

УДК 577.23

ДЕЙСТВИЕ АСТАКСАНТИНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА КРЫС ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

© 2022 г. Р.Р. Крестинин*, Ю.Л. Бабурина*, И.В. Одинокова*,
Л.Д. Сотникова*, О.В. Крестинина*.*#

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

#E-mail: ovkres@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2022 г.

После доработки 07.07.2022 г.

Принята к публикации 18.07.2022 г.

Изучено влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга у крыс с сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность была достигнута путем введения изопротеренола крысам подкожно. Хроническое введение астаксантина осуществляли перорально. Обнаружено, что инъекция изопротеренола ухудшала функциональное состояние митохондрий мозга крыс, в то время как введение астаксантина снимало эффект изопротеренола и функциональное состояние митохондрий у крыс с сердечной недостаточностью улучшалось. При этом дыхательный контроль митохондрий мозга крыс повышался. Содержание основных субъединиц, таких как альфа-субъединица комплекса V, митохондриально кодируемая цитохром с-оксидаза I комплекса IV, фактор сборки комплекса убихинооксидоредуктазы 8 комплекса I, сукцинатдегидрогеназный комплекс II, цитохром *b-c1* комплекс субъединицы 2 комплекса III увеличивалось. Изопротеренол ускорял Ca^{2+} -индуцированное набухание митохондрий, тогда как астаксантин этот параметр снижал. Астаксантин оказывал защитное действие на митохондрии.

Ключевые слова: сердечная недостаточность, митохондрии мозга крыс, астаксантин, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0006302922050088, EDN: JIJTXD

Митохондрии считаются важными клеточными органеллами потому что более 90% энергии, которая идет на многочисленные процессы, происходящие в клетке, производится именно митохондриями. Кроме того, митохондрии принимают участие в заболеваниях различной этиологии. Поддержание структурной и функциональной целостности митохондрий – важнейшая предпосылка для нормальной функции клетки. Митохондрии являются основным источником активных форм кислорода, дисбаланс которых в организме приводит к нарушению функционирования митохондрий т.е. к митохондриальной дисфункции. В свою очередь, митохондриальная дисфункция может вызывать окислительный стресс, что приводит к возникновению различных заболеваний. Окислительный стресс является

одной из причин возникновения различных заболеваний у человека, таких как метаболический синдром и нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и воспалительные заболевания [1]. Снизить окислительный стресс способны антиоксиданты [2]. Существуют антиоксиданты, которые вырабатываются организмом человека, и те, которые поступление которых возможно только извне, например, с продуктами питания. Под воздействием различных факторов, таких как загрязнение атмосферы, травмы, стресс и других, количество антиоксидантов, вырабатываемых в организме уменьшается, это может привести к возникновению различных заболеваний. Одним из интересных для исследования антиоксидантов является астаксантин, представляющий собой вещество красного цвета. Он принадлежит к семейству каротиноидов, подклассу ксантофилов; обладает сильной антиоксидантной способностью и может поглощать синглетный кислород и свободные радикалы [3]. Большое количество астаксантина содержится в водоросли *Hematococcus pluvialis*, кроме того он встречается в дрожжах

Сокращения: ИЗО – изопротеренол, ММК – митохондрии мозга крысы, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, МТСО1 – митохондриально кодируемая цитохром с-оксидаза I комплекса IV, С1П-UQCRC2 – цитохром *b-c1*-комплекс субъединицы 2 комплекса III, ДК – дыхательный контроль.

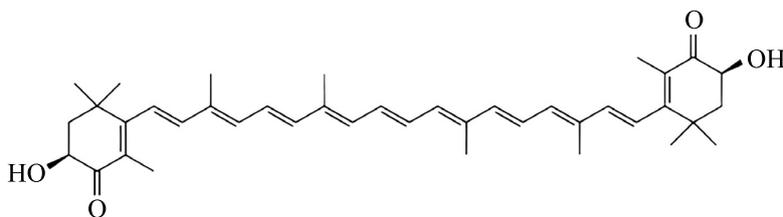


Рис. 1. Химическая структура астаксантина.

и морских животных, таких как лосось, форель, креветки и омары. Структурно молекула астаксантина представляет собой длинный полиеновый скелет с полярными иононовыми кольцами на концах (рис. 1). Наличие полярных гидроксильных и карбонилсодержащих иононовых колец наделяет его более высокой антиоксидантной способностью по сравнению с другими каротиноидами [4]. Астаксантин имеет уникальную молекулярную структуру, которая позволяет ему оставаться как внутри, так и вне клеточной мембраны [5]. Известно, что астаксантин значительно ослабляет митохондриальную дисфункцию, связанную с ишемическим повреждением миокарда, может снижать окислительный стресс [6] и предотвращать развитие сердечно-сосудистых заболеваний [7–9].

Сердечная недостаточность приводит к уменьшению кровотока из-за снижения эффективности сердечной мышцы [10]. У пациентов с сердечной недостаточностью были обнаружены как анатомические, так и функциональные повреждения головного мозга [11]. Причиной может быть недостаточное снабжение кислородом организма, в том числе головного мозга. Исследования, проведенные авторами работы [12], показали, что астаксантин улучшает обучение и уменьшает ослабление памяти и повреждение нейронов. Его применение увеличивало количество пирамидных нейронов гиппокампа и восстанавливало нормальную морфологию нейронов.

Изопротеренол (ИЗО) — неселективный агонист бета-адренорецепторов. Введение ИЗО представляет собой модель, имитирующую стресс-индуцированные повреждения в различных сердечных патологиях [13]. Целью настоящей работы было исследовать влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс (ММК) с сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность была вызвана инъекцией ИЗО модели, признанной в международном сообществе и успешно применяемой в нашей лаборатории [14, 15]. Были исследованы дыхательные активности в ММК, изменение основных субъединиц комплексов дыхательной цепи и набухание ММК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка животных к эксперименту. В эксперименте были использованы 16 крыс-самцов линии Wistar, массой 240–250 г (возраст два месяца). Животных содержали индивидуально в помещении с регулируемой температурой (22°C) и кормили стандартной диетой с полным доступом к воде и пище. Для экспериментов крыс разделили на четыре группы (по четыре крысы в каждой группе). Первая группа была контрольной, крысам второй группы вводили перорально растворенный в оливковом масле астаксантин (Natural, Китай) в дозе 150 мг/кг в течение двух недель. Крысам третьей группы для индукции сердечной недостаточности делали инъекцию растворенным в воде ИЗО (100 мг/кг) дважды с интервалом 24 ч. Крысам четвертой группы вводили астаксантин (150 мг/кг) в течение двух недель. Животные первой и третьей групп получали равное количество оливкового масла. Через две недели крысам четвертой группы делали инъекцию ИЗО дважды с интервалом в 24 ч [14, 15], а крысам первой и второй групп вводили физиологический раствор. Митохондрии выделяли из мозга крыс каждой экспериментальной группы.

Приготовление тканевых лизатов. От левого желудочка сердца отрезали 6–7 мг ткани. К кусочку ткани сердца добавляли RIPA-буфер с коктейлем протеаз (4°C), гомогенизировали и перемешивали на орбитальном шейкере в течение 2 ч при температуре 4°C. Полученные образцы центрифугировали при 10000 g в течение 20 мин при 4°C. Концентрацию белка в тканевых лизатах определяли по методу Брэдфорда, она составляла 2 мг/мл.

Выделение митохондрий мозга крыс. Мозг крыс быстро (в течение 30 с) извлекали и помещали в раствор, содержащий 320 мМ сахарозы, 0.5 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ЭГТА, 0.02% бычьего сывороточного альбумина (фракция V, не содержащая жирных кислот) и 10 мМ трис-HCl, pH 7.4. Ткань мозга гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе; отношение мозговой ткани к среде выделения составляло 1 : 10 (масса/объем). Гомогенат центрифугировали при 2000 g в течение 3 мин. Нечистый митохондриальный осадок получали путем центрифугирования полученного суперна-

танта при 12500 *g* в течение 10 мин. Затем митохондрии очищали в градиенте Перколла (3–10–15–24%). Несинаптические митохондрии мозга суспендировали в растворе, содержащем 320 мМ сахарозы и 10 мМ трис-НСl, рН 7.4, центрифугировали при 11500 *g* в течение 10 мин и ресуспендировали в том же буфере. Все процедуры проводили при 4°C [16]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда (Bio-Rad Protein assay; Bio-Rad, Германия), она составляла 25–30 мг/мл.

Измерение дыхательной активности митохондрий. Митохондрии (1 мг белка/мл) инкубировали при 25°C в среде, содержащей 125 мМ КСl, 10 мМ трис (рН 7.4) и 2 мМ К₂НРО₄. В экспериментах в качестве дыхательных субстратов использовали глутамат (5 мМ) и малат (5 мМ). Эксперимент проводили в закрытой камере после добавления 150 мкМ АДФ к ММК. Оценивали скорость потребления кислорода ($V_{st.2}$, $V_{st.3}$ и $V_{st.4}$; нг-атом О/мин/мг белка).

Измерение митохондриального набухания. Набухание митохондрий определяли путем изменения светорассеяния в митохондриальной суспензии при длине волны 540 нм (A_{540}) на спектрофотометре Tecan I-Control Infinite 200 (Tecan Group Ltd, Швейцария) при 25°C. Стандартная среда инкубации для анализа набухания содержала 125 мМ КСl, 10 мМ трис, 0.4 мМ КН₂РО₄, 5 мМ глутамата и 5 мМ малата. Концентрация митохондриального белка в лунке составляла 0.5 мг белка/мл. Набухание инициировали добавлением 120 нмоль Са²⁺ на мг белка. Процесс набухания характеризовался временем достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ($T_{1/2}$).

Электрофорез и вестерн-блоттинг. Аликвоты тканевых лизатов (1 мг/мл), солюбилизованные в буфере Лэммли (Bio-Rad, США), наносили по 20 мкг на каждую ячейку и разделяли при помощи электрофореза (12.5% SDS-PAGE) на белки по массе. Переносили белки с геля на нитроцеллюлозную мембрану (0.2 мкм) и блокировали в растворе Roti-block (Karl Roth, Германия) в течение 1 ч. Полученные мембраны окрашивали антителами к миоглобину, тропонину I и лактатдегидрогеназе (ЛДГ) (Abcam, Великобритания). Моноклональные антитела к глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) (SantaCruz, США) использовали как контроль белковой нагрузки.

Аликвоты лизатов выделенных интактных митохондрий (2 мг/мл) из каждой группы переносили в пробирки и солюбилизовали в буфере Лэммли (Bio-Rad, США). Образцы митохондриального белка (20 мкг) наносили на каждую линию и разделяли при помощи электрофореза (12.5% SDS-PAGE) по массе, затем осуществляли перенос с геля на нитроцеллюлозную мембрану

(0.2 мкм) методом вестерн-блоттинга. Изменения в уровнях субъединиц электронно-транспортной цепи определяли с помощью коктейля антител Total OxpHos Rodent WB Antibody Cocktail (ab 110413, Abcam, Великобритания). Коктейль антител OxpHos состоит из альфа-субъединицы комплекса V (CV-АТР5А, 55 кДа), цитохром *b*-с1-комплекса субъединицы 2 комплекса III (СIII-UQCRC2, 48 кДа), митохондриально кодируемой цитохром *c*-оксидазы I комплекса IV (СIV-МТ-СО1, 40 кДа), сукцинатдегидрогеназного комплекса II (СII-SDHB, 30 кДа), фактора сборки комплекса убихиноноксидоредуктазы 8 комплекса I (СI-NDUFB8, 20 кДа). СОХIV (Abcam, Великобритания) использовали для нормирования белковой нагрузки.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали среднее значение параметров из трех-четырех экспериментов $\pm SD$. Статистическую достоверность считали с использованием тестов *t*-критерия Стьюдента и *t*-критерия Стьюдента–Ньюмана–Кайло.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сначала мы проверили изменение содержания белков, таких как миоглобин, тропонин I и лактатдегидрогеназа, с целью выявления нарушения функционирования сердца в присутствии изопротеренола. Для этого тканевые лизаты сердца разделяли на белки по массе методом электрофореза в системе Лэммли, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали антителами к миоглобину, тропонину I и ЛДГ. Как видно из рис. 2, уровень всех белков в тканевых лизатах сердца третьей группы (с инъекциями ИЗО) снижался. На рис. 2а–в в верхней части показан вестерн-блоттинг исследуемых белков. В нижней части рисунка представлено количественное соотношение белковых полос после нормирования их по GAPDH. Снижение содержания белков в тканевых лизатах у крыс после инъекции ИЗО (сравнение колонок 3 и 1) свидетельствует о нарушении функционирования сердца. Астаксантин снимал эффект ИЗО, и уровень белков повышался (сравнение колонок 4 и 3).

Следующим этапом исследования было выяснить влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга крыс с сердечной недостаточностью. В табл. 1 представлены результаты влияния астаксантина на дыхательные активности в митохондриях мозга крыс, которым вводили ИЗО для достижения сердечной недостаточности. Скорость потребления кислорода в состояниях 2 ($V_{st.2}$) отражает субстрат-зависимое дыхание изолированных митохондрий, а в состоянии 3 ($V_{st.3}$) – скорость потребления кислорода митохондриями в фосфорилирующем состоянии.

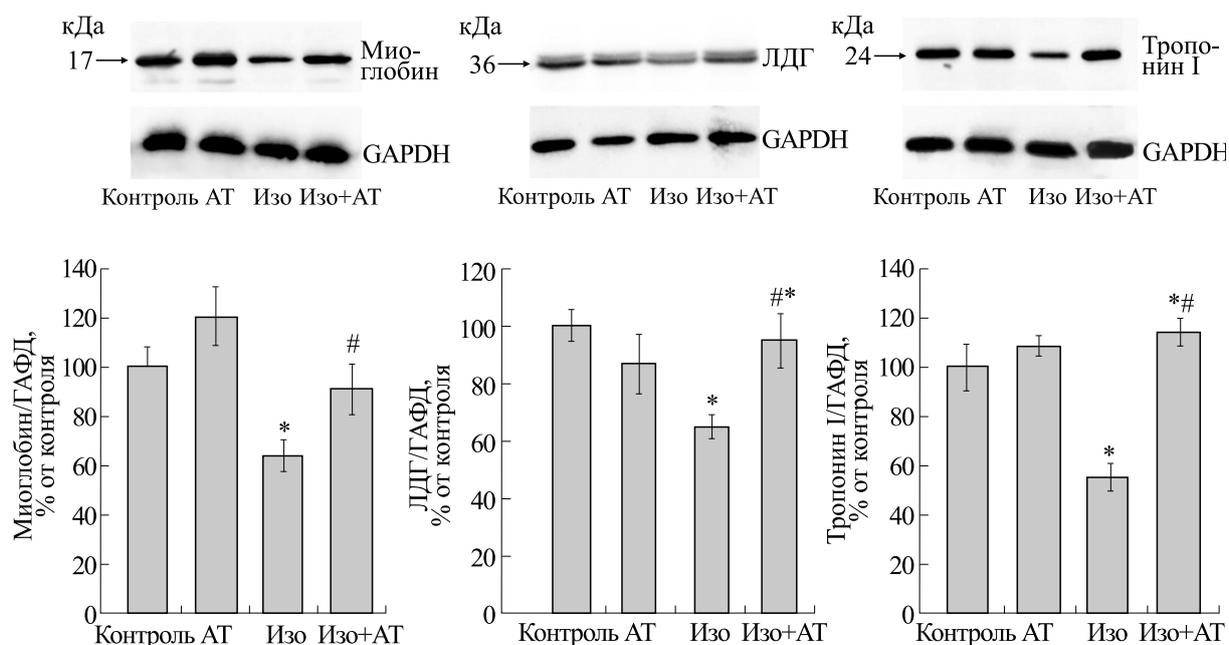


Рис. 2. Влияние астаксантина (АТ) и изопротеренола (ИЗО) на изменение содержания миоглобина, тропонина I и ЛДГ в тканевых лизатах сердца крыс. Образцы белка экстрагировали и подвергали вестерн-блоттингу. GAPDH использовали как контроль белковой нагрузки. В верхнем ряду – иммуноокрашивание антителами к миоглобину, ЛДГ, тропонину I и GAPDH; в нижнем ряду – количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, представленная как отношение количества отдельных белков к GAPDH; данные представлены как среднее \pm SD трех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$ – достоверная разница в уровне белка по сравнению с контролем (первая группа); # – $p < 0.05$ по сравнению с ММК, изолированными из крыс, которым вводили ИЗО (третья группа). Статистическую значимость оценивали с помощью теста Стьюдента–Ньюмена–Кейлса.

Мы наблюдали, что $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ снижалась на 50 и 30% соответственно в ММК после инъекций ИЗО по сравнению с контролем. Хроническое введение астаксантина не повлияло на скорости потребления кислорода в $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ по сравнению с контролем. Однако $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ в ММК из четвертой группы повышались на 70 и 60% соответственно по сравнению с ММК, изолированными из группы крыс после инъекции ИЗО. Скорость

потребления кислорода в состоянии 4 ($V_{st.4}$, скорость дыхания в отрегулированном состоянии после истощения избытка АДФ) в ММК с инъекцией ИЗО замедлялась на 35% по сравнению с контролем. После введения астаксантина в сочетании с ИЗО $V_{st.4}$ в ММК не изменилась по сравнению с контролем и увеличивалась на 30% относительно $V_{st.4}$ в ММК, изолированных из крыс, которым вводили ИЗО. Показателем работоспо-

Таблица 1. Влияние астаксантина и изопротеренола на дыхательную активность митохондрий, изолированных из каждой группы крыс

	$V_{st.2}$	$V_{st.3}$	$V_{st.4}$	RCI
Первая группа	14.37 \pm 1.8	102.06 \pm 6.26	12.35 \pm 3.69	8.26 \pm 1.1
Вторая группа	13.07 \pm 1.6	99.5 \pm 13.78	12.81 \pm 2.67	7.76 \pm 1.32
Третья группа	7.65 \pm 1.12*	77.74 \pm 3.74*	14.23 \pm 0.51*	5.46 \pm 0.98
Четвертая группа	12.99 \pm 0.54#	116.84 \pm 2.19#	12.65 \pm 0.61#	9.17 \pm 2.73*#

Примечание. Показатели дыхательной активности в состояниях 2, 3 и 4 определяли, как число нг-атомов кислорода, потребляемых митохондриями в минуту на мг белка. ДК рассчитывается как отношение $V_{st.3}$ к $V_{st.4}$; данные представлены как среднее \pm SD четырех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$, указывает на достоверную разницу относительно контроля (ММК из первой группы); # – $p < 0.05$, указывает на достоверную разницу по сравнению с ММК, изолированными из группы крыс, которым вводили ИЗО (третья группа).

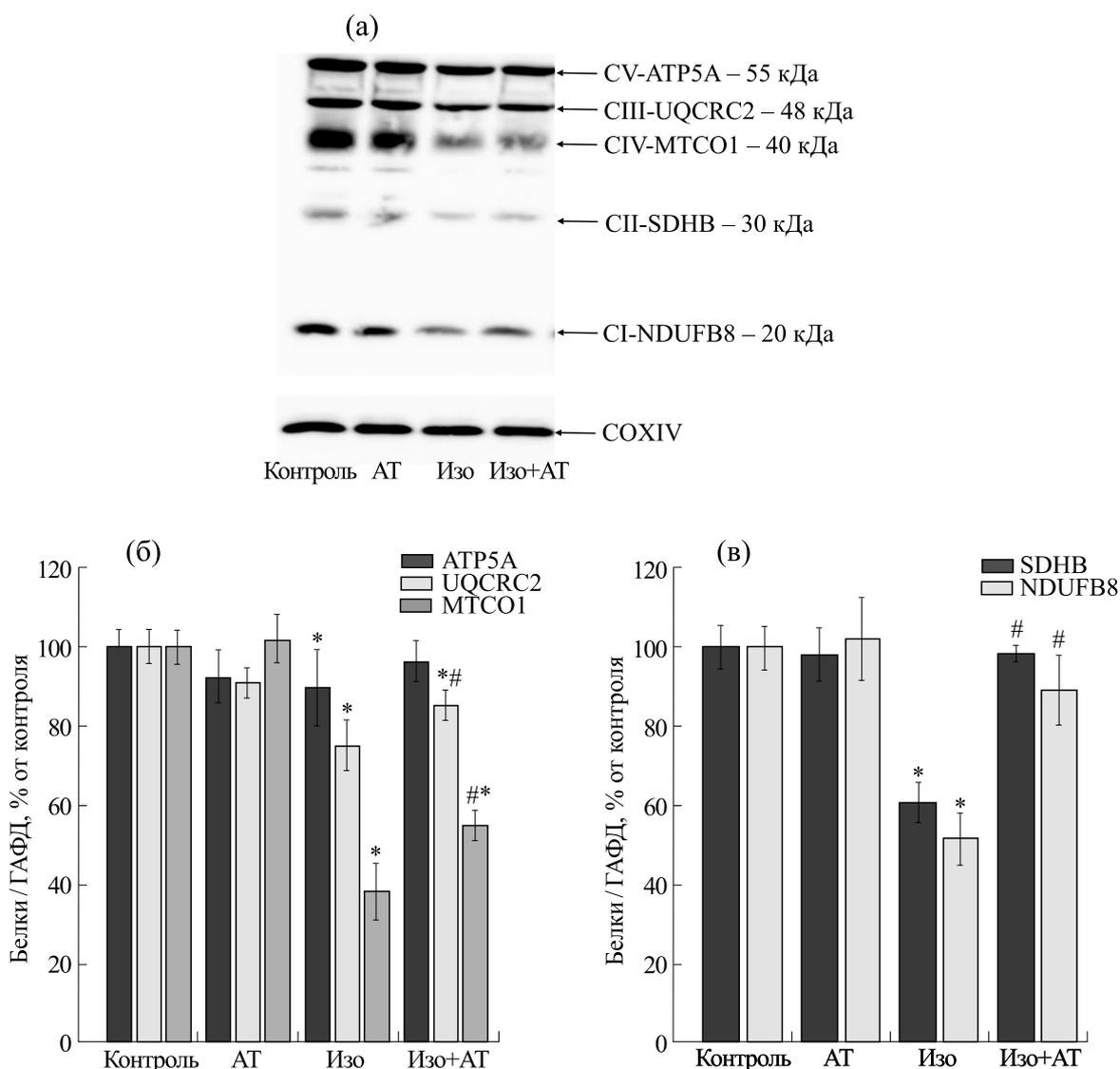


Рис. 3. Влияние астаксантина и ИЗО на изменение уровней основных субъединиц комплексов дыхательной цепи в ММК. COXIV был использован в качестве контроля белковой нагрузки. (а) – Иммуноокрашивание коктейлем антител OXPHOS и COXIV; (б) и (в) – количественная оценка иммунного окрашивания с помощью компьютерной денситометрии, данные представлены как среднее \pm SD из трех независимых экспериментов. * – $p < 0.05$ свидетельствует о достоверном различии уровня белка по сравнению с контролем (первая группа); # – $p < 0.05$ по сравнению с ММК, изолированными из крыс, которым вводили ИЗО (третья группа). Статистическую значимость оценивали с помощью теста ANOVA типа 2 (критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

способности митохондрий является коэффициент дыхательного контроля (ДК), который рассчитывается как отношение $V_{st.3}/V_{st.4}$. Следует отметить, что ДК у крыс, которым вводили астаксантин, не изменялся по отношению к ДК контрольных крыс. ДК в митохондриях крыс после инъекции ИЗО снижался приблизительно на 40%, в то время как ДК в митохондриях крыс, получавших астаксантин, с последующей инъекцией ИЗО увеличился на 40% по сравнению с ДК в митохондриях крыс, которым вводили ИЗО.

Далее мы проанализировали изменение содержания основных субъединиц комплексов электрон-транспортной цепи в интактных ММК, выделенных из каждой группы крыс. На рис. 3а показан вестерн-блоттинг основных субъединиц комплексов дыхательной цепи, таких как CV-ATP5A (55 кДа), CIII-UQCRC2 (48 кДа), CIV-MTCO1 (40 кДа), CII-SDHB (30 кДа), CI-NDUFB8 (20 кДа). COX IV использовали как контроль белковой нагрузки. На рис. 3б,в изображены диаграммы, отражающие количественное соотношение белковых полос после нормирования их

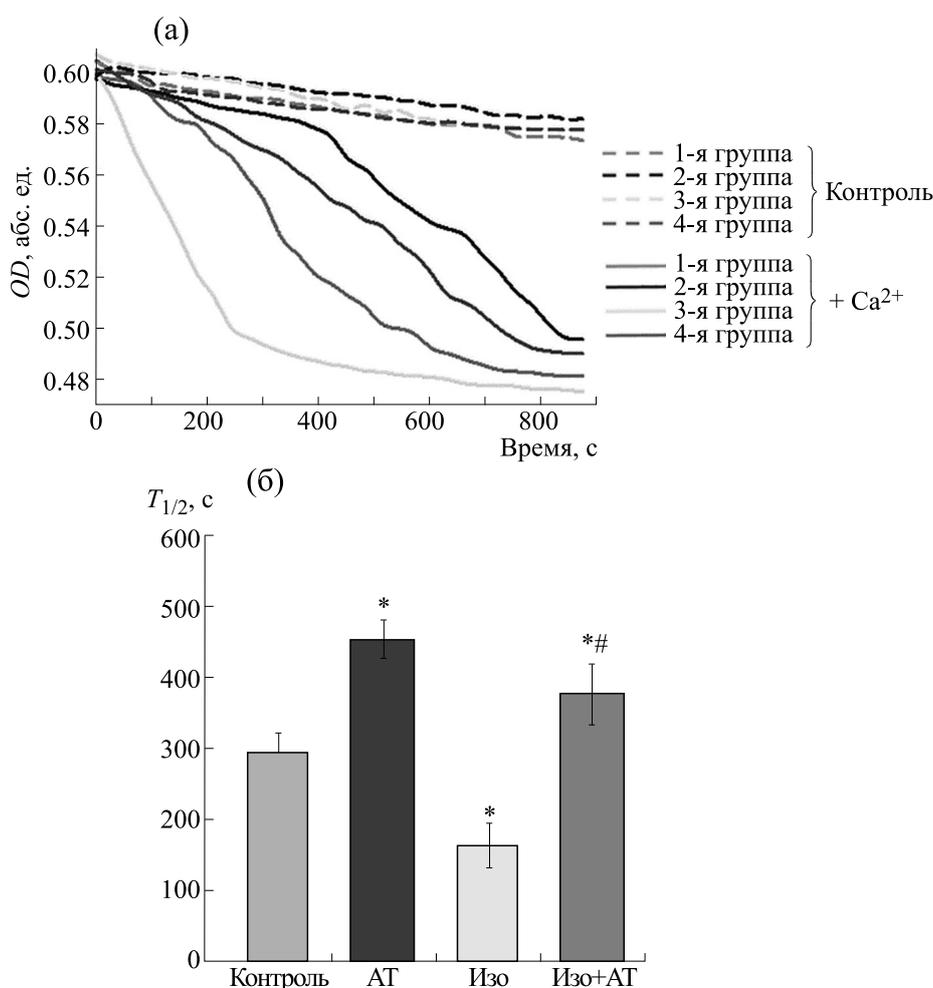


Рис. 4. Влияние астаксантина и ИЗО на набухание митохондрий мозга крыс: (а) — кривые набухания ММК, изолированных из крыс каждой группы; (б) — диаграмма, отражающая время достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ($T_{1/2}$). Набухание инициировалось ионами Ca^{2+} и составляло 120 нмоль на мг белка. Данные представлены как среднее \pm SD из четырех независимых экспериментов. * — $p < 0.05$ указывает на достоверную разницу в $T_{1/2}$ относительно контроля (первая группа); # — $p < 0.05$ по сравнению с ММК, изолированными из крыс, которым вводили ИЗО (третья группа). Статистическую значимость различий оценивали с помощью теста ANOVA типа 2 (критерий Стьюдента–Ньюмена–Кейлса).

по COX IV. Введение астаксантина не изменяло уровень всех субъединиц комплексов дыхательной цепи по сравнению с контролем (вторая группа против первой), тогда как инъекция ИЗО снижала содержание CV-ATP5A на 15%, CIII-UQCRC2 — на 25%, CIV-MTCO1 — на 60%, CII-SDHB — на 40%, а CI-NDUF8 — на 50% относительно контроля (третья группа против первой). При комбинированном действии астаксантина и ИЗО мы наблюдали, что по сравнению с контролем не было изменений в содержании CV-ATP5A-, CII-SDHB- и CI-NDUF8-субъединиц, однако содержание CIII-UQCRC2 и CIV-MTCO1 снижалось на 15 и 45% соответственно (четвертая группа против первой). Следует отметить, что содержание CV-ATP5A увеличивалось на 10%, CIII-UQCRC2 — на 10%, CIV-MTCO1 — на 17%, CII-SDHB — на

38% и CI-NDUF8 — на 35% по сравнению с содержанием субъединиц в ММК, изолированных из группы крыс с инъекцией ИЗО (четвертая группа против третьей).

Общепринято, что при разобщении окислительного фосфорилирования наблюдается изменение проницаемости митохондриальной мембраны. Поэтому на следующем этапе нашего исследования мы измерили набухание митохондрий в наших экспериментальных условиях. На рис. 4а показаны кривые набухания митохондрий, изолированных из всех групп крыс. Набухание инициировалось ионами Ca^{2+} (120 нмоль на мг белка). Рис. 4б количественно отражает процесс набухания, охарактеризованный временем достижения полумаксимального сигнала све-

торассеяния ($T_{1/2}$). $T_{1/2}$ митохондрий в присутствии астаксантина увеличивался в полтора раза по сравнению с контролем (вторая группа против первой), т.е. скорость набухания снижалась. Инъекция ИЗО привела к тому, что $T_{1/2}$ набухания в ММК снижалась в два раза по сравнению с контролем (третья группа против первой), т.е. скорость набухания повышалась. Введение астаксантина крысам с последующей инъекцией ИЗО увеличивало $T_{1/2}$ на 20% по сравнению с контролем (четвертая группа против первой) и более чем в два раза снижало по сравнению с $T_{1/2}$ в ММК с инъекцией ИЗО (четвертая группа против третьей).

ОБСУЖДЕНИЕ

Митохондриальная дисфункция может быть причиной различных заболеваний, таких как нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, различные поражения печени и скелетно-мышечной системы, сепсис и психические расстройства [17]. Митохондриальная дисфункция, вызванная окислительным повреждением, вызывает морфологические и функциональные изменения в митохондриях. При патологических состояниях структурные изменения, возникающие при окислительных повреждениях, такие как набухание, фрагментация митохондрий и деление митохондрий, становятся более выраженными [18]. При возникновении различных заболеваний может происходить уменьшение потребления кислорода митохондриями и, как следствие, возникает митохондриальная дисфункция [19]. Митохондриальная дисфункция характеризуется потерей эффективности цепи переноса электронов и снижением синтеза высокоэнергетических молекул, таких как аденозин-5'-трифосфат (АТФ), что характерно для хронических заболеваний [20]. Ранее мы показали, что астаксантин улучшал функциональное состояние митохондрий сердца крыс при сердечной недостаточности [7–9].

Авторы работы [21] показали, что в результате поражения сердца сердечная недостаточность может индуцировать повреждения головного мозга, поскольку у пациентов с сердечной недостаточностью были обнаружены как анатомические, так и функциональные повреждения головного мозга. Было показано, что повреждения головного мозга наблюдаются в широком диапазоне клинических состояний и сердечных функций, кроме того, они могут влиять на результаты лечения пациентов. Существуют данные, показывающие участие нейрогормональных, пищевых и воспалительных механизмов в этом сложном процессе [21]. В настоящей работе был исследован эффект астаксантина на функцио-

нальное состояние митохондрий мозга, изолированных из крыс с сердечной недостаточностью. Сердечная недостаточность была достигнута путем инъекции изопроterenолола, модели широко используемой в международном научном сообществе [14, 15]. Снижение уровней белков, таких как миоглобин, тропонин I и ЛДГ в тканевых лизатах левого желудочка сердечной мышцы показало, что сердечная недостаточность была достигнута.

В различных патологиях наблюдается снижение скорости потребления кислорода митохондриями, это может быть связано с нарушением работы переносчиков электронов [22]. Известно, что при окислительном стрессе или гипоксии скорость потребления кислорода митохондриями в $V_{st.3}$ снижается. Кроме того, низкая скорость дыхания неповрежденных митохондрий в состоянии $V_{st.4}$ может быть связана с тем, что высокий мембранный потенциал препятствует переносу протонов через внутреннюю мембрану, и тем самым останавливает поток электронов. Утечка ионов через мембрану снимает мембранный потенциал и приводит к увеличению скорости дыхания $V_{st.4}$. Повышение $V_{st.4}$ может происходить также благодаря увеличению проницаемости внутренней мембраны митохондрий. В настоящей работе мы заметили, что в ММК, изолированных из крыс третьей группы (инъекция ИЗО), $V_{st.3}$ снижался, а $V_{st.4}$ увеличивался по сравнению с контролем, что приводило к снижению ДК митохондрий. Напротив, мы заметили, что $V_{st.3}$ увеличивался, а $V_{st.4}$ снижался в митохондриях в группе крыс, которым вводили астаксантин, с последующей инъекцией ИЗО. Астаксантин отменял эффект ИЗО и ДК митохондрий увеличивался.

Известно, что электрон-транспортная цепь во внутренней митохондриальной мембране состоит из трансмембранных белковых комплексов (I–IV) и свободно движущихся переносчиков электронов — убихинона и цитохрома *c*. Для правильной работы комплексы должны быть собраны в специально образованный суперкомплекс. Эти собранные компоненты вместе с комплексом V становятся основой для производства АТФ при окислительном фосфорилировании. Следует отметить, что дефекты дыхательных комплексов и АТФ-синтазы влияют на митохондриальные функции [23, 24]. В наших экспериментальных условиях уровень основных субъединиц комплексов дыхательной цепи в ММК, изолированных из крыс третьей группы (инъекция ИЗО) снижался, что свидетельствовало о снижении митохондриальной эффективности. Астаксантин отменял эффект ИЗО и содержание субъединиц в интактных ММК повышалось.

Снижение скорости потребления кислорода митохондриями может происходить также и в результате разрыва мембран и набухания митохондрий, вследствие чего проницаемость внутренней мембраны митохондрий может изменяться [25]. Ранее мы наблюдали, что скорость набухания митохондрий сердца, изолированных из крыс с сердечной недостаточностью, увеличивалась, тогда как астаксантин предотвращал эффект ИЗО и скорость набухания снижалась [7, 8]. В настоящем исследовании мы заметили тот же эффект в митохондриях мозга крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы изучили влияние астаксантина на функциональное состояние митохондрий мозга у крыс с сердечной недостаточностью, вызванной инъекцией ИЗО. Мы показали, что в условиях сердечной недостаточности скорость потребления кислорода в состоянии 3 снижалась, а в состоянии 4 увеличивалась, вследствие чего снижался и дыхательный контроль, в то время как астаксантин снимал воздействие ИЗО, дыхательный контроль повышался, и функциональное состояние митохондрий улучшалось. Кроме того, астаксантин повышал уровень основных субъединиц комплексов дыхательной цепи и АТФ синтазы в митохондриях мозга у крыс с сердечной недостаточностью, тем самым снижая проницаемость внутренней мембраны, что также улучшало функциональное состояние мозга крыс. Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что астаксантин выполняет защитную функцию в митохондриях, повышая их эффективность. Поэтому астаксантин можно рассматривать как важный ингредиент в питании для профилактики возникновения сердечно-сосудистых заболеваний и повреждений головного мозга.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе были использовано научное оборудование Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 20-04-00131 и № 20-015-00072), а также Государственного задания 075-01027-22-00.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Опыты проводили в соответствии с Положением о проведении исследований на экспериментальных животных (приказ Минздрава России от 12 августа 1997 г. № 755). Протокол одобрен комиссией по биологической безопасности и этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (протокол №05/2022 от 05 марта 2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. S. Bhatti, G. K. Bhatti, and P. H. Reddy, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863** (5), 1066 (2017).
2. B. Halliwell, *Biochem. Soc. Symp.*, **61**, 73 (1995).
3. J. P. Yuan, J. Peng, K. Yin, and J. H. Wang, *Mol. Nutr. Food Res.*, **55** (1), 150 (2011).
4. R. R. Ambati, S. M. Phang, S. Ravi, and R. G. Aswathanarayana, *Mar. Drugs*, **12** (1), 128 (2014).
5. I. Higuera-Ciapara, L. Felix-Valenzuela, and F. M. Goycoolea, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **46** (2), 185 (2006).
6. S. H. Kim and H. Kim, *Nutrients*, **10** (9), 1137 (2018).
7. Y. Baburina, R. Krestinin, I. Odinkova, et al., *Antioxidants (Basel)*, **8** (12), 576 (2019).
8. R. Krestinin, Y. Baburina, I. Odinkova, et al., *Biomedicines*, **8** (10), 437 (2020).
9. O. Krestinina, Y. Baburina, R. Krestinin, et al., *Antioxidants (Basel)*, **9** (3), 262 (2020).
10. K. Mueller, F. Thiel, F. Beutner, et al., *Circ Res.*, **126** (6), 750 (2020).
11. O. Havakuk, K. S. King, L. Grazette, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **69** (12), 1609 (2017).
12. C. Galasso, I. Orefice, P. Pellone, et al., *Mar. Drugs*, **16** (8), 247 (2018).
13. P. Balakumar, A. P. Singh, and M. Singh, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **56** (1), 1 (2007).
14. P. Akila, L. Asaikumar, and L. Vennila, *Biomed. Pharmacother.*, **85**, 582 (2017).
15. I. Odinkova, Y. Baburina, A. Kruglov, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (6), 1555 (2018).
16. Y. Baburina, I. Odinkova, T. Azarashvili, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (11), 3499 (2018).
17. G. T. Rezin, G. Amboni, A. I. Zugno, et al., *Neurochem. Res.*, **34** (6), 1021 (2009).
18. S. H. Kim, J. W. Lim, and H. Kim, *Nutrients*, **10** (9), 1320 (2018).
19. P. M. Herst, M. R. Rowe, G. M. Carson, and M. V. Berridge, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **8**, 296 (2017).
20. P. H. Reddy and T. P. Reddy, *Curr. Alzheimer Res.*, **8** (4), 393 (2011).
21. J. S. Bock and S. S. Gottlieb, *Circulation*, **121** (23), 2592 (2010).
22. C. Guo, L. Sun, X. Chen, and D. Zhang, *Neural Regen. Res.*, **8** (21), 2003 (2013).
23. R. Guo, S. Zong, M. Wu, et al., *Cell*, **170** (6), 1247 (2017).
24. S. Iwata, J. W. Lee, K. Okada, et al., *Science*, **281** (5373), 64 (1998).
25. K. A. Webster, *Future Cardiol.*, **8** (6), 863 (2012).

The Effect of Astaxanthin on the Functional State of Rat Brain Mitochondria in Heart Failure

R.R. Krestinin*, Yu.L. Baburina*, I.V. Odinkova*, L.D. Sotnikova*, and O.V. Krestinina*

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

The effect of astaxanthin on the functional state of brain mitochondria in rats with heart failure was studied. The induction of heart failure in rats was performed through subcutaneous injection of isoproterenol. Astaxanthin was chronically administered through the oral route. It was found that application of isoproterenol impaired the functional state of rat brain mitochondria, while administration of astaxanthin abolished the effect of isoproterenol and improved the functional state of mitochondria in rats with heart failure. At the same time, the respiratory control index of rat brain mitochondria increased. The content of the main subunits, such as alpha subunits of complex V, mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I of complex IV, ubiquinone oxidoreductase complex assembly factor 8 of complex I, succinate dehydrogenase (complex II), cytochrome *b-c1* complex subunit 2 of complex III increased. Isoproterenol accelerated Ca^{2+} -induced swelling of mitochondria, while astaxanthin reduced this parameter. Astaxanthin exhibited a protective effect on mitochondria.

Keywords: heart failure, rat brain mitochondria, astaxanthin, mitochondrial dysfunction, oxidative stress