

*На правах рукописи*

**Хизриева Саимат Ибрагимовна**

**ИНТЕНСИВНОСТЬ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА  
И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЕМБРАН  
МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ**

1.5.4. Биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2023 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Дагестанский государственный университет»

**Научный руководитель:** **Халилов Рустам Абдуразакович**  
кандидат биологических наук, доцент  
Дагестанского государственного университета

**Официальные оппоненты:** **Белослудцев Константин Николаевич**  
доктор биологических наук, доцент,  
проректор по инновационной деятельности  
Марийского государственного университета

**Новожилов Артемий Викторович**  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник лаборатории  
сравнительной биохимии ферментов Института  
эволюционной физиологии и биохимии  
им.И.М.Сеченова Российской академии наук

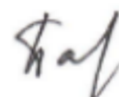
**Ведущая организация:** Институт биофизики клетки Российской академии наук - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ИБК РАН)

Защита состоится 28 ноября 2023 г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.152.02 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН) по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44. Тел.: (812) 552-79-01, e-mail: office@iephb.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН, с авторефератом – на сайте ВАК РФ, с диссертацией и авторефератом – на сайте ИЭФБ РАН: <https://www.iephb.ru/nauka/dissertacionnyj-sovet/>

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Парнова Р. Г.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Из всего многообразия сложных климатических и геофизических влияний на биосистемы, температура является одним из наиболее важных экологических факторов. Несмотря на то, что у гомойотермов эволюция пошла в направлении стабилизации температуры тела на одном уровне (Hochachka, Somero, 2002), в экстремальных для организма условиях (ишемии, гипоксии, отравлении, переохлаждении) температура тела гомойотермов может существенно снижаться. Снижение температуры тела на 2-3 и более градусов называется гипотермией. Гипотермия нашла широкое практическое применение в медицине при хирургических вмешательствах (Yan et al., 2013; Søreide, 2014; Yamada et al., 2021), ишемическом инсульте головного мозга (Tang, Yenari, 2010; Onose et al., 2022), травме спинного и головного мозга (Andresen et al., 2015; Strapazzon et al., 2021), поскольку обладает протективными свойствами и нивелирует негативные последствия различных травм. Защита, обусловленная понижением температуры тела, является результатом снижения скорости метаболических процессов и уменьшения потребности тканей в кислороде и глюкозе. Однако наряду с положительными эффектами гипотермия вызывает ряд нежелательных изменений. Гипотермия приводит к метаболическому ацидозу, увеличению вязкости плазмы крови, снижению деформируемости эритроцитов и затруднению их прохода через микрокапилляры, увеличения сродства гемоглобина к кислороду, в результате чего наступают гипоксические состояния (Глуткин, Зинчук, 2009; Polderman, 2009; Brown, 2012; Alva et al., 2013; Paal et al., 2022).

Множество научных работ подтверждают, что гипотермические состояния вызывают генерацию активных форм кислорода (АФК) и азота с последующим развитием оксидативного стресса (Alva et al., 2013; Кличханов и др., 2016; Schaible et al., 2018; Kong et al., 2020; Klichkhanov, Dzhafarova, 2021). Известно, что АФК могут стимулировать перекисное окисление липидов (ПОЛ), способствуют окислительной модификации как растворимых, так и мембранно-связанных белков (окислительная модификация белков, ОМБ), что приводит к потере их функциональной активности (Dalle-Donne et al., 2003; Lipinski, 2011; Fernando et al., 2016; Sies et al., 2017; Hernansanz-Agustín, Enríquez, 2021). Начальные этапы гипотермии (30°C) способствуют интенсификации прооксидантных процессов на фоне истощения компонентов антиоксидантной системы (Эмирбеков, Кличханов, 2011; Alva et al., 2013; Schaible et al., 2018). Пролонгирование и углубление умеренной гипотермии может изменить скорость генерации и элиминации АФК. Было показано, что в эритроцитах и плазме крови при 1-часовой гипотермии происходит интенсификация ОМБ и ПОЛ, тогда как при пролонгированной 3-часовой гипотермии - нормализация этих показателей (Klichkhanov, Dzhafarova, 2021). Однако механизмы, посредством которых за достаточно короткий промежуток времени (3 ч) происходят столь существенные изменения содержания интермедиатов оксидативного стресса в крови, не вполне ясны.

В гомеостатических и метаболических процессах крови печень принимает непосредственное участие. В гепатоцитах происходит биохимическая трансформация токсических соединений, в том числе продуктов ПОЛ и ОМБ, которые могут поступать в печень из крови (Ayala et al., 2014). Гомеостатические и метаболические процессы печени

тесно связаны с функционированием митохондрий гепатоцитов. В митохондриях протекает множество метаболических процессов, вместе с тем они являются одним из источников АФК в клетке и одновременно служат для них мишенью, что приводит к нарушениям целостности структуры и функций митохондрий. Окислительная модификация липидов и белков митохондриальных мембран может изменить их микровязкость, проницаемость, мембранный потенциал, активность ферментов дыхательной цепи и АТФазы. Поэтому наиболее перспективными для детального раскрытия механизмов генерации и утилизации АФК на различных этапах развития гипотермического состояния является исследование прооксидантно-антиоксидантного статуса митохондрий и зависимости гипотермического состояния от функционального состояния компонентов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ).

**Цели и задачи.** Целью настоящей работы является исследование взаимосвязи между интенсивностью оксидативного стресса и структурно-функциональным состоянием мембран митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности и глубины. Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи:**

1. Исследовать интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) в митохондриях печени крыс при гипотермии.
2. Исследовать активность ферментов и содержание низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы (АОС) в митохондриях печени крыс при гипотермии.
3. Исследовать интенсивность и спектры собственной флуоресценции мембран митохондрий печени крыс при гипотермии.
4. Исследовать структурно-динамические параметры мембран (микровязкость липидной матрицы, полярность фосфолипидов) митохондрий печени крыс при гипотермии.
5. Исследовать кинетические характеристики связывания флуоресцентного зонда 1-анилинонафталин-8-сульфоната (1,8-АНС) с митохондриями печени крыс при гипотермии.
6. Исследовать респираторные характеристики митохондрий печени крыс при гипотермии.
7. Исследовать кинетику набухания и кальциевую ёмкость митохондрий печени крыс при гипотермии.

**Научная новизна исследования.** В данной работе впервые продемонстрировано влияние гипотермии различной глубины и длительности на состояние прооксидантной и антиоксидантной систем, структурно-динамические и функциональные параметры митохондрий печени крыс. Впервые показано, что в митохондриях печени крыс при умеренной кратковременной и пролонгированной до 1 ч гипотермии происходит интенсификация ПОЛ и ОМБ. При этом большинство параметров перекисидации липидов и модификации белков при пролонгированной до 3 ч гипотермии держатся на уровне контрольных значений. Установлено, что умеренная кратковременная гипотермия и ее пролонгирование оказывают значительный эффект на ряд функциональных параметров митохондрий: увеличиваются скорости дыхания и фосфорилирования, изменяются коэффициент окислительного фосфорилирования, чувствительность к ионам кальция и кальциевая ёмкость митохондрий. Обнаружено, что умеренная кратковременная гипотермия и ее пролонгирование снижают микровязкость общих и аннулярных липидов и интенсивность собственной флуоресценции мембранных белков.

**Теоретическая значимость.** Полученные в работе данные об интенсивности оксидативных процессов и о структурно-функциональных характеристиках митохондрий печени крыс расширяют представления о молекулярных механизмах их функционирования

при низких температурах тела гомойотермных животных. Результаты исследования представляют интерес для понимания механизмов формирования патогенеза холодового повреждения, компенсаторно–приспособительных и адаптивных реакций в митохондриях при низкотемпературном стрессе.

**Практическая значимость.** Решение вышеуказанных теоретических проблем может иметь практическое значение для различных медико–биологических приложений, в том числе связанных с адаптацией организма в условиях Заполярья и Крайнего Севера, при выполнении физических нагрузок в экстремальных температурных условиях и в разработке новых криопротекторов и способов предотвращения последствий переохлаждения. Полученные в диссертации результаты используются при чтении спецкурсов «Биофизика», «Кинетика и термодинамика ферментативных реакций», «Биохимия гипометаболических состояний позвоночных» в Дагестанском государственном университете.

**Методология и методы исследования.** Опыты проводились на белых аутбредных ненаркотизированных крысах Вистар массой 220-230 г, полученных из питомника "Столбовая" (НЦБМТ ФМБА России) и содержащихся в стандартных условиях вивария Дагестанского государственного университета. Эксперименты выполнены с соблюдением Приказа Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. ("Правила надлежащей лабораторной практики"). Животных делили на 5 групп по 8 в каждой – контрольную и 4 группы – животных, подвергнутых гипотермии. Доступ к пище и воде был круглосуточный. Температуру тела крыс снижали равномерно со скоростью 0,28°C/мин до 30°C в течение 30 мин (кратковременная умеренная гипотермия). Достигнутый уровень гипотермии поддерживали в течение 1ч и 3ч (продолжительная гипотермия). Контролем служили интактные животные с температурой тела 38,4 °С. Состояние глубокой гипотермии достигалось за 60 мин (0,3 °С/мин). Температуру измеряли в прямой кишке на глубине 4–5 см ректальным цифровым термометром MS6501. Были исследованы следующие состояния животных: 1) Контроль; 2) Кратковременная умеренная гипотермия (30 °С, 30 мин); 3) Умеренная гипотермия, продолжительная до 1 часа (30 °С, 1 час); 4) Умеренная гипотермия, продолжительная до 3-х часов (30 °С, 3 часа); 5) Кратковременная глубокая гипотермия (20 °С, 1 час).

Выделение интактных митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Рыбальченко, Коганов, 1998). Об интенсивности оксидативного стресса в митохондриях печени крыс судили по содержанию маркеров ПОЛ - малонового диальдегида (МДА) (Лысакова и др., 1997), кетодиенов (КД), сопряженных триенов (СТ), оснований Шиффа (ШО) (Волчегарский и др., 1998), гидроперекисей липидов (Mihaljević et al., 1996), и по содержанию маркеров ОМБ – тиоловых групп (Nabeeb, 1972), карбонильных групп (Schild et al., 1997). Активность ферментативных и содержание низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы исследовали на спектрофотометре Beckman DU-730: супероксиддисмутазы (СОД) (Сирота, 2013), глутатионпероксидазы (ГП) (Разыграев, 2004), глутатионредуктазы (ГР) (Mannervik, 2001), восстановленный глутатион (GSH) (Арутюнян и др., 2000) и витамин Е ( $\alpha$ -токоферол) (Тринеева, 2013).

Методом полярографии регистрировали скорости дыхания в разных метаболических состояниях (по Чансу). Определяли P/O, дыхательный контроль по Ларди (V3/V2), по Чансу (V3/V4), чувствительность митохондрий к протонофорам (V5/V4), способность мембран митохондрий сохранять собственный энергетический потенциал (V2/V4). Интенсивность

суммарной флуоресценции митохондриальных белков регистрировали при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм в диапазоне 290–400 нм.

Оценка структурно-динамических свойств мембран митохондрий (микровязкости липидной фазы и аннулярных липидов, полярность фосфолипидов) производили с помощью пирена при температуре 25° С. Микровязкость липидного слоя митохондриальных мембран оценивали при  $\lambda_{\text{возб}} = 337$  нм, микровязкость зон белок-липидных контактов при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм. Максимумы длин волн флуоресценции ( $\lambda_{\text{эмисс}}$ ) составляли для мономеров пирена 394 нм, для эксимеров 470 нм (Владимиров, Добрецов, 1980; Добрецов, 1989; Schönbrunn, 2000.)

Исследования концентрационной зависимости флуоресценции АНС, инкубированной с суспензией митохондрий, проводили в диапазоне концентраций 2,5-30 мкМ при температуре 25°С.  $\lambda_{\text{возб}} = 360$  нм и  $\lambda_{\text{эмисс}} =$  в диапазоне 400-550 нм. Для расчета кинетических характеристик связывания зонда использовали нелинейный многомерный регрессионный анализ (Schönbrunn et al., 2000).

Определение функционального состояния  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцируемой митохондриальной поры производили путем регистрации на спектрофотометре Beckman DU-730 скорости набухания (изменения светопоглощения реакционной смеси,  $\Delta D540/\text{мин}$  на 1 мг белка) митохондрий, инкубированных в среде с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  (Brookes, Darley-Usmar, 2004). Кальциевую емкость изолированных митохондрий печени крыс определяли полярографическим методом.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Динамика изменений липидных и белковых маркеров оксидативного стресса, а также компонентов антиоксидантной системы митохондрий печени имеет различный характер в зависимости от интенсивности и длительности гипотермии.
2. Структурно-динамические параметры митохондриальных мембран изменяются в состоянии умеренной кратковременной гипотермии, углубление гипотермии не приводит к более существенным изменениям.
3. Умеренная гипотермия обуславливает обратимые изменения функциональных показателей митохондрий, при глубокой гипотермии функциональные изменения не превышают отмеченных при умеренной кратковременной гипотермии.
4. Корреляционные связи между показателями интенсивности оксидативного стресса, структурно-динамического и функционального состояния митохондрий различаются по тесноте (силе) и количеству признаков.

**Личный вклад автора.** Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Исследования проводились на кафедре биохимии и биофизики биологического факультета Дагестанского государственного университета. Большинство представленных в исследовании экспериментов, связанных с функционированием митохондрий, проведены автором впервые на кафедре. Автор принимал непосредственное участие в планировании и подготовке экспериментов по исследованию структурно-динамических параметров мембран митохондрий, проводил анализ, теоретическое обобщение и статистическую обработку полученных результатов, а также принимал участие в подготовке к публикации статей и отчетов по теме диссертации. Также автор лично собрал всю необходимую для теоретического анализа литературу. Автор выражает благодарность соавторам по опубликованным статьям.

**Апробация результатов работы.** Результаты исследования обсуждались на Международной научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы» (г. Гродно, Республика Беларусь), 2016, 2022); 21-й, 23-й, 24-й Международной Пушинской школы-конференции для молодых ученых «Биология – наука XXI века» (г. Пушино, 2017, 2019, 2020); Всероссийской молодежной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика'17» (г. Пушино, 2017); на Межрегиональном форуме «Единство-Unitas» (ДГМУ, г. Махачкала, 2018); на IV Фестивале науки Юга России «Наука и молодежь – факторы становления инновационного общества» (г. Махачкала, 2018); 11-й Российской научной конференции по озонотерапии: «Озон: активные формы кислорода, оксид азота и выскоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (г. Нижний Новгород, 2018); «Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм» (г. Махачкала, 2021).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 159 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, содержащего 274 литературных источников, из них 68 русскоязычных и 206 англоязычных. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 6 таблицами и 1 схемой.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Исследование интенсивности оксидативных процессов в митохондриях печени крыс в норме при гипотермии.** При кратковременной гипотермии 30°C наблюдается незначительный рост в таких продуктах ПОЛ, как ДК, КД и СТ, в то время как содержание гидроперекисей липидов, ШО и МДА существенно увеличивается: на 40%, 18,3% и 39,4% соответственно. Часовая умеренная гипотермия, в целом, снижает интенсивность процессов ПОЛ, на это указывает снижение многих продуктов перекисидации липидов до более низких, относительно контроля, уровней. При этом содержание МДА не изменяется и остается на уровне такового крыс, подверженных кратковременной гипотермии. Дальнейшее пролонгирование гипотермии (30°C 3 ч) и углубление (20°C) не приводят к достоверным изменениям в продуктах ПОЛ в митохондриях печени крыс и способствуют нормализации ПОЛ – уровень всех показателей перекисидации липидов достигает контрольных значений.

Образующиеся в митохондриях АФК могут привести к окислительной модификации не только липидов, но и белков. Наиболее чувствительными к окислению являются серосодержащие (тиоловые) аминокислотные остатки белков (Дубинина, 2006). Исследование показало, что умеренная кратковременная гипотермия способствует незначительному (на 8,2 %) снижению концентрации сульфгидрильных групп в белках мембран митохондрий (рис. 1). Пролонгирование гипотермического состояния до 1 ч индуцирует более существенное снижение SH-групп (на 13,6%). 3-х часовая гипотермия способствует их нормализации. Углубление гипотермического состояния до 20°C не оказывает никакого эффекта на содержание тиоловых групп: они остаются на уровне контроля. Корреляционный анализ показал наличие отрицательной корреляции ( $r = -0.76$ ) между содержанием МДА в митохондриях и уровнем SH-групп в мембранных белках при нормотермии и умеренной гипотермией. Анализ содержания SH-групп в белках

митохондриального матрикса (рис. 1) позволил выявить более значимые эффекты кратковременной гипотермии: снижение их уровня составило около 25,6% относительно контроля. Пролонгирование гипотермического состояния до 1 ч сопровождается дальнейшим окислением сульфгидрильных групп матричных белков. 3-часовая гипотермия, напротив, способствует повышению концентрации сульфгидрильных групп относительно пролонгированной 1 ч гипотермии (на 17,6%), однако содержание их еще остается на более низком, относительно контроля, уровне. Глубокая гипотермия не оказывает существенного влияния на уровень сульфгидрильных групп в матричных белках митохондрий, снижение их концентрации составляет всего лишь 11,8%. Окисление боковых радикалов белков может приводить к образованию таких продуктов, как карбонильные группы, которые также часто используются в качестве маркеров окислительного повреждения белков (Dalle-Donne et al, 2003; Дубинина, 2008). На рис. 2 видно, что при кратковременной умеренной гипотермии содержание карбонильных групп в мембранных белках митохондрий печени крыс повышается на 19%. Пролонгирование гипотермического состояния до 1 ч способствует дальнейшему повышению содержания карбонильных групп, которое составляет относительно контроля 52%, а относительно кратковременной гипотермии 28%. При этом 3-часовая гипотермия нормализует уровень карбонильных групп, снижая его на 29,2% относительно часовой гипотермии. Снижение температуры тела крыс до 20°C способствует повышению уровня карбонильных групп на 35% относительно контроля. Корреляционный анализ показал наличие положительной корреляции ( $r=0.71$ ,  $P<0.05$ ) между содержанием МДА в митохондриях и уровнем карбонильных групп в мембранных белках митохондрий при нормотермии и умеренной гипотермии.

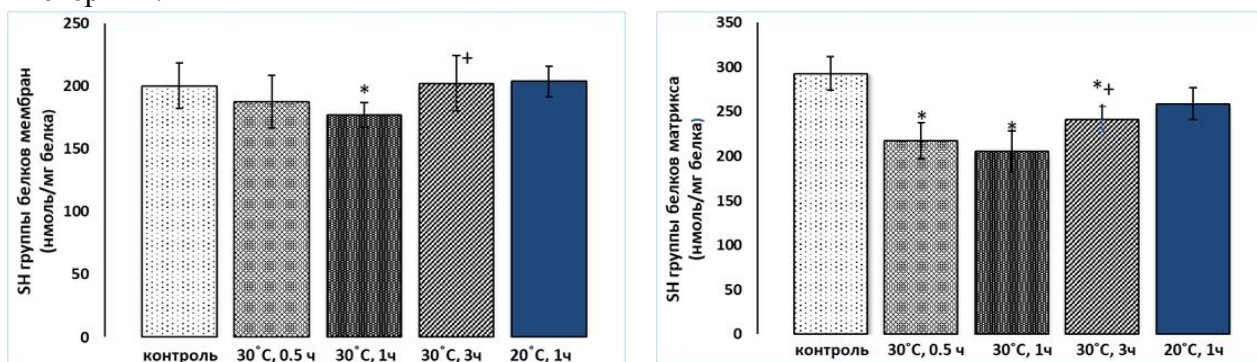


Рисунок 1. Содержание сульфгидрильных групп в белках мембран и матрикса митохондрий печени крыс в контроле, умеренной кратковременной гипотермии (30°C, 0,5 ч), умеренной, пролонгированной 1 ч гипотермии (30°C, 1ч), умеренной пролонгированной 3 ч гипотермии (30°C, 3ч) и глубокой гипотермии (20°C, 1 ч) (Mean±SD, n=8).

Примечание.  $P<0.05$ : \* относительно контроля, # относительно умеренной кратковременной гипотермии, + относительно умеренной пролонгированной 1 ч гипотермии

Гипотермия оказала более существенный эффект на содержание карбонильных групп в матричных белках митохондрий (рис 2). Так, содержание карбонильных групп в них при кратковременной гипотермии увеличилось на 22,9%. Пролонгирование гипотермического состояния до 1 ч способствует повышению уровня карбонильных групп в 2,49 раз относительно контроля и в 2 раза относительно кратковременной гипотермии. Дальнейшее пролонгирование значительно (на 67%) снижает содержание карбонильных групп относительно 1ч гипотермии. При этом содержание карбонильных групп на 17%



ниже контрольного уровня. Глубокая гипотермия также способствует сильно выраженному повышению содержания карбонильных групп, которое относительно контроля составляет 87%.

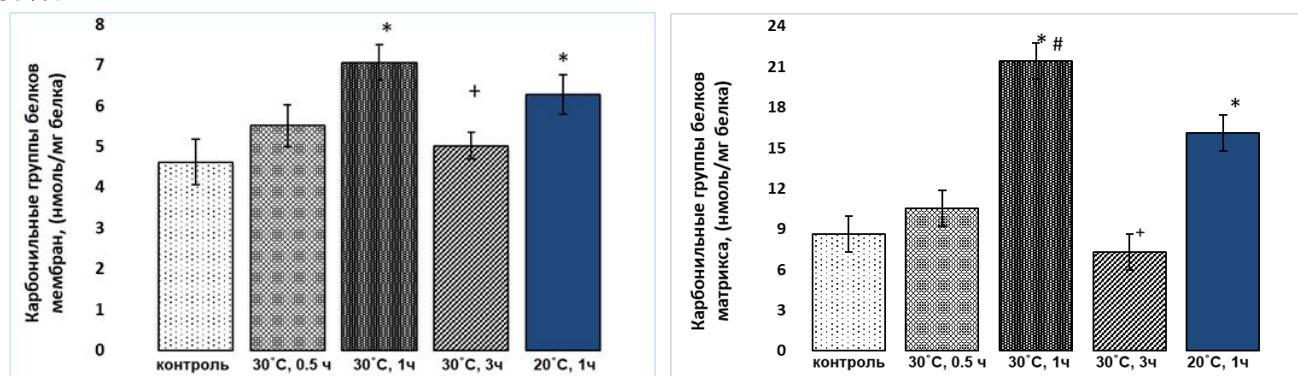


Рисунок 2. Содержание карбонильных групп в белках мембран и матрикса митохондрий печени крыс в норме, умеренной кратковременной гипотермии (30°C, 0.5 ч), умеренной, пролонгированной 1 ч гипотермии (30°C, 1ч), умеренной пролонгированной 3 ч гипотермии (30°C, 3ч) и глубокой гипотермии (20°C, 1ч) (Mean±SD, n=8).

Примечание. P<0.05: \* относительно контроля, # относительно умеренной гипотермии, + - относительно умеренной пролонгированной 1 ч гипотермии.

Результаты нашего исследования указывают на интенсификацию оксидативных процессов на начальных этапах гипотермии, однако пролонгирование гипотермического состояния приводит к нормализации исследуемых значений. Вероятно, снижение содержания продуктов ПОЛ и ОМБ обусловлено изменением состояния антиоксидантной системы в митохондриях и клетках печени.

**Исследование активности ферментов и содержание низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы митохондрий печени крыс в норме и при гипотермии.** Нами исследована активность суммарной СОД (матричная Mn-СОД, межмембранная Cu, Zn-СОД) в митохондриях печени крыс в норме и при гипотермии различной глубины и длительности (рис. 3). Умеренная кратковременная гипотермия способствует повышению активности СОД на 53,2 %. Пролонгирование умеренной гипотермии до 1 ч способствует снижению активности фермента относительно контроля и кратковременной гипотермии на 36,1% и 58,3% соответственно. Пролонгированная 3 ч гипотермия повышает активность фермента: относительно контроля в 2,36 раз относительно кратковременной и пролонгированной одночасовой умеренной гипотермии в 1,5 раз и в 3,7 раз. Углубление гипотермического состояния до 20°C способствует такой же активации фермента, что и его пролонгирование. Образующийся пероксид водорода в митохондриях нейтрализуется ГП, которая используют GSH в качестве восстановителя. Исследование активности ГП показало, что активность фермента при кратковременной гипотермии незначительно (на 11,9%) увеличивается. Пролонгирование умеренной гипотермии до 1 ч способствует значительному снижению активности фермента, которая составляет относительно контроля 49%, а относительно кратковременной гипотермии 54,4% (рис. 4).

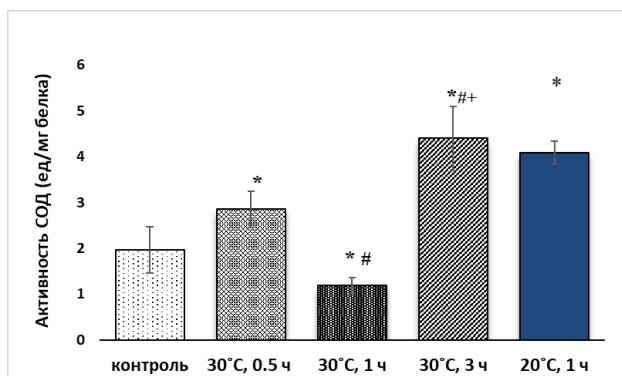


Рисунок 3. Активность суммарной СОД в митохондриях печени крыс в норме, умеренной кратковременной гипотермии (30°C, 0.5ч), умеренной, пролонгированной 1 ч гипотермии (30°C, 1ч), умеренной пролонгированной 3 ч гипотермии (30°C, 3ч) и глубокой гипотермии (20°C, 1ч) (Mean±SD, n=8). Примечание. P<0.05: \* - относительно контроля, # - относительно умеренной кратковременной гипотермии, + относительно умеренной пролонгированной 1 ч гипотермии..

Дальнейшее пролонгирование умеренной гипотермии до 3 ч способствует повышению активности фермента относительно пролонгированной гипотермии 1 час на 20,2%, при этом значение активности фермента остаются ниже таковых кратковременной гипотермии и контроля. Эффекты глубокой гипотермии подобны эффектам пролонгированной 3-часовой гипотермии т.е. активность фермента относительно контроля оказывается на достаточно низком уровне. Восстановление глутатион-дисульфида (GSSG), образующегося в ГП реакции происходит под воздействием ГР, которая использует NADPH в качестве донатора водорода. Результаты экспериментов по изучению активности ГР в митохондриях печени крыс представлены на рис. 4. Дальнейшее пролонгирование гипотермического состояния до 3 ч повышает активность фермента относительно пролонгированной 1 ч гипотермии на 40%, а относительно кратковременной гипотермии на 26,2%, при этом значение активности ГР не превышает контрольных значений. При углублении гипотермического состояния значение держится на уровне умеренной кратковременной гипотермии.

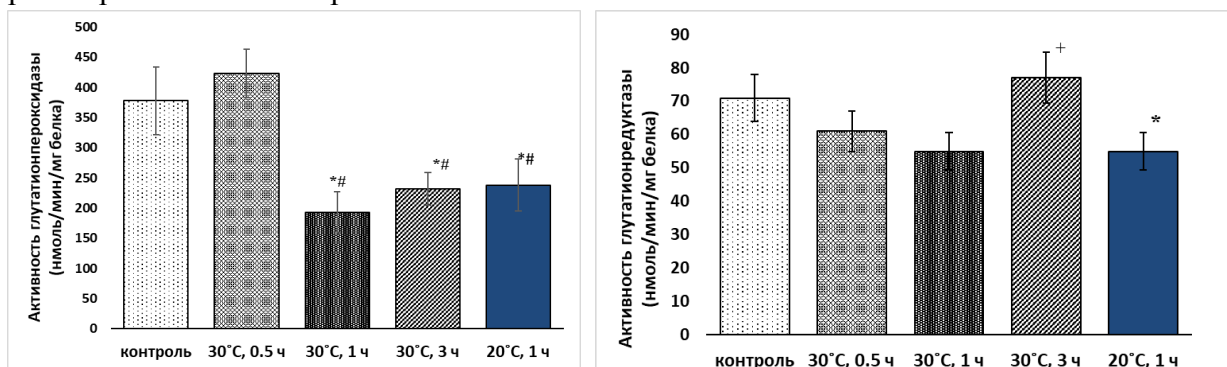


Рисунок 4. Активность ГП и ГР в митохондриях печени крыс в норме, умеренной кратковременной гипотермии (30°C, 0.5ч), умеренной пролонгированной 1 ч гипотермии (30°C, 1ч), умеренной пролонгированной 3 ч гипотермии (30°C, 3ч) и глубокой гипотермии (20°C, 1ч) (Mean±SD, n=8).

Примечание. P<0.05: \* относительно контроля, # относительно умеренной кратковременной гипотермии, + относительно пролонгированной 1 ч гипотермии

Исследование восстановленного глутатиона показало (рис. 5), что кратковременная умеренная гипотермия способствует снижению уровня глутатиона на 27,6% относительно контроля. Пролонгирование гипотермического состояния до 1 ч способствует дальнейшему снижению уровня глутатиона, Дальнейшее пролонгирование гипотермии до 3 ч повышает

его на 54,2% относительно 1 ч пролонгированной гипотермии, однако содержание антиоксиданта остается по прежнему низким по сравнению с контролем. Глубокая гипотермия примерно в такой же степени что и пролонгированная 3-часовая гипотермия оказывает влияние на содержание глутатиона. Между активностью ГП и содержанием глутатиона также обнаружена достаточно слабая положительная корреляция ( $r = 0.61$ ).

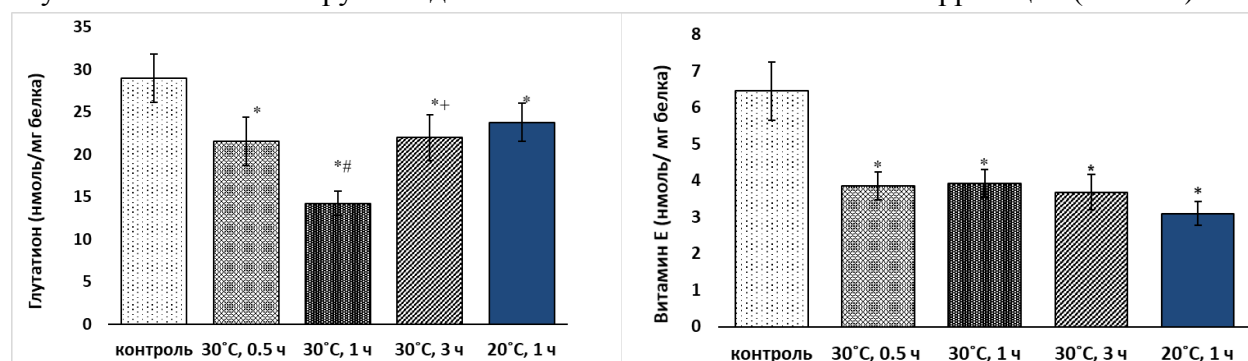


Рисунок 5. Содержание глутатиона и витамина Е в митохондриях печени крыс в норме, умеренной кратковременной гипотермии (30°C, 0.5ч), умеренной пролонгированной 1 ч гипотермии (30°C, 1ч), умеренной пролонгированной 3 ч гипотермии (30°C, 3ч) и глубокой гипотермии (20°C, 1ч) (Mean±SD, n=8). Примечание. P<0.05: \* относительно контроля, # относительно умеренной кратковременной гипотермии, + относительно умеренной пролонгированной 1 ч гипотермии.

Исследование содержания витамина Е в митохондриях показало его значительное (на 40,2%) снижение относительно контроля (рис. 5). Пролонгирование гипотермии до 1 и 3 ч не приводит к дальнейшему снижению витамина Е. Наиболее существенные изменения в содержании витамина происходят при глубокой гипотермии: снижение содержания витамина составляет 52%. Таким образом, на начальных этапах умеренной гипотермии происходит снижение уровня низкомолекулярных компонентов и активности ферментов АОС митохондрий печени крыс (СОД, ГП, ГР). Пролонгирование гипотермии до 3 ч повышает содержание глутатиона, активности СОД и ГР, а углубление гипотермии до 20 °С не оказывает существенного влияния на параметры АОС по сравнению с умеренной пролонгированной гипотермией.

**Исследование суммарной флуоресценции в митохондриях печени крыс в норме и при гипотермии.** В контроле спектр суммарной флуоресценции митохондрий имеет симметричную колоколообразную форму с максимумом интенсивности около 333 нм (рис. б). На всех этапах гипотермии, кроме 3-часовой умеренной гипотермии интенсивность суммарной флуоресценции митохондрий достоверно снижается при этом существенно не изменяются другие спектральные параметры ( $\lambda_{\text{max}}$ ), например, изменение спектральной асимметрии. Этот факт можно объяснить дезорганизацией митохондриальной мембраны в результате процессов ПОЛ наряду с явными конформационными перестройками мембранных белков.

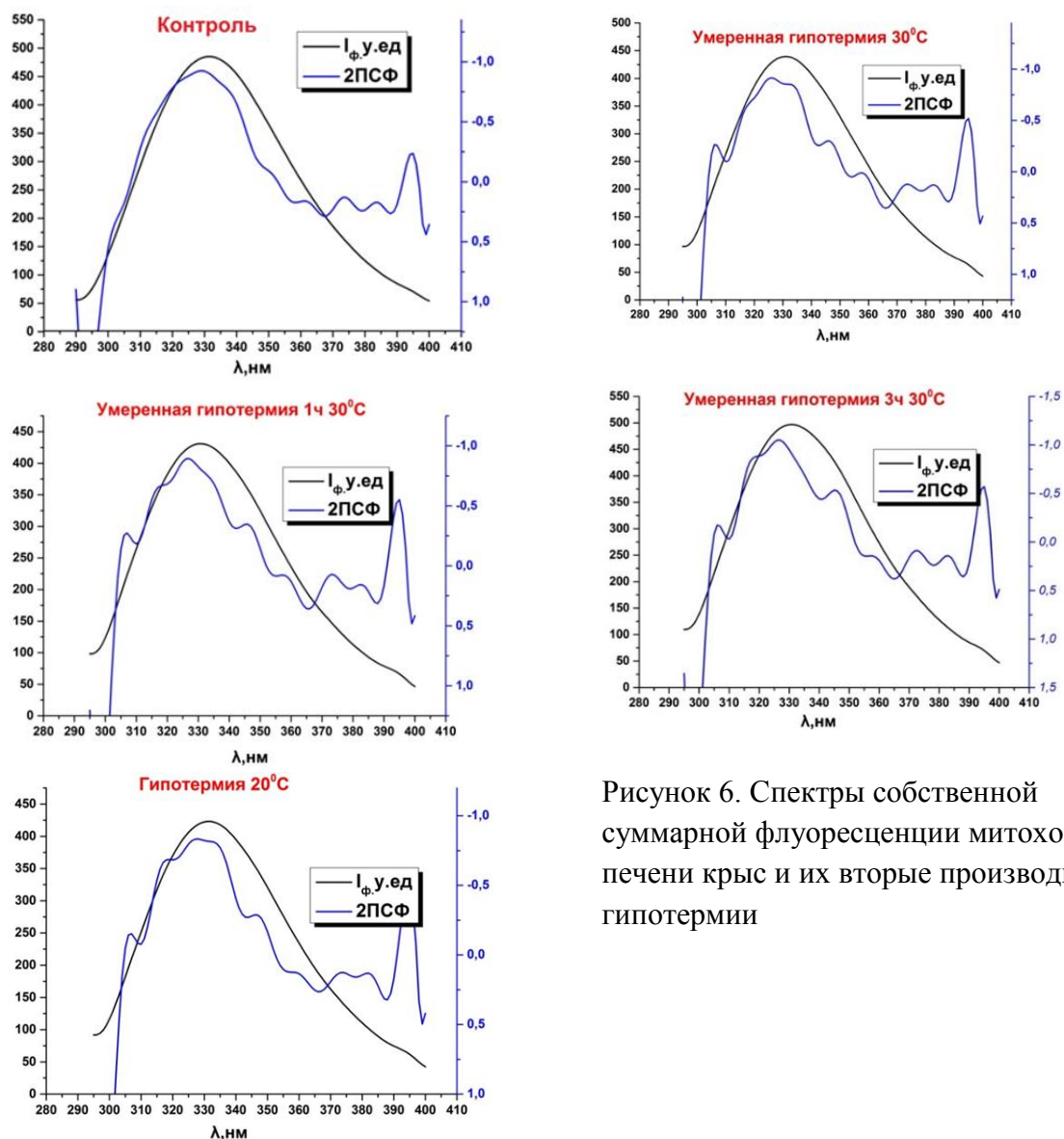


Рисунок 6. Спектры собственной суммарной флуоресценции митохондрий печени крыс и их вторые производные при гипотермии

При анализе спектров флуоресценции предпочтительно применять вторые производные спектров флуоресценции (2ПСФ) (Mozo-Villarias, 2002), как наиболее информативные. Использование 2ПСФ оправдано тем, что они, по сравнению с исходными спектрами, дают возможность получить более детальную информацию о состоянии микроокружения ароматических остатков белков, а в ряде случаев также и разделить вклад тирозиновой и триптофановой составляющих в суммарный спектр. В нашем случае, применение вторых производных, при анализе спектров флуоресценции, показало, что при гипотермии, в спектрах вторых производных флуоресценции формируется пик на 305 нм соответствующий тирозиновой флуоресценции. Помимо тирозинового компонента, в спектрах вторых производных суммарной флуоресценции митохондриальных белков, при гипотермии, наблюдается формирование длинноволновых пиков (345 нм, 355 нм), соответствующих триптофанилам, расположены на периферии молекулы белка, которые частично или полностью контактируют с водным окружением. Данные пики отсутствуют в спектрах вторых производных флуоресценции митохондрий в контроле (рис.6). Это свидетельствует о конформационных перестройках белков в липидном окружении (Lakowicz, 2006).

**Исследование структурно-динамических параметров мембран митохондрий печени крыс в норме и при гипотермии.** Гипотермия может опосредованно оказывать влияние на функциональную активность ферментов ЭТЦ и на скорость передачи электронов во внутренней мембране митохондрий. Для проверки гипотезы было проведено исследование структурно-динамических свойств мембран митохондрий печени крыс (микровязкости липидной фазы и аннулярных липидов, степени погружения белков в липидный слой). С помощью метода флуоресцентной спектроскопии был произведен анализ спектров флуоресценции пирена, связанного с митохондриальными мембранами. В липидном бислое мономерные способны образовывать эксимерные формы, количество которых зависит от скорости латеральной диффузии зонда. Это в свою очередь определяется микровязкостью липидной матрицы.

Таким образом, коэффициент эксимеризации пирена, представляющий собой отношение интенсивности флуоресценции эксимеров и мономеров пирена  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ , является величиной обратно пропорциональной микровязкости липидов. При этом отношение  $F_{470}/F_{395}$  нм при  $\lambda_{\text{возб}} = 337$  нм отражает микровязкость липидных слоев мембраны клеток, а при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм - микровязкость зонда липид-белковых контактов. (Добрецов, 1980). Кроме этого, спектральные характеристики пирена могут быть использованы для оценки полярности его окружения. Соотношение максимумов флуоресценции пирена  $F_{372}/F_{393}$  при  $\lambda_{\text{возб}} = 337$  нм характеризует изменения полярности микроокружения его мономеров в общих липидах, а при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм - в аннулярных липидах. Пирен также позволяет оценить структурные перестройки мембранных белков по изменению эффективности переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков белков на флуоресцентный зонд. (Владимиров, Добрецов, 1980; Добрецов, 1989). Степень тушения флуоресценции белков мембран митохондрий измеряли при  $\lambda_{\text{возб}} = 280$  нм и  $\lambda_{\text{флу}} = 333$  нм в отсутствие пирена и после инкубации с зондом. Эффективность переноса энергии определяли по выражению:  $(F_0 - F)/F_0 \times 100$ , где  $F_0$  – интенсивность флуоресценции суспензии мембран митохондрий в отсутствие пирена;  $F$  – интенсивность флуоресценции суспензии мембран митохондрий после инкубации с пиреном (7,76 мкМ). Значение параметра  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 337$ ) сразу после снижения температуры тела возрастает на 24%. Пролонгирование гипотермии до 1 и 3 ч не вызывает дальнейших изменений  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$ . Углубление гипотермического состояния до 20 °С также способствует снижению коэффициента эксимеризации пирена на 20 %. На фоне снижения относительной микровязкости липидного бислоя мембран митохондрий при гипотермии наблюдается увеличение параметра  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$ ). Увеличение параметра  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$ ) начинается сразу после снижения температуры тела и составляет 25%. Дальнейшее пролонгирование гипотермического состояния и углубление его до 20°С не сопровождается изменениями  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$ ). Таким образом, сразу же после снижения температуры тела достоверно снижается микровязкость как общих липидов митохондриальной мембраны, так и аннулярных. Параметр  $(F_0 - F)/F_0$  зонда пирена, характеризующего снижение эффективности переноса энергии электронного возбуждения с триптофановых остатков мембранных белков на пирен при всех исследованных гипотермических состояниях, не претерпевает достоверных изменений. Полученные результаты показывают, что в мембранах митохондрий печени крыс при всех исследованных гипотермических состояниях параметр  $F_{370}/F_{390}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 280$ ), характеризующий полярность микроокружения зонда в области аннулярных липидов, существенно не изменяется. При этом



продолгование гипотермического состояния и углубление его до 20°C приводит к достаточно выраженным изменениям параметра  $F_{370}/F_{390}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 337$ ), характеризующего полярность микроокружения зонда в общих липидах. Так продолгование гипотермии до 1 часа и 3-х часов приводит к повышению  $F_{370}/F_{390}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 337$ ) ~ на 10%. Наиболее значимые изменения параметра  $F_{370}/F_{390}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 337$ ) претерпевает при глубокой гипотермии: он увеличивается на 13,1% относительно контроля.

Полученные данные свидетельствуют об изменении структурно-динамических характеристик мембран митохондрий печени крыс. После понижения температуры тела повышается значение параметра  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$  ( $\lambda_{\text{возб}} = 337$ ) и  $F_{\text{Э}}/F_{\text{М}}$  ( $\lambda_{\text{возб}}=280$ ), что свидетельствует о повышении текучести (или соответствующее снижение микровязкости) липидного бислоя мембран и зон белок-липидных контактов митохондрий, по сравнению с нормой, поскольку степень эксимеризации пирена находится в обратной зависимости от микровязкости липидной фазы.

**Исследование интенсивности флуоресценции и кинетических характеристик связывания АНС митохондриями печени крыс в норме и при гипотермии.** АФК и продукты ПОЛ посредством окислительной модификации митохондриальных белков могут привести к изменению их конформационного состояния. Широкое применение для характеристики структурно-динамических свойств белковых молекул нашел флуоресцентный зонд АНС (Gasymov, Glasgow, 2007). Для расчета кинетических параметров связывания АНС с интактными митохондриями печени контрольных и гипотермированных крыс нами была исследована концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции АНС в диапазоне концентраций 2,5-30 мкМ при инкубации зонда с препаратом митохондрий. Исследование позволяет предположить наличие как минимум двух типов участков связывания зонда, имеющих различное сродство к АНС, одни из которых обеспечивают более полярное окружение зонда, а другие менее полярное.

Из таблицы 1 видно, что константы диссоциации двух гетерогенных сайтов связывания АНС митохондриями печени крыс в норме существенно отличаются:  $K_{d2}$  больше  $K_{d1}$  в 2.24 раз. При этом отличается и кажущееся число центров связывания АНС ( $N_1$  и  $N_2$ ). Так участков первого типа связывания ( $N_1$ ) меньше таковых второго типа ( $N_2$ ) на 24,43%. Данный факт, скорее всего, является следствием связывания АНС как с гидрофобными “карманами” белка (имеющих более высокое сродство к зонду), так и с остатками положительно заряженных аминокислот (имеющих более низкое сродство к зонду).

Таблица 1. Кинетические параметры связывания АНС с митохондриями печени крыс в норме и при гипотермии (Mean±SD, n=8)

Состояние животного	$N_1$ (y.ед)	$N_2$ (y.ед)	$K_{d1}$ , мкМ	$K_{d2}$ , мкМ
контроль	827,99±28,49	1095,7±79,5	4,13±0,31	9,3±0,98
Гипотермия 30°C, 30мин	671, 59±63,70***	1145,7±89,6	4,2±0,20	16,3±1,12**
Гипотермия 30°C, 1 ч	644,274±55,02***	1143,6±32	4,0±0,14	15,3± 1,15**
Гипотермия 30°C, 3 ч	649,22±49,41***	1084,53±59,3	4,3±0,04	17,6±1,24**
Гипотермия 20°C, 60мин	696,5 ±66***	1163,4±40,6	3,9±0,25	15,4±1,13**

Примечание: \* P<0.05; \*\* P≤0.01; \*\*\* P≤0.001 относительно контроля

Интенсивность флуоресценции АНС и кинетика его связывания с митохондриями гипотермированных крыс претерпевает значительные изменения. При кратковременной гипотермии интенсивность флуоресценции АНС инкубированного с митохондриями значительно снижается и остается примерно на этом же уровне при гипотермии продолжительностью 1 ч. Пролонгирование гипотермии до 3 ч способствует дальнейшему снижению интенсивности флуоресценции АНС, однако это снижение по сравнению с кратковременной гипотермией не является ярко выраженным. Глубокая гипотермия не приводит к значительным изменениям интенсивности флуоресценции АНС относительно умеренной кратковременной гипотермии и контроля. Анализ изменений кинетических параметров связывания АНС с митохондриями гипотермированных крыс показал, что кратковременная гипотермия приводит к снижению  $N_1$  на 18%, однако в динамике гипотермических состояний значения  $N_1$  не претерпевают достоверных изменений относительно умеренной кратковременной гипотермии. Параметр  $K_{d1}$  у гипотермированных крыс держится на уровне контрольных значений. Вместе с тем, параметр  $N_2$  существенно не меняется в динамике гипотермических состояний, а  $K_{d2}$  при умеренной кратковременной гипотермии повышается на 76% относительно контроля и держится приблизительно на том же уровне при других гипотермических состояниях. Таким образом, гипотермия приводит к снижению интенсивности флуоресценции АНС, значительные изменения в кинетике связывания АНС с митохондриями печени крыс возникают при кратковременной умеренной гипотермии.

**Исследование биоэнергетических характеристик митохондрий печени крыс в норме и при гипотермии.** Исследованы биоэнергетические характеристики митохондрий печени крыс: скорость дыхания при различных метаболических состояниях, дыхательный контроль, коэффициент окислительного фосфорилирования, скорость фосфорилирования печени крыс в норме и при гипотермии различной глубины и длительности. Метаболические состояния митохондрий (по Чансу):  $V_1$  - скорость эндогенного дыхания;  $V_2$  - скорость дыхания после добавления субстрата (3 мМ сукцината калия или 5 мМ глутамата калия),  $V_3$  - после добавления АДФ (100 мкМ) и  $KH_2PO_4$  (1мМ),  $V_4$  - после истощения, добавленного АДФ,  $V_5$  - после добавления 2,4-ДНФ (100 мкМ). Снижение температуры тела крыс до 30°C приводит к повышению скоростей дыхания в различной степени во всех метаболических состояниях, как при сукцинат, так при глутамат-зависимом дыхании. При пролонгировании гипотермии до 1 ч происходит дальнейшая стимуляция дыхания во всех метаболических состояниях как на сукцинат, так и на глутамат-зависимом дыхании. Пролонгирование гипотермического состояния до 3 ч в сукцинат-зависимом дыхании приводит к снижению скоростей дыхания во всех метаболических состояниях близким к значениям умеренной кратковременной гипотермии, та же картина наблюдается и при глутамат-зависимом дыхании. При гипотермии 20°C в митохондриях печени крыс при сукцинат- и глутамат-зависимом дыхании достигает значений близких к умеренной кратковременной гипотермии.

Исследование сукцинат-зависимого дыхания показало, что умеренная кратковременная и глубокая гипотермии в одинаковой степени (на 17%) повышают скорость фосфорилирования ( $V_{\text{фосф}}$ ). Умеренная кратковременная гипотермия на фоне выраженных изменений скоростей дыхания способствует незначительному повышению  $V_{\text{фосф}}$ . Пролонгированная 1 час гипотермия приводит к дальнейшему повышению скорости на 21%. Дальнейшее пролонгирование гипотермического ведёт к снижению

$V_{\text{фосф}}$  до значений чуть ниже контрольных (рис. 7). Исследование глутамат-зависимого дыхания митохондрий позволило обнаружить, что умеренная гипотермия сопровождается существенным повышением  $V_{\text{фосф}}$  (на 70,9%). Исследование глутамат-зависимого дыхания митохондрий позволило обнаружить, что умеренная гипотермия сопровождается существенным повышением  $V_{\text{фосф}}$  (на 70,9%). Однако, при пролонгировании гипотермии до 1ч и 3ч изменение скорости не происходит. Снижение температуры тела (до 20°C) незначительно снижает этот параметр относительно умеренной.

Разобщение дыхания и фосфорилирования на сукцинате при умеренной кратковременной гипотермии сопровождается снижением P/O на 16% относительно контроля (рис. 7). Пролонгирование гипотермического состояния до 1 часа снижает P/O на 30%. Пролонгированная умеренная 3 ч и глубокая кратковременная гипотермия повышают P/O до значений умеренной кратковременной гипотермии. Умеренная кратковременная гипотермия при глутамат-зависимом дыхании приводит к незначительному снижению P/O, пролонгирование до 1 ч снижает P/O на 11%. Пролонгированная 3 ч и глубокая кратковременная гипотермии повышают P/O до контрольных значений.

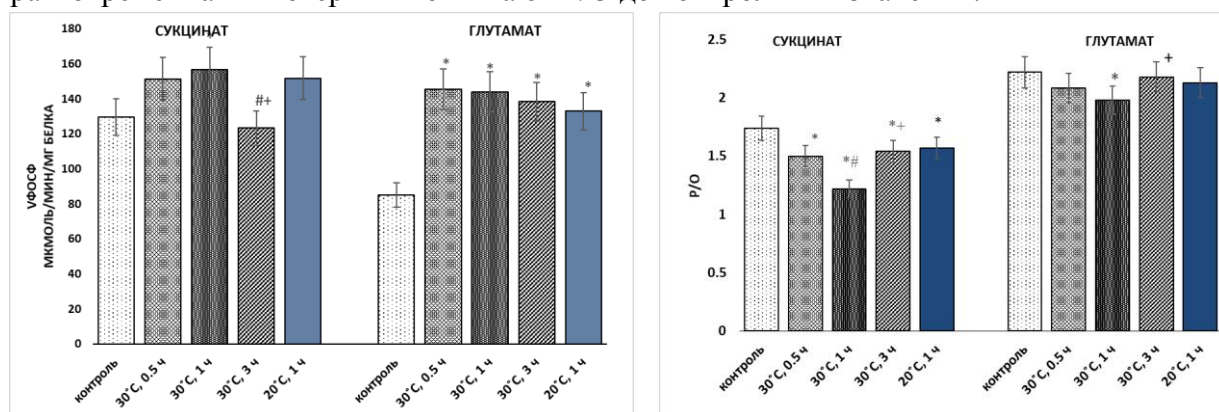


Рисунок 7. Скорость фосфорилирования ( $V_{\text{фосф}}$ ) и значения коэффициента окислительного фосфорилирования (P/O) митохондрий печени крыс в норме (1) и при умеренной кратковременной гипотермии (2), умеренной пролонгированной 1ч гипотермии (3), умеренной пролонгированной 3ч гипотермии (4), глубокой кратковременной гипотермии (5). (Mean±SD, n=8). Примечание, P<0.05: \* относительно контроля, # относительно умеренной кратковременной гипотермии; + относительно пролонгированной 1 ч гипотермии

На рис. 8 представлены значения дыхательного контроля по Ларди и по Чансу. Умеренная гипотермия незначительно снижает значения ДК по Ларди (отношение  $V_3/V_2$ ) и по Чансу (отношение  $V_3/V_4$ ). Пролонгирование гипотермии до 1 ч способствует выраженному снижению дыхательных контролей, как по Чансу (на 20%), так и по Ларди (на 25,7%). Пролонгирование гипотермии до 3 ч способствует повышению дыхