

на правах рукописи

Крестинин Роман Русланович

**Защитное действие астаксантина при дисфункции
в митохондриях сердца крыс и в кардиомиоцитах линии H9c2**

Специальность 1.5.2. – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино - 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пущино.

Научный руководитель: к.б.н. **Крестинина Ольга Владимировна**,
ведущий научный сотрудник ИТЭБ РАН

Официальные оппоненты: д.х.н. **Сергеева Марина Глебовна**, ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

д.б.н. **Бережнов Алексей Валерьевич**, ведущий научный сотрудник, Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита диссертации состоится «18» марта 2025 г. в 15:30 часов на заседании Совета 24.1.127.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.
С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <http://iteb.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Бобылева Лия Гивиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) находятся на одном из первых мест по распространенности и в настоящее время являются одной из главных причин инвалидности и смерти населения во многих развитых странах. ССЗ по праву называют «эпидемией 21 века». Несмотря на непрерывное развитие науки и внедрение новых медицинских технологий, позволяющих проводить раннюю диагностику, значительного снижения смертности от ССЗ, как в России, так и во всем мире достичь не удастся. Всемирная организация здравоохранения в настоящее время отмечает, что ССЗ будут играть ключевую роль в смертности людей ещё длительное время. Отсюда следует, что ССЗ по-прежнему является важнейшей социальной и медико-биологической проблемой.

Известно, что патогенез ССЗ, включая инфаркт миокарда (ИМ), является многофакторным и до настоящего времени полностью не выяснен. Общеизвестно, однако, что дисфункция митохондрий кардиомиоцитов играет ключевую роль в развитии заболевания (Chang, 2021; Ponasenko, 2019). Поэтому очевидно, что выявление механизмов нарушения митохондриальных процессов в кардиомиоцитах необходимо не только для обнаружения дополнительных причин возникновения ССЗ, но и для поиска специфических мишеней, способствующих разработке эффективной фармакотерапии ССЗ.

Многочисленные исследования показали, что нарушение функций митохондрий, проявляющееся в снижении скорости образования АТФ, нарушении гомеостаза кальция и усиленной генерации активных форм кислорода (АФК) и приводящее к развитию окислительного стресса, играет ключевую роль в инициации и формировании патологических изменений, характерных для сердечной недостаточности (Boovarahan, Kurian, 2018). В связи с этим актуальным остается поиск новых природных антиоксидантов, предотвращающих или ослабляющих повреждение клеток сердца, вызванное избыточным образованием АФК и дисфункцией митохондрий.

Астаксантин (АТ) является природным каротиноидом, обладающим мощной антиоксидантной активностью (Fassett, Coombes, 2012). Этот антиоксидант применяется в качестве пищевой добавки в западных странах уже более 30 лет, а в последние годы начал использоваться в составе различных БАД и в России. Однако, как показывают многочисленные исследования, АТ обладает многогранной лечебно-профилактической активностью и может быть применен при различных заболеваниях, таких как диабет, гиперлипидемия, стеатогепатит, нейродегенеративные болезни, сердечно-сосудистые заболевания и многих других (Попов, 2013). В связи с этим следует отметить, что несмотря на интенсификацию исследований, посвященных выявлению способности АТ восстанавливать антиоксидантный баланс в митохондриях клеток различных органов, нарушенный при развитии различных заболеваний (Kirkinetzos, Moraes, 2008) и, в частности, при ССЗ,

механизмы действия этого соединения, направленные на предотвращение митохондриальной дисфункции, остаются малоизученными.

В настоящем исследовании для доказательства защитного действия АТ была использована модель сердечной недостаточности (СН), вызываемая изопротеренолом (ИЗО) – синтетическим катехоламином. ИЗО действует как β -адренергический агонист, вызывающий повреждение тканей сердца, и как индуктор ИМ и СН способствует гипертрофии миокарда и митохондриальной дисфункции (Zaragoza et al., 2011; Davel, Brum, Rossoni, 2014). Кроме этого, защитное действие АТ изучали на культуре кардиомиоцитов линии H9c2, где проокислительный эффект достигался действием индукторов клеточной гибели, такими как пероксид водорода (H_2O_2) (Qin et al., 1999) и доксорубин (Докс) (Octavia, 2012).

Цель работы: выявление защитного действия астаксантина *in vivo* и *in vitro* от повреждений, вызванных изопротеренолом в митохондриях сердца крыс и индукторами клеточной гибели (пероксидом водорода и доксорубицином) в кардиомиоцитах линии H9c2.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние астаксантина на параметры окислительного фосфорилирования (активность комплексов дыхательной цепи митохондрий, Ca^{2+} ёмкость, мембранный потенциал, набухание) в митохондриях сердца крыс при изопротеренол - индуцированном поражении сердца;
2. Выявить митохондриальные белки, содержание которых изменяется под действием астаксантина при изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункции;
3. Изучить влияние астаксантина на содержание белков - маркеров деления, слияния митохондрий и митофагии при изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункции;
4. Исследовать действие астаксантина на уровень цитозольного Ca^{2+} , изменение мембранного потенциала, продукции АФК, маркеров митофагии, а также жизнеспособность кардиомиоцитов линии H9c2 при токсическом действии пероксида водорода и доксорубина.

Новизна работы.

В работе впервые было показано, что астаксантин обладал защитным действием и, в частности, предотвращал ИЗО-индуцированное нарушение митохондриальной функции, связанное с ухудшением параметров окислительного фосфорилирования. Были обнаружены белки, являющиеся потенциальными мишенями защитного действия астаксантина в митохондриях сердца, которые могут играть существенную роль в восстановлении митохондриальной массы и процессов митофагии при окислительных повреждениях. В целом, полученные результаты расширяют знания о механизмах защитного действия астаксантина и могут быть использованы для развития новых терапевтических стратегий, необходимых для предотвращения развития заболеваний сердца.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные данные позволяют расширить знания о механизмах действия АТ на изолированные митохондрии сердца и кардиомиоциты. Помимо этого, полученные результаты указывают на возможность защитного действия астаксантина на многочисленные процессы, протекающие в митохондриях. Обнаруженные эффекты позволяют рассматривать астаксантин в качестве митохондриального протектора в терапии патологических состояний, связанных с функциональным нарушением митохондрий при повреждении сердечной ткани. Полученные результаты указывают на то, что астаксантин может быть использован для развития новых терапевтических стратегий, необходимых для предотвращения развития заболеваний сердца.

Методология и методы исследования.

Работа выполнена в рамках методологии биофизики, клеточной биологии и биохимии. Она включает в себя такие методы как дифференцированное центрифугирование, измерение митохондриальных параметров на многофункциональной ячейке со встроенными электродами, спектрофото- и флуорометрия, Вестерн блот. Статистическая обработка данных проводилась с помощью ANOVA (Student-Newman-Keul тест) с использованием программного обеспечения SigmaPlot. Все эксперименты проводились на базе Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН и оборудования Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН. Полученные в ходе работы результаты сопоставляются с данными, представленными в научной литературе, и соответственно интерпретируются.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Астаксантин является митохондриальным протектором и способен улучшать параметры окислительного фосфорилирования;
2. Астаксантин предотвращает изопротеренол-индуцированное изменение содержания белков, регулирующих деление, слияние митохондрий и митофагию;
3. Прохибитин является одной из потенциальных мишеней воздействия астаксантина в митохондриях;
4. АТ сохраняет жизнеспособность, снижает содержание цитозольного Ca^{2+} и продукцию АФК, повышает митохондриальный мембранный потенциал в кардиомиоцитах линии H9c2 при перексиде водорода- и доксорубицин-индуцированной клеточной гибели.

Достоверность полученных результатов.

Полученные результаты, заключение и выводы, сформулированные в диссертации, отвечают целям и задачам работы. Достоверность и статистическая значимость результатов исследований подтверждена с применением современных методов, адекватных подходов, компьютерных программ и использованием сертифицированного оборудования.

Апробация.

Основные результаты работы представлены на международном и междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2019, 2020, 2021), Международной конференции «Рецепторы и

внутриклеточная сигнализация», (Пушино, 2021), Пушкинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2020), VII съезде биофизиков России (Краснодар, 2023), на международной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии» (Севастополь, 2023).

Личный вклад автора.

Все результаты, представленные в диссертации, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автору диссертационной работы принадлежит ключевая роль в определении цели и задач, анализе литературных данных, самостоятельном планировании и выполнении экспериментов, обработке и интерпретации результатов, представлении и апробации результатов исследований на научных конференциях, подготовке научных публикаций по выполненной работе.

Связь работы с научными программами.

