

РЕСВЕРАТРОЛ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

© 2021 г. В.И. Бинюков*, И.В. Жигачева*, Е.М. Миль*, Н.И. Крикунова*, М.М. Расулов**

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: zhigacheva@mail.ru

**Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, 105118 Москва, ш. Энтузиастов, 38

E-mail: rasulovmaksud@gmail.com

Поступила в редакцию 25.01.2020 г.

После доработки 12.07.2020 г.

Принята к публикации 08.07.2020 г.

На моделях острой гипобарической гипоксии и острого алкогольного отравления исследованы антистрессовые свойства природного полифенола ресвератрола. Острая гипобарическая гипоксия и острое алкогольное отравление приводили к росту интенсивности перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей. Активация перекисного окисления липидов сопровождалась набуханием и изменениями в содержании жирных кислот C_{18} и C_{20-22} в составе общей липидной фракции мембран митохондрий. Индекс ненасыщенности C_{18} -жирных кислот снижался на 7.5% (с 1.69 ± 0.01 до 1.52 ± 0.01). При этом соотношение $(20:3\omega 6 + 20:5\omega 3)/22:6\omega 3$ для жирных кислот в условиях острой гипобарической гипоксии уменьшалось с 0.23 ± 0.02 до 0.13 ± 0.01 , что свидетельствовало о снижении метаболизма в эйкозаноидном цикле. Введение животным в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ моль/кг ресвератрола предотвращало изменения жирнокислотного состава, активацию перекисного окисления липидов и набухание митохондрий, что влияло на физиологические показатели. Предполагается, что адаптогенные свойства ресвератрола могут быть обусловлены предотвращением перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий, что, вероятно, отражается на функциональном состоянии этих органелл, способствуя сохранению энергетического метаболизма клетки в условиях стресса.

Ключевые слова: адаптогены, митохондрии, перекисное окисление липидов, гипоксия, острое алкогольное отравление.

DOI: 10.31857/S0006302921020101

Стрессовые воздействия влекут за собой смещение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения содержания активных форм кислорода (АФК) в клетке [1]. При этом одним из основных источников АФК могут быть митохондрии [2]. Митохондрии являются как источником, так и мишенью для этих интермедиатов. Избыточная генерация АФК приводит к окислению белков по остаткам тирозина, цистеина и серина, повреждению ДНК митохондрий и смещению редокс-потенциала клетки из-за окисления глутатиона и НАД(Ф)Н [3]. Кроме того, увеличение генерации АФК вызывает пероксидацию липидов мембран, прежде всего кар-

диолипина, и набухание митохондрий. Следствием «перекисного» набухания митохондрий (или образования больших пор во внешней мембране) является высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства в цитоплазму и активация митохондриального пути апоптоза. Поскольку наиболее общим проявлением стресс-реакции является увеличение генерации АФК митохондриями, то, можно предположить, что препараты-адаптогены, вероятно, должны снижать генерацию АФК этими органеллами. В качестве адаптогенов, вероятно, можно использовать антиоксиданты, в частности антиоксиданты природного происхождения. К таким антиоксидантам относится ресвератрол (транс-3,4,5-тригидроксистерилбен).

Ресвератрол (рис. 1) был выделен в 1940 г. из корня белого морозника (*Veratrum album*), а затем найден в корнях японского спорыша (*Polygonum cuspidatum*) [4]. В настоящее время ресвератрол

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин, ПОЛ – перекисное окисление липидов, МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот, ЖК – жирные кислоты, АСМ – атомно-силовая микроскопия, ОГГ – острая гипобарическая гипоксия, ОАО – острое алкогольное отравление.

обнаружен как минимум в 72 видах растений [5]. Он обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [6]. Кроме того, ресвератрол предотвращает возрастные заболевания, рак кожи и осуществляет защиту от сердечно-сосудистых заболеваний [7].

Несмотря на низкую биодоступность, ресвератрол проявляет активность *in vivo* [8]. Активность ресвератрола *in vivo* можно объяснить повторным превращением как сульфатов, так и глюкуронидов ресвератрола в свободный ресвератрол в органах-мишенях, таких как печень [9, 10]. Также возможно, что комплексы ресвератрола с альбумином и липопротеинами могут взаимодействовать с клеточными мембранами, которые имеют рецепторы для альбумина и липопротеинов низкой плотности. По-видимому, комплексы диссоциируют, оставляя ресвератрол свободным и позволяя ему проникать в клетки. Другим возможным объяснением может быть биологическая активность его метаболитов.

Основной мишенью для ресвератрола являются митохондрии. Точный механизм влияния ресвератрола на функциональное состояние митохондрий еще не известен. С одной стороны, ресвератрол проявляет антиоксидантный эффект при патологиях и стрессе, с другой стороны — он проявляет прооксидантные свойства и активирует апоптоз [11]. В работах [12, 13] авторы *in vitro* и *in vivo* выявили дозовые эффекты ресвератрола. Так, была установлена стимуляция активности комплекса I ресвератролом в низких (<5 мкМ) дозах, и наоборот — подавление активности этого комплекса ресвератролом в больших (50 мкМ) дозах. Препарат предотвращал высвобождение цитохрома *c* и снижал генерацию супероксидного анион-радикала за счет активации в мембранах митохондрий разобщающего белка UCP2 [11]. Однако ресвератрол в зависимости от концентрации (12–28 мкМ) может ингибировать активность F_0F_1 -АТФазы/АТФ-синтазы митохондрий [13]. По мнению авторов, влияние ресвератрола на F_0F_1 -АТФазу/АТФ-синтазу связано с его способностью взаимодействовать с частью F1 белка. Нарушение активности F_0F_1 -АТФаз может привести к гибели клеток в результате апоптоза или некроза, в зависимости от степени ингибирования. Ингибирование активности F_0F_1 -АТФазы/АТФ-синтазы наблюдалось лишь при использовании препарата в довольно высоких концентрациях. В более низких концентрациях (от пикомолярных до наномолярных) ресвератрол стимулировал активность F_0F_1 -АТФазы [14, 15].

Необходимо отметить, что препарат повышал активность антиоксидантных ферментов и активировал экспрессию антиоксидантных генов [16, 18]. Так в опытах *in vitro* на гепатоцитах он повышал активность каталазы, супероксиддисмутазы,

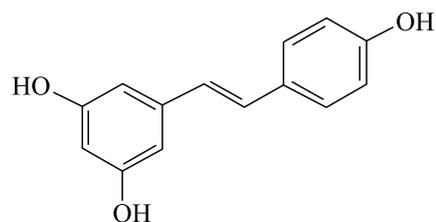


Рис. 1. Структурная формула ресвератрола.

глутатионпероксидазы, NADPH-хинон-оксидоредуктазы и глутатион-S-трансферазы. При этом ресвератрол повышал уровень Nrf2, регулирующего экспрессию антиоксидантных генов, и индуцировал его транслокацию в ядро [17]. В высоких концентрациях препарат вызывал нарушение окислительно-восстановительного статуса клетки, увеличение генерации АФК митохондриями, а также открытие митохондриальной неспецифической поры, что вело к снижению жизнеспособности клеток [19]. Эти результаты подчеркивают важность баланса между про- и антиоксидантными эффектами ресвератрола в зависимости от его дозы и возраста животных. В связи с этим целью исследования было изучение влияния ресвератрола и стрессовых воздействий на функциональное состояние митохондрий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работу проводили на митохондриях печени мышей линии Balb/c.

Регулирующие стандарты. Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации и в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [20], согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя, а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [21].

Мышам опытной группы внутрибрюшинно вводили $2 \cdot 10^{-5}$ моль/кг ресвератрола в течение 5 суток. Раствор ресвератрола готовили разведением препарата в бидистиллированной воде. Исходный раствор (1 мл) препарата ($2 \cdot 10^{-4}$ М) доводили водой до 40 мл и вводили животным препарат в объеме 0.1 мл (исходя из средней массы мышей 25 г). Контрольной группе животных внутрибрюшинно вводили 0.1 мл бидистиллированной воды.

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [22]. Первое центрифугирование — при 600 g в те-

чение 10 мин, второе – при 9000 g, 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде выделения. Соотношение ткань : среда – 1 : 0.25. Среда выделения содержала 0.25 М сахарозы, 10 мМ HEPES, pH 7.4.

Скорости дыхания митохондрий определяли с помощью закрытого электрода типа Кларка на полярографе LP-7E (Чехия). Среда инкубации содержала: 0.25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ MgSO₄, 2 мМ KН₂PO₄, 10 мМ KCl, 2 мМ аскорбата, 5 мкМ ротенона, 0.9 мкМ антимицина А, 0.5 мкМ FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразона) и 400 мкМ N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), pH 7.4.

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [23]. Липиды экстрагировали смесью «хлороформ : метанол» = 2 : 1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3–5 мг белка. Соотношение митохондрии : смесь «хлороформ–метанол» = 1:10. Регистрацию флуоресценции проводили в десяти миллиметровых кварцевых кюветах на спектрофлуориметре FluoroMax (Horiba Yvon GmbH, Япония). В контрольную кювету добавляли 3 мл хлороформа, а затем 0.3 мл метанола. Длина волны возбуждения флуоресценции составляла 360 нм, испускания – 420–470 нм. Результаты выражали в условных единицах флуоресценции, пересчитанных на мг белка.

Исследование жирных кислот мембран митохондрий печени мышей проводили методом газожидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии.

Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [24, 25]. МЭЖК экстрагировали гексаном и полученные растворы анализировали.

Определение количественного состава метиловых эфиров жирных кислот проводили на хроматографе марки Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0.32 мм, слой 0.25 мкм, J&W Scientific, США). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270°C со скоростью 4°C/мин. Температура инжектора и детектора – 270°C; скорость газа-носителя гелия составляла 2.0 мл/мин, деление потока на входе в колонку – 1 : 40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [26]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали как площадь пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Математическую обработку результата проводили с

использованием программ Microsoft Excel и Sigma Plot 10.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях, аналогичных газохроматографическому анализу, на приборе Hewlett Packard-6890 (США). Масс-спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70 эВ и скорости сканирования 1 с на декаду масс в области 40–400 дальтон.

Индекс ненасыщенности жирных кислот (или индекс двойных связей) рассчитывали по формуле $ИДС = \sum P_j n / 100$, где P_j – относительное процентное содержание жирных кислот (ЖК) в общей липидной фракции мембран митохондрий, n – число двойных связей в молекуле ЖК.

Коэффициент ненасыщенности (K) жирных кислот определяли, как отношение \sum ненасыщенных ЖК / \sum насыщенных ЖК.

Морфологию митохондрий исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Образцы митохондрий фиксировали 2%-м глутаровым альдегидом в течение 1 ч с последующей промывкой водой и осаждением методом центрифугирования. Митохондрии наносили на поверхность кремниевой подложки и подсушивали на воздухе. Исследование проводили на приборе SOLVER P47 SMENA на частоте 150 кГц в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG11 с радиусом кривизны 10 нм. Некоторые геометрические параметры имиджа митохондрий определяли, используя программный пакет «Image Analysis». Сечение проводили на высоте 30 нм. Объем имиджа митохондрий исследуемых препаратов соответствовал произведению площади сечения имиджа митохондрии на среднюю высоту данного имиджа в области сечения.

Набухание выделенных митохондрий оценивали по оптической плотности суспензии митохондрий (D) при длине волны 540 нм на спектрофотометре СФ-26 (Россия). Измерение проводили в кювете объемом 2 мл при температуре 28°C. Среда инкубации митохондрий содержала: 0.25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, pH 7.5. Концентрация белка в пробе составляла 0.3 мг/мл.

Протекторную активность препарата исследовали, используя модели острой гипобарической гипоксии, острой гемической гипоксии, острой цитотоксической гипоксии и острого алкогольного отравления.

Модель «старения» митохондрий. Выделенные митохондрии (2–3 мг белка) помещали в 0.5 мл среды, содержащей 65 мМ KCl, 10 мМ HEPES и 1 мМ KН₂PO₄, pH 7.4. Митохондрии инкубировали 20–25 мин при комнатной температуре.

Острую гипобарическую гипоксию (ОГГ) у мышей Balb/c моделировали в стеклянной барокамере в атмосфере низкого давления (230.40 мм рт. ст.), что соответствует высоте 9000 м над уровнем моря. В первые минуты в камере создавали разрежение, соответствующее 5 тысячам метров (давление 405 мм рт. ст.) над уровнем моря. В каждую последующую минуту проводили «подъем» еще на одну тысячу метров. Время пребывания крыс на «высоте» 9000 м над уровнем моря – 5.0 мин.

Острое алкогольное отравление (ОАО) вызывали введением мышам линии Balb/c массой 20–25 г перорально этанол в дозе 8 г/кг.

Острую гемическую гипоксию вызывали внутрибрюшинным введением мышам линии Balb/c нитрита натрия в дозе 250 мг/кг.

Острую цитотоксическую гипоксию вызывали внутрибрюшинным введением мышам линии Balb/c азида натрия из расчета 20 мг/кг.

Протекторную активность препарата определяли при введении мышам течение 5 суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола.

Использовали следующие реактивы: метанол, хлороформ, карбонат калия (Merck, Германия), сахарозу, трис, ротенон, антимицин А, ТМФД (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин (свободный от жирных кислот), глутаровый альдегид (Sigma, США), NEPES (MP Biomedicals, Германия), гексан (Panreac, Испания), ацетилхлорид (Acros, Бельгия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск концентраций ресвератрола, эффективно снижающих интенсивность ПОЛ, проводили, используя модель «старения» митохондрий печени (инкубация митохондрий в гипотонической солевой среде при комнатной температуре). «Старение» митохондрий печени мышей приводило к активации ПОЛ в мембранах митохондрий. При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ (оснований Шиффа) в мембранах митохондрий возрастала в 2.5 раза (рис. 2). Введение ресвератрола в среду инкубации митохондрий снижало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ и имело дозозависимую зависимость. В концентрации 10^{-4} М препарат не влиял на интенсивность ПОЛ в мембранах «стареющих» митохондрий. При этом в концентрации 10^{-3} М ресвератрол проявлял прооксидантную активность. В интервале 10^{-5} – 10^{-14} М ресвератрол снижал интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ почти до контрольных значений. Эти данные свидетельствуют о возможности использования 10^{-5} – 10^{-14} М препарата для защиты от оксидативного стресса.

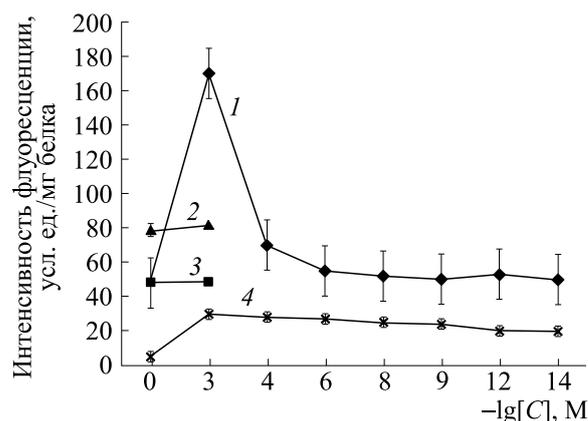


Рис. 2. Влияние «старения» митохондрий и различных концентраций ресвератрола на интенсивность флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа). По оси абсцисс отрицательный логарифм концентрации ресвератрола; по оси ординат — интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в усл. ед./мг белка; 1 — «старение» митохондрий с ресвератролом; 2 — уровни флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах «стареющих» митохондрий; 3 — уровни флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий группы «контроль» (без введения в среду инкубации ресвератрола); 4 — раствор ресвератрола, приготовленный в среде выделения (0.25 М сахарозы, 10 мМ NEPES, pH 7.4). Нулевая точка на кривой 4 — флуоресценция среды выделения.

Для исследования антистрессовых свойств препарата была выбрана концентрация 10^{-5} М. Поскольку выбор данной концентрации был сделан исходя из результатов изучения прямого влияния ресвератрола на изолированные митохондрии, необходимо было выяснить, окажет ли препарат в данной концентрации защитный эффект при введении его животным. Для этого ресвератрол вводили мышам в течение 5 суток в концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ моль/кг. Последнюю инъекцию проводили за 45 мин до выделения митохондрий. Проверку защитного действия препарата осуществляли на модели «старения» митохондрий, исследуя АСМ-изображения митохондрий различных групп животных. АСМ-изображения митохондрий печени мышей, инкубируемых в гипотонической среде, существенно отличались от контрольных образцов, инкубируемых в изотонической среде, где наблюдали митохондрии со средним объемом $V = 0.295 \pm 0.003$ мкм³, (рис. 3). В то время в условиях гипотонии объем митохондрий составлял $V = 0.555 \pm 0.003$ мкм³. Ресвератрол предотвращал набухание митохондрий: средний размер митохондрий почти не отличался от контрольных образцов. В следующей серии опытов проверку протекторных свойств препарата проводили на моделях острой ОГГ и ОАО. Выбор данных моделей обусловлен активацией пе-

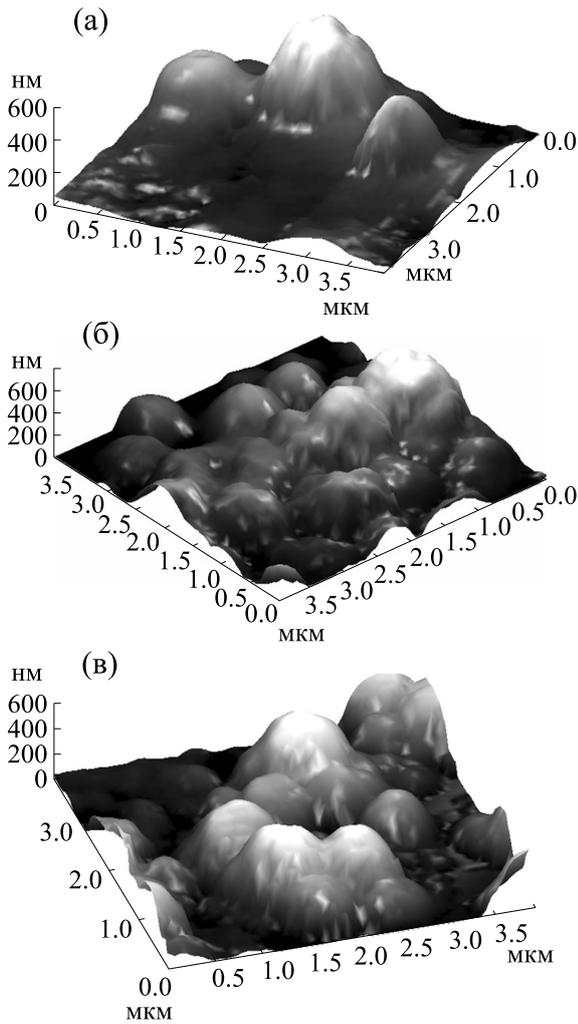


Рис. 3. АСМ-изображения (3Д) изолированных митохондрий печени мышей ($\mu\text{м}^2$): (а) – контроль; (б) – ОГГ; (в) – введение в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола, последнее введение за 45 мин до воздействия + ОГГ.

рекисного окисления липидов и дисфункцией митохондрий в условиях ОГГ и острого алкогольного отравления [27]. ОГГ вызывала увеличение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени мышей в 1.75 раза (рис. 4). При этом острое алкогольное отравление в 1.4 раза повышало интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени (рис. 5). Это согласуется с литературными данными, поскольку одним из основных гепатотоксических эффектов ацетальдегида, образующегося в печени из этанола в результате активации алкогольдегидрогеназы, является инициация перекисного окисления липидов [28]. Увеличение генерации АФК митохондриями, сопровождающееся активацией ПОЛ, способствовало набуханию митохондрий [29], о

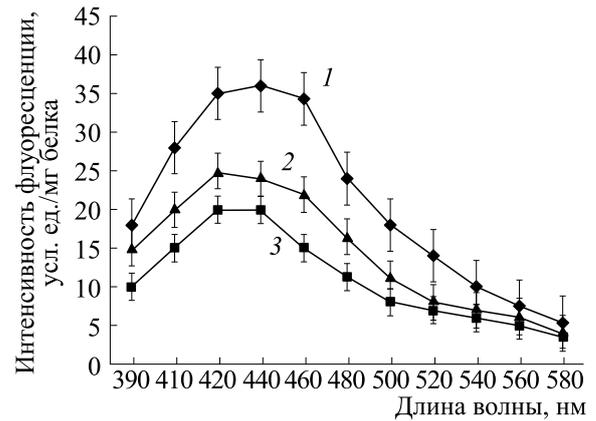


Рис. 4. Влияние острой гипобарической гипоксии и ресвератрола на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. По оси абсцисс – длина волны в нм; по оси ординат – интенсивность флуоресценции в усл. ед./мг белка; 1 – ОГГ; 2 – введение в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола, последнее введение за 45 мин до воздействия + ОГГ; 3 – контроль.

чем свидетельствовало снижение оптической плотности суспензии митохондрий в 1.15 раза.

Введение животным в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола до стрессовых воздействий (ОГГ или ОАО) предотвращало активацию ПОЛ и набухание митохондрий (рис. 4 и 5).

Рост интенсивности ПОЛ в условиях ОГГ приводил к изменениям в жирнокислотном составе общей липидной фракции мембран митохондрий. Изменения наблюдались в содержании ЖК, содержащих 18 и 20–22 углеродных атома. Так, индекс ненасыщенности C_{18} ЖК снижался на 7.5% (табл. 1), а коэффициент ненасыщенности C_{18} ЖК – с 1.69 ± 0.01 до 1.52 ± 0.01 . При этом содержание линолевой кислоты, одной из основных ЖК в составе кардиолипина – фосфолипиды, который входит в состав внутренней мембраны митохондрий и обеспечивает эффективную работу дыхательной цепи митохондрий, уменьшалось на 6%. На 27% снижалось содержание метаболита арахидоновой кислоты ($22:4\omega 6$) и на 28.4% – докозапентаеновой кислоты ($22:5\omega 3$) (табл. 1).

Соотношения между ЖК – предшественниками и ингибитором синтеза эйкозаноидов $20:4\omega 6/22:6\omega 3$ и $(20:3\omega 6+20:5\omega 3)/22:6\omega 3$ – в условиях ОГГ снизились с 2.11 ± 0.12 до 1.61 ± 0.10 и – с 0.23 ± 0.02 до 0.13 ± 0.01 соответственно, что свидетельствовало о снижении метаболизма в эйкозаноидном цикле (рис. 6). Известно, что эйкозаноиды являются сигнальными молекулами и имеют широкий спектр биологических функций, включая усиление или подавление воспалительных и аллергических реакций, контроль артериального давления, сокращения или расслабления гладких мышц и многое другое [30].

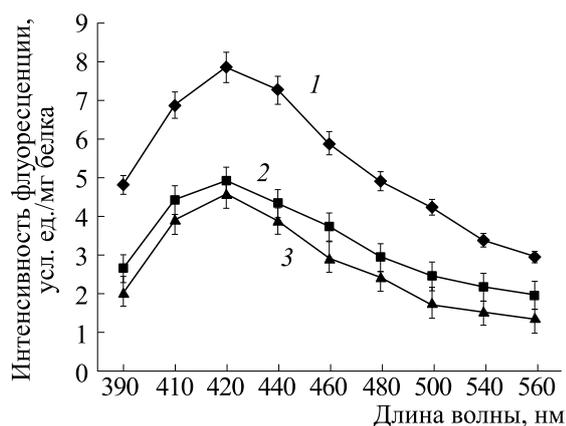


Рис. 5. Влияние острого алкогольного отравления и ресвератрола на спектры флуоресценции продуктов ПОЛ. По оси абсцисс – длина волны в нм; по оси ординат – интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в усл. ед./мг белка; 1 – ОАО; 2 – введение в течение пяти суток $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола, последнее введение за 45 мин до воздействия + ОАО; 3 – контроль.

Снижение содержания этих ЖК, возможно, так же как и снижение содержания линолевой кислоты, влияло на устойчивость организма к стрессовым воздействиям

Сокращение пула ненасыщенных C_{18} ЖК, входящих в состав кардиолипина, главным образом линолевой кислоты, вероятно, обусловлено

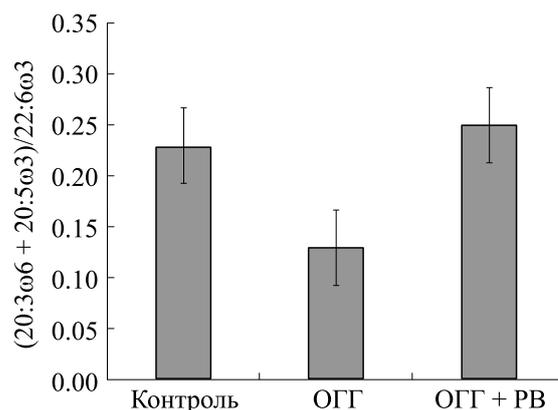


Рис. 6. Соотношение $20:3\omega6 + 20:5\omega3 / 22:6\omega3$ в мембранах митохондрий печени.

окислением этого фосфолипида во внутренней мембране митохондрий, что могло отразиться на биоэнергетических характеристиках [31]. Действительно, ОГГ почти в 1.3 раза снижала скорости транспорта электронов на конечном цитохром-оксидазном участке дыхательной цепи митохондрий. При этом скорости окисления аскорбата в присутствии ТМФД сократились с 68.4 ± 2.5 до 53.1 ± 1.8 нг моль $O_2 / (мг \text{ белка} \cdot \text{мин})$.

Введение в среду инкубации этих митохондрий $5 \cdot 10^{-6}$ М цитохрома с вызывало восстановление скоростей окисления пары «аскорбат +

Таблица 1. Влияние ОГГ на жирнокислотный состав общей липидной фазы митохондрий печени мышей

ЖК	Контроль, отн. %	ОГГ, отн. %	ОГГ + ресвератрол, отн. %
16:1 ω 9	0.50 \pm 0.20	1.00 \pm 0.50	0.45 \pm 0.35
16:1 ω 1	0.75 \pm 0.05	0.85 \pm 0.35	0.75 \pm 0.35
16:0	21.35 \pm 1.25	21.41 \pm 1.16	21.7 \pm 0.8
18:2 ω 6	13.50 \pm 0.15	12.71 \pm 0.16	14.35 \pm 0.19
18:1 ω 9	11.0 \pm 2.5	9.50 \pm 2.13	9.55 \pm 0.95
18:1 ω 7	2.90 \pm 0.04	2.13 \pm 0.60	2.60 \pm 0.10
18:0	16.75 \pm 1.30	15.98 \pm 1.27	16.85 \pm 1.65
20:4 ω 6	20.3 \pm 1.0	20.93 \pm 0.76	20.15 \pm 1.35
20:3 ω 6	1.90 \pm 0.02	1.56 \pm 0.38	2.05 \pm 0.55
20:5 ω 3	0.30 \pm 0.00	0.17 \pm 0.04	0.45 \pm 0.15
22:6 ω 3	9.6 \pm 1.0	13.01 \pm 2.04	10.0 \pm 0.50
22:4 ω 6	0.55 \pm 0.50	0.40 \pm 0.13	0.50 \pm 0.00
22:5 ω 3	0.60 \pm 0.00	0.43 \pm 0.11	0.60 \pm 0.00
$\Sigma C_{18\text{ненас}} / C_{18}$	1.69	1.52	1.57

Таблица 2. Антистрессовая активность ресвератрола

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	Ресвератрол
Инъекция азида натрия 20 мг/кг (цитотоксическая гипоксия)	Время жизни, мин	2.3 ± 0.5	6.2 ± 1.5
	Доля выживших, %	0	30
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (гемическая гипоксия)	Время жизни, мин	20.5 ± 3.1	38.7 ± 5.4
	Доля выживших, %	0	15
Пероральное введение этанола (8 г/кг)	Время жизни, мин	35.4 ± 6.1	127.4 ± 41.1
	Доля выживших, %	0	12

Примечание. Представлены результаты пяти повторов по десять животных.

ТМФД» до контрольных значений, что свидетельствует о потере митохондриями части цитохрома *c*, обусловленной окислением кардиолипидов [31].

Отметим, что ресвератрол предотвращал изменения в жирнокислотном составе мембран митохондрий. Предотвращая ПОЛ, ресвератрол, по видимому, предупреждал потери цитохрома *c* митохондриями. При этом скорости окисления пары «аскорбат + ТМФД» не отличались от контрольных величин. Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, приводящие к изменениям в энергетическом метаболизме, отразились и на физиологических показателях, а именно на устойчивости организма к действию стрессовых факторов. Действительно, введение $2 \cdot 10^{-5}$ М ресвератрола в течение пяти суток в 1.89–2.70 раза увеличивало продолжительность жизни в условиях цитотоксической и гемической гипоксии и в 3.6 раза – в условиях острого алкогольного отравления. При этом на 15–30% повышалась выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии и на 12% – в условиях острого алкогольного отравления (табл. 2).

ВЫВОДЫ

Основываясь на полученных результатах, можно прийти к заключению, что адаптогенные свойства ресвератрола могут быть обусловлены предотвращением перекисного окисления липидов в стрессовых условиях. Предупреждение перекисидации фосфолипидов в мембранах митохондрий, вероятно, отразилось и на функциональном состоянии этих органелл, способствуя сохранению энергетического метаболизма клетки. Таким образом ресвератрол, вероятно, повышал устойчивость организма к действию стрессовых факторов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, а также в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. L. Taylor, D. A. Day, and A. H. Millar, *J. Exp. Botany* **55** (394), 1 (2003).
2. E. Plotnikov, A. Chupyrkina, A. Vasileva, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, S58 (2008).
3. M. P. Murphy, *Biochem. Soc. Trans.* **32** (6), 1011 (2004).
4. S. Nonomura, H. Kanagawa, and A. Makimoto, *Yakugaku Zasshi* **83**, 988 (1963).
5. W. Dercks and L. L. Creasy, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**, 203 (1989).
6. V. Cucciolla, A. Borriello, A. Oliva, et al., *Cell Cycle* **6** (20), 2495 (2007). DOI: 10.4161/cc.6.20.4815
7. J. A. Baur and D. A. Sinclair, *Nature Rev. Drug Discovery* **5**, 493 (2006).
8. S. Saxena and A. Srivastava, *J. Pharmaceut. Technol., Research and Management* **2**, 145, (2014) DOI: 10.15415/jptrm.2014.22010
9. E. Wenzel and V. Somoza, *Mol. Nutrition Food Res.* **49** (5), 472 (2005).
10. X. Vitrac, A. Desmoulière, B. Brouillaud, et al., *Life Sci.* **72** (20), 2219 (2003).
11. A. C. Moreira, A. M. Silva, M. S. Santos, and V. A. Sardão, *Food Chem. Toxicol.* **53**, 18 (2013). DOI: 10.1016/j.fct.2012.11.031
12. N. Gueguen, V. Desquirit-Dumas, G. Leman, et al., *PloS One* **10** (12), e0144290 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0144290

13. V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, G. Leman, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 6662 (2013).
14. J. Zheng and V. D. Ramirez, *Br. J. Pharmacol.* **130**, 1115 (2000).
15. J. L. Kipp and V. D. Ramirez, *Endocrine* **15**, 165 (2001).
16. M. Inglés, J. Gambini, M. G. Miguel, et al., *BioMed Res. Int.* (3), Article ID 580852, 6 (2014).
17. J. A. Rubiolo, G. Mithieux, and F. V. Vega, *Eur. J. Pharmacol.* **591** (1–3), 66 (2008).
18. G.-S. Liu, Z.-S. Zhang, B. Yang, and W. He, *Life Sci.* **91** (17–18), 872 (2012).
19. W. Gadacha, M. Ben-Attia, D. Bonnefont-Rousselot, et al., *Redox Rep.* **14** (4), 154 (2009) DOI: 10.1179/135100009X46613112
20. Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), (Strasbourg, 1986).
21. Н. Н. Каркищенко и С. В. Грачевой. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях* (Профиль, М., 2010).
22. E. N. Mokhova, V. P. Skulachev, and I. V. Zhigacheva, *Biochim. Biophys. Acta* **501**, 415 (1977).
23. B. I. Fletcher, C. D. Dillard, and A. L. Tappel, *Anal. Biochem.* **52**, 1 (1973). DOI: 10.1016/0003-2697(73)90327-811
24. J. P. Carreau and J. P. Dubacq, *J. Chromatogr.* **151** (3), 384 (1979). DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9Get
25. J. Wang, H. Sunwoo, G. Cherian, and I. S. Sim, *Poult. Sci.* **79** (8), 1168 (2000). DOI: 10.1093/ps/79.8.1168
26. R. V. Golovina and T. E. Kuzmenko, *Chromatography* **10** (9), 545 (1977).
27. Л. Д. Лукьянова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **124** (9), 244 (1997).
28. Е. Г. Доркина, *Эксперим. клинич. фармакология* **73** (4), 35 (2010).
29. I. Scott and D. C. Logan, *New Phytologist* **177**, 90 (2008).
30. C. C. C. R. de Carvalho and M. J. Caramujo, *Molecules* **23** (10), 2583 (2018). DOI: 10.3390/molecules23102583
31. J. Petereit, K. Katayama, Ch. Lorenz, et al., *Front. Plant Sci.* **8**, 72 (2017). DOI: 10.3389/fpls.2017.00072.

Resveratrol Prevents Stress-Related Dysfunction of Mitochondria

V.I. Binyukov*, I.V. Zhigacheva*, E.M. Mil'*, N.I. Krikunova*, and M.M. Rasulov**

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**State Scientific Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, shosse Entuziastov 38, Moscow, 105118 Russia

This study was conducted to investigate the antistress potential of resveratrol, a natural polyphenol, in models that reproduce the conditions of acute hypobaric hypoxia and acute alcohol intoxication. Acute alcohol intoxication and acute hypobaric hypoxia induced an increase in the intensity of lipid peroxidation in the membranes of liver mitochondria from mice. Activation of lipid peroxidation was accompanied by swelling and variations in the levels of fatty acids with C₁₈ and C_{20–22n} in the composition of the total lipid fraction of mitochondrial membranes. The index of the unsaturation of fatty acids with C18 was decreased by 7.5% (from 1.69 ± 0.01 to 1.52 ± 0.01). Moreover, the index (20:3ω6+20:5ω3)/22:6ω3 was decreased from 0.23 ± 0.02 to 0.13 ± 0.01 for fatty acids under acute hypobaric hypoxia conditions, suggesting a decrease in eicosanoid metabolism. The administration of 2 · 10⁻⁵ mol/kg of resveratrol in animals for five days prevented changes in fatty acid composition, inhibiting activation of lipid peroxidation and swelling of mitochondria, thereby affecting physiological parameters. Thus, the adaptogenic properties of resveratrol may be ascribed to the prevention of lipid peroxidation in mitochondrial membranes, that probably affect functional state of these organelles, contributing to the maintenance of cell energy metabolism under stress conditions.

Keywords: adaptogens, mitochondria, lipid peroxidation, hypoxia, acute alcohol intoxication