by a decrease in the intensity of oxidative stress, assessed by the level of lipid peroxidation products (MDA products) and normalization of the mitochondrial ultrastructure in the heart of *mdx* mice. In addition, we found positive changes in the tissue, expressed in a decrease in the level of fibrosis in the heart of dystrophin-deficient animals treated with NS1619. It was noted that NS1619 had no significant effect on the structure and function of heart mitochondria in wild-type animals. The paper discusses the mechanisms of influence of NS1619 on the function of mouse heart mitochondria in Duchenne muscular dystrophy and the prospects for applying this approach to correct pathology.

Keywords: Duchenne dystrophy, heart, mitochondria, NS1619, calcium-activated potassium channel, BK_{Ca}