Представленные результаты получены при выполнении исследований в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 20-04-00131 (рег. № АААА-А20-120021890127-7), «Идентификация белков – потенциальных мишеней кардиопротекторного действия астаксантина в митохондриях. Новые подходы в предотвращении развития острой сердечной недостаточности» (руководитель – Крестинина О.В.) и гранта Российского научного фонда № 24-25-00129 (рег. № 124041500003-6) «Изучение механизмов защитного действия астаксантина для предотвращения дисфункции митохондрий в клетках кардиомиоцитов человека и крысы» (руководитель – Крестинина О.В.).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, из них 7 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, Web of Science и Scopus и 7 тезисов докладов научных конференций всероссийского и международного уровней.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 135 страницах, содержит 28 рисунков и 1 таблицу. Список цитируемой литературы включает 302 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка животных к эксперименту

Для исследования использовали крыс линии Wistar в возрасте 2 месяца, весом 220-250 граммов, которые были разделены на четыре группы. 1 группа – контрольная; животным 2 группы ежедневно вводили АТ в дозе 150 мг/кг (в виде растворенного в оливковом масле порошка) в течение 14 суток (Ambati et al., 2014) перорально; животным 3 группы подкожно вводили ИЗО, растворенный в физиологическом растворе, в дозе 100 мг/кг дважды в течение

двух суток (Akila et al., 2017); животным 4 группы вводили АТ в вышеуказанной дозе в течение 14 суток и через сутки вводили ИЗО однократно в течение двух суток. Животные первой и третьей групп получали равное количество оливкового масла, также животным первой и второй групп вводили физиологический раствор.

Гистологический анализ ткани левого желудочка сердца

Окрашивание срезов ткани левого желудочка (ЛЖ) крыс проводили с использованием стандартного метода трихромного окрашивания по Массону (Werner M. и др., 2000). Анализ окрашенных гистологических препаратов выполняли с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) и программного обеспечения Nis Elements AR4.13.05(Build933) (NIS-Elements software).

Выделение митохондрий из сердца крыс

Митохондрии выделяли методом дифференцированного центрифугирования. Среда выделения (4 °С) содержала 75 мМ сахарозу, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 225 мМ маннитол, 0,5 мМ ЕДТА, 0,5 мМ ЭГТА и 0,1% БСА. Среда промывания и суспендирования содержала 75 мМ сахарозу, 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 225 мМ маннитол (Paradies et al., 2004). Концентрацию белка измеряли по методу Бредфорд (Kluger, 1994).

Измерение показателей окислительного фосфорилирования

Измерение скорости поглощения O_2 , транспорта Ca^{2+} , мембранный потенциал (TPP⁺) измеряли в многофункциональной ячейке со встроенными O_2 (электрод Кларка), Ca^{2+} - и TPP⁺-селективными электродами (Azarashvili et al., 2007). Измерения проводились в среде, содержащей 125 мМ KCL, 2 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 5 мМ глутамата и 5 мМ малата использовали в качестве дыхательных субстратов. Набухание митохондрий измеряли в той же среде с помощью планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 PRO (Tecan, Швейцария) при длине волны 540 нм.

Электрофорез в не денатурирующих условиях и измерение активностей комплексов и суперкомплексов дыхательной цепи

Электрофорез с синим нативным красителем (G-250) проводили в неденатурирующих условиях с применением 10% додецил-бета-д-мальтозида, либо 10% дигитонина, как описано в (Jha et al., 2016). Для определения активности комплексов и суперкомплексов дыхательной цепи митохондрий, полученные гели окрашивали соответствующими субстратами как описано в (Jha et al., 2016).

Масс-спектрометрический метод анализа

Участки гелей, содержащие области с наиболее изменяющимися белками, анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Панорамные спектры регистрировали в диапазоне m/z (отношения массы заряженных частиц к их заряду) от 300 до 2000 со спектральным разрешением 240 000. Данные обрабатывали с использованием

программ Xcalibur (Thermo Scientific) и PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc., Канада).

Клеточные культуры и условия культивирования

Культивирование культуры кардиомиоцитов крысы линии Н9с2 в количестве $2,5 \times 10^3$ проводилось в 96-луночной планшете в течение 24 ч в CO_2 инкубаторе (5%, 37 °С, 95% влажности). Питательная среда состояла из DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, США), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), содержащей 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США).

Анализ жизнеспособности клеток

Количество живых клеток после инкубации с АТ, H_2O_2 и Докс по сравнению с контрольными клетками (без добавления АТ, H_2O_2 и Докс) оценивали по интенсивности восстановления резазурина (30 мкг/мл, 24 ч в условиях CO_2 инкубатора). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 (Tecan, Австрия) (Lavogina и др., 2022) при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 530 нм.

Измерение мембранного потенциала митохондрий

Для определения митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$), клетки Н9с2 окрашивали флуоресцентным красителем йодид 3,3'-дигексилосакарбоцианина $\text{DiOC}_6(3)$ (10 нМ, 30 мин в условиях CO_2 инкубатора). В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные 0,5% сапонином (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин перед добавлением $\text{DiOC}_6(3)$. Детектирование интенсивности флуоресценции осуществляли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (Biosciences, США) при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 530 нм.

Измерение продукции активных форм кислорода

Для определения внутриклеточной продукции АФК, клетки Н9с2 окрашивали флуоресцентным красителем 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат (DCFH-DA) (10 мкМ, 10 мин в условиях CO_2 инкубатора). Интенсивность флуоресценции измеряли на планшетном спектрофлуориметре Infinite F200 PRO при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны испускания 530 нм.

Измерение уровня цитозольного Ca^{2+} в клетках

Для определения изменения цитозольного Ca^{2+} клетки Н9с2 окрашивали флуоресцентным красителем Fluo-4 AM (2 мкМ, 30 мин в условиях CO_2 инкубатора). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью планшетного спектрофлуориметра Infinite F200 PRO при длине волны возбуждения 494 нм и длине волны испускания 516 нм.

Электрофорез и Вестерн блот

Митохондриальные и клеточные белки разделяли по молекулярной массе с помощью 12,5% SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм), с последующим их блокированием в растворе Roti-block при комнатной температуре в течение часа. Затем мембраны инкубировали при 4 °С в течение 12 ч с первичными антителами, специфическими к белкам ANT2, АТРВ, VDAC1, РНВ, ОРА1, Mfn2 и DRP1, Parkin, PINK1 и РНВ2. В качестве контроля белковой нагрузки использовали антитела к Tom20 и GAPDH. Белковые полосы детектировали с использованием ECL (Bio-Rad, США) при помощи гель-документирующей системы ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, США).

Конфокальная микроскопия

Клетки H9c2 высевали в чашки Петри диаметром 35 мм (15 000 клеток/см²) и обрабатывали 10 мкМ АТ и 100 мкМ H₂O₂ в течение 1 ч. После инкубации клетки промывали три раза 2 мл HBSS и инкубировали в 2 мл HBSS с добавлением 1 мкг/мл бисБензимид Хёхст 33342 (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, США) и 150 нМ MitoTracker Green FM (Cell Signaling, США) при 37 °С в течение 30 мин в термостате без CO₂. После окрашивания клетки промывали 3 раза буфером HBSS. Флуоресцентные изображения клеток получали с помощью флуоресцентного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP-5 DM6000 CS (Leica Microsystems, Германия).

Статистический анализ

Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическую значимость определяли с помощью ANOVA (Student-Newman-Keuls тест) с использованием программного обеспечения SigmaPlot (Systat Software Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние АТ и ИЗО на структуру ткани левого желудочка сердца крыс

Для выявления повреждения миокарда и его локализации анализировали трансмуральные гистотопограммы образцов левого желудочка (ЛЖ) из сердца крыс всех исследуемых групп (рис. 1). Сравнительный анализ показал, что введение крысам АТ не вызывало изменений в характерных для контрольных образцов зонах миокарда. Однако, после инъекции ИЗО наблюдались значительные фиброзоподобные поражения миокарда в субэндокардиальной и средней зонах миокарда, тогда как при совместном введении АТ с ИЗО фиброзоподобные поражения были менее выражены, а субэндокардиальная и срединная зоны сердечной стенки не были повреждены.

