

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

# ВПЛИВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ЩУРІВ РІЗНОЇ СТАТІ\*

Горбенко Н. І.<sup>1</sup>, Боріков О. Ю.<sup>1</sup>, Іванова О. В.<sup>1</sup>, Козар В. В.<sup>2</sup>, Кіприч Т. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»,  
м. Харків, Україна;

<sup>2</sup> Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна  
gorbenkonat58@ukr.net

Відомо, що цукровий діабет (ЦД) є найпоширенішим ендокринним захворюванням, розповсюдженість якого у 21 столітті набула характеру пандемії.

Незважаючи на суттєве підвищення рівня життя та зниження кардіоваскулярної летальності протягом останніх десятиріч, серцево-судинні захворювання (ССЗ) залишаються головною причиною смертності як у чоловіків, так і у жінок, та обумовлюють 35% загальної летальності в світі і 48% — у країнах Європи [1].

Дані клінічних спостережень свідчать, що ЦД, у залежності від статі, різною мірою впливає на ризик кардіоваскулярних захворювань та смертність, підвищуючи його в 4 рази у жінок та лише в 2 рази — у чоловіків [2].

На сьогодні остаточною причиною гендерних відмінностей у ризику діабетичних кардіоваскулярних ускладнень залишається нез'ясованою. Однією із ймовірних причин статево-залежних відмінностей серцевої діяльності в нормі та за умов патологічного стану вважають статеві особливості біогенезу та активності мітохондрій міокарду [3].

Показано, що мітохондрії серця самиць тварин є більш диференційованими, мають підвищену окисну ємність та активність компонентів електрон-транспортного ланцюга, а також продукують меншу кількість активних форм кисню (АФК) у порівнянні з самцями [4]. Вважають, що провідну роль у статевому диморфізмі мітохондріальної функції відіграють статеві гормони, зокрема естрогени, які беруть участь у регуляції

\* Роботу виконано згідно з плановою науковою тематикою лабораторії біохімічних досліджень ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» «Визначення біохімічних та функціональних порушень, які обумовлюють статевий диморфізм основних чинників кардіоваскулярного ризику за умов цукрового діабету 2 типу», (державний реєстраційний № 0116U000332).

Установою, що фінансує дослідження, є НАМН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 13.02.2019.

біогенезу, інтенсивності споживання кисню та продукції АТФ [5].

Слід зазначити, що результати більшої частини досліджень на експериментальних моделях дозволяють визначити лише загальні ланки патогенетичних механізмів діабетичних серцево-судинних порушень, але не пояснюють взаємозв'язок між статтю та діабетом, оскільки переважно були прове-

дені на самцях гризунів. У зв'язку з цим, поглиблене доклінічне вивчення статевого диморфізму в патогенезі діабетичних макросудинних ускладнень є необхідним для розробки гендерно-специфічної профілактики та терапії ССЗ за умов ЦД 2 типу.

**Метою** роботи був порівняльний аналіз змін функціонального стану мітохондрій серця самців та самиць щурів за умов ЦД 2 типу.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводили згідно з національними Загальними етичними принципами експериментів на тваринах (Київ, 2001), Директивою Ради ЄС № 86/609/ЄЕС та вимогами GLP.

ЦД 2 типу моделювали у 3-місячних самців та самиць щурів масою 160–200 г за допомогою висококалорійної дієти та низьких доз стрептозоточину [6]. Через шістьнадцять тижнів від початку експерименту стан глюкозного гомеостазу оцінювали за показниками базальної глікемії за допомогою аналізатора «Ексан-Г» (Литва).

Мітохондрії серця щурів отримували методом диференційного центрифугування [7]. Функціональний стан електрон-транспортного ланцюга мітохондрій оцінювали за активністю цитохром С-оксидази, аконітази, тіоредоксинредуктази та сукцинатдегідрогенази в суспензії ізольованих міто-

хондрій [8–10].  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане відкриття мітохондріальної пори кардіоміоцитів (mPTP, mitochondrial permeability transition pore) досліджували за швидкістю циклоспоринчутливого набухання мітохондрій [11].

