

УДК 577.23

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ I ТИПА

© 2019 г. В.С. Старинец*, Е.В. Лебедева*, И.Б. Михеева**, Н.В. Белослудцева**, М.В. Дубинин*, К.Н. Белослудцев* **

*Марийский государственный университет, 424000, Йошкар-Ола, площадь Ленина, 1

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино, Институтская ул., 3

E-mail: bekonik@gmail.com

Поступила в редакцию 14.06.2019 г.

После доработки 14.06.2019 г.

Принята к публикации 08.07.2019 г.

Изучены особенности ультраструктуры и функционирования митохондрий печени крыс линии Sprague Dawley с экспериментальным сахарным диабетом I типа. Установлено, что сахарный диабет, вызванный введением крысам стрептозотоцина в дозе 75 мг/кг массы тела, сопровождается нарушением структуры митохондриальных крист и уменьшением размера органелл по сравнению с контролем. Показано, что скорости дыхания митохондрий в метаболических состояниях 2, 3 и 4 увеличиваются при развитии у крыс диабета I типа. Это может быть связано с увеличением общего содержания жирных кислот в митохондриях печени диабетических крыс. В то же время моделирование стрептозотин-индуцированного диабета у крыс не оказывало достоверного влияния на показатели эффективности окислительного фосфорилирования (АДФ/О₂, дыхательный контроль и время фосфорилирования) митохондрий печени.

Ключевые слова: сахарный диабет I типа, митохондрии, митохондриальное дыхание, окислительное фосфорилирование.

DOI: 10.1134/S0006302919050144

Сахарный диабет и вызываемые им осложнения являются одними из самых распространенных эндокринных заболеваний во всем мире. Клинически сахарный диабет представляет собой гетерогенное заболевание, связанное с нарушением усвоения глюкозы, которое вызвано относительной или абсолютной недостаточностью гормона инсулина, что в конечном итоге приводит к гипергликемии. Согласно современной классификации существуют два основных типа диабета. Сахарный диабет I типа – аутоиммунная патология, связанная с деструкцией β-клеток поджелудочной железы, результатом которой становится абсолютная недостаточность инсулина в организме [1]. Сахарный диабет II типа развивается в результате нарушения механизмов взаимодействия инсулина с клетками организма (инсулинорезистентность), его патологические проявления связаны с глюкозотоксичностью и липотоксичностью, которые приводят к возникновению различных осложнений в таких органах,

как глаза, почки, печень, сердце, мозг, а также в скелетных мышцах [2–4].

Печень играет важную роль в поддержании гомеостаза глюкозы в организме [5]. Косвенно или непосредственно она является основной мишенью действия инсулина [6]. В то время как высвобождение инсулина уменьшается при диабете, выработка глюкагона возрастает, что способствует увеличению скорости разложения гликогена. Таким образом, клетки печени первыми подвергаются воздействию больших концентраций глюкозы по сравнению с другими клетками организма. Высокий уровень глюкозы может являться причиной неферментативного гликозилирования белков и липидов и в конечном итоге приводит к изменениям энергетического обмена. Кроме того, изменения в синтезе АТФ также влияют на степень гликолиза, уменьшая утилизацию глюкозы, поскольку активность глюкокиназы (и гексокиназы) зависит от внутриклеточного пула АТФ [7].

В клетках основная роль в поддержании энергетического метаболизма принадлежит митохондриям, которые производят большую часть АТФ с

Сокращения: ДНФ – 2,4-динитрофенол.

помощью реакций окислительного фосфорилирования. Поскольку АТФ необходим для многих клеточных процессов, митохондрии играют важную роль в регуляции метаболизма и поддержании нормального функционирования клеток в целом [8]. При этом митохондрии являются источником активных форм кислорода, которые участвуют во многих патологических процессах и часто играют существенную роль в физиологических механизмах гибели клеток [9].

Общепризнано, что митохондрии принимают непосредственное участие в развитии сахарного диабета [10]. Так, было установлено, что митохондриальная дисфункция напрямую связана с общими метаболическими дефектами, вызванными диабетом, ожирением и его метаболическими осложнениями [11]. Также известно, что при сахарном диабете I и II типов происходит снижение энергетического метаболизма [12]. На клеточном уровне сахарный диабет II типа характеризуется нарушением митохондриальной динамики — увеличением деления и снижением слияния митохондрий [13–15]. Еще одним проявлением митохондриальной дисфункции при сахарном диабете является индукция окислительного стресса [16,17]. Тем не менее данные, представленные в литературе, в некоторой степени являются разрозненными и не раскрывают полной картины изменений, происходящих на уровне митохондрий, выделенных из печени.

Особое место в изучении физиологических и патологических изменений этого заболевания отводится моделям диабета на животных, которые позволяют строго контролировать условия эксперимента, что практически недостижимо в человеческой популяции. Так, в настоящей работе были использованы крысы линии Sprague Dawley с экспериментальным сахарным диабетом I типа, полученным в результате селективного разрушения β -клеток с помощью стрептозотоцина, антибиотика широкого спектра действия, обладающего диабетогенным эффектом. После введения стрептозотоцина у крыс появляются многие характерные признаки, наблюдаемые у пациентов с инсулинзависимым типом диабета: гипoinsулинемия, гипергликемия, кетонурия и гиперлипидемия [18]. В связи с вышесказанным, целью настоящей работы являлось определение взаимосвязанных изменений ультраструктуры и функциональной активности митохондрий печени крыс линии Sprague Dawley при индукции у них сахарного диабета I типа. В работе показано: 1) при стрептозотоцин-индуцированном диабете у крыс происходит изменение структуры крист митохондрий печени; 2) основные функциональные параметры митохондрий (АДФ/О, дыхательный контроль и время фосфорилирования) не изменяются при индукции диабета I типа у крыс; вместе с тем увеличиваются скорости дыхания митохондрий в состояниях 2, 3 и 4;

3) при стрептозотоцин-индуцированном диабете I типа увеличивается содержание жирных кислот в митохондриях печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование сахарного диабета I типа у крыс. В работе были использованы неполовозрелые самцы крысы линии Sprague Dawley массой 90–100 г. Крысы были случайным образом распределены на две группы по пять особей в каждой — контрольную и экспериментальную. Экспериментальная группа получала однократные внутривентрикулярные инъекции высоких доз стрептозотоцина в концентрации 75 мг/кг массы тела животного, контрольная группа — эквивалентный объем цитратного буфера. Через одну неделю после инъекции развитие сахарного диабета подтверждали посредством измерения уровня глюкозы в крови животных с помощью глюкометра OneTouch select Plus (LifeScan Johnson & Johnson, США). При этом концентрация глюкозы в крови крыс контрольной группы была в пределах нормы и составляла 5–6 ммоль/л, а у животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом — 25 ммоль/л и выше. Через две недели после введения стрептозотоцина животных забивали способом декапитации.

Выделение митохондрий печени крыс. Митохондрии выделяли из печени крыс описанным ранее методом дифференциального центрифугирования [19]. В состав среды выделения входили 210 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ HEPES/КОН, рН 7,4. Последующие этапы центрифугирования проводили с использованием того же буфера, но с заменой ЭДТА на 100 мкМ ЭГТА. Концентрацию митохондриального белка измеряли с помощью метода Лоури [20]. Полученная суспензия митохондрий содержала 70–80 мг белка в 1 мл.

Электронно-микроскопические исследования. Для электронной микроскопии кусочки ткани печени забирали у декапитированного животного и фиксировали в 2,5%-м растворе глутаральдегида в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, рН 7,4 в течение 2 ч. После отмывания буфером ткань дофиксировали в течение 2 ч 1%-м раствором осмиевой кислоты в фосфатно-солевом буфере и обезвоживали в спиртах возрастающих концентраций. Полученные образцы заключали в смолу Epon 812. Ультратонкие срезы (толщиной 70–75 нм) готовили на микротоме Leica EM UC6 (ФРГ) и окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Препараты просматривали и фотографировали в электронном микроскопе JEM-100B (JEOL, Япония). Ультраструктурный анализ проводили на негативах, оцифрованных с помощью сканера Epson V700. Морфометрический анализ

осуществляли на фотонегативах с использованием программы Image Tool.

Определение параметров митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования. Скорость потребления кислорода измеряли полярографическим методом с помощью кислородного электрода типа Кларка (Oxygraph-2k, Австрия) при постоянном перемешивании и температуре 26°C [21]. Среда инкубации содержала 130 мМ КСl, 5 мМ KH_2PO_4 , 10 мкМ ЭГТА, 10 мМ HEPES/KOH , рН 7,4. Были использованы следующие концентрации субстрата дыхания и других реактивов: 5 мМ сукцината калия, 0,2 мМ АДФ, 50 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ) и 1 мкМ ротенона. Скорости дыхания митохондрий (V_2 , V_3 , V_4 и $V_{\text{ДНФ}}$ – скорости в состояниях 2, 3, 4 и разоб- щенном состоянии соответственно) выражали в нмоль $\text{O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка. Митохондриальное дыхание оценивали по следующим показате- лям: состояние 2 – субстратное дыхание; состоя- ние 3 – АДФ-стимулированное дыхание; состоя- ние 4 – скорость дыхания митохондрий при полном исчерпании добавленного ранее АДФ; разоб- щенное состояние – дыхание митохондрий, стимулированное добавлением протонофорного разоб- щителя ДНФ. Дыхательный контроль опи- сывается отношением скорости дыхания в при- сутствии АДФ к скорости, когда он полностью перешел в АТФ (состояние 3/состояние 4), отно- шение АДФ/О определяли согласно работе [22]. Время фосфорилирования измеряли в секундах и определяли как время, необходимое митохондри- ям для фосфорилирования всего ранее добавлен- ного АДФ. При регистрации параметров дыхания использовали митохондрии с концентрацией белка 0,5–1,0 мг/мл.

Определение содержания и состава жирных кис- лот в мембранах митохондрий печени крыс. Содер- жание жирных кислот в составе фосфолипидов, образующих митохондриальные мембраны, определяли методом газовой хроматографии. Экстракцию липидов из митохондрий проводили по методике, описанной в работе [23] с изменени- ями. Митохондрии печени крыс (с концентраци- ей митохондриального белка 2 мг/мл) помещали в центрифужную пробирку, в которую затем до- бавляли 200 мкл воды и 900 мкл смеси хлоро- форм/метанол (в объемном соотношении 2 : 1). Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Также к образцам в качестве внутреннего стандарта добавляли гептадекановую кислоту, растворенную в гексане (С17:0, с концентрацией 0,15 мкг/мл). Разделение слоев хлороформа и смеси вода/метанол осуществля- лось посредством центрифугирования при 10000 г в течение 10 мин при 4°C. Нижний слой, содержа- щий липидную фракцию, переносили в другую

пробирку и высушивали в потоке аргона при 25°C. Полученную фракцию подвергали метили- рованию в результате добавления однократного объема смеси 5%-й серной кислоты/метанола с последующей инкубацией при 100°C в течение 3 ч. Реакцию останавливали добавлением трех- кратного объема 5%-го K_2CO_3 . Полученные мети- ловые эфиры экстрагировали четырехкратным объемом гексана, а затем упаривали азотом до объема 100 мкл. Образцы анализировали в систе- ме для газовой хроматографии Chromatek-Crystal 5000 («Хроматэк», Россия). На основании полу- ченных хроматограмм было рассчитано общее количество жирных кислот в образце.

Статистическая обработка данных. Получен- ные результаты были проанализированы с ис- пользованием программ GraphPad Prism 5 и Mic- rrosoft Excel и представлены как средние значения с учетом стандартной ошибки от трех до семи экс- периментов. Статистическую значимость между данными определяли с помощью *t*-критерия; зна- чимыми считались различия, удовлетворяющие условию $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изменения морфологии митохондрий, выделен- ных из печени крыс со стрептозотоцин-индуциро- ванным диабетом I типа. Согласно литературным данным, митохондрии различных тканей (мыш- цы, мозг и т.д.) претерпевают ряд как структур- ных, так и функциональных изменений, опосре- дованных развитием сахарного диабета [24,25]. В свою очередь, в данной работе с помощью метода электронной микроскопии были определены морфологические изменения митохондрий, вы- деленных из печени крыс с моделью диабета I ти- па, индуцированной стрептозотоцином.

На рис. 1 представлены микрофотографии ми- тохондрией гепатоцитов контрольных животных и со стрептозотоцин-индуцированным диабетом I типа. Исходя из представленных микрофотогра- фий, видно, что митохондрии печени контроль- ных животных имеют бобовидную структуру, электронноплотный матрикс и равномерную ис- черченность крист. У крыс с экспериментальным диабетом I типа митохондрии обладают меньшим размером по сравнению с митохондриями печени контрольной группы. В целом форма митохон- дрий практически не изменяется. При этом структура митохондрий печени крыс с сахарным диабетом претерпевает изменения – наблюдается деформация крист и внешней мембраны орга- nell. В свою очередь, матрикс митохондрий со- храняется электронноплотным. Также можно за- метить изменения во взаимодействии митохон- дрий с эндоплазматическим ретикулумом: в клетках печени контрольных животных присут-

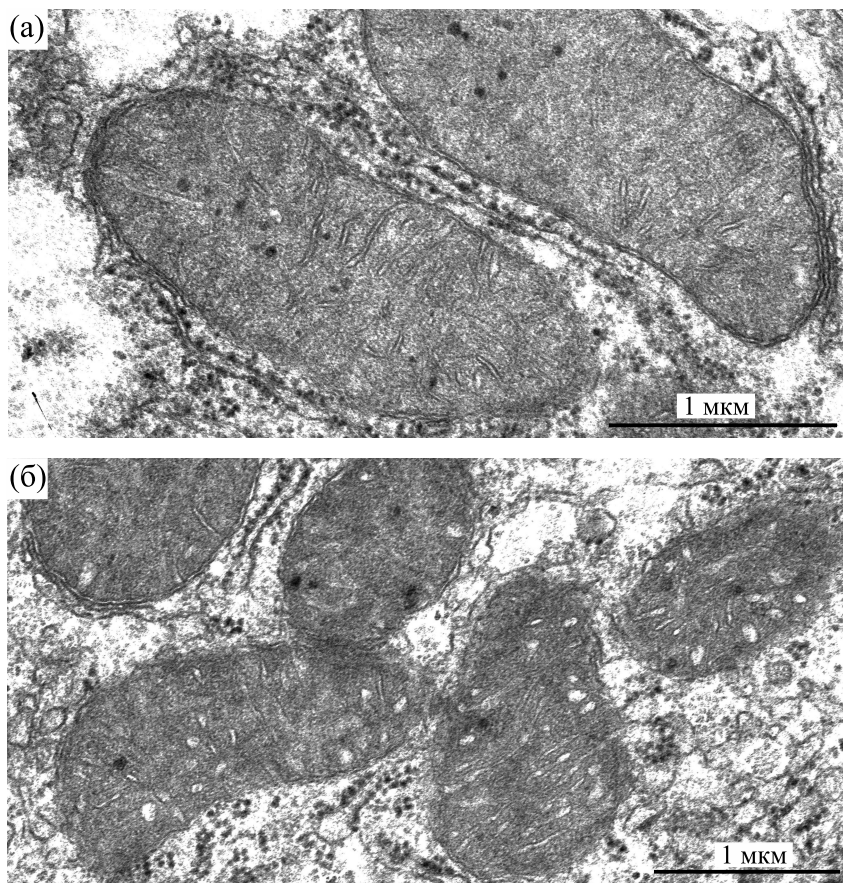


Рис. 1. Электронные микрофотографии митохондрий печени контрольной группы крыс (а) и крыс с экспериментальным стрептозотозин-индуцированным диабетом I типа (б).

ствуют достаточно плотные контакты с митохондриями, в то время как в клетках печени крыс со стрептозотозин-индуцированным диабетом I типа такая картина не повторяется.

При этом результат подсчета периметра митохондрий, представленный на рис. 2, позволил также подтвердить уменьшение размера органелл, выделенных из печени крыс с сахарным диабетом I типа. Из рис. 2 видно, что данный параметр достоверно снижался у крыс опытной группы по сравнению с контрольными животными.

Стрептозотозин-индуцированный сахарный диабет I типа способствует стимуляции скоростей митохондриального дыхания. Функциональное состояние митохондрий, выделенных из печени крыс со стрептозотозин-индуцированным диабетом, оценивали по скорости митохондриального дыхания в присутствии сукцината (субстрат II комплекса) с добавлением ротенона (табл. 1). Основываясь на этих данных, мы также оценили скорости окислительного синтеза АТФ и уровень сопряжения дыхания и фосфорилирования (табл. 2).

Из табл. 1 видно, что скорости дыхания митохондрий, выделенных из печени крыс со стрептозотозин-индуцированным диабетом I типа, достоверно увеличивались в метаболических состояниях V_2 , V_3 и V_4 . При этом параметры дыхательного контроля, АДФ/О и времени фосфорилирования оставались без значительных изменений (табл. 2).

Стрептозотозин-индуцированный сахарный диабет I типа сопровождается увеличением общего количества жирных кислот в составе липидов митохондриальных мембран печени. С помощью метода газовой хроматографии был проведен количественный анализ общего пула жирных кислот (как свободных, так и этерифицированных) мембран митохондрий, выделенных из печени контрольных животных и особей с моделью диабета I типа. На рис. 3 представлены полученные результаты, из которых следует, что общий уровень жирных кислот в составе фосфолипидов мембран митохондрий из печени животных с индуцированным диабетом I типа значительно превышает (примерно в 1,6 раза) этот параметр у контрольной группы.

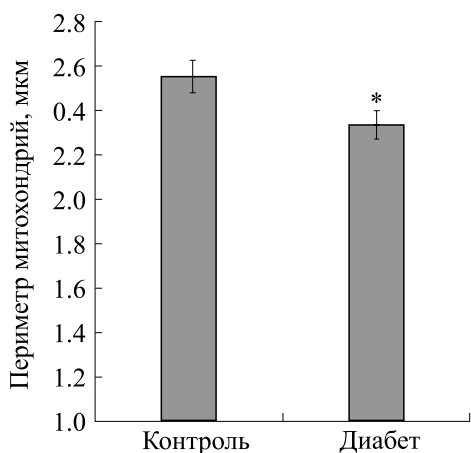


Рис. 2. Периметр митохондрий, выделенных из печени экспериментальных животных. Результаты представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 6$); * – разница между контролем и экспериментальными образцами является статистически значимой ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сахарный диабет является одним из самых распространенных эндокринных заболеваний во всем мире, связанным с нарушением усвоения глюкозы, которое вызвано относительной или абсолютной недостаточностью гормона инсулина, это в конечном итоге приводит к развитию гипергликемии. Метаболическая природа данного заболевания объясняет тесную связь сахарного диабета с дисфункцией митохондрий, играющих ключевую роль в регуляции путей метаболизма и поддержании энергетического баланса клеток.

Таким образом, в настоящей работе были изучены как структурные, так и функциональные изменения, происходящие с митохондриями печени крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом I типа.

В первой части работы было установлено, что при развитии сахарного диабета I типа с последующей гипергликемией происходят морфологические изменения митохондрий печени крыс. Как видно из рис. 2, при развитии диабета происходит достоверное снижение размера митохондрий гепатоцитов крыс. При этом происходят и структурные изменения митохондриальных мембран – наблюдается деформация крист и видимое увеличение межмембранного пространства митохондрий (рис. 1). Ранее было показано, что у крыс линии Wistar не наблюдалось изменений в структуре митохондриальных крист при развитии диабета I типа [26]. По-видимому, данные различия связаны с использованием другой линии животных (в данной работе были использованы крысы линии Sprague Dawley). Вместе с тем, как и в работе [26], мы наблюдали увеличение числа митохондрий в клетке (данные не приведены).

Исходя из полученных результатов, можно предположить два варианта изменения морфологической структуры митохондрий. Одним из них является нарушение митохондриального биогенеза [27,28]. Так как при сахарном диабете происходит снижение новообразования митохондрий, можно сделать вывод, что нарушение их биогенеза, скорее всего, не провоцирует увеличение числа органелл и уменьшение их размеров в клетках печени крыс с экспериментальным сахарным диабетом [24]. Тогда логично предположить, что

Таблица 1. Скорости дыхания митохондрий контрольной и диабетической групп животных

Группа животных	Скорость дыхания, $\text{нмоль O}_2 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка			
	V_2	V_3	V_4	$V_{\text{ДНФ}}$
Контроль	9.9 ± 0.5	45.6 ± 0.5	10.6 ± 0.5	63.1 ± 1.8
Диабет	$11.9 \pm 0.4^*$	$53.9 \pm 2.7^*$	$12.2 \pm 0.4^*$	65.7 ± 2.7

Примечание. Состав среды инкубации указан в разделе «Материалы и методы». Дыхание митохондрий в состоянии 3 запускали добавлением 200 мкМ АДФ. Скорость разобщенного дыхания измеряли в присутствии 50 мкМ ДНФ ($V_{\text{ДНФ}}$). Результаты представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 6$); * – разница между контрольной и диабетической группами является статистически значимой ($p < 0.05$).

Таблица 2. Функциональные параметры митохондрий, выделенных из печени контрольной и диабетической групп животных

Группа животных	Дыхательный контроль	АДФ/О	Время фосфорилирования
Контроль	4.3 ± 0.3	1.9 ± 0.03	104.8 ± 10.9
Диабет	4.4 ± 0.2	1.9 ± 0.01	98.3 ± 11.6

Примечание. В качестве субстрата был использован сукцинат в концентрации 5 мМ. Результаты представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 6$); * – разница между контрольной и диабетической группами является статистически значимой ($p < 0.05$).

изменение размера митохондрий печени крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом может быть связано с нарушением процессов слияния и деления органелл. Это предположение согласуется с литературными данными, из которых следует, что экспрессия ответственного за слияние митофузина снижается, в то время как экспрессия Dgr1, регулирующего деление митохондрий, увеличивается в диабетической группе животных [29]. Так как происходит возрастание экспрессии Dgr1, а также нарушение биогенеза органелл, на микрофотографиях можно наблюдать деформацию крист и наружной мембраны митохондрий печени крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом I типа (рис. 1).

Несмотря на то, что при индукции сахарного диабета I типа происходит изменение ультраструктуры митохондрий печени крыс, это практически не приводит к ухудшению функциональных параметров митохондриального дыхания. Можно видеть, что дыхательный контроль, параметр АДФ/О и время фосфорилирования митохондрий печени крыс линии Sprague Dawley при развитии диабета I типа практически не изменяются. Ранее в литературе было показано, что у крыс линии Wistar происходит улучшение функциональных параметров митохондрий в течение трех недель после введения стрептозотоцина. Было предположено, что это связано с увеличением активности комплексов дыхательной цепи митохондрий [7]. Важно также отметить, что при развитии стрептозотоцин-индуцированного диабета происходит увеличение количества некоторых анионных переносчиков внутренней мембраны митохондрий (пируватного, дикарбоксилатного, фосфатного, но не цитратного) [30]. Все это указывает на диабет-индуцированное ремоделирование биоэнергетической системы клетки и митохондрий.

Наряду с отсутствием влияния диабета на функциональные параметры митохондрий можно видеть, что происходит достоверное увеличение скоростей дыхания в состояниях 2, 3 и 4 при индукции сахарного диабета I типа. Это может быть связано как с увеличением активности дыхательных комплексов, так и с наблюдаемым в настоящей работе увеличением общего уровня жирных кислот в митохондриальных мембранах. Как известно, свободные жирные кислоты являются разобщителями окислительного фосфорилирования, и увеличение их уровня в митохондриях будет приводить к стимуляции митохондриального дыхания [31].

Таким образом, полученные в работе результаты и имеющиеся литературные данные позволяют говорить о том, что у животных со стрептозотоцин-индуцированным диабетом на ранних этапах уже происходит изменение ультраструктуры

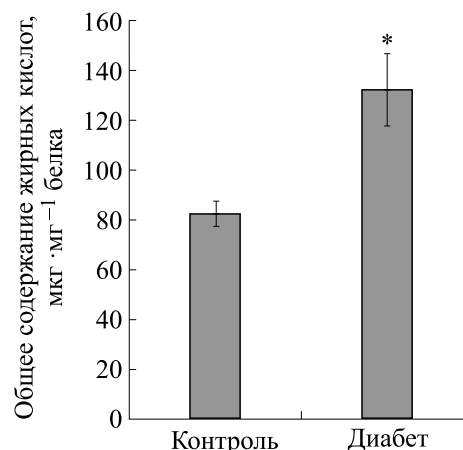


Рис. 3. Общее содержание жирных кислот в составе фосфолипидов митохондриальных мембран экспериментальных животных. Результаты представлены как средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 6$); * — разница между контролем и экспериментальными образцами является статистически значимой ($p < 0,05$).

митохондрий. При этом функциональные параметры дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс не только не ухудшаются, но, по крайней мере, не изменяются или даже улучшаются. Поэтому можно предположить, что изменения в ультраструктуре митохондрий на ранних этапах развития диабета могут носить адаптивный характер, что будет способствовать поддержанию клеточной энергетики при данной патологии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00117-а).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с лабораторными животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986) и с принципами Хельсинкской Декларации (2000). Все протоколы экспериментов были утверждены Комитетом по этике ИТЭБ РАН (приказ № 173 / к от 03.10.2011 г., протокол № 04/2019 от 05.03.2019 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. American Diabetes Association, in *Diabetes Care* (American Diabetes Association, 2011), pp. 62–69.
2. L. C. Groop and J. G. Eriksson, *Ann. Med.* **24**, 483 (1992).

3. W. H. Gispen and G. J. Biessels, *Trends Neurosci.* **23**, 542 (2000).
4. D. M. D'Souza, D. Al-Sajee, and T. J. Hawke, *Front. Physiol.* **4**, 379 (2013).
5. M. A. Liu, H. B. Cao, Y. A. Hou, et al., *Cell Physiol. Biochem.* **45** (4), 1423 (2018).
6. D. E. Frances, M. T. Ronco, J. A. Monti, et al., *J. Endocrinol.* **205** (2), 187 (2010).
7. F. M. Ferreira, C. M. Palmeira, R. Seica, et al., *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **17** (4), 214 (2003).
8. M. K. Montgomery and N. Turner, *Endocr. Connect.* **4** (1), R1 (2015).
9. M. P. Murphy and R. A. Smith, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 629 (2007).
10. J. Chen, S. E. Stimpson, G. A. Fernandez-Bueno, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **29** (14), 1361 (2018).
11. K. Morino, K. F. Petersen, and G. I. Shulman, *Diabetes* **55** (2), S9 (2006).
12. K. F. Petersen, D. Befroy, S. Dufour, et al., *Science* **300**, 1140 (2003).
13. F. Malka, O. Guillery, C. Cifuentes-Diaz, et al., *EMBO Rep.* **6**, 853 (2005).
14. H. Chen, A. Chomyn, and D. C. Chan, *J. Biol. Chem.* **280**, 26185 (2005).
15. H. Chen, M. Vermulst, Y. E. Wang, et al., *Cell* **141**, 280 (2010).
16. J. A. Baur, K. J. Pearson, N. L. Price, et al., *Nature* **444**, 337 (2006).
17. T. Nishikawa, D. Kukidome, K. Sonoda, et al., *Diabetes Res/ Clin. Pract.* **77**, 161 (2007).
18. B. Rodrigues, P. Poucheret, M. L. Battell, et al., in *Experimental Models of Diabetes*, Ed by J. H. McNeill (Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1999), pp 3–17.
19. K. N. Belosludtsev, N. V. Belosludtseva, A. V. Agafonov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1838** (10), 2600 (2014).
20. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., *J Biol Chem.* **193** (1), 265 (1951).
21. N. I. Venediktova, O. S. Gorbacheva, N. V. Belosludtseva, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.* **49** (2), 149 (2017).
22. B. Chance and G. R. Williams, *Nature* **176** (4475), 250 (1955).
23. E. Bligh and W. Dyer, *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911 (1959).
24. W. I. Sivitz and M. A. Yorek, *Antioxid. Redox Signal.* **12** (4), 537 (2010).
25. M. Patti and S. Corvera, *Endocr. Rev.* **31** (3), 364 (2010).
26. R. N. Remedioa, A. Castellar, R. A. Barbosa, et al., *Micron* **42** (5), 484 (2011).
27. D. A. Hood, L. D. Tryon, H. N. Carter, et al., *Biochem. J.* **473**, 2295 (2016).
28. A. T. Erlich, L. D. Tryon, M. J. Crilly, et al., *Integr. Med. Res.* **5**, 187 (2016).
29. P. A. Parone, S. Da Cruz, D. Tondera, et al., *PLoS One* **3**, 3257 (2008).
30. R. S. Kaplan, D. L. Oliveira, and G. L. Wilson, *Arch Biochem Biophys.* **280** (1), 181 (1990).
31. В. Н. Самарцев, *БИОХИМИЯ* **65**, 1173 (2000).

Ultrastructural and Functional Changes in the Liver Mitochondria in Experimental Rat Models of Type I Diabetes Mellitus

V.S. Starinets*, E.V. Lebedeva*, I.B. Mikheeva**, N.V. Belosludtseva**,
M.V. Dubinin*, and K.N. Belosludtsev* **

*Mari State University, pl. Lenina 1, Yoshkar-Ola, 424000 Russia

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

Experimental rat models of type I diabetes mellitus developed on Sprague Dawley rats were used to study specific features of the ultrastructure and function of mitochondria in rat liver. It was found that diabetes mellitus induced in rats after administration of a dose of 75 mg/kg body weight of streptozotocin is accompanied by disturbances in the structural organization of mitochondrial cristae and a decrease in the size of the organelles when compared to the control. It was shown that in the animal models of type I diabetes, the respiration rates of liver mitochondria in metabolic states 2, 3 and 4 increased. This increase may be related to a higher content of fatty acids in mitochondria isolated from the livers of diabetic rats. In addition, the modeling of diabetes mellitus by using streptozotocin in rats showed no differences in the parameters of the efficiency of oxidative phosphorylation (ADP/O, respiratory control ratio, and phosphorylation time) of liver mitochondria.

Keywords: type I diabetes mellitus, mitochondria, mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation