

УДК 577.352.4

АЛИСПОРИВИР НОРМАЛИЗУЕТ МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ ЛЕГКИХ МЫШЕЙ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

© 2022 В.С. Старинец^{1,2}, Д.А. Серов^{3,4}, Н.В. Пеньков⁴, Н.В. Белослудцева^{1,2}, М.В. Дубинин¹, К.Н. Белослудцев^{1,2*}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет», 424001 Республика Марий Эл, Йошкар-Ола, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, 142290 Московская обл., Пущино, Россия; электронная почта: bekonik@gmail.com

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук», 119991 Москва, Россия

⁴ Институт биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»», 142290 Московская обл., Пущино, Россия

Поступила в редакцию 11.04.2022

После доработки 16.05.2022

Принята к публикации 06.06.2022

В настоящей работе мы исследовали влияние алиспоривира (ингибитора митохондриальной поры) на развитие митохондриальной дисфункции при индукции гипергликемии в первичной культуре легочных эндотелиоцитов мыши. Продемонстрировано, что в условиях гипергликемии (30 мМ глюкоза в течение 24 часов) в эндотелиоцитах развивается митохондриальная дисфункция, которая выражается в увеличении генерации активных форм кислорода, индукции митохондриальных пор и падении мембранного потенциала. Все это приводит к снижению жизнеспособности клеток. Инкубация эндотелиоцитов с 5 мкМ алиспоривиром в гипергликемических условиях приводит к восстановлению жизнеспособности эндотелиоцитов, уровня трансмембранного потенциала и подавлению открытия митохондриальных пор до контрольных значений. Продемонстрировано, что в условиях гипергликемии может происходить увеличение митофагии в первичной культуре эндотелиоцитов легких мышей: наблюдалось увеличение степени колокализации митохондрий и лизосом и уровня экспрессии гена *Parkin*. Алиспоривир восстанавливал эти параметры до уровней, наблюдаемых в контрольных клетках. Гипергликемия приводила к увеличению в эндотелиоцитах экспрессии гена *Drp1*, ответственного за синтез белка, участвующего в процессе деления митохондрий. При этом алиспоривир достоверно не изменял уровень экспрессии данного гена. Обсуждаются механизмы влияния алиспоривира на митохондриальную дисфункцию легочных эндотелиоцитов мышей в условиях гипергликемии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, алиспоривир, митохондриальная пора, гипергликемия, сахарный диабет, митофагия.

DOI: 10.31857/S0320972522070028, EDN: AVIJNU

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет — метаболическое заболевание, связанное либо с нарушением секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы (сахарный диабет I типа), либо с инсулинорезистентностью органов и тканей организма человека и животных (сахарный диабет

II типа). Вследствие этого происходит развитие гипергликемии, которая сопровождается нарушением белкового и липидного обмена. Эти нарушения приводят к патологическим изменениям в органах и тканях организма [1–5].

Общепризнано, что митохондриальная дисфункция является из одним процессов, вовлеченных в развитие сахарного диабета на клеточном уровне [6, 7]. Действительно, для многих органов и тканей, а также клеточных линий продемонстрировано, что сахарный диабет или гипергликемия приводят к усиленной генерации активных форм кислорода мито-

Принятые сокращения: Али — алиспоривир; АФК — активные формы кислорода; МХ — митохондрии; МРТ — mitochondrial permeability transition.

* Адресат для корреспонденции.

хондриями, нарушению процессов окислительного фосфорилирования и падению мембранного потенциала. Считается, что это связано с нарушением клеточного контроля качества митохондрий – внутриклеточной системы, ответственной за митофагию, митохондриальный биогенез и митохондриальную динамику [6–9].

Формирование во внутренней митохондриальной мембране Ca^{2+} -зависимой поры (mitochondrial permeability transition pore, MPT) является одним из важных признаков дисфункции митохондрий [10, 11]. MPT-пору определяют как белковый мегаканал, который формируется во внутренней и внешней мембране митохондрий в присутствии избыточной концентрации ионов Ca^{2+} , при развитии окислительного стресса и ряде других модуляторов. В условиях максимальной проводимости через этот канал могут транспортироваться соединения с молекулярной массой до 1500 Да, что приводит к коллапсу мембранного потенциала, нарушению ионного гомеостаза, набуханию органелл, их разрушению [12–14]. Несмотря на то что исследования митохондриальной поры ведутся уже более 50 лет, ее структура и механизм образования еще далеки от разрешения. Единственным доказанным белком, который принимает участие в индукции MPT-поры является циклофилин Д – белок митохондриального матрикса. Считается, что циклофилин Д является регулятором MPT-поры, а ингибиторы данного белка (циклоспорин А, алиспоривир) подавляют открытие MPT-поры в субмикромольных концентрациях [10–16]. В качестве гипотетических канальных белков внутренней мембраны сегодня рассматриваются транслокатор адениновых нуклеотидов и АТФ-синтаза [14].

Совокупность литературных данных позволяет говорить о том, что при развитии сахарного диабета наблюдаются тканеспецифические изменения чувствительности митохондрий к индукции MPT-поры [6]. Так, в ряде органов и тканей (скелетная мускулатура, сердце, поджелудочная железа) при развитии сахарного диабета происходит увеличение чувствительности митохондрий к открытию MPT-поры [6, 17–19]. В то же время митохондрии печени приобретают повышенную резистентность к образованию MPT-поры [20, 21]. Возможно, указанные различия и обуславливают тот факт, что фармакологическая и генетическая модуляция MPT-поры не всегда способствует возникновению терапевтического эффекта. Так, с одной стороны, нокаут циклофилина Д или его ингибирование не влияли на развитие диабетической нефропатии [22]. С другой стороны,

у мышей, нокаутированных по циклофилину Д, в условиях высокожировой диеты клетки скелетной мускулатуры проявляли способность к усиленному поглощению глюкозы [23], а ингибиторы MPT-поры снижали размер зоны инфаркта миокарда у диабетических животных при ишемии/реперфузии [6, 24].

В предыдущих исследованиях нами было показано, что продолжительное (3 недели) введение ингибитора MPT-поры алиспоривира (неиммуносупрессорный аналог циклоспорина А) мышам с индуцированным сахарным диабетом приводит в скелетной и сердечной мускулатуре к снятию эффектов диабетической митохондриальной дисфункции. Более того, алиспоривир увеличивает скорость утилизации глюкозы из крови диабетических животных при проведении глюкозотолерантного теста [25, 26]. В настоящей работе мы продолжаем исследовать влияние алиспоривира на митохондриальную дисфункцию, индуцированную гипергликемией. Исследования на клеточном уровне часто раскрывают молекулярные и внутриклеточные механизмы, которые не могут быть обнаружены в экспериментах на животных. Таким образом, задачами настоящего исследования являлось: 1) определить влияние алиспоривира на жизнеспособность первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей при гипергликемии; 2) оценить влияние алиспоривира на индуцированную гипергликемией митохондриальную дисфункцию легочных эндотелиоцитов; 3) установить влияние алиспоривира на колокализацию митохондрий и лизосом в легочных эндотелиоцитах в условиях гипергликемии, тем самым определить возможное влияние агента на митофагию; 4) определить уровень экспрессии генов белков, ответственных за митохондриальный биогенез, митофагию и митохондриальную динамику, в эндотелиоцитах легких в условиях гипергликемии в отсутствие и в присутствии алиспоривира.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолирование и культивирование эндотелиальных клеток мыши. Изолирование эндотелиальных клеток из микрососудов легких мыши выполняли методом непрямой магнитной сепарации [27, 28]. В работе использованы мыши линии BALB/c (самцы, масса 20–22 г). Животные были умерщвлены методом цервикальной дислокации. В стерильных условиях легкие извлекали из грудной клетки, промывали в среде DMEM («Gibco», США) и измельчали хирургическими ножницами. После измельчения ткань

инкубировали в 0,2%-ном растворе коллагеназы типа II («Abscam», Великобритания) в течение 40 мин при 37 °С и постоянном перемешивании. Образцы ресуспендировали и пропускали через сито с диаметром пор 70 мкм («Greiner Bio-One», Австрия). К суспензии клеток добавляли 20%-ную сыворотку и далее двукратно центрифугировали при 500 g в течение 8 мин. Клетки ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере без солей кальция и магния с добавлением 2 мМ ЭДТА и антител против CD31 («Abscam», разведение 1 : 100) и инкубировали в течение 15 мин при постоянном перемешивании, затем отмывали центрифугированием при 500 g в течение 8 мин. После отмывки клетки инкубировали 15 мин с магнитными частицами, конъюгированными со вторичными антителами (разведение 1 : 100) («Thermo Fisher», США). Сепарацию CD31⁺ клеток выполняли с помощью магнитного штатива MagJET («Thermo Fisher»). Клетки пятикратно отмывали фосфатно-солевым буфером и высевали в культуральные флаконы, дно которых было предварительно обработано раствором 0,2%-ного желатина из кожи быка («Sigma-Aldrich», США). Полученные клетки культивировали по стандартному протоколу в среде DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 25 мкг/мл амфотерицина В («Gibco») и 50 мкг/мл добавки для роста эндотелиальных клеток («Sigma-Aldrich»). Культура была получена путём объединения клеток от трёх животных [27]. В экспериментах были использованы клетки 7–10 пассажа с жизнеспособностью, оцениваемой по окрашиванию йодистым пропидием, не менее 98%. Круглые покровные стекла (диаметр 25 мм) по одному помещали в ячейки 6-луночных планшетов. Стекла обрабатывали раствором 0,2%-ного желатина, высушивали и наносили суспензию эндотелиальных клеток в среде культивирования. Культивировали клетки в течение 3 сут. до достижения конfluence 90% и выше.

Моделирование гипергликемии. Гипергликемию моделировали инкубацией клеток в среде культивирования с повышенной концентрацией глюкозы (30 мМ) в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе («Sanyo», Япония) [29]. Контрольные клетки инкубировали 24 ч в среде культивирования с концентрацией глюкозы 5 мМ. Половину образцов инкубировали с 5 мкМ алиспоривиром («Medchemexpress», США), который добавляли в среду культивирования в виде раствора в DMSO (разведение 1 : 2000). Клетки без алиспоривира инкубировали 24 ч после добавления соответствующего объема DMSO.

Определение выживаемости клеток. Для оценки выживаемости клетки сразу после окончания инкубации трижды отмывали раствором Хенкса и инкубировали 30 мин с 5 мкг/мл витального красителя Hoechst 33342 и 5 мкМ йодистого пропидия («Thermo Fisher») при 37 °С. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью светодиодной системы визуализации, сконструированной на основе инвертированного микроскопа AE31E («Motic», Испания), оснащённого объективом Motic PLAN FLUAR 10× N.A. 0.3 [30]. Анализ выполняли с помощью программы Image J2, Fiji (NIH, США).

Определение митохондриального мембранного потенциала эндотелиоцитов. Для определения потенциала внутренней митохондриальной мембраны использовали флуоресцентный краситель родамин 123 («ThermoFisher»). Сразу после окончания инкубации клетки трижды отмывали раствором Хенкса с соответствующей концентрацией глюкозы и окрашивали родамином 123 (длина волны возбуждения – 485 нм, длина волны флуоресценции – 525 нм) в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С. После окончания инкубации трижды отмывали клетки раствором Хенкса. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью светодиодной системы визуализации, указанной выше. Все измерения были выполнены при постоянных значениях силы тока источника возбуждающего света (80 мА), времени экспозиции (1 с), коэффициента усиления (×623) и усреднении пикселей (2×2). Интенсивность флуоресценции родамина 123 выражали в виде отношения интенсивности флуоресценции в каждой точке (F) к усредненной интенсивности флуоресценции в базовых условиях (F₀). Для оценки мембранного потенциала добавляли 2 мкМ FCCP и оценивали изменение интенсивности флуоресценции. Для удобства сравнения данных между образцами мембранный потенциал выражали в процентах. За 100% принимали изменение интенсивности флуоресценции в контрольных клетках.

Определение колокализации митохондрий и лизосом в эндотелиоцитах. Колокализацию митохондрий и лизосом в эндотелиоцитах оценивали с помощью конфокальной микроскопии по колокализации в клетках флуоресцентных красителей MitoTracker DeepRed FM (200 нМ) и LysoTracker Green (50 нМ) («Thermo Fisher») [31].

Конфокальные изображения получали с помощью микроскопа DMI6000 («Leica», Германия). Аргонный лазер с длиной вол-

ны 488 нм использовали для возбуждения флуоресценции LysoTracker Green, которую измеряли при 505–530 нм. Для MitoTracker DeepRed использовали Ne/He лазер с длиной волны 638 нм, флуоресценцию измеряли при 650–680 нм. Анализ колокализации выполняли с помощью программного обеспечения Image J2, Fiji. Долю площади колокализации митохондрий и лизосом рассчитывали к общей площади митохондрий в поле зрения (принятой за 100%). Для каждого образца было проанализировано не менее 10 полей зрения. Для каждого экспериментального условия было выполнено 4 биологических повторения (покровное стекло с клетками отдельной культуры).

Определение наличия митохондриальной поры в эндотелиоцитах. Образование митохондриальной поры оценивали по флуоресценции кальцеина АМ в присутствии 1 мМ CoCl_2 [32, 33]. После инкубации с исследуемыми агентами клетки трижды отмывали раствором Хенкса и инкубировали 30 мин при 37 °С в присутствии 1 мкМ кальцеина АМ, 200 нМ MitoTracker Red (для визуализации структуры митохондрий) и 1 мМ CoCl_2 . После окрашивания клетки промывали сбалансированным солевым раствором Хенкса и получали флуоресцентные изображения с использованием конфокального микроскопа DMI6000 («Leica»). Митохондрии идентифицировали с помощью флуоресценции MitoTracker Deep Red FM и измеряли интенсивность флуоресценции кальцеина АМ в них (длина волны возбуждения – 494 нм, длина волны флуоресценции – 517 нм). Анализ изображений выполняли с помощью программы Image J2, Fiji. Интенсивность флуоресценции фона вычитали из интенсивности флуоресценции клеток. Интенсивность флуоресценции кальцеина АМ рассчитывали относительно интенсивности флуоресценции MitoTracker Red. Для каждого экспериментального условия было выполнено 4 биологических повторения (по 2 покровных стекла с клетками отдельной культуры).

Определение окислительного стресса в эндотелиоцитах. Оценку уровня окислительного стресса проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитометре Muse Cell Analyzer («Luminex», США). Для проведения цитофлуориметрии эндотелиоциты каждой группы открепляли от подложки с помощью раствора, содержащего трипсин (0,05%) и ЭДТА (0,53 мМ) в течение 10 мин при 37 °С. Открепленные клетки переносили в 5 мл среды DMEM с 10%-ной эмбриональ-

ной телячьей сывороткой для ингибирования трипсина, перемешивали и центрифугировали при 350 g в течение 8 мин, осадок ресуспендировали в 100 мкМ стерильного раствора Хенкса («ПанЭко», Россия). Для поддержания гипергликемических условий концентрацию глюкозы в растворе доводили до 30 мМ. Количественное измерение клеточной популяции, подвергшейся действию окислительного стресса, оценивали с использованием Muse Oxidative Stress Kit (MCH100111) («Luminex»). Все исследования проводили строго в соответствии с протоколом производителя.

Производство АФК также оценивали с помощью флуоресцентного красителя 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетата (H_2DCFDA) («Thermo Fisher»). Клетки окрашивали 20 мкМ H_2DCFDA в течение 30 мин при 37 °С. Далее клетки отмывали раствором Хенкса и анализировали с помощью светодиодной системы визуализации при длине волны возбуждения 490 нм и эмиссии – 520 нм.

ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии генов белков, ответственных за митофагию, митохондриальный биогенез и митохондриальную динамику, определяли методом ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции [26]. Тотальную РНК из образцов клеточной суспензии получали 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 [34] (последовательность олигонуклеотидов представлена в таблице). Нормирование проводили относительно гена *Rplp2*. Расчет $\Delta\Delta\text{Ct}$ проводили по формуле $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (Контроль) – ΔCt (опыт); каждое значение ΔCt рассчитывали по формуле $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (исследуемый ген) – Ct (*Rplp2*) [35].

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью GraphPad Prism 7.0 с применением однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Для последующего сравнения средних значений дисперсионного комплекса использовали тест Тьюки. Результаты представлены в виде среднего значения \pm среднего квадратичного отклонения ($n = 4–8$, где n – число экспериментов с разными культурами).

Список ген-специфичных праймеров

Ген	Прямой (5'→3')	Обратный (5'→3')
<i>Drp1</i>	TTACAGCACACAGGAATTGT	TTGTCACGGGCAACCTTTTA
<i>Mfn2</i>	CACGCTGATGCAGACGGAGAA	ATCCCAGCGGTTGTTCAGG
<i>Ppargc1a</i>	CTGCCATTGTTAAGACCGAG	GTGTGAGGAGGGTTCATCGTT
<i>Pink1</i>	TTGCCCCACACCCTAACATC	GCAGGGTACAGGGGTAGTTCT
<i>Parkin</i>	AGCCAGAGGTCCAGCAGTTA	GAGGGTTGCTTGTTTGCAGG
<i>Rplp2</i>	CGGCTCAACAAGGTCATCAGTGA	AGCAGAAACAGCCACAGCCCCAC

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Алиспоривир увеличивает жизнеспособность эндотелиоцитов легких мышей при гипергликемии. Анализ жизнеспособности клеток первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей, содержащихся в условиях нормо- (5 мМ) и гипергликемии (30 мМ) в отсутствие и в присутствии 5 мкМ алиспоривира, представлен на рис. 1 и рис. S1 в Приложении. Данная концентрация алиспоривира была выбрана по результатам серии предварительных экспериментов с использованием суспензии изолированных митохондрий (данные не опубликованы). Продемонстрировано, что инкубация клеток в гипергликемических условиях в течение 24 ч приводила к достоверному снижению числа живых клеток. Присутствие в инкубационной среде алиспоривира приводило к увеличению жизнеспособности эндотелиоцитов легких мышей в условиях гипергликемии.

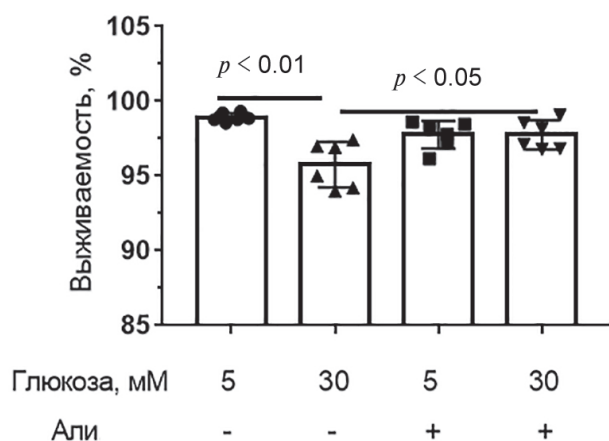


Рис. 1. Влияние алиспоривира (Али, 5 мкМ) на выживаемость эндотелиоцитов легких мышей в условиях нормо- (5 мМ глюкоза) и гипергликемии (30 мМ глюкоза). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6$)

Алиспоривир подавляет развитие митохондриальной дисфункции в эндотелиоцитах легких мышей при гипергликемии. В предыдущих работах мы показали, что введение алиспоривира *in vivo* мышам с экспериментальным сахарным диабетом II типа нормализует функционирование митохондрий сердца и скелетной мускулатуры [25, 26]. В настоящей работе мы оценили влияние алиспоривира на функционирование митохондрий в первичной культуре эндотелиоцитов легких мышей в условиях гипергликемии. Как показано на рис. 2, у эндотелиоцитов, инкубированных в среде с высокой концентрацией глюкозы (30 мМ), был снижен мембранный потенциал по сравнению с контрольными клетками (5 мМ глюкоза). Инкубация клеток с 5 мкМ алиспоривиром в условиях гипергликемии приводила к восстановлению мембранного митохондриального потенциала до контрольных значений (рис. S2 в Приложении).

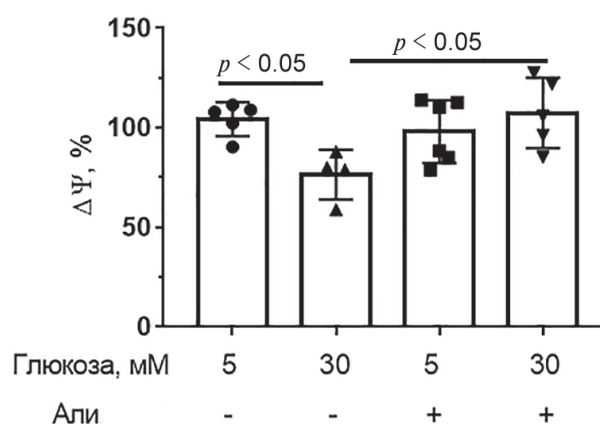


Рис. 2. Влияние алиспоривира (Али, 5 мкМ) на $\Delta\Psi$ (%) митохондрий эндотелиоцитов легких мышей в условиях нормо- (5 мМ глюкоза) и гипергликемии (30 мМ глюкоза). Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 4$)

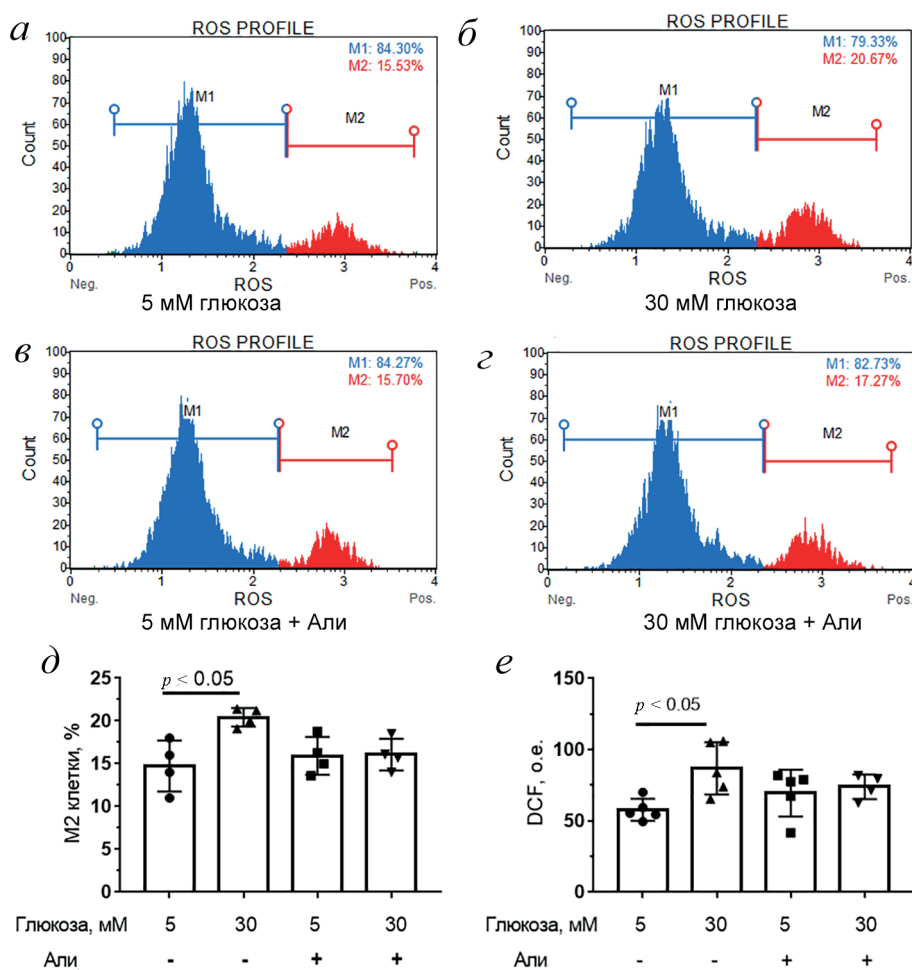


Рис. 3. Влияние алисповири (Али, 5 мкМ) (в, г) на продукцию АФК (ROS) легочными эндотелиоцитами в условиях нормо- (5 мМ глюкоза) (а, в) и гипергликемии (30 мМ глюкоза) (б, г). а–г – Типичные диаграммы распределения популяции клеток четырех экспериментальных групп; д – расчёт АФК-положительных клеток (%) в экспериментальных группах; е – уровень флуоресценции DCF в клетках четырех экспериментальных групп. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 4-5$)

Параллельно с митохондриальной деполяризацией в условиях гипергликемии развивается окислительный стресс. На рис. 3, а–г представлены данные проточной цитофлуориметрии по количеству АФК-положительных (условный пик М2 – популяция клеток, у которых вызванная супероксидом флуоресценция выше установленного порога) и АФК-негативных клеток (условный пик М1 – популяция клеток, у которых вызванная супероксидом флуоресценция ниже установленного порога) в каждой группе. Можно видеть, что в этих условиях наблюдается увеличение АФК-положительных клеток, что свидетельствует об увеличенной генерации супероксид-аниона в эндотелиоцитах. В присутствии алисповири мы не обнаружили достоверного снижения АФК-положительных клеток в условиях гипергликемии, хотя наблюдалась тенденция к снижению (рис. 3, д). Подобные результаты были получены методом флуоресцентной микроско-

пии с использованием зонда DCF (рис. 3, е и рис. S3 в Приложении).

Алисповир является ингибитором образования МРТ-поры [15]. В связи с этим в следующей части работы мы определили его влияние на открытие МРТ-поры в клетках первичной культуры эндотелиоцитов легких мышей, подверженных действию гипергликемии. Открытие МРТ-поры в митохондриях эндотелиоцитов оценивали по флуоресценции кальцеина в митохондриях в присутствии ионов кобальта. При нарушении целостности мембраны митохондрий, в том числе и при образовании МРТ-поры, CoCl_2 проникает в митохондрии и вызывает тушение флуоресценции кальцеина. Таким образом, по снижению интенсивности флуоресценции кальцеина в митохондриях можно судить об открытии МРТ-поры. На рис. 4, а представлена типичная картина легочных эндотелиоцитов в четырех экспериментальных условиях, окрашенных кальцеи-

ном в присутствии ионов кобальта. Стоит отметить, что МРТ-пора может находиться как в высокопроводящем, так и в низкопроводящем состоянии [12]. При этом кобальт может проникнуть в митохондриальный матрикс в обоих состояниях. Таким образом, можно

предположить, что тушение флуоресценции, наблюдаемое в контрольных клетках, связано со спонтанным низкопроводящим состоянием МРТ-поры. Можно видеть, что в условиях повышенного содержания глюкозы наблюдается значительное снижение интенсивности

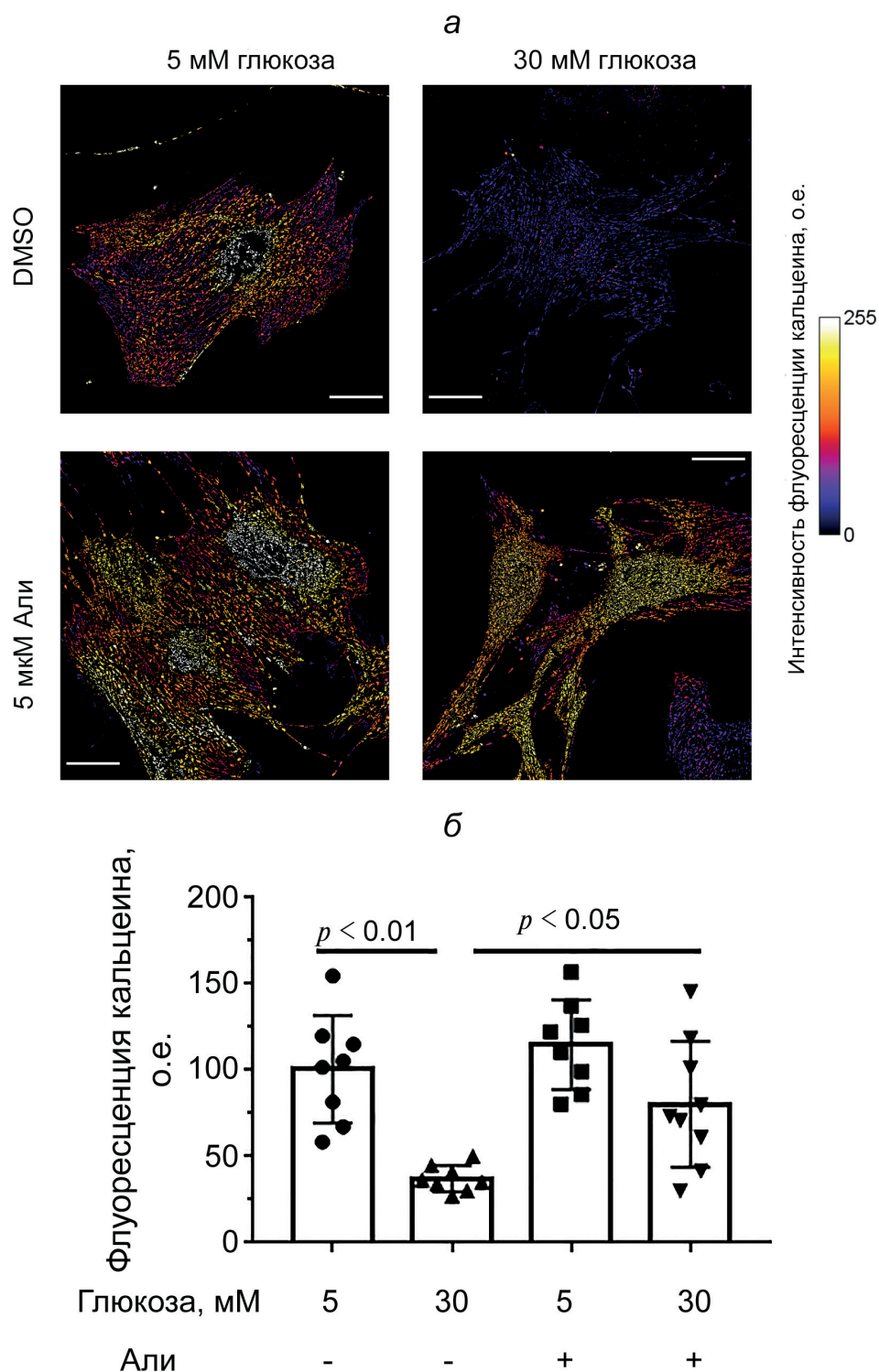


Рис. 4. Образование МРТ-поры в эндотелиоцитах легких мышей. *а* – Типичные фотографии флуоресценции митохондриального кальцеина в присутствии CoCl_2 в эндотелиоцитах экспериментальных групп. Шкала – 40 мкм. *б* – Интенсивность флуоресценции кальцеина в митохондриях эндотелиоцитов легких мышей четырех экспериментальных групп. Али – алиспоривир. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 4$)

флуоресценции кальцеина в митохондриях эндотелиоцитов по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, а, б). Это свидетельствует в пользу того, что в условиях гипергликемии увеличивается активность открытия МРТ-поры в эндотелиоцитах.

Инкубация клеток с алиспоривиром в условиях гипергликемии приводит к достоверному увеличению интенсивности флуоресценции кальцеина в митохондриях по сравнению с митохондриями эндотелиоцитов, инкубированных лишь в присутствии 30 мМ глюкозы (рис. 4, б). Это говорит о том, что алиспоривир ингибирует открытие МРТ-пор во внутренней мембране митохондрий эндотелиоцитов, экспонированных в условиях гипергликемии.

Также была рассчитана доля митохондрий, не окрашенных кальцеином. В контроле содержание таких митохондрий составляет $9,5 \pm 2,1\%$. В условиях гипергликемии доля таких митохондрий достоверно увеличивалась до $23,2 \pm 6,6\%$. В присутствии алиспоривира наблюдалась тенденция к снижению количества не окрашенных кальцеином митохондрий до $17,6 \pm 6,2\%$. Это также служит подтверждением того, что гипергликемия стимулирует открытие МРТ-поры в эндотелиоцитах, а алиспоривир ингибирует этот процесс.

Алиспоривир подавляет индуцированную гипергликемией колокализацию митохондрий и лизосом (митофагию). Одним из адаптационных ответов на гипергликемию и пониженный мембранный потенциал в клетке является митофагия (аутофагия митохондрий) [6, 36]. В настоящей работе мы оценивали уровень митофагии по степени колокализации митохондрий и лизосом, используя метод двойного окрашивания клеток (MitoTracker Deep Red FM и LysoTracker Green). Было обнаружено, что в условиях 24-часовой гипергликемии степень колокализации митохондрий и лизосом достоверно увеличивается, что может свидетельствовать об усилении митофагии. В этих условиях инкубация эндотелиоцитов легких мышей с 5 мкМ алиспоривиром приводила к восстановлению уровня колокализации митохондрий и лизосом до контрольных значений (рис. 5).

Влияние алиспоривира на изменения в условиях гипергликемии уровня мРНК белков, ответственных за митохондриальный биогенез, митохондриальную динамику и митофагию. В следующей части работы мы оценивали уровень экспрессии генов белков, ответственных за митохондриальный биогенез, митофагию и митохондриальную динамику. Показано, что при гипергликемии происходит достоверное

увеличение уровня экспрессии *Drp1*, что может косвенно свидетельствовать об увеличении содержания белка Drp1, участвующего в процессах деления митохондрий (рис. 6). Инкубация клеток с 5 мкМ алиспоривиром в условиях гипергликемии не приводила к достоверным изменениям уровня экспрессии этого гена, хотя наблюдалась тенденция к восстановлению к контрольным значениям. Во всех исследуемых группах не наблюдалось достоверных различий по уровню экспрессии гена *Ppargc1a*, ответственного за синтез PGC1- α , белка, участвующего в митохондриальном биогенезе, и гена *Mfn2*, кодирующего митофузин 2, белок, участвующий в процессе слияния митохондрий. Стоит отметить, что в гипергликемических условиях достоверно увеличивается экспрессия *Parkin* (но не *Pink1*), ответственного за синтез белка, участвующего в митофагии. Это косвенно подтверждает описанные выше результаты, показывающие, что в условиях гипергликемии (30 мМ глюкоза в течение 24 ч) в эндотелиоцитах легких мышей наблюдается индукция митофагии. Добавление 5 мкМ алиспоривира к клеткам, экспонируемым в 30 мМ глюкозе, приводит к достоверному снижению экспрессии *Parkin* до контрольных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Митохондриальная дисфункция является одним из основных проявлений развития сахарного диабета [6]. В ряде исследований показано, что митохондриально-направленная генная или фармакологическая терапия восстанавливает структурно-функциональные параметры митохондрий, снижает вероятность осложнений сахарного диабета, в том числе приводя к увеличению чувствительности к инсулину тканей и органов и гипогликемическому действию [23, 25, 37]. В предыдущих работах мы показали, что продолжительная терапия диабетических мышей алиспоривиром (ингибитором МРТ-поры) приводит как к снижению митохондриальной дисфункции в скелетной и сердечной мускулатуре, так и к увеличению скорости утилизации глюкозы из крови при проведении глюкозотолерантного теста [25]. В настоящей работе мы исследовали внутриклеточные механизмы, которые могут лежать в основе защитного действия алиспоривира от повреждений, опосредованных высоким уровнем глюкозы, на эндотелиоциты легких мышей.

Как продемонстрировано в настоящей работе, экспозиция легочных эндотелиоцитов в условиях гипергликемии приводила к разви-

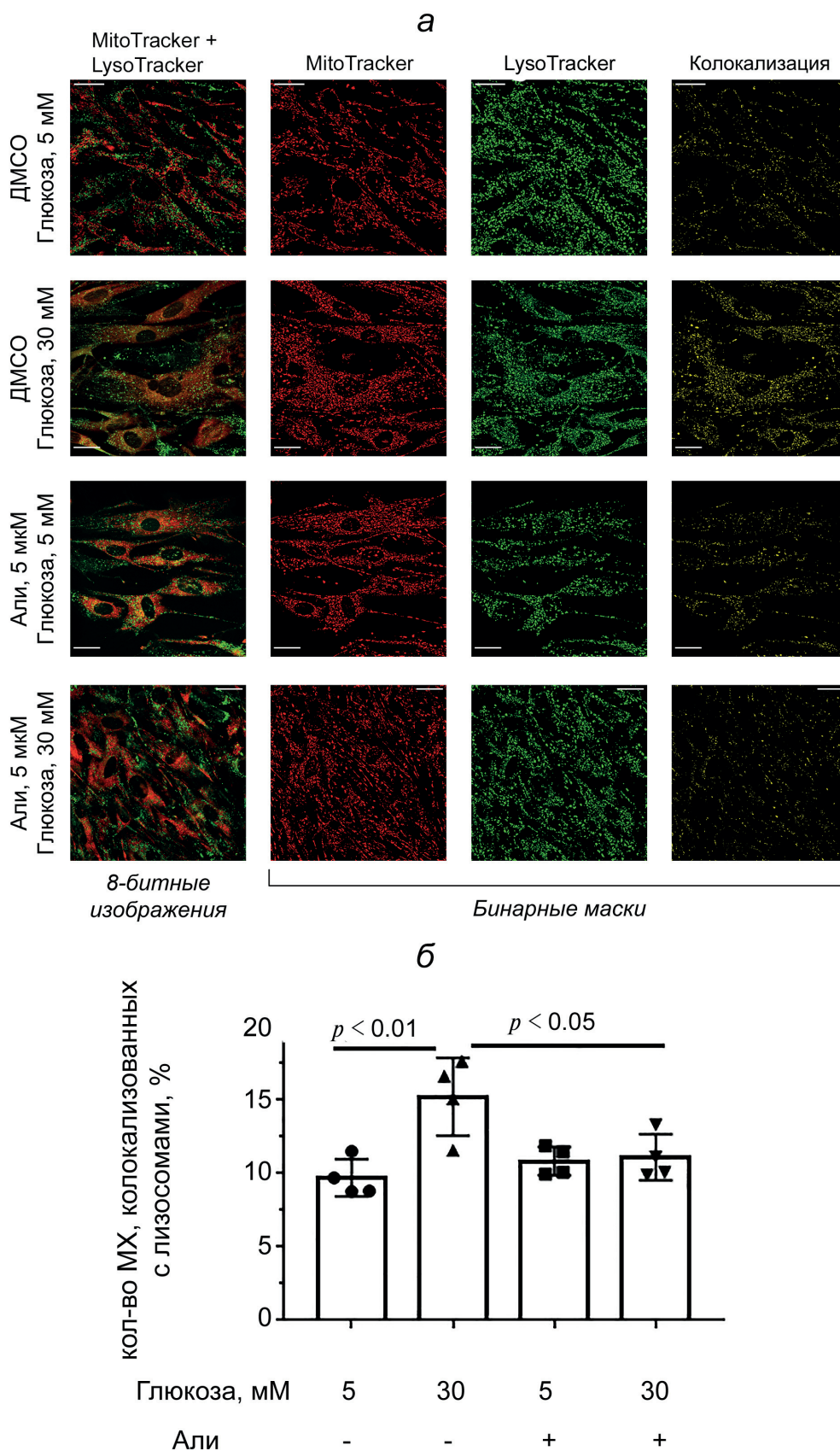


Рис. 5. Колокализация митохондрий и лизосом в эндотелиоцитах легких мышей четырех экспериментальных групп. Степень колокализации митохондрий и лизосом определяли с использованием двойного окрашивания клеток MitoTracker Deep Red FM и LysoTracker Green. *а* – Представлены 8-битные изображения и бинарные маски каждого красителя и их колокализация. *б* – Количество митохондрий (МХ) (%), колокализованных с лизосомами в эндотелиоцитах легких мышей четырех экспериментальных групп. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 4$)

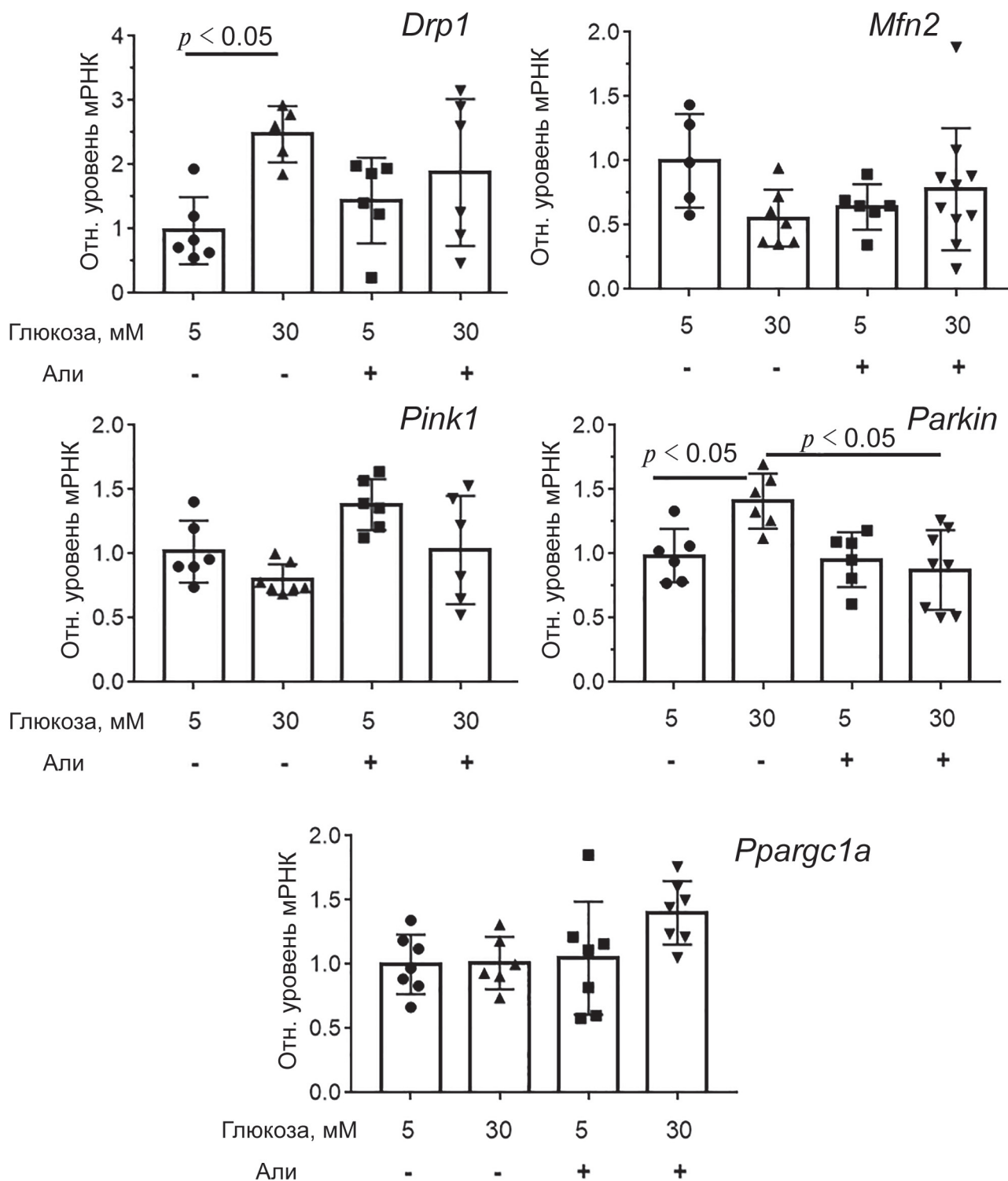


Рис. 6. Относительный уровень мРНК *Drp1*, *Mfn2*, *Pink1*, *Parkin* и *Ppargc1a* в эндотелиоцитах легких мышей четырех экспериментальных групп. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 6-8$)

тию митохондриальной дисфункции, которая выражалась в повышенной генерации АФК, индукции МРТ-поры и, как следствие этих факторов, митохондриальной деполяризации (рис. 2–5). Эти нарушения функционирования

митохондрий могут лежать в основе клеточной гибели. Действительно, в условиях гипергликемии наблюдалось снижение жизнеспособности легочных эндотелиоцитов (рис. 1). Инкубация клеток с алиспоривиром (5 мкМ) в

гипергликемических условиях в значительной степени устраняет развитие признаков митохондриальной дисфункции. Установлено, что происходит снижение числа пермеабилizованных митохондрий в эндотелиоцитах вследствие открытия МРТ-поры и, следовательно, восстановление трансмембранного потенциала митохондрий, который становится сравнимым с митохондриальным потенциалом контрольных клеток. Мы не смогли зафиксировать достоверное снижение продукции АФК в присутствии алиспоривира в гипергликемических условиях (наблюдался лишь тренд к снижению продукции АФК по сравнению с гипергликемическими условиями). Тем не менее нормализация описанных выше митохондриальных функций алиспоривиром приводила к увеличению числа выживших клеток в условиях гипергликемии.

Считается, что снижение трансмембранного потенциала в митохондриях является одним из факторов запуска митофагии [31, 38]. В наших экспериментах в условиях гипергликемии и сниженного мембранного потенциала наблюдалось усиление колокализации митохондрий и лизосом и увеличение в эндотелиоцитах экспрессии участвующего в митофагии гена *Parkin*. Важно отметить, что эти методические подходы являются косвенными доказательствами митофагии, однако они позволяют предполагать ее активацию в условиях гипергликемии, что подтверждается литературными данными. Известно, что на стадии преддиабета наблюдается активация митофагии, тогда как на стадии сахарного диабета II типа – ингибирование данного процесса [6, 39]. При этом активация митофагии рассматривается в качестве адаптивного ответа. По-видимому, экспозиция первичной культуры эндотелиоцитов мыши в течение 24 ч в среде, содержащей 30 мМ глюкозу, индуцирует снижение жизнеспособности клеток и развитие митохондриальной дисфункции. Однако при этом в клетках альтернативно могут активироваться процессы (в частности, митофагия), препятствующие этому негативному сценарию.

Инкубация клеток в условиях гипергликемии с алиспоривиром приводила к тому, что уровень колокализации митохондрий и лизосом, а также уровень экспрессии гена *Parkin* становились неотличимы от наблюдаемых в контрольных клетках. Таким образом, можно предположить, что алиспоривир в гипергликемических условиях препятствует не только образованию МРТ-поры и снижению мембранного митохондриального потенциала, но и, возможно, запуску митофагии в эндотелиоци-

тах. Для доказательства этого предположения необходимо провести дополнительные исследования по определению митофагии.

Можно дискутировать о том, насколько полезным для организма будет отсутствие такого адаптивного ответа, как митофагия, при развитии сахарного диабета, однако проведенные нами предыдущие исследования позволяют говорить о том, что алиспоривир оказывает терапевтическое воздействие в ходе продолжительного введения диабетическим животным [25, 26]. Мы продемонстрировали, что в сердце диабетических мышей наблюдается снижение экспрессии генов *Pink1* и *Parkin*, а продолжительное (в течение 3 недель) введение диабетическим животным алиспоривира приводило к нормализации уровня экспрессии этих генов [26].

Как показано в настоящей работе, помимо изменения экспрессии гена *Parkin*, гипергликемия вызывает увеличение содержания мРНК белка *Drp1*, ответственного за деление митохондрий. Эти результаты косвенно подтверждают имеющиеся в литературе данные, что при развитии сахарного диабета у человека и животных, а также моделировании гипергликемии на клеточных культурах наблюдается фрагментирование митохондриальной сети [6–8]. В наших условиях алиспоривир не смог достоверно восстановить уровень мРНК *Drp1* до контрольных значений.

Как было сказано выше, исследования на клеточном уровне позволяют определить механизмы и таргетные молекулы, которые не могут быть обнаружены в экспериментах на животных. Алиспоривир, как и его иммуносупрессорный аналог циклоспорин А, имеет несколько мишеней [40, 41]. Помимо митохондриального циклофилина Д, алиспоривир способен взаимодействовать с цитоплазматическим циклофилином А [41]. С этим действием связывают его способность подавлять в клетках репликацию различных вирусов, в том числе и SARS-Cov-2 [42]. Поэтому полученные в настоящей работе эффекты могут быть обусловлены не только действием данного агента на митохондрии. Однако очевидно, что алиспоривир как в экспериментах *in vivo* на животных, так и в экспериментах на клеточной культуре подавляет развитие митохондриальной дисфункции при сахарном диабете и способствует облегченному течению заболевания.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00120).

Благодарности. В работе использовали оборудование (конфокальный микроскоп DM16000, «Leica», Германия) центра коллективного пользования ИБК РАН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работу с лабораторными животными выполняли в соот-

ветствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986) и принципами Хельсинкской декларации (2000). Все протоколы были одобрены этической комиссией ИТЭБ РАН (протокол № 6/202 от 08.02.2021).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- American Diabetes Association Professional Practice Committee (2022) 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022, *Diab. Care*, **45** (Suppl 1), S17-S38, doi: 10.2337/dc22-S002.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., et al. (2015) Type 2 diabetes mellitus, *Nat. Rev. Dis. Primers*, **1**, 15019, doi: 10.1038/nrdp.2015.19.
- Skyler, J. S., Bakris, G. L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R. H., et al. (2017) Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis, *Diabetes*, **66**, 241-255, doi: 10.2337/db16-0806.
- Roden, M., and Shulman, G. I. (2019) The integrative biology of type 2 diabetes, *Nature*, **576**, 51-60, doi: 10.1038/s41586-019-1797-8.
- Nolan, C. J., Prentki, M. (2019) Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift, *Diab. Vasc. Dis. Res.*, **16**, 118-127, doi: 10.1177/1479164119827611.
- Belosludtsev, K. N., Belosludtseva, N. V., Dubinin, M. V. (2020) Diabetes mellitus, mitochondrial dysfunction and Ca²⁺-dependent permeability transition pore, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6559, doi: 10.3390/ijms21186559.
- Montgomery, M. K., and Turner, N. (2015) Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: An update, *Endocr. Connect.*, **4**, R1-R15, doi: 10.1530/EC-14-0092.
- Fujimaki, S., and Kuwabara, T. (2017) Diabetes-induced dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, E2147, doi: 10.3390/ijms18102147.
- Dai, W., Lu, H., Chen, Y., Yang, D., Sun, L., and He, L. (2021) The loss of mitochondrial quality control in diabetic kidney disease, *Front Cell Dev Biol.*, **9**, 706832, doi: 10.3389/fcell.2021.706832.
- Белослудцев К. Н., Дубинин М. В., Белослудцева Н. В., Миронова Г. Д. (2019) Транспорт ионов Ca²⁺ митохондриями: механизмы, молекулярные структуры и значение для клетки, *Биохимия*, **84**, 759-775, doi: 10.1134/S0006297919060026.
- Bonora, M., Patergnani, S., Ramaccini, D., Morciano, G., Pedriali, G., et al. (2020) Physiopathology of the permeability transition pore: molecular mechanisms in human pathology, *Biomolecules*, **10**, 998, doi: 10.3390/biom10070998.
- Neginskaya, M. A., Pavlov, E. V., and Sheu, S. S. (2021) Electrophysiological properties of the mitochondrial permeability transition pores: Channel diversity and disease implication, *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.*, **1862**, 148357, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148357.
- Zoratti, M., and Szabo, I. (1995) The mitochondrial permeability transition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**, 139-176, doi: 10.1016/0304-4157(95)00003-a.
- Bernardi, P., Carraro, M., and Lippe, G. (2021) The mitochondrial permeability transition: Recent progress and open questions, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.16254.
- Šileikytė, J., and Forte, M. (2016) Shutting down the pore: The search for small molecule inhibitors of the mitochondrial permeability transition, *Biochim Biophys Acta*, **1857**, 1197-1202, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.02.016.
- Efimov, S. V., Dubinin, M. V., Kobchikova, P. P., Zgadzay, Y. O., Khodov, I. A., et al. (2020) Comparison of cyclosporin variants B-E based on their structural properties and activity in mitochondrial membranes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 1054-1060, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.184.
- Oliveira, P. J., Seica, R., Coxito, P. M., Rolo, A. P., Palmeira, C. M., et al. (2003) Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats, *FEBS Lett.*, **554**, 511-514, doi: 10.1016/s0014-5793(03)01233-x.
- Lablanche, S., Cottet-Rousselle, C., Lamarche, F., Benhamou, P. Y., Halimi, S., et al. (2011) Protection of pancreatic INS-1 β-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin, *Cell Death Dis.*, **2**, e134, doi: 10.1038/cddis.2011.15.
- Monaco, C., Hughes, M. C., Ramos, S. V., Varah, N. E., Lamberz, C., et al. (2018). Altered mitochondrial bioenergetics and ultrastructure in the skeletal muscle of young adults with type 1 diabetes, *Diabetologia*, **61**, 1411-1423, doi: 10.1007/s00125-018-4602-6.
- Ferreira, F. M., Seica, R., Oliveira, P. J., Coxito, P. M., Moreno, A. J., et al. (2003) Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: Role of coenzyme Q and cardiolipin contents,

- Biochim. Biophys. Acta*, **1639**, 113-120, doi: 10.1016/j.bbadis.2003.08.001.
21. Belosludtsev, K. N., Starinets, V. S., Belosludtsev, M. N., Mikheeva, I. B., Dubinin, M. V., et al. (2021) Chronic treatment with dapagliflozin protects against mitochondrial dysfunction in the liver of C57BL/6NCRl mice with high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Mitochondrion*, **59**, 246-254, doi: 10.1016/j.mito.2021.06.008.
 22. Lindblom, R., Higgins, G. C., Nguyen, T. V., Arnstein, M., Henstridge, D. C., et al. (2020) Delineating a role for the mitochondrial permeability transition pore in diabetic kidney disease by targeting cyclophilin D, *Clin. Sci.*, **134**, 239-259, doi: 10.1042/CS20190787.
 23. Taddeo, E. P., Laker, R. C., Breen, D. S., Akhtar, Y. N., Kenwood, B. M., et al. (2013) Opening of the mitochondrial permeability transition pore links mitochondrial dysfunction to insulin resistance in skeletal muscle, *Mol. Metab.*, **3**, 124-134, doi: 10.1016/j.molmet.2013.11.003.
 24. Najafi, M., Farajnia, S., Mohammadi, M., Badalzadeh, R., Ahmadi Asl, N., et al. (2014) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore restores the cardioprotection by postconditioning in diabetic hearts, *J. Diabetes Metab. Disord.*, **13**, 106, doi: 10.1186/s40200-014-0106-1.
 25. Belosludtsev, K. N., Starinets, V. S., Talanov, E. Y., Mikheeva, I. B., Dubinin, M. V., et al. (2021) Alisporivir treatment alleviates mitochondrial dysfunction in the skeletal muscles of C57BL/6NCRl mice with high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9524, doi: 10.3390/ijms22179524.
 26. Belosludtseva, N. V., Starinets, V. S., Mikheeva, I. B., Serov, D. A., Astashev, M. E., et al. (2021) Effect of the MPT pore inhibitor alisporivir on the development of mitochondrial dysfunction in the heart tissue of diabetic mice, *Biology (Basel)*, **10**, 839, doi: 10.3390/biology10090839.
 27. Sobczak, M., Dargatz, J., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (2010) Isolation and culture of pulmonary endothelial cells from neonatal mice, *J. Vis. Exp.*, **46**, e2316, doi: 10.3791/231.
 28. Serov, D. A., Tankanag, A. V., and Astashev, M. E. (2022) Low frequency oscillations of murine skin microcirculations and periodic changes of $[Ca^{2+}]_i$ and $[NO]_i$ levels in murine endotheliocytes: an effect of provocative tests, *Cell Biol. Int.*, **46**, 427-442, doi: 10.1002/cbin.11743.
 29. Lee, W. C., Chau, Y. Y., Ng, H. Y., Chen, C. H., Wang, P. W., et al. (2019) Empagliflozin protects HK-2 cells from high glucose-mediated injuries via a mitochondrial mechanism, *Cells*, **8**, 1085, doi: 10.3390/cells8091085.
 30. Serov, D., Tikhonova, I., Safronova, V., and Astashev, M. (2021) Calcium activity in response to nAChR ligands in murine bone marrow granulocytes with different Gr-1 expression, *Cell Biol. Int.*, **45**, 1533-1545, doi: 10.1002/cbin.11593.
 31. Berezhnov, A. V., Soutar, M. P., Fedotova, E. I., Frolova, M. S., Plun-Favreau, H., et al. (2016) Intracellular pH modulates autophagy and mitophagy, *J. Biol. Chem.*, **291**, 8701-8708, doi: 10.1074/jbc.M115.691774.
 32. Sasaki, K., Donthamsetty, R., Heldak, M., Cho, Y. E., Scott, B. T., et al. (2012) VDAC: old protein with new roles in diabetes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **303**, 1055-1060, doi: 10.1152/ajpcell.00087.2012.
 33. Zhao, Z., Gordan, R., Wen, H., Fefelova, N., Zang, W. J., et al. (2013) Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca flux in mouse cardiomyocytes, *PLoS One*, **8**, e80574, doi: 10.1371/journal.pone.0080574.
 34. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., et al. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, *BMC Bioinformatics*, **13**, 134, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
 35. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
 36. Onphachanh, X., Lee, H. J., Lim, J. R., Jung, Y. H., Kim, J. S., et al. (2017) Enhancement of high glucose-induced PINK1 expression by melatonin stimulates neuronal cell survival: Involvement of $MT_2/Akt/NF-\kappa B$ pathway, *J. Pineal Res.*, **63**, doi: 10.1111/jpi.12427.
 37. Benton, C. R., Holloway, G. P., Han, X. X., Yoshida, Y., Snook, L. A., et al. (2010) Increased levels of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PGC-1alpha) improve lipid utilisation, insulin signalling and glucose transport in skeletal muscle of lean and insulin-resistant obese Zucker rats, *Diabetologia*, **53**, 2008-2019, doi: 10.1007/s00125-010-1773-1.
 38. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., and Youle, R. J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy, *J. Cell Biol.*, **183**, 795-803, doi: 10.1083/jcb.200809125.
 39. Bhansali, S., Bhansali, A., Walia, R., Saikia, U. N., and Dhawan, V. (2017) Alterations in mitochondrial oxidative stress and mitophagy in subjects with prediabetes and type 2 diabetes mellitus, *Front. Endocrinol.*, **8**, 347, doi: 10.3389/fendo.2017.00347.
 40. Dubinin, M. V., Sharapov, V. A., Ilzorkina, A. I., Efimov, S. V., Klochkov, V. V., et al. (2022) Comparison of structural properties of cyclosporin A and its analogue alisporivir and their effects on mitochondrial bioenergetics and membrane behavior. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, **1864**, 183972, doi: 10.1016/j.bbamem.2022.183972.
 41. Di Lisa, F., Carpi, A., Giorgio, V., and Bernardi, P. (2011) The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection, *Biochim. Biophys. Acta*, **1813**, 1316-1322, doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.031.
 42. Softic, L., Brillet, R., Berry, F., Ahnou, N., Nevers, Q., et al. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 infection by the cyclophilin inhibitor Alisporivir (Debio 025), *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00876-20, doi: 10.1128/AAC.00876-20.

ALISPORIVIR NORMALIZES MITOCHONDRIAL FUNCTION OF PRIMARY MOUSE LUNG ENDOTHELIAL CELLS UNDER CONDITIONS OF HYPERGLYCEMIA

V. S. Starinets^{1,2}, D. A. Serov^{3,4}, N. V. Penkov⁴, N. V. Belosludtseva^{1,2},
M. V. Dubinin¹, and K. N. Belosludtsev^{1,2*}

¹ Mari State University, 424001 Yoshkar-Ola, Mari El, Russia

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: bekonik@gmail.com

³ Prokhorov General Physics Institute RAS, Biophotonics Center, 119991 Moscow, Russia

⁴ Institute of Cell Biophysics RAS, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

The present work shows the effect of alisporivir (a mitochondrial permeability transition pore inhibitor) on the development of mitochondrial dysfunction under hyperglycemic conditions in a primary culture of mouse lung endothelial cells. We have demonstrated that hyperglycemia (30 mM glucose for 24 h) leads to a decrease in the viability of pulmonary endotheliocytes. Hyperglycemia causes mitochondrial dysfunction, manifested by a drop of membrane potential, an increase in superoxide anion generation and mitochondrial pore (MPT pore) opening activity. Incubation of endothelial cells with 5 μ M alisporivir under hyperglycemic conditions leads to an increase in cell viability, restoration of the membrane potential level and MPT pore opening activity to control values. Hyperglycemia leads to increased mitophagy in lung endothelial cells: we observed an increase in the degree of colocalization of mitochondria and lysosomes and the expression of the *Parkin* gene. Alisporivir restored these parameters back to levels seen in control cells. Hyperglycemia led to an increase in the expression of the *Drp1* gene in endotheliocytes responsible for the synthesis of proteins involved in the process of fission of mitochondria. Alisporivir did not significantly alter the expression of the gene. The paper discusses the mechanisms of alisporivir effect on mitochondrial dysfunction in murine pulmonary endotheliocytes under conditions of hyperglycemia.

Keywords: mitochondria, alisporivir, mitochondrial permeability transition pore, hyperglycemia, diabetes mellitus, mitophagy