Статистичний аналіз отриманих даних проводили методами варіаційної статистики. Розподіл ознаки у виборці визначали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для множинного порівняння даних із нормальним розподілом проводили параметричний однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA та застосовували критерій Ст'юдента-Н'юмена-Кейлса; дані представляли у вигляді  $(X \pm S_x)$ , де  $X$  — середнє арифметичне значення,  $S_x$  — стандартна похибка середнього арифметичного значення. Розходження вважали статистично значущим, якщо  $p \leq 0,05$  [12].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень було встановлено, що рівень базальної гіперглікемії у діабетичних щурів не залежить від статі, оскільки не відзначалось вірогідної різниці в концентрації глюкози у самиць та самців (відповідно  $8,10 \pm 0,98$  ммоль/л та  $8,15 \pm 0,61$  ммоль/л,  $p > 0,05$ ).

Відповідно до сучасної гіпотези оксидативного стресу як патогенетичного механізму захворювань, включаючи ЦД 2 типу, саме порушення мітохондріальних редоксигнальних шляхів, які регулюють баланс між накопиченням і утилізацією енергії, є основною причиною розвитку метаболічних змін, які призводять до зниження чутливості до інсуліну, а також до прогресування супутніх патологій, зокрема діабетичної кардіоміопатії [13].

Одним із найбільш чутливих до пошкоджуючої дії АФК компонентів енергетичного метаболізму в мітохондріях є аконітаза — фермент циклу трикарбонових кислот. За умов ЦД хронічна гіперпродукція АФК може призводити до інактивації аконітази, що спричиняє надмірне накопичення жирних кислот та їх похідних, таких як ацилгліцероли, в нежирових тканинах. Останні, як відомо, є основним тригером процесів, що призводять до розвитку інсулінорезистентності, а також супутніх метаболічних порушень, опосередкованих ліпотоксичністю [14].

Встановлено, що активність аконітази у мітохондріях серця контрольних самиць вище, ніж у самців (табл.). Останнє може бути як наслідком більш низької базаль-

Показники функціонального стану мітохондрій серця у самиць та самців щурів із цукровим діабетом 2 типу, ( $X \pm S_x$ ),  $n = 6$ 

Показник	Інтактний контроль		ЦД 2 типу	
	самці	самиці	самці	самиці
Активність аконітази, нмоль/хв/мг білка	342,9 ± 17,9	407,7 ± 36,5	124,6 ± 13,1 <sup>1)</sup>	323,7 ± 34,3 <sup>2)</sup>
Активність сукцинат-дегідрогенази, нмоль/хв/мг білка	23,27 ± 2,05	36,74 ± 0,66 <sup>2)</sup>	15,14 ± 0,80 <sup>1)</sup>	28,84 ± 2,39 <sup>1), 2)</sup>
Активність цитохром С-оксидази, мкмоль/хв/мг білка	7,21 ± 0,85	9,63 ± 0,84	9,27 ± 1,13	10,05 ± 1,27
Швидкість набухання мітохондрій, мЕ/хв/мг білка	15,14 ± 2,75	15,46 ± 1,10	36,84 ± 2,89 <sup>1)</sup>	23,02 ± 1,42 <sup>1), 2)</sup>
Активність тіоредоксин-редуктази, нмоль НАДФН/ хв/мг білка	2,50 ± 0,28	3,13 ± 0,26	1,34 ± 0,19 <sup>1)</sup>	2,31 ± 0,10 <sup>1), 2)</sup>

## Примітки:

- <sup>1)</sup> статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи «Інтактний контроль» відповідної статі,  $p \leq 0,05$ ;
- <sup>2)</sup> статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для самців відповідної групи,  $p \leq 0,05$ .

ної продукції АФК мітохондріями самиць, так і здатністю естрогенів безпосередньо регулювати експресію ферменту. Розвиток ЦД 2 типу супроводжувався зниженням активності аконітази в мітохондріях серця тварин обох статей, але у самців зміна активності ферменту була виразнішою (див. табл.).

Також було показано, що за умов ЦД 2 типу у тварин обох статей знижується активність іншого ферменту циклу трикарбонових кислот, який одночасно є компонентом дихального ланцюга мітохондрій (комплекс II) — сукцинатдегідрогенази. В той же час, активність ензиму була достовірно вищою у самиць із діабетом у порівнянні з самцями щурів (див. табл.).

Зниження активності сукцинатдегідрогенази може бути наслідком окисної інактивації редокс-чутливої аконітази внаслідок окислативного стресу, оскільки останнє призводить не тільки до гальмування роботи циклу Кребса, але й до накопичення ацетил-КоА, що посилює неферментативне ацетилювання білків. Відомо, що процеси ацетилювання/деацетилювання є важливою сигнальною системою посттрансляційної модифікації білків, яка відіграє значну роль у регуляції різних функцій клітини [15]. В той же час, її дисбаланс може бути

одним із молекулярних механізмів патогенезу ЦД 2 типу.

Слід зазначити, що ані стать, ані наявність діабету не вплинули на активність іншого компонента дихального ланцюга — цитохром С-оксидази (комплекс IV) (див. табл.).

Одним із провідних механізмів апоптоїчної або некротичної загибелі кардіоміоцитів за умов мітохондріальної дисфункції, зокрема індукованої ЦД, є активація відкриття неспецифічної мітохондріальної пори (mPTP) [16].

Основним індуктором відкриття mPTP є підвищення концентрації  $Ca^{2+}$  у матриці мітохондрій та інші фактори, які характерні також для мітохондріальної дисфункції (однієї з основних ознак діабетичної кардіоміопатії), а саме — розвиток окислативного стресу в мітохондріях, зниження мітохондріального трансмембранного потенціалу та, як наслідок, зниження концентрації аденілових нуклеотидів (АДФ, АТФ), а також підвищення рН мітохондріального матриксу [17].

Встановлено, що у тварин із експериментальним ЦД 2 типу швидкість  $Ca^{2+}$ -залежного набухання мітохондрії перевищувала аналогічний показник в інтактних тварин відповідної статі. Крім того, міто-

хондрії самців щурів із ЦД 2 типу виявилися більш чутливими до набухання у порівнянні з мітохондріями серця діабетичних самиць (див. табл.).

Відомо, що посиленню апоптозу кардіоміоцитів та розвитку кардіоміопатії за умов ЦД 2 типу також може сприяти зниження активності тіоредоксинредуктази [18]. Припускають, що цей фермент відіграє важливу роль у регуляції проліферації, ско-

рочувальної активності та апоптозу кардіоміоцитів [19]. В результаті проведених досліджень було встановлено зниження активності тіоредоксинредуктази в мітохондріях серця як у самців, так і у самиць щурів із ЦД 2 типу у порівнянні з контрольними тваринами відповідної статі. При цьому, зниження активності ферменту було виразнішим у діабетичних самців (див. табл.).

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що цукровий діабет 2 типу призводить до зниження активності ферменту енергетичного обміну — аконітази — в мітохондріях серця щурів обох статей, причому у самців воно є більш виразним.
2. Аналіз функціонального стану мітохондрій виявив більш суттєве зниження активності сукцинатдегідрогенази під впливом ЦД 2 типу у самців щурів порівняно з самицями.
3. Виявлено більш виразну активацію неспецифічної мітохондріальної пори (mPTP) у діабетичних самців, що, у поєднанні з більшим зниженням активності тіоредоксинредуктази порівняно із діабетичними самицями, може свідчити про збільшену чутливість кардіоміоцитів самців щурів до ушкоджуючої дії проапоптотичних чинників.
4. Отримані результати обґрунтовують необхідність розробки нових методів профілактики та лікування діабетичних кардіоваскулярних ускладнень, спрямованих на збереження функціонального стану мітохондрій кардіоміоцитів, із урахуванням статевих особливостей щодо чутливості до проапоптотичних чинників.

## ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Preis SR, Hwang SJ, Coady S, et al. *Circulation* 2009; 119(13): 1728-1735. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.829176.
2. Murphy E, Amanakis G, Fillmore N, et al. *Cardiovasc Res* 2017; 113(4): 370-377. doi: 10.1093/cvr/cvx008.
3. Salinero AE, Anderson BM, Zuloaga KL. *Int J Obes (Lond)* 2018; 2(5): 1088-1091. doi: 10.1038/s41366-018-0023-3.
4. Coronado M, Fajardo G, Nguyen K, et al. *Circ Res* 2018; 122: 282-295. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310725.
5. Klinge CM. *J Cell Biochem* 2008; 105(6): 1342-1351. doi: 10.1002/jcb.21936.
6. Lin S, Yang J, Wu G, et al. *J Biomed Sci* 2010; 17(1): 46-56. doi: 10.1186/1423-0127-17-S1-S46.
7. Karuzina II, Archakov AI. *Sovremennye metody v biohimii, Moskva, 1977; 1: 47-49.*
8. Straus W. *Biochem Biophys Acta* 1956; 19(1): 58-65.
9. Talbot DA, Brand MD. *Biochem Biophys Acta* 2005; 1709(2): 150-156. doi: 10.1016/j.bbabi.2005.07.001.
10. Krivchenkova RS. *Sovremennye metody v biohimii, Moskva, 1977; 1: 44-47.*
11. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, et al. *J Biol Chem* 2001; 276(4): 2571-2575. doi: 10.1074/jbc.M006825200.
12. Glans S. *Mediko-biologicheskaja statistika, Moskva, 1998: 459 p.*
13. Toedebusch R, Belenchia A, Pulakat L. *Front Physiol* 2018; 9(453): 14 p. doi: 10.3389%2Ffphys.
14. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, et al. *Lipids Health Dis* 2012; 11(30): 11 p. doi: 10.1186/1476-511X-11-30.
15. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, et al. *Science* 2009; 325(5942): 834-840. doi: 10.1126/science.1175371.
16. Riojas-Hernández A, Bernal-Ramírez J, Rodríguez-Mier D, et al. *Life Sci* 2015; 141(15): 32-43. doi: 10.1016/j.lfs.2015.09.018.
17. Korge P, John SA, Calmettes G, et al. *J Biol Chem* 2017; 292: 9896-9905. doi: 10.1074/jbc.M116.768325.
18. Yoshioka J. *J Amer Heart Assoc* 2015; 4(7): 3 p. doi: 10.1161/JAHA.115.002278.
19. Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, et al. *Molec Cell Biol* 2004; 24(21): 9414-9423. doi: 10.1128/MCB.24.21.9414-9423.2004.

## ВПЛИВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ЩУРІВ РІЗНОЇ СТАТІ

Горбенко Н. І.<sup>1</sup>, Боріков О. Ю.<sup>1</sup>, Іванова О. В.<sup>1</sup>, Козар В. В.<sup>2</sup>, Кіпріч Т. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України»,  
м. Харків, Україна;

<sup>2</sup> Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна  
gorbenkonat58@ukr.net

Цукровий діабет 2 типу є одним із основних чинників кардіоваскулярного ризику, який призводить до диспропорційного зростання серцево-судинних катастроф у жінок та чоловіків. Остаточні причини підвищеного кардіоваскулярного ризику у жінок за умов цукрового діабету залишаються до кінця не з'ясованими, однією із ймовірних причин відмінностей серцевої діяльності вважаються статеві особливості біогенезу та активності мітохондрій міокарду. Проведено порівняльний аналіз змін функціонального стану мітохондрій серця самців та самиць щурів за умов експериментального цукрового діабету 2 типу. Встановлено більш суттєве зниження активності сукцинатдегідрогенази, яка входить до комплексу II електрон-транспортного ланцюга, у діабетичних самців щурів порівняно з самицями з діабетом. Визначено, що цукровий діабет 2 типу призводить до більшого зниження активності ферменту енергетичного обміну — аконітази — в мітохондріях серця самців у порівнянні з самицями щурів. Одним із провідних механізмів апоптотичної або некротичної загибелі кардіоміоцитів за умов мітохондріальної дисфункції, зокрема індукованої діабетом, вважають активацію відкриття неспецифічної мітохондріальної пори (mPTP, mitochondrial permeability transition pore). Виявлено більш виразну активацію mPTP у самців із діабетом, що, в поєднанні з більш суттєвим зниженням активності тiorедоксинредуктази порівняно із діабетичними самицями, може свідчити про збільшену чутливість кардіоміоцитів самців щурів до ушкоджуючої дії проапоптотичних чинників.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, кардіоміоцити, неспецифічна мітохондріальна пора, функціональний стан мітохондрій, статеві відмінності.

## ВЛИЯНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ СЕРДЦА КРЫС РАЗНОГО ПОЛА

Горбенко Н. И.<sup>1</sup>, Бориков А. Ю.<sup>1</sup>, Иванова О. В.<sup>1</sup>, Козарь В. В.<sup>2</sup>, Киприч Т. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,  
г. Харьков, Украина;

<sup>2</sup> Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина  
gorbenkonat58@ukr.net

Сахарный диабет 2 типа является одним из основных факторов кардиоваскулярного риска, который приводит к диспропорциональному росту сердечно-сосудистых катастроф у женщин и мужчин. Окончательные причины повышенного кардиоваскулярного риска у женщин при сахарном диабете остаются до конца не выясненными, одной из вероятных причин различий сердечной деятельности считаются половые особенности биогенеза и активности митохондрий миокарда. Проведен сравнительный анализ изменений функционального состояния митохондрий сердца самцов и самок крыс в условиях экспериментального сахарного диабета 2 типа. Установлено более существенное снижение активности сукцинатдегидрогеназы, входящей в состав комплекса II электрон-транспортной цепи, у диабетических самцов по сравнению с самками. Выведено, что сахарный диабет 2 типа приводит к большему снижению активности фермента энергетического обмена — аконитазы — в митохондриях сердца самцов крыс в отличие от самок. Одним из ведущих механизмов апоптотической или некротической гибели кардиомиоцитов в условиях митохондриальной дисфункции, в частности индуцированной диабетом, считают активацию открытия неспецифической митохондриальной поры (mPTP, mitochondrial permeability transition pore). Показано, что у самцов крыс с экспериментальным диабетом наблюдается более выраженная активация mPTP, что, в сочетании с более существенным снижением активности тiorедоксинредуктазы по сравнению с диабетическими самками, может свидетельствовать о большей чувствительности кардиомиоцитов самцов крыс к повреждающему действию проапоптотических факторов.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, кардиомиоциты, неспецифическая митохондриальная пора, функциональное состояние митохондрий, половые различия.

**THE IMPACT OF DIABETES MELLITUS  
ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE MITOCHONDRIA  
IN THE HEART OF MALE AND FEMALE RATS**

Gorbenko N. I.<sup>1</sup>, Borikov O. Y.<sup>1</sup>, Ivanova O. V.<sup>1</sup>, Kozar V. V.<sup>2</sup>, Kiprych T. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv, Ukraine;*

<sup>2</sup> *National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine*

*gorbenkonat58@ukr.net*

Type 2 diabetes is one of the main factors of the cardiovascular risk, which leads to a disproportionate increase in cardiovascular events in women and men. All causes of increased cardiovascular risk in women with type 2 diabetes mellitus are not established, one of the most likely causes of cardiac activity is considered to be gender features of biogenesis and activity of myocardial mitochondria. A comparative analysis of changes in the functional state of the heart mitochondria in males and females rats with experimental type 2 diabetes mellitus was conducted. It was established that the activity of succinate dehydrogenase, the part of complex II of the electron transport chain, reduced more significantly in diabetic males compared with diabetic females. Type 2 diabetes mellitus also caused a greater decrease in the activity of the energy metabolism enzyme — aconitase, in heart mitochondria of male compared to female. One of the leading mechanisms of cardiomyocytes' apoptotic or necrotic death in conditions of mitochondrial dysfunction, in particular induced by diabetes, is the activation of a nonspecific mitochondrial pore opening (mPTP, mitochondrial permeability transition pore). It was found a more pronounced activation of mPTP and more significant decrease in thioredoxin reductase activity in males with type 2 diabetes mellitus compared with diabetic females. The obtained data may indicate a greater sensitivity of male cardiomyocytes to the damaging effects of proapoptotic factors.

**Key words:** type 2 diabetes mellitus, cardiomyocytes, mitochondrial permeability transition pore, mitochondria functional state, sex differences.