

MITOCHONDRIAL AREA IN THE CYTOPLASM OF MICE HEPATOCYTES ON HIGH-FAT DIET TREATED WITH METFORMIN

POVRŠINA MITOHONDRIJA U CITOPLAZMI HEPATOCITA MIŠEVA NA ISHRANI SA POVEĆANIM SADRŽAJEM MASTI KOJI SU TRETIRANI METFORMINOM

Sara Milošević¹, Darko Ćirić², Tamara Martinović²

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za histologiju i embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić", Beograd, Srbija

Correspondence: sara020501@gmail.com

Abstract

Introduction: At the cellular level, it is well acknowledged that diabetes is escorted with mitochondrial dysfunction in hepatocytes. Decreased number of mitochondria and their respiratory activity have been noticed in type 2 diabetes patients. The primary way that metformin works is thought to be due to inhibition of complex 1 respiratory chain in the inner mitochondrial membrane, and recent research has suggested that metformin, at therapeutically relevant concentrations, increases mitochondrial membrane potential, mitochondrial respiration and ATP levels in hepatocytes. C57BL/6J mice on high-fat diet (HFD) are a commonly used model for type 2 diabetes and metabolic syndrome.

Aim: Examination of the area occupied by mitochondria in HFD fed mice hepatocytes without treatment and treated with metformin.

Material and methods: Male mice C57BL/6J were divided into two experimental groups that received high-fat food. During the last month, once a day, one group of mice was given metformin. After 6 months, mice were sacrificed and liver samples were handled for TEM. Photomicrographs were analyzed using ImageJ software by measuring the area of all visible mitochondria. Statistical analysis was done by the SPSS program using Student's T test.

Results: Analysis of the hepatocyte ultrastructure revealed that the mitochondria were mostly spherical or oval in shape and of normal morphology, with no noticeable differences among the experimental groups. The average size of mitochondria in the group of HFD mice was $4.75 \pm 0.25 \mu\text{m}$, and in the group of HFD mice that received metformin $4.44 \pm 0.6 \mu\text{m}$. There were no statistically significant differences in mitochondrial size across the research groups ($p > 0.05$).

Conclusion: In light of the findings, it may be said that in animals on a high fat diet metformin does not change the area of mitochondria.

Keywords:

diabetes,
hepatocytes,
mitochondria,
metformin,
HFD

Sažetak

Uvod: Opšte je prihvaćeno da na ćelijskom nivou dijabetes prati mitohondrijalna disfunkcija u hepatocitima. U pacijenata sa tipom 2 dijabetesa primećeni su smanjen broj mitohondrija i njihova respiratorna aktivnost. Smatra se da je glavni mehanizam delovanja metformina posledica inhibicije kompleksa i respiratornog lanca u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Najnovija istraživanja su ukazala na mogućnost da metformin, u terapijski relevantnim koncentracijama, povećava respiraciju mitohondrija, membranski potencijal i nivo adenozin-trifosfata (ATP) u hepatocitima. Miševi C57BL/6 J, podvrgnuti dijeti sa visokim sadržajem masti, predstavljaju često korišćeni model za metabolički sindrom i tip 2 dijabetesa.

Cilj: Cilj ovog rada je ispitivanje površine mitohondrija mišjih hepatocita na ishrani sa povećanim udelom masti i miševa na istoj ishrani koji su tretirani metforminom.

Materijal i metode: Miševi muškog pola, soja C57BL/6 J, raspoređeni su u dve eksperimentalne grupe, koje su dobijale hranu sa visokim sadržajem masti (HFD). Tokom poslednjeg meseca, jednom dnevno, jednoj grupi miševa je davan metformin. Nakon 6 meseci miševi su žrtvovani i uzeti su uzorci jetre koji su obrađeni za transmisiju elektronsku mikroskopiju. Fotomikrografije su analizirane pomoću programa *ImageJ* 1.49 tako što su izmerene površine svih vidljivih mitohondrija. Statistička analiza vršena je u SPSS programu primenom Studentovog T-testa.

Rezultati: Analizom ultrastrukture hepatocita utvrđeno je da su mitohondrije uglavnom bile sferičnog ili ovalnog oblika i normalne morfologije, bez upadljivih razlika među eksperimentalnim grupama životinja. Prosečna površina mitohondrija u grupi miševa na HFD ishrani iznosila je $4,75 \pm 0,25 \mu\text{m}$, a u grupi miševa na HFD ishrani koji su dobijali metformin $4,44 \pm 0,6 \mu\text{m}$. Nije pokazana statistički značajna razlika u površini mitohondrija između ispitivanih grupa ($p > 0,05$).

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju da kod životinja koje su hranjene dijetom sa visokim sadržajem masti metformin ne dovodi do promene površine mitohondrija.

Ključne reči:

dijabetes,
hepatociti,
mitohondrije,
metformin,
HFD

Uvod

Metabolički sindrom je poremećaj zasnovan na nizu metaboličkih abnormalnosti koje uključuju intoleranciju na glukozu, insulinsku rezistenciju, centralnu gojaznost, dislipidemiju i hipertenziju. Klinička implikacija metaboličkog sindroma je da povećava rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti i tipa 2 dijabetesa (1).

Dijabetes predstavlja jedan od najčešćih hroničnih endokrinometaboličkih poremećaja koji se može podeliti na dve vrste, tip 1 dijabetesa (ranije poznat kao insulin zavisni) i tip 2 dijabetesa (ranije poznat kao insulin nezavisni) (2).

Tip 2 dijabetesa melitusa (T2DM) ima patogenezu povezanu sa razvojem insulinske rezistencije koja dovodi do hiperglikemije i poremećaja metabolizma lipida i proteina. Ova bolest izaziva patološke promene u strukturi i funkcijama mnogih organa i organskih sistema, uključujući ozbiljna oštećenja srca, krvnih sudova, očiju, jetre, bubrega i nerava (3).

Opšte je prihvaćeno da na ćelijskom nivou T2DM prati mitohondrijalna disfunkcija u jetri i drugim organima. Mitohondrije su esencijalne organele uključene u proizvodnju energije, regulaciju ćelijskog metabolizma, ćelijsku signalizaciju i mnoge druge procese odgovorne za opstanak i smrt ćelije. Poremećaji mitohondrijalne biogeneze, mitofagije i mitohondrijalne dinamike dovode do oštećenja mitohondrijalne mreže, promena u broju organela i njihove ultrastrukture u većini tkiva kod T2DM.

Oštećena respiratorna aktivnost mitohondrija doprinosi razvoju insulinske rezistencije (3) i posledične disfunkcije organa preko povećane proizvodnje reaktivnih vrsta kiseonika. Način života i određeni lekovi mogu poboljšati kapacitet za oksidativnu fosforilaciju i aktivnost mitohondrija i poboljšati insulinsku rezistenciju u nekim (pre)dijabetesnim slučajevima (4). Promene u obliku ili veličini mitohondrija primećene su kod pacijenata sa dijabetesom i kod životinjskih modela, a smatra se da su posledica fizijske i fuzije mitohondrija (5).

Metformin je lek koji se, od strane Američkog udruženja za dijabetes i smernica Evropskog udruženja za pružavanje dijabetesa, preporučuje kao antidijabetesni lek prve linije, čije se dejstvo odlikuje smanjenjem nivoa glukoze u krvi i insulinske rezistencije. Sam mehanizam dejstva nije do kraja utvrđen, ali su određene studije pokazale da metformin aktivira adenozin-monofosfat (AMP) aktiviranu protein-kinazu (AMPK) putem adenozin nukleotidno nezavisnog mehanizma, tj. nezavisno od AMP/ATP odnosa. Umesto toga, metformin inhibira mitohondrijalni kompleks i nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) oksidoreduktazu, smanjujući produkciju adenozin-trifosfata (ATP) i povećavajući nivo AMP-a, što dovodi do indirektno aktivacije AMPK. Aktivirana AMPK zatim deluje na smanjenje glukoneogeneze u jetri, inhibirajući fosfoenolpiruvat karboksikinazu i glukozo-6-fosfatazu, enzime uključene u ovaj proces. Na taj način se smanjuje produkcija glukoze u jetri. Takođe utiče na poboljšanje transporta glukoze u mišićne ćelije, čime pomaže u regulaciji nivoa

glukoze u krvi i povećava osetljivost na insulin. Upravo ovi efekti predstavljaju ključne aspekte u tretmanu tipa 2 dijabetesa (6-9). Primećeno je da su u pacijenata sa tipom 2 dijabetesa smanjeni broj mitohondrija i njihova respiratorna aktivnost. Iako se od ranije smatra da je glavni mehanizam delovanja metformina posledica inhibicije kompleksa 1 respiratornog lanca u unutrašnjoj membrani mitohondrija, najnovija istraživanja su ukazala na mogućnost da metformin, u terapijski relevantnim koncentracijama, povećava respiraciju mitohondrija, membranski potencijal i nivoe ATP-a u hepatocitima. Određene doze metformina povećavaju i gustinu mitohondrija jetre i aktivnost kompleksa 1, što bi moglo da utiče na poboljšanu regulaciju glikemije miševa koji su na dijeti sa visokim sadržajem masti (engl. *High fat diet* - HFD) (10).

S obzirom na to da hroničnim bolestima kao što je dijabetes trebaju godine da se razviju, životinjski modeli su esencijalni za proučavanje molekularnih aspekata i patofizioloških efekata ovih bolesti. Jedan od modela koji dobijaju sve veću pažnju je model dijabetesa izazvan ishranom kod miša. Miševi soja C57BL/6 J imaju genetski faktor koji uzrokuje razvoj analoga tipa 2 dijabetesa ukoliko životinja postane gojazna, što se može izazvati određenom ishranom kao što je dijeta sa visokim sadržajem masti (HFD) ili drugim manipulacijama. Pokazalo se da hrana bogata mastima dovodi do povećanja telesne težine i dijabetesa kod različitih sojeva miševa i pacova. Miševi soja C57BL/6 J podvrgnuti dijeti sa visokim sadržajem masti ispoljavaju metaboličke poremećaje koji odgovaraju progresiji bolesti kod ljudi i često su korišćeni model metaboličkog sindroma i tipa 2 dijabetesa melitusa (11, 12).

Cilj rada

Cilj ovog rada je ispitivanje površine mitohondrija mišjih hepatocita na ishrani sa povećanim udelom masti i miševa na istoj ishrani koji su tretirani metforminom.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

U ovom istraživanju korišćeni su miševi muškog pola, soja C57BL/6 J, koji su bili stari 8 nedelja. Miševi su dobijeni iz vivarijuma Galenika a.d. (Beograd, Srbija).

Animalni model

Miševi su gajeni 6 meseci u standardnim laboratorijskim uslovima i imali su pristup hrani i vodi *ad libitum*. Zatim su raspoređeni u dve eksperimentalne grupe, od kojih je svaka sadržala osam životinja koje su dobijale hranu sa visokim sadržajem masti. Razlika između normalne ishrane i HFD ishrane je što se u HFD nalazi 60% kalorija, poreklom većinski iz svinjske masti. Tokom poslednjeg meseca, jednom dnevno, jednoj grupi miševa hranjenoj HFD-om davan je metformin (300 mg/kg telesne mase) pomoću orogastrične sonde. Pre primene, odgovarajuća doza leka rastvorena je u 0,5 ml destilovane vode.

Etički aspekt sprovođenja studije

Odobrenje za sprovođenje navedenog eksperimenta sa životinjama izdato je od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (9110/2; 3/4/2018) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprava za veterinu (323-07-03704/2017-05/1).

Priprema histoloških uzoraka

Uzimanje uzoraka

Posle 6 meseci HFD ishrane sve životinje su žrtvovane primenom cervikalne dislokacije. Nakon žrtvovanja uzeti su delovi jetre i za potrebe analize na transmissionom elektronskom mikroskopu (TEM) uzorci su fiksirani u 2,5% rastvoru glutaraldehida.

Priprema uzoraka za transmissionu elektronsku mikroskopiju

Nakon fiksacije u 2,5% glutaraldehidu uzorci su ispirani 0,1 M kakodilatnim puferom i dodatno fiksirani 1% osmijum-tetroksidom. Zatim su ponovo isprani kakodilatnim puferom i ostavljeni u rastvoru uranil-acetata preko noći. Sledećeg dana je izvršeno ispiranje uzoraka destilovanom vodom, a zatim dehidratacija rastvorima etanola rastuće koncentracije (50%, 70%, 96% i 100%) i finalno propilen-oksidom. Nakon dehidratacije uzorci su ukapljeni u epoksidne smole (*Epoxy Embedding Medium kit, Sigma-Aldrich*) i ostavljeni u termostatu na 60 °C tokom 48h (13).

Dobijeni kalupi su zatim sečeni dijamantskim nožem na ultramikrotomu na ultratanke isečke debljine oko 70 nm koji su hvatani na bakarne mrežice i kontrastirani olovo-citratom i uranil-acetatom. Posle sušenja isecci su posmatrani na TEM-u (*Morgagni 268D, FEI*).

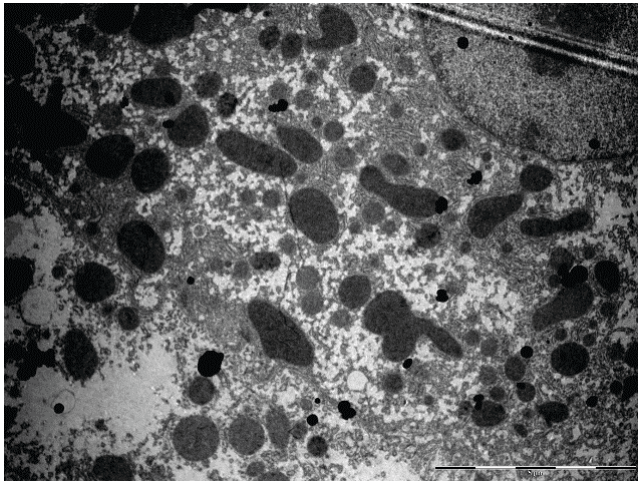
Analizirano je po 30 fotomikrografija svakog uzorka iz obe eksperimentalne grupe pomoću *ImageJ 1.49* programa (*National Institutes of Health, Bethesda, Maryland*). Na svakoj fotomikrografiji mitohondrije su obeležene kao regija od interesa pomoću alatke za poligonalnu selekciju. Na dobijenim selekcijama izračunata je površina pomoću opcije *Set measurements/Measure*.

Statistička analiza

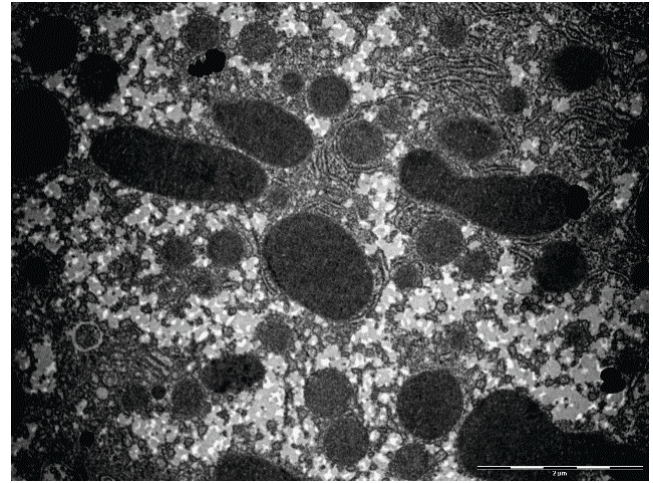
Statistička obrada podataka je urađena u SPSS programu (verzija 24). Za statističku analizu korišćen je Studentov T-test, vrednost $p < 0,01$ smatrana je statistički visoko značajnom, a vrednost $p < 0,05$ statistički značajnom. Dobijeni rezultati prikazani su kao aritmetička sredina \pm standardna greška.

Rezultati

Analiza uzoraka transmissionom elektronskom mikroskopijom

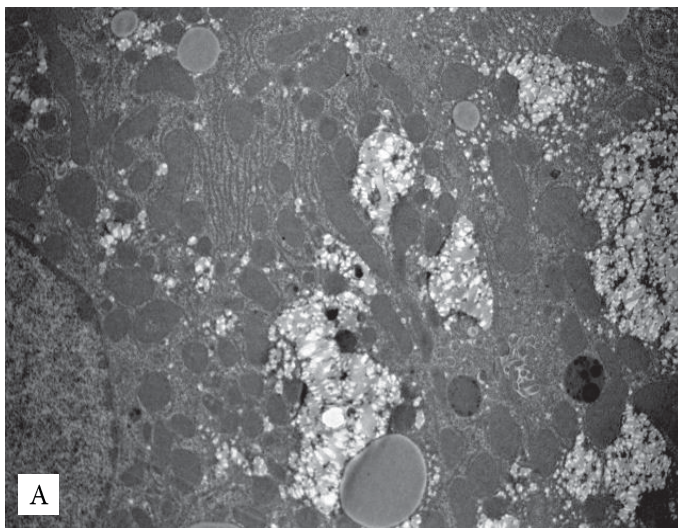


A

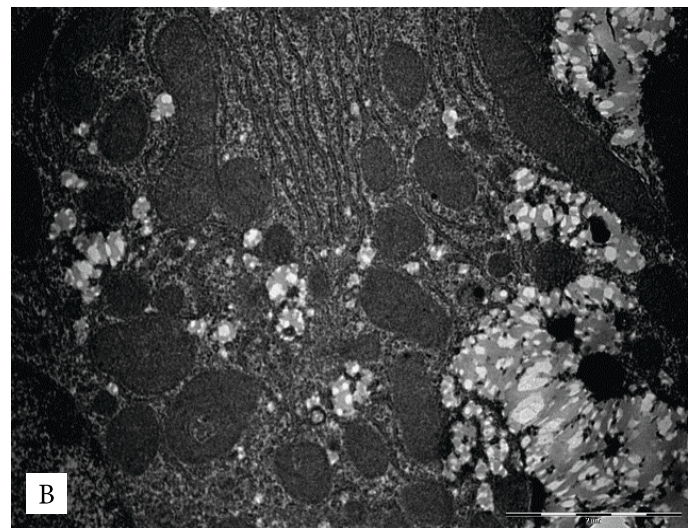


B

Slika 1. Mikrofotografije hepatocita miševa na HFD ishrani. Na slici se uočavaju tamno obojene mitohondrije okruglog ili ovalnog oblika i normalne ultrastrukturne građe (A - uveličanje 5600x, B - uveličanje 11000x).



A



B

Slika 2. Mikrofotografije hepatocita miševa na HFD ishrani koji su dobijali metformin. Na slici se uočavaju tamno obojene mitohondrije okruglog ili ovalnog oblika i normalne ultrastrukturne građe (A - uveličanje 5600x, B - uveličanje 11000x).

Primenom transmisiona elektronske mikroskopije analizirani su uzorci jetre ispitivanih miševa. Analizom ultrastrukture hepatocita primećeno je da su mitohondrije uglavnom bile sferičnog ili ovalnog oblika i normalne morfologije, bez jasnih razlika između ispitivanih grupa životinja (**slika 1 i 2**).

Morfometrijske analize transmisionom elektronskom mikroskopijom

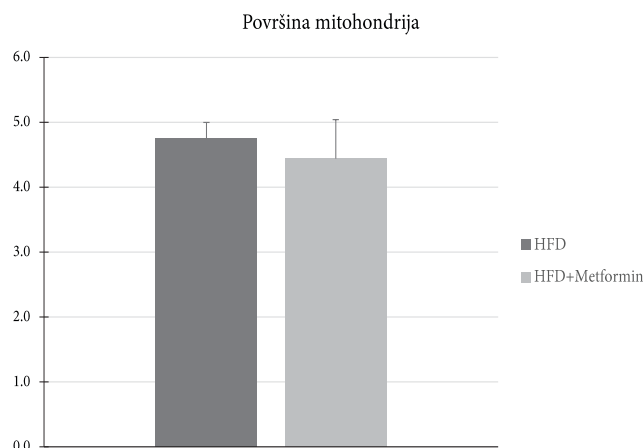
Prosečna površina mitohondrija u grupi miševa na HFD ishrani bila je $4,75 \pm 0,25 \mu\text{m}$, a u grupi miševa na HFD ishrani koji su dobijali metformin $4,44 \pm 0,6 \mu\text{m}$. Statistička analiza je pokazala da nije bilo značajne razlike u površini mitohondrija među ispitivanim grupama ($p > 0,05$) (**grafikon 1**).

Diskusija

U ovom istraživanju ispitivan je uticaj leka metformina na površinu mitohondrija u hepatocitima kod

miševa koji su bili ishrani sa visokim sadržajem masti (HFD). Mitohondrijalna disfunkcija igra ključnu ulogu u patofiziologiji dijabetesa, posebno T2DM. Ova disfunkcija se manifestuje smanjenjem kapaciteta oksidativne fosforilacije i smanjenjem biogeneze mitohondrija (3, 5). Jedan od ključnih regulatora mitohondrijalne funkcije je koaktivator PGC-1 α , koji je često smanjen u uslovima dijabetesa. Njegovo smanjenje rezultira smanjenjem gustine i funkcije mitohondrija u insulinskim senzitivnim tkivima, kao što su skeletni mišići i jetra, što doprinosi insulinskoj rezistenciji i hiperglikemiji. Prema tome, utvrđeno je da u metaboličkom sindromu i T2DM dolazi do smanjenja respiratorne aktivnosti mitohondrija (10, 14, 15). Intenzitet respiratorne aktivnosti utiče na dinamiku mitohondrija (fisiju i fuziju), što dovodi do promene njihove veličine i oblika (5).

Metformin predstavlja terapiju prve linije kod dijabetesa. Još uvek nije poznat celokupan put njegovog delovanja, ali se zna da utiče na respiratorni lanac na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Smatra se da ima inhibitorno dejstvo na respiraciju, ali neka savremenija



Grafikon 1. Grafikon prikazuje površine mitohondrija kod miševa na HFD ishrani i onih na HFD ishrani uz tretman metforminom. Statistička analiza je izvedena t-testom, a podaci su dobijeni analizom po 30 mikrografija po uzorku za svaku eksperimentalnu grupu.

istraživanja pokazuju i suprotno, tj. da u adekvatnim dozama može povećati aktivnost u mitohondrijama (6-10, 15). Određen broj istraživanja je pokazao da metformin može smanjiti veličinu mitohondrija u mišićnim ćelijama kod pacijenata sa dijabetesom, dok druga istraživanja sugeriraju da ne dolazi do značajnih promena u obliku i veličini mitohondrija nakon primene metformina. Ovo može ukazivati na to da mehanizam delovanja metformina ne uključuje direktne promene u mitohondrijalnoj dinamici već više utiče na njihove funkcije i metabolizam. Takođe, određena istraživanja sugeriraju da metformin može delovati kao regulator mitohondrijalne biogeneze, što bi moglo dovesti do poboljšanja mitohondrijalne funkcije i potencijalnog povećanja broja mitohondrija, ali ne nužno njihovih dimenzija (16-19).

U našem istraživanju je oblik mitohondrija bio sferičan ili ovalan i nisu uočene razlike između ispitivanih grupa. Rezultati merenja površine mitohondrija u našem radu pokazali su da nema statistički značajne razlike u površini mitohondrija između miševa na HFD ishrani i onih koji su dobijali metformin. Ovakav rezultat može da ukazuje da mehanizam delovanja metformina ne dovodi do dinamičke promene mitohondrija i, samim tim, njihovog oblika i veličine, što može biti u korelaciji sa odsustvom promene u njihovoj aktivnosti.

Potrebno je uraditi dodatna ispitivanja delovanja metformina na mitohondrije hepatocita miševa sa dijabetesom, koja obuhvataju i druge analize, pored morfološke, kako bi se pouzdanije odredio njegov uticaj.

Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih merenjem površine mitohondrija može se zaključiti da metformin ne dovodi do promene površine ovih organela kod miševa na dijeti sa visokim sadržajem masti.

Literatura

1. Eckel R, Grundy S, Zimmet P. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; 365(9468):1415-28.
2. Martinovic T, Ciric D, Pantic I, Lalic K, Rasulic I, Despotovic S, et al. Unusual shape and structure of lymphocyte nuclei is linked to hyperglycemia in type 2 diabetes patients. *Tissue Cell*. 2018; 52:92-100.
3. Belosludtsev K, Starinets V, Belosludtsev M, Mikheeva I, Dubinin M, Belosludtseva N. Chronic treatment with dapagliflozin protects against mitochondrial dysfunction in the liver of C57BL/6NCRl mice with high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mitochondrion*. 2021; 59:246-254.
4. Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Na Rev Endocrinol*. 2011; 8(2):92-103.
5. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor V. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol*. 2017; 11:637-645.
6. Lim S, Eckel R. Pharmacological treatment and therapeutic perspectives of metabolic syndrome. *Revi in Endocr Metab Disord*. 2014; 15(4):329-341.
7. Hawley S, Gadalla A, Olsen G, Ghrame D. The Antidiabetic Drug Metformin Activates the AMP-Activated Protein Kinase Cascade via an Adenine Nucleotide-Independent Mechanism. *Diabetes*. 2002; 51(8):2420-2425.
8. Agius L, Ford BE, Chachra SS. The Metformin Mechanism on Gluconeogenesis and AMPK Activation: The Metabolite Perspective. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(9):3240.
9. Chang W, Li W, Li P. The anti-diabetic effects of metformin are mediated by regulating long non-coding RNA. *Front Pharmacol*. 2023; 14:1256705.
10. Wang Y, An H, Liu T, Qin C, Sesaki H, Guo S, et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Rep*. 2019; 29(6):1511-1523.e5.
11. Surwit R, Kuhn C, Cochrane C, McCubbin J, Feinglos M. Diet-Induced Type II Diabetes in C57BL/6J Mice. *Diabetes*. 1988; 37(9):1163-1167.
12. Wang C, Liao J. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Methods in Mol Biol*. 2011; 421-433.
13. Vucicevic L, Misirkic-Marjanovic M, Paunovic V, Kravic-Stevovic T, Martinovic T, Ciric D, et al. Autophagy inhibition uncovers the neurotoxic action of the antipsychotic drug olanzapine. *Autophagy*. 2014; 10(12):2362-78.
14. Chen R, Chen J. Mitochondrial transfer - a novel promising approach for the treatment of metabolic diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024; 14:1346441.
15. Jenkins Y, Sun TQ, Li Y, Markovtsov V, Uy G, Gross L, et al. Global metabolite profiling of mice with high-fat diet-induced obesity chronically treated with AMPK activators R118 or metformin reveals tissue-selective alterations in metabolic pathways. *BMC Res Notes*. 2014; 7:674.
16. Apostolova N, Vezza T, Muntane J, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Type 2 Diabetes: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *Antioxid Redox Signal*. 2023; 39(4-6):278-320.
17. Zhu H, Jia Z, Li YR, Danelisen I. Molecular mechanisms of action of metformin: latest advances and therapeutic implications. *Clin Exp Med*. 2023; 23(7):2941-2951.
18. Fung TS, Chakrabarti R, Kollasser J, Rottner K, Stradal TEB, Kage F, et al. Parallel kinase pathways stimulate actin polymerization at depolarized mitochondria. *Curr Biol*. 2022; 32(7):1577-1592.e8.
19. Chen Q, Thompson J, Hu Y, Lesnfsky EJ. Chronic metformin treatment decreases cardiac injury during ischemia-reperfusion by attenuating endoplasmic reticulum stress with improved mitochondrial function. *Aging (Albany NY)*. 2021; 13(6):7828-7845.