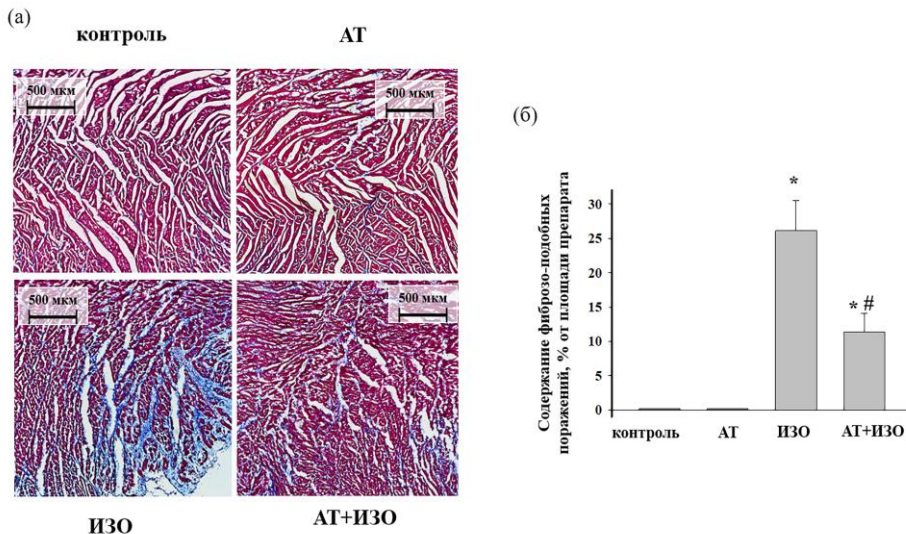


Рисунок 1. Гистотопограммы ткани левого желудочка (ЛЖ) сердца крыс. (а) – окрашивание срезов ткани: трихромная окраска по Массону (коллаген/фиброз окрашивается в синий цвет, мышечная и другие ткани - в красный, ядра клеток - в коричневый цвет); (б) – Диаграмма, отражающая процент фиброзного роста в тканях каждой группы (n=5). Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=5). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля. # $p < 0,05$ достоверное отличие по сравнению с ИЗО.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что АТ проявляет защитные свойства и частично предохраняет ткань ЛЖ крыс от повреждений, вызываемых ИЗО.

2. Влияние АТ на параметры окислительного фосфорилирования митохондрий сердца крыс при ИЗО-индуцированном повреждении миокарда

На следующем этапе исследования было изучено влияние АТ на параметры окислительного фосфорилирования митохондрий сердца (МС) крыс при ИЗО-индуцированном повреждении миокарда. С этой целью определяли скорость поглощения кислорода МС при окислении субстратов, дыхательный контроль (ДК), Ca^{2+} ёмкость митохондрий, мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$), способность к набуханию.

На рисунке 2 (а) представлены кривые, отражающие изменение скорости потребления O_2 в состоянии 2 ($V_{st.2}$), 3 ($V_{st.3}$) и 4 ($V_{st.4}$). Количественные характеристики скоростей потребления кислорода (ng -атом O в min^{-1} на mg^{-1} белка) в различных состояниях и ДК представлены на рисунке 2 (б, в).

Как можно видеть, $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ в МС у крыс после инъекции ИЗО снижались на ~ 33 и 70% соответственно по сравнению с контролем. АТ не влиял на эти показатели, и после совместного действия АТ и ИЗО $V_{st.2}$ и $V_{st.3}$ также не отличались от контроля. $V_{st.4}$ в МС у крыс после инъекции ИЗО повышалась на 30% по сравнению с контролем, тогда как при совместном действии АТ и ИЗО $V_{st.4}$ восстанавливалось до контрольного значения.

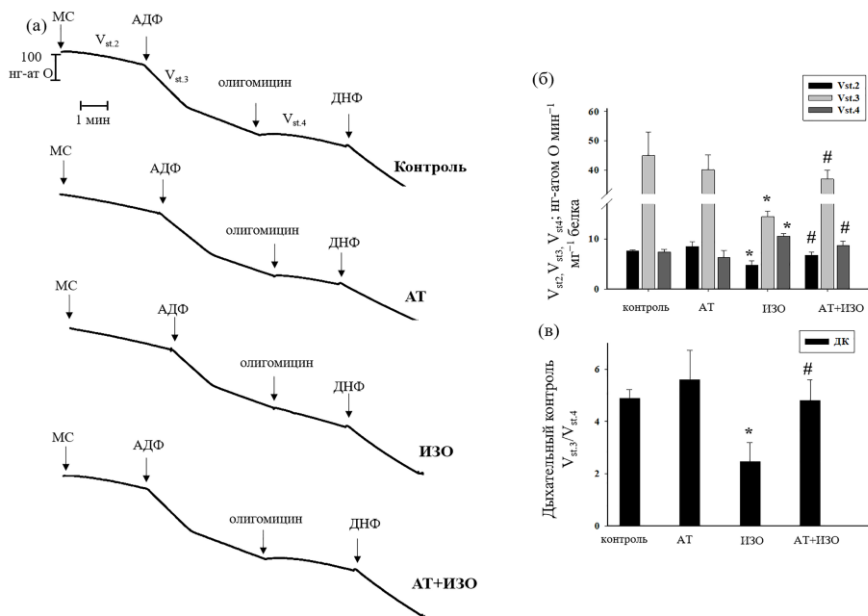


Рисунок 2. Влияние АТ и ИЗО на изменение дыхательных активностей в митохондриях сердца крыс. (а) – кривые дыхательных активностей, стрелками показано время добавления МС, 200 мкМ АДФ, 1.5 мкМ олигомицина и 30 мкМ ДНФ; (б) – количественный анализ скорости дыхания в митохондриях в состояниях 2, 3 и 4; (в) – значения ДК. Данные представлены как среднее значение \pm SD (n = 10). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

Как видно из рисунка 2 (в) АТ не изменял ДК (соотношение $V_{st.3}$ к $V_{st.4}$) митохондрий, тогда как ИЗО снижал этот показатель в ~ 2 раза по сравнению с контролем. При совместном введении АТ и ИЗО величина ДК не только достигала контрольного значения, но и повышалась в 2 раза при сравнении с ДК, характерным для митохондрий сердца крыс с одиночным введением ИЗО.

Таким образом, полученные данные свидетельствовали о том, что ИЗО, вводимый *in vivo*, тормозил скорость потребления кислорода митохондриями, изолированными из сердца крыс, а преобразование АТ предотвращало нарушения, вызванные ИЗО.

Согласно литературным данным, одним из основных механизмов снижения скорости потребления кислорода митохондриями, наблюдаемого при развитии различных патологий, является нарушение работы мультибелковых комплексов – переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий [Guo и др., 2013]. Поэтому далее мы исследовали, как АТ и ИЗО влияют на активность комплексов дыхательной цепи митохондрий, изолированных из сердца крыс. На рисунке 3 (а) показаны гели, полученные в результате проведения электрофореза в неденатурирующих условиях и окрашенные специфическими субстратами; количественные изменения активности комплексов, рассчитанные с помощью компьютерной денситометрии, представлены на рисунке 3 (б). Как видно из рисунка 3 (б) введение АТ крысам не изменяло активность всех комплексов дыхательной цепи по сравнению с контролем, в то время как ИЗО снижал активность комплексов на ~40% (CI), 25% (CV), 60% (CIII), 20% (CIV) и 25% (CII), тогда как при совместном использовании АТ и ИЗО, активность комплексов повышалась относительно показателей, полученных после введения ИЗО.

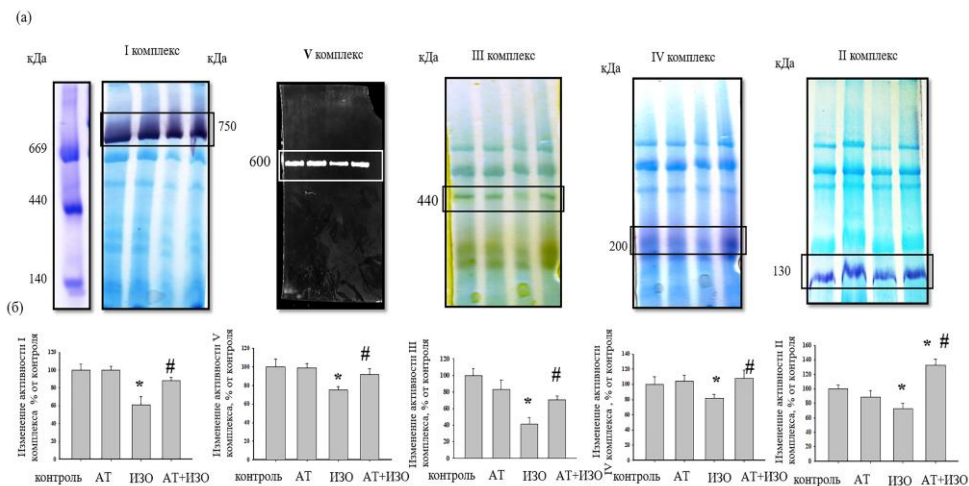


Рисунок 3. Влияние АТ и ИЗО на активность комплексов ЭТЦ в МС крыс. (а) – гели после нативного синего электрофореза, окрашенные соответствующими субстратами; (б) - диаграммы, количественно отражающие изменение активности комплексов ЭТЦ. Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=4). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

Общепризнано, что митохондриальная дисфункция может выявляться по изменению параметров, регулирующих процесс митохондриального дыхания (Bhatti, Bhatti, Reddy, 2017).

Поэтому мы исследовали влияние АТ и ИЗО на транспорт Ca^{2+} , изменение $\Delta\Psi_m$ и набухание митохондрий, выделенных из сердца крыс всех исследуемых групп.

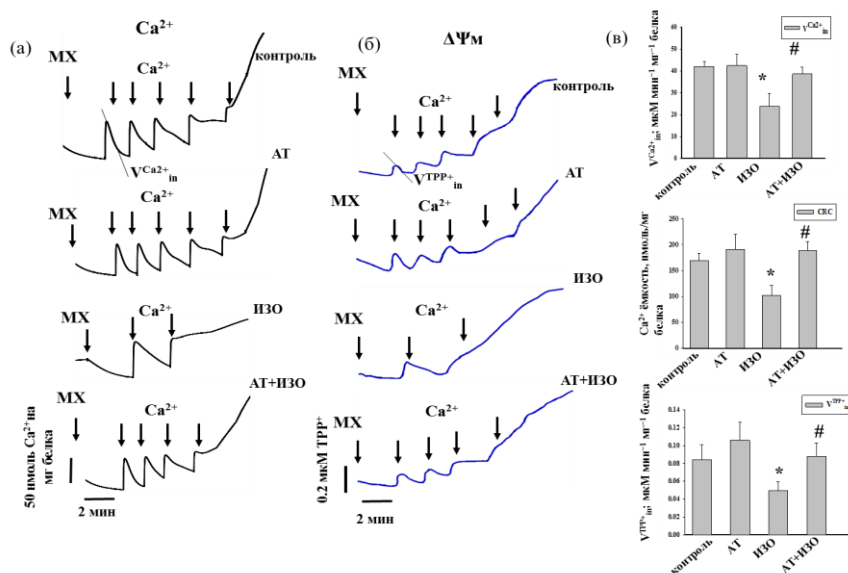


Рисунок 4. Влияние АТ и ИЗО на транспорт Ca^{2+} , Ca^{2+} ёмкость и изменение мембранного потенциала. (а) – изменение потоков Ca^{2+} ; (б) – изменение распределения TRP^{+} ; (в) – количественный анализ $V^{\text{Ca}^{2+}_{in}}$, Ca^{2+} ёмкости и $V^{\text{TRP}^{+}_{in}}$. Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=10). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

На рисунке 4 (а) показаны кривые изменения потоков Ca^{2+} (каждое добавление Ca^{2+} составляло 50 нМ на мг белка). Как видно из рисунка 4 (в), скорость входа Ca^{2+} в МС, после 1 добавки Ca^{2+} ($V^{\text{Ca}^{2+}_{in}}$) в присутствии АТ не отличалась от контроля. Инъекция ИЗО замедляла $V^{\text{Ca}^{2+}_{in}}$ на ~ 45%, относительно контроля. Введение АТ с последующей инъекцией ИЗО не изменяло $V^{\text{Ca}^{2+}_{in}}$ относительно контроля, но повышалось на ~ 40% по сравнению с ИЗО. Ca^{2+} ёмкость в МС контрольных крыс составляла $169 \pm 14,3$ нмоль на мг белка (Рис. 4 (в)). При введении крысам АТ, этот показатель увеличивался, но не достоверно по отношению к контролю ($191 \pm 28,6$ нмоль на мг белка). В присутствии ИЗО Ca^{2+} ёмкость снижалась до $102 \pm 19,4$ нмоль на мг белка, а при совместном использовании АТ с ИЗО восстанавливалась до контрольного значения ($188 \pm 17,8$ нмоль на мг белка). На рисунке 4 (б) показаны кривые Ca^{2+} -индуцированного изменения распределения иона TRP^{+} между средой и

митохондриями, а скорость входа TPP^+ ($V^{TPP^+_{in}}$, нмоль $\text{мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ белка) предшествующее падению $\Delta\Psi_m$ показана на рисунке 4 (в). Как видно из рисунка 4 (в), $V^{TPP^+_{in}}$ в МС изменялась аналогично изменениям $V^{Ca^{2+}_{in}}$. АТ не изменял $V^{TPP^+_{in}}$, а ИЗО снижал на $\sim 37\%$ по сравнению с контролем, тогда как предобработка АТ, несмотря на последующую инъекцию ИЗО, увеличивало скорость $V^{TPP^+_{in}}$ в митохондриях сердца на $\sim 44,4\%$ по сравнению с этим параметром в митохондриях, изолированных из сердца крыс с инъекцией ИЗО. Набухание митохондрий, инициированное добавлением Ca^{2+} и количественно определяемое как время достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ($T_{1/2}$), показано на рисунке 5. Набухание инициировали добавлением 170 нмоль Ca^{2+} на мг белка, что соответствовало контрольному значению Ca^{2+} ёмкости. На рисунке 5 (а) показаны кривые набухания в митохондриях, изолированных из сердца крыс всех исследуемых групп, количественная характеристика показана на рисунке 5 (б). Как видно из рисунка, АТ повышал $T_{1/2}$ на $\sim 25,54\%$, тогда как инъекция ИЗО снижала $T_{1/2}$ в 2,3 раза по сравнению с контролем. Совместное действие АТ с ИЗО повышало $T_{1/2}$ на $\sim 46\%$ по сравнению с контролем и в 3,6 раза относительно одиночного введения ИЗО. Повышение $T_{1/2}$ свидетельствует о снижении скорости набухания митохондрий, а снижение этого параметра указывает на ее увеличение. Следовательно, АТ предотвращал эффект ИЗО при Ca^{2+} -индуцированном набухании митохондрий.

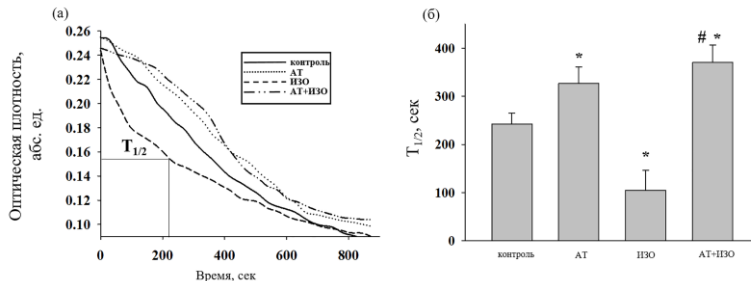


Рисунок 5. Влияние АТ и ИЗО на Ca^{2+} -индуцированное набухание МС. (а) - кривые набухания МС, изолированные из каждой группы крыс, (б) - количественный анализ набухания, характеризующийся временем достижения полумаксимального сигнала светорассеяния ($T_{1/2}$). Данные представлены как среднее значение \pm SD ($n=10$). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что введение крысам ИЗО приводит к нарушению многочисленных функциональных параметров митохондрий сердца крыс. Напротив, АТ предотвращает нарушения, вызываемые ИЗО. Так, под воздействием АТ, ДК

и активность комплексов дыхательной цепи повышались, что указывает на восстановление биоэнергетической эффективности митохондрий.

3. Выявление белков в митохондриях сердца крыс при ИЗО-индуцированной митохондриальной дисфункции.

Известно, что в митохондриях существует надмолекулярная структура, называемая суперкомплексами (СК), которая основана на специфических взаимодействиях между комплексами дыхательной цепи во внутренней мембране митохондрий (Jha, Wang, Auwerx, 2016). Образование СК имеет важные биологические и биомедицинские последствия, поскольку дефекты сборки ферментов митохондриальных комплексов могут вызывать нарушение работы сердца (Lenaz, Genova, 2010). Исходя из этого, мы проверили влияние АТ на активность СК в митохондриях сердца крыс при ИЗО-индуцированной митохондриальной дисфункции.

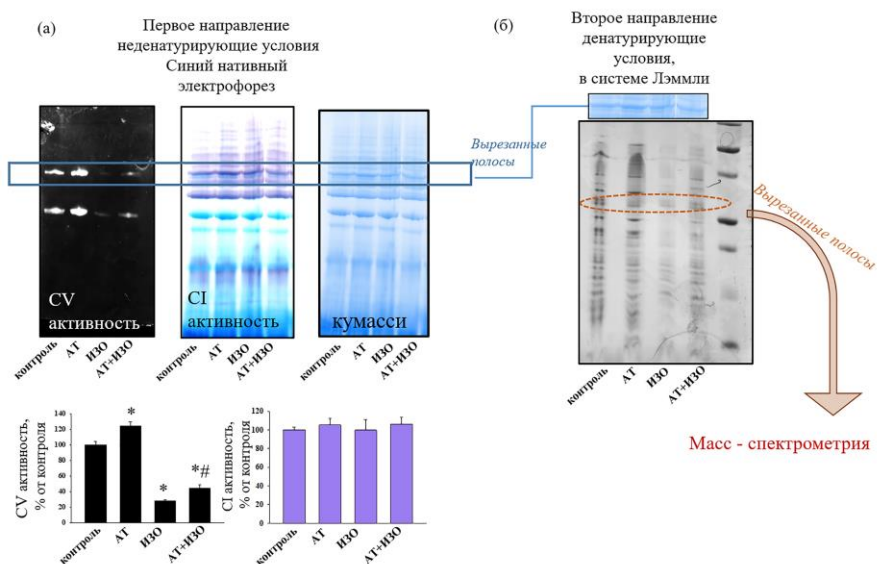


Рисунок 6. Идентификация белка, являющегося потенциальной мишенью действия АТ. (а) — первое измерение после разделения суспензии митохондрий с помощью ВНЕ (Blue Native Electrophoresis, неденатурирующие условия), окраска Кумасси, активность Комплекса V и I (верхняя часть); диаграмма, отражающая изменение активности Комплексов V и I (нижняя часть). Оптическая плотность полос Кумасси использовалась в качестве контроля нагрузки; (б) — второе измерение (система Лэммли в денатурирующих условиях) после вырезания полос из (а). Данные представлены как средние значения \pm стандартные отклонения (n=5) * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

Как видно из рисунка 6 (а) активность CI не изменялась во всех условиях эксперимента. АТ повышал активность CV в МС на 22%, тогда как ИЗО

снижал этот показатель на ~ 70% в митохондриях. При совместном действии АТ с ИЗО, активность CV повышалась на ~ 32% относительно ИЗО. Далее мы вырезали полосы на уровне, где наблюдались изменения активности комплекса V, и разделяли белки в денатурирующих условиях (рис. 6 (б)). Мы обнаружили, что на определенных уровнях происходило изменение содержания некоторых белков. Вырезанные полосы были проанализированы методом масс-спектрометрии.

Таблица 1. Белки, обнаруженные в образцах.

Белок ID	Определение	Молекулярная масса	Описание
43143	Q09073 ADT_RAT	32901	ADP/ATP translocase 2 OS=Rattus norvegicus
43163	P67779 PHB_RAT	29820	Prohibitin OS=Rattus norvegicus
43089	P10719 ATPB_RAT	56354	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Rattus norvegicus
43087	tr F1LP05 F1LP05_RAT	59813	ATP synthase subunit alpha OS=Rattus norvegicus
43230	tr D3ZG43 D3ZG43_RAT	30191	NADH dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S protein 3 OS=Rattus norvegicus
43093	P35435 ATPG_RAT	30191	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Rattus norvegicus
43125	Q9Z2L0 VDAC1_RAT	30756	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Rattus norvegicus

В результате, в образцах определились следующие белки: изоформа 2 АДФ/АТФ транслоказы, прохибитин (PHB), субъединица β АТФ-синтазы, субъединица α АТФ-синтазы, белок Fe-S НАДН-дегидрогеназы (убихинон) 3 и белок 1 изоформы потенциал-зависимого анион-селективного канала (VDAC1) (таблица 1). Некоторые из них входят в состав митохондриальных комплексов I или V.

На следующем этапе исследовали влияние АТ на изменение ряда белков, выявленных при масс-спектрометрическом методе анализа при ИЗО-индуцированной митохондриальной дисфункции. На рисунке 7 (а) показан Вестерн блот в присутствии специфических антител к белкам ANT2, VDAC1, АТРВ (субъединица β) и РНВ в митохондриях, изолированных из сердца крыс каждой группы. Количественный анализ представлен на рисунке 7 (б).

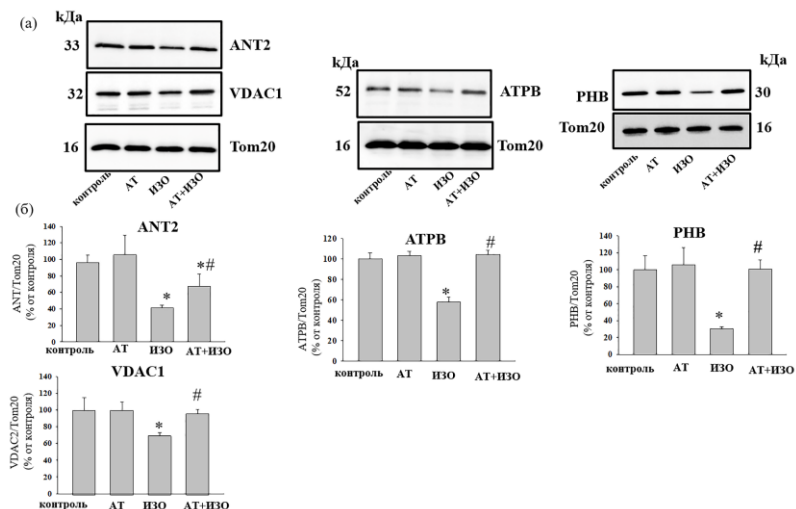


Рисунок 7. Влияние АТ и ИЗО на изменение содержания ANT2, VDAC1, АТРВ и РНВ. (а) Вестерн блот в присутствии антител к ANT2, VDAC1, АТРВ и РНВ; (б) количественная оценка с помощью компьютерной денситометрии, нормированная по белку Tom20. Данные представлены как средние значения \pm стандартные отклонения ($n=4$). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

Как видно из рисунка 7 (б), содержание ANT2 и VDAC1 снижалось по сравнению с контролем на $\sim 60\%$ и 30% соответственно в митохондриях, изолированных из сердца крыс, которым вводили ИЗО. При совместном действии АТ с ИЗО уровни этих белков повышались на $\sim 40\%$ и 30% соответственно по сравнению с одиночным действием ИЗО. Уровень АТРВ в митохондриях сердца крыс, которым вводили ИЗО, снижался на $\sim 40\%$ по сравнению с контролем, и не изменялся по сравнению с контролем, если крысы были предварительно обработаны АТ перед инъекцией ИЗО. АТ не изменял уровень РНВ, тогда как ИЗО снижал содержание РНВ на $\sim 70\%$ по сравнению с контролем. При совместном действии АТ и ИЗО уровень РНВ соответствовал контрольному значению. АТ предотвращал ИЗО-индуцированное снижение содержания белков.

Из совокупности выявленных белков особое внимание заслуживает белок PNH, который участвует в регуляции контроля качества митохондрий (слияние, деление митохондрий и митофагия), а ANT2, VDAC1 являются белками-партнерами PNH, которые образуют с PNH комплекс (Kasashima et al., 2006, Trebinska et al., 2010). Более того, прохибитины представляют собой высококонсервативную группу белков, участвующих в регуляции активности ЭТЦ, взаимодействуя с некоторыми субъединицами комплексов (Signorile et al., 2019).

В связи с тем, что прохибитины участвуют в регуляции контроля качества митохондрий (деление, слияние митохондрий и митофагия), следующим этапом исследования являлось изучение влияния АТ на изменение белков-маркеров деления, слияния митохондрий и митофагии при ИЗО-индуцированной митохондриальной дисфункции.

4. Влияние астаксантина на параметры митохондриальной динамики в митохондриях сердца крыс при ИЗО-индуцированной митохондриальной дисфункции.

Известно, что митофузины 1 и 2 (Mfn1, Mfn2) участвуют в слиянии (fusion) внешних мембран митохондрий, а белок атрофии зрительного нерва 1 (OPA1) в слиянии внутренних мембран. Drp1 (Родственный динамину белок 1) необходим для деления (fission) митохондрий. Поэтому мы исследовали изменение содержания белков, участвующих в этих процессах (Рис.8). Мы наблюдали, что содержание DRP1 увеличивалось на ~ 65% под воздействием ИЗО по сравнению с контролем. Введение АТ не изменяло уровень DRP1, в то время как при совместном воздействии АТ и ИЗО, содержание DRP1 снижалось на ~ 34% по сравнению с ИЗО. Введение АТ не влияло на уровень Mfn2, но снижало содержание OPA1 на ~ 42,5% по сравнению с контролем.

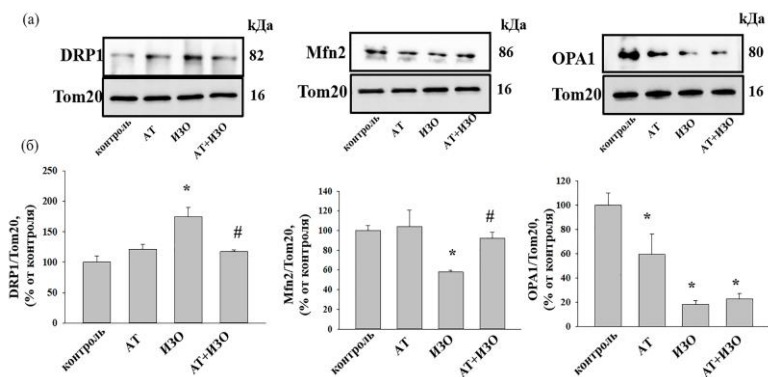


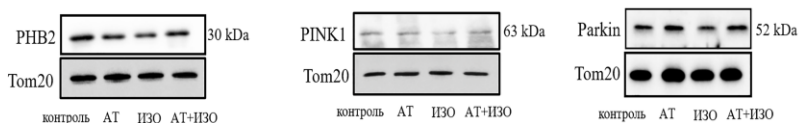
Рисунок 8. Влияние АТ и ИЗО на изменение содержания белков, участвующих в слиянии и делении митохондрий. (а) - иммуноокрашивание антителами к DRP1, Mfn2 и OPA; (б) - количественная оценка иммуноокрашивания методом компьютерной денситометрии,

нормированная по белку Tom20. Данные представлены как средние значения \pm стандартные отклонения (n=4). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

Введение ИЗО уменьшало содержание Mfn2 и OPA1 на $\sim 48\%$ и 80% , соответственно относительно контроля. Совместный эффект АТ с ИЗО не влиял на уровень Mfn2 по сравнению с контролем и увеличивал его на $\sim 42\%$ по сравнению с ИЗО. Содержание OPA1 в этих условиях снижалось на $\sim 77,5\%$ по сравнению с контролем.

Известно, что РНВ существует в двух изоформах (Coates et al., 1997), и именно изоформа РНВ2 является белком, принимающим участие в деградации митохондрий путем аутофагии (Wei et al., 2017), и играющим ключевую роль в гомеостазе клеточного энергетического метаболизма (Tatsuta et al., 2005). Поэтому на следующем этапе нашего исследования мы выяснили как изменяется содержание маркеров митофагии, таких как РНВ2, PINK1 и Parkin. На рисунке 9 (а) показан Вестерн блот этих белков, а 9 (б) – количественный анализ содержания белков. Как видно из рисунка 9, АТ существенно не влиял на содержание РНВ2, PINK1 и Parkin, тогда как ИЗО снижал содержание всех белков по сравнению с контролем на $\sim 26,5\%$, $54,3\%$ и $31,4\%$, соответственно. При совместном действии АТ с ИЗО содержание белков по сравнению с контролем не изменялось.

(а)



(б)

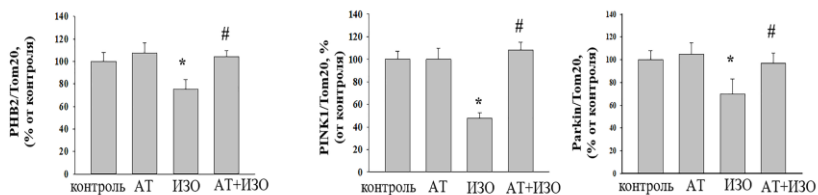


Рисунок 9. Влияние АТ и ИЗО на изменение содержания белков, участвующих в процессе митофагии. (а) - иммуноокрашивание антителами к РНВ2, PINK1 и Parkin; (б) - количественная оценка иммуноокрашивания методом компьютерной денситометрии, нормированная по белку Tom20. Данные представлены как средние значения \pm стандартные отклонения (n=4). * $p < 0,05$ достоверное отличие относительно контроля, # $p < 0,05$ достоверное отличие относительно ИЗО.

Таким образом, ИЗО усиливал деление митохондрий и ингибировал слияние внешней мембраны. Предполагается, что снижение содержания РНВ2 могло приводить к активации PARL (резидентной протеазы внутренней мембраны митохондрий), которая расщепляет PINK1, снижая его содержание

в митохондриях. Дестабилизированный PINK1 блокирует рекрутирование Parkin в митохондрии. Поэтому снижение содержания PINK2 ингибирует митофагию. Поврежденные митохондрии накапливаются в митохондриальной сети и не удаляются митофагией. Предобработка с АТ увеличивала содержание PINK2, что, в свою очередь, усиливало слияние наружной митохондриальной мембран и восстанавливало митофагию.

На следующем этапе исследовали защитный эффект АТ в кардиомиоцитах линии H9c2, где гибель клеток вызывали H₂O₂ (100 мкМ) и доксорубицином (Докс; 100 мкМ).

5. Влияние АТ на жизнеспособность кардиомиоцитов H9c2, вызванную пероксидом водорода

Для выявления защитного действия АТ при индукции клеточной гибели пероксидом водорода (H₂O₂), исследовали влияние различных концентраций АТ и H₂O₂ на жизнеспособность кардиомиоцитов H9c2 (Рис. 10).

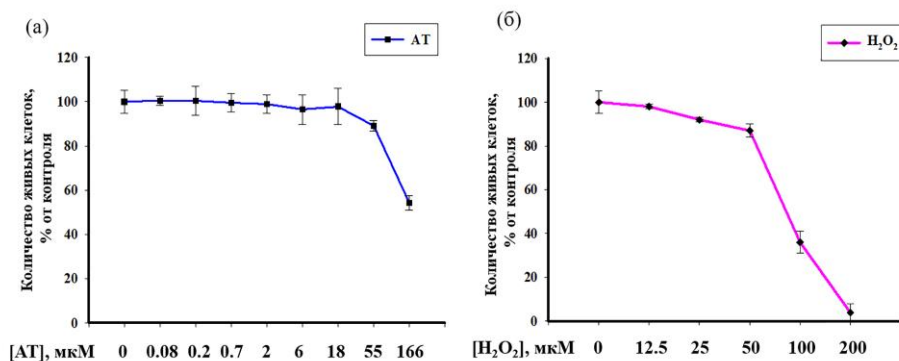


Рисунок 10. Зависимость жизнеспособности клеток H9c2 от концентрации АТ и H₂O₂. Долю живых клеток определяли через 24 часа после добавления веществ по восстановлению резазурина. Количество живых клеток интактной культуры (контроль без обработки препаратами) принималось за 100%. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n=10).

Как видно из рисунка АТ в концентрации до 55 мкМ не оказывал влияния на жизнеспособность клеток, однако при 166 мкМ АТ выживаемость клеток снижалась на ~ 45%. При добавлении H₂O₂ к клеткам H9c2 их жизнеспособность снижалась при 50, 100 и 200 мкМ H₂O₂ на ~ 13%, 65% и 100%, соответственно.

При действии АТ на клетки в течение разного времени инкубации (1, 4 и 6 ч) совместно с H₂O₂ степень защитного эффект АТ была различной (Рис.11). При предынкубации клеток с АТ (5-20 мкМ) в течение 1 часа добавление H₂O₂ в различных концентрациях не выявило защитного эффекта АТ (Рис. 11 (а)). При 4-часовой инкубации клеток с АТ (Рис. 11 (б)) добавление H₂O₂ в

концентрации до 50 мкМ не влияло на жизнеспособность клеток, а при 100 мкМ H_2O_2 жизнеспособность снижалась на ~ 65%. Однако, 4-часовая предынкубация клеток с 5 - 10 мкМ АТ, предшествующая обработке клеток с 100 мкМ H_2O_2 , повышала жизнеспособность клеток до контрольного уровня.

АТ в концентрации 15 и 20 мкМ предотвращал снижение жизнеспособности клеток в присутствии 100 мкМ H_2O_2 на ~ 25 и 15% соответственно.

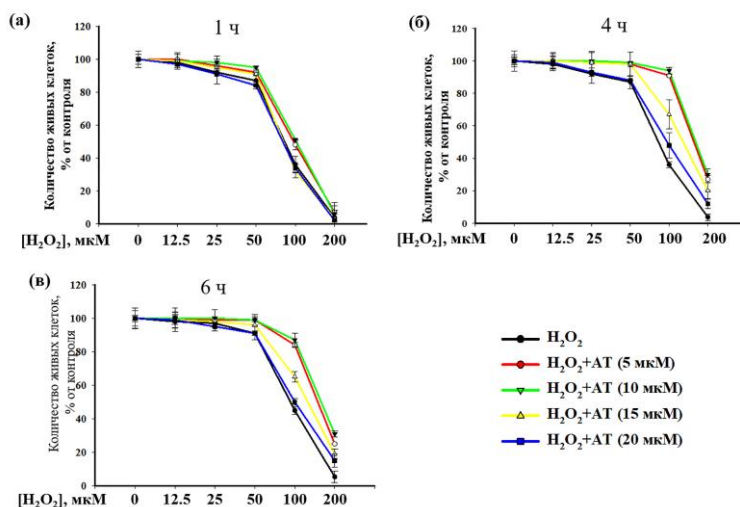


Рисунок 11. Зависимость жизнеспособности клеток Н9с2 от концентрации H_2O_2 в присутствии АТ. Кардиомиоциты в количестве $2,5 \times 10^3$ инкубировали с АТ в течение 1, 4 и 6 часов, затем добавляли H_2O_2 и через 30 минут измеряли жизнеспособность клеток по восстановлению резазурина. Количество живых клеток интактной культуры (контроль, без обработки препаратами) принималось за 100%. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=10).

При 6-часовой инкубации клеток с АТ с последующим добавлением 100 мкМ H_2O_2 , также наблюдался защитный эффект АТ, но он был менее выраженным, чем при 4-часовой инкубации с АТ. Добавление 200 мкМ H_2O_2 к клеткам приводило к 100% снижению их жизнеспособности. Однако, предынкубация клеток с АТ (5 – 10 мкМ) предотвращала вызванное добавлением 200 мкМ H_2O_2 снижение жизнеспособности клеток на 30% как при 4 часах, так и при 6 часах инкубации с АТ.

Аналогичные результаты по действию АТ на выживаемость клеток мы получили при доксорубин-индуцированной клеточной гибели, однако в этом случае, эффект тех же самых концентраций АТ был более существенным в течение 6 - часовой инкубации клеток с АТ.

Поскольку защитный эффект АТ на жизнеспособность клеток, нарушенную добавлением 100 мкМ H_2O_2 был более существенным при инкубации с АТ в концентрации 5 и 10 мкМ с клетками в течение 4 часов, то эти условия были выбраны для дальнейшего исследования.

6. Влияние АТ на изменение уровня цитозольного Ca^{2+} , митохондриального мембранного потенциала и продукции АФК в кардиомиоцитах Н9с2 при H_2O_2 -индуцируемой клеточной гибели

Далее, мы проанализировали изменение содержания цитозольного Ca^{2+} , $\Delta\Psi_m$ и продукции АФК в кардиомиоцитах Н9с2. Как видно из рисунка 12 (а), при 100 мкМ концентрации H_2O_2 содержание цитозольного Ca^{2+} повышалось почти в 2 раза, а $\Delta\Psi_m$, в этих условиях, снижался на ~ 65,2% по сравнению с контролем (Рис. 12 (б)). Предынкубация клеток с АТ (5 и 10 мкМ) предотвращала вызываемое добавлением 100 мкМ H_2O_2 увеличение уровня Ca^{2+} в 1,3 раза, и повышала $\Delta\Psi_m$ при обеих концентрациях АТ в ~ 2 раза по сравнению с одиночным действием H_2O_2 .

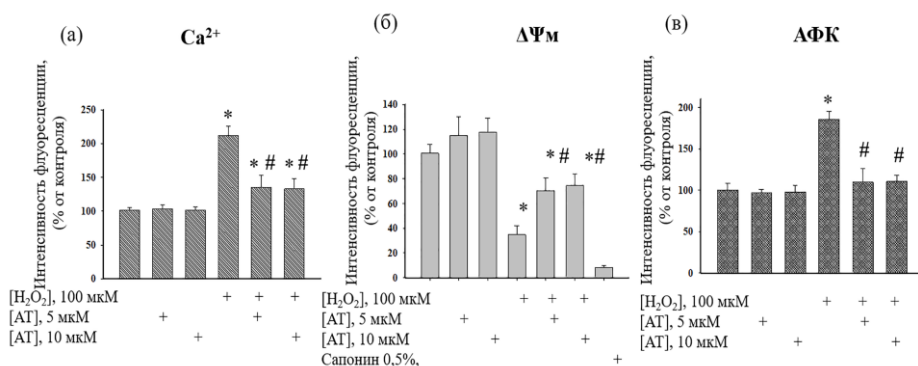


Рисунок 12. Влияние АТ на изменение цитозольного Ca^{2+} , митохондриального мембранного потенциала и продукции АФК в кардиомиоцитах линии Н9с2 при H_2O_2 -индуцированной клеточной гибели. (а) – изменение цитозольного Ca^{2+} ; (б) – изменение $\Delta\Psi_m$; (в) – изменение внутриклеточной продукции АФК. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=10). * $p < 0,05$ значимое изменение по сравнению с контролем (интактная культура); # $p < 0,05$ значимое изменение по сравнению с соответствующим значениями H_2O_2 .

В присутствии 100 мкМ H_2O_2 , продукция АФК в кардиомиоцитах увеличивалась в ~ 1,85 раз по сравнению с контролем. Предобработка клеток АТ (5 и 10 мкМ) уменьшала продукцию АФК, вызываемую добавлением 100 мкМ H_2O_2 , до контрольного уровня.

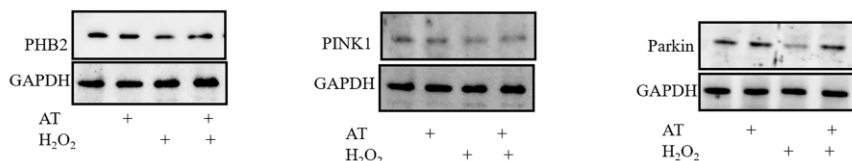
Аналогичные результаты были получены при доксорубицин-индуцированной клеточной гибели, как и в предыдущих экспериментах эффект АТ был более существенным через 6 часов инкубации клеток с АТ.

Таким образом, несмотря на цитотоксическое действие H_2O_2 , предынкубация с АТ повышала $\Delta\Psi_m$ и снижала внутриклеточную продукцию АФК, а также содержание цитозольного Ca^{2+} , проявляя защитный эффект.

7. Влияние АТ на изменение содержания маркеров митофагии и прохибитина 2 в кардиомиоцитах H9c2 при H_2O_2 -индуцируемой клеточной гибели

Митофагия играет важную роль в контроле качества митохондрий и выживании клеток (Li et al., 2021), а PNB2 участвует в этом процессе (Wei et al., 2017), поэтому мы исследовали изменение содержания PNB2, PINK1 и Parkin в кардиомиоцитах H9c2 (Рис. 13). На рисунке 13 (а) показаны Вестерн блоты белков, а на 13 (б) - количественная характеристика денситометрического анализа.

(а)



(б)

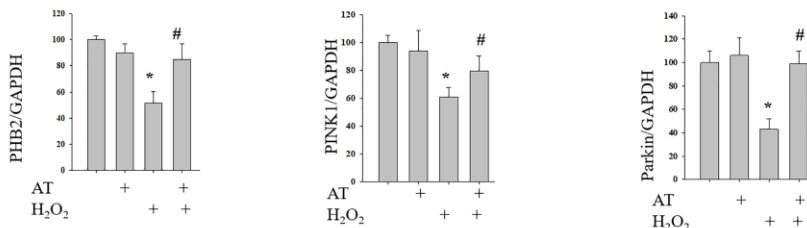


Рисунок 13. Влияние АТ и H_2O_2 на изменение содержания PINK1, Parkin и PNB2 в клетках кардиомиоцитов H9c2. (а) – иммуноокрашивание антителами к PINK1, Parkin и PNB2; (б) - количественная оценка иммуноокрашивания методом компьютерной денситометрии, представленная как соотношение белков к GAPDH. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=4), * $p < 0,05$ значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ значимое изменение по сравнению с H_2O_2 .

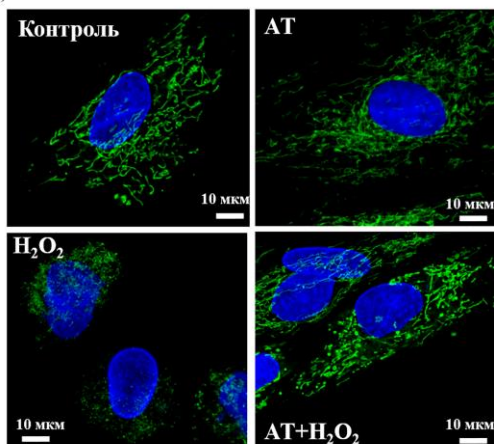
Из рисунка видно, что содержание белков в клетках, инкубированных с АТ (10 мкМ) не отличалось от контроля, тогда как в присутствии 100 мкМ H_2O_2 содержание PNB2, PINK1 и Parkin снижалось на ~ 50, 40 и 60% соответственно по сравнению с контролем. При совместном действии АТ с H_2O_2 содержание PNB2, PINK1 и Parkin не отличалось от контроля, но повышалось на ~ 35, 20 и 55% соответственно по сравнению с одиночным действием H_2O_2 .

Аналогичные результаты были получены при доксорубицин-индуцированной клеточной гибели.

Поскольку содержание PNB2 снижалось в присутствии H_2O_2 , это могло приводить к нарушению PINK1/Parkin – зависимого пути митохондриальной аутофагии (Yan et al., 2020). Напротив, повышение уровня PNB2 почти до контрольных значений, наблюдаемое в присутствии АТ и маркеров митохондриальной аутофагии, могло свидетельствовать о восстановлении митохондриальной аутофагии.

Известно, что снижение содержания PNB2 приводит к нарушению морфологической структуры митохондрий и их фрагментации (Artal-Sanz et al., 2003), поэтому на следующем этапе было исследовано влияние АТ (10 мкМ) на морфологические изменения митохондрий в кардиомиоцитах Н9с2 при H_2O_2 (100 мкМ) -индуцируемой клеточной гибели (Рис. 14).

(а)



(б)

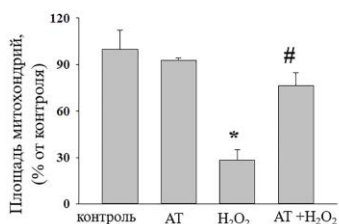


Рисунок 14. Влияние АТ (10 мкМ) и H_2O_2 (100 мкМ) на изменение митохондриальной массы в клетках кардиомиоцитов Н9с2. (а) – фотографии конфокальной микроскопии в различных условиях; (б) – диаграмма, отражающая изменение площади митохондрий. Необработанные клетки служили контролем. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n=6$), * $p < 0,05$ значимое изменение по сравнению с контролем, # $p < 0,05$ значимое изменение по сравнению с H_2O_2 .

На рисунке 14 (а) показаны изображения конфокальной микроскопии в клетках Н9с2 под воздействием АТ и H_2O_2 , которые использовались для создания диаграммы, отражающей изменения площади митохондриальной массы в клетках (Рис. 14 (б)). Как видно из рисунка, инкубация клеток с АТ в течение 4 часов не изменяла площадь митохондриальной массы, тогда как в присутствии H_2O_2 этот показатель снижался на 70%. При совместном использовании АТ и H_2O_2 площадь митохондрий не отличалась от контрольных значений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучено влияние АТ на параметры окислительного фосфорилирования, ответственные за функциональное состояние митохондрий сердца крыс при ИЗО-индуцированной митохондриальной дисфункции, а также при H₂O₂-индуцируемой клеточной гибели в кардиомиоцитах линии Н9с2. Было показано, что при нарушении показателей окислительного фосфорилирования, в частности дыхательного контроля, активности комплексов дыхательной цепи, а также транспорта Ca²⁺, набухания митохондрий, изменения ΔΨ_м и белков, участвующих в слиянии, делении митохондрий и митофагии, АТ обладает защитным эффектом, предотвращает изменение указанных параметров и может использоваться как индикатор

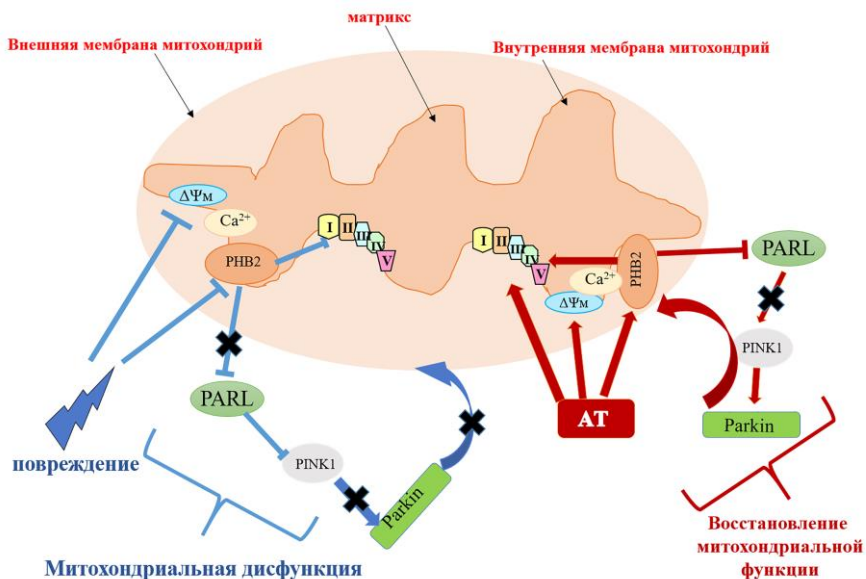


Рисунок 15. Предполагаемый механизм действия АТ в митохондриях.

контроля качества митохондрий. На основании полученных результатов на рисунке 15 представлена схема предполагаемого механизма защитного действия АТ в митохондриях сердца. Повреждения, вызываемые ИЗО в митохондриях сердца крыс и пероксидом водорода или доксорубицином в культуре кардиомиоцитов линии Н9с2, приводили к снижению митохондриального мембранного потенциала, а также к снижению содержания РНВ2, что в свою очередь, уменьшало активность комплексов дыхательной цепи, дыхательный контроль и увеличивало чувствительность митохондрий к Ca²⁺. Снижение уровня РНВ2 в митохондриях активировало протеазу PARL, которая расщепляла PINK1, что ингибировало рекрутирование Parkin в митохондрии из цитозоля и нарушало процесс

митофагии. Поврежденные митохондрии накапливались и не удалялись, поэтому возникала митохондриальная дисфункция. При введении АТ происходило повышение содержания РНВ2, что приводило к восстановлению мембранного потенциала и дыхательного контроля митохондрий и делало их более устойчивыми к Ca^{2+} нагрузке и в целом восстанавливало эффективность митохондрий. Использование АТ в терапии может стать перспективным подходом для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Астаксантин оказывает защитное действие на функциональное состояние митохондрий сердца крыс при изопротеренол-индуцированной митохондриальной дисфункции, что характеризуется повышением дыхательного контроля, активности комплексов ЭТЦ, мембранного потенциала и устойчивостью к Ca^{2+} нагрузке.
2. Астаксантин предотвращает вызванные изопротеренол-индуцированным воздействием изменения в содержании прохибитина 2 и белков, участвующих в процессах слияния, деления и митофагии (Mfn2, DRP1, PINK1, Parkin).
3. В митохондриях прохибитин является потенциальной мишенью защитного действия астаксантина, направленного на восстановление процесса митофагии.
4. Астаксантин предотвращает повышение содержания цитозольного Ca^{2+} и продукции АФК, падение мембранного потенциала, изменение содержания белков-маркеров митофагии, митохондриальной массы и снижение жизнеспособности кардиомиоцитов линии H9c2, вызванные действием индукторов клеточной гибели (пероксида водорода и доксорубицина).
5. Астаксантин обладает протекторным действием и может рассматриваться в качестве препарата для терапии патологических состояний, сопровождающихся нарушением функций митохондрий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Krestinina O.V., Baburina Y.L., Krestinin R.R., Odinkova I.V., Fadeeva I.S., Sotnikova L.D. Astaxanthin Prevents Mitochondrial Impairment Induced by Isoproterenol in Isolated Rat Heart Mitochondria. // *Antioxidants*. 2020. V. 9, iss. 3. Art.No. 262. <https://doi.org/10.3390/antiox9030262>

2. Krestinin R.R., Baburina Y.L., Odinkova I.V., Kruglov A.G., Fadeeva I.S., Zvyagina A.I., Sotnikova L.D., Krestinina O.V. Isoproterenol-Induced Permeability Transition Pore-Related Dysfunction of Heart Mitochondria Is Attenuated by Astaxanthin. // *Biomedicines*. 2020. V. 8, iss. 10. Art.No. 437. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100437>
3. Krestinina O.V., Baburina Y.L., Krestinin R.R. Mitochondrion as a Target of Astaxanthin Therapy in Heart Failure. // *International journal of molecular sciences*. 2021. V. 22, iss. 15. Art.No. 7964. <https://doi.org/10.3390/ijms22157964>
4. Baburina Y.L., Krestinin R.R., Odinkova I.V., Fadeeva I.S., Sotnikova L.D., Krestinina O.V. The Identification of Prohibitin in the Rat Heart Mitochondria in Heart Failure. // *Biomedicines*. 2021. V. 9, iss. 12. Art.No. 1793. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121793>
5. Krestinin R.R., Baburina Y.L., Odinkova I.V., Kruglov A.G., Sotnikova L.D., Krestinina O.V. The effect of astaxanthin on mitochondrial dynamics in rat heart mitochondria under ISO-induced injury. // *Antioxidants*. 2023. V. 12, iss. 6. Art.No. 1247. <https://doi.org/10.3390/antiox12061247>
6. Krestinin R.R., Kobyakova M.I., Baburina Y.L., Sotnikova L.D., Krestinina O.V. Astaxanthin Protects against H₂O₂- and Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in H9c2 Rat Myocardial Cells. // *Life*. 2024. V. 14, iss. 11. Art.No. 1409. <https://doi.org/10.3390/life14111409>
7. Krestinin R.R., Kobyakova M.I., Baburina Y.L., Sotnikova L.D., Krestinina O.V. Astaxanthin Reduces H₂O₂- and Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in H9c2 Cardiomyocyte Cells. // *Biochemistry (Moscow)*. 2024. V. 89, iss. 10. P. 1823-1833. <https://doi.org/10.1134/S0006297924100122>

По результатам работы опубликовано 7 тезисов в сборниках материалов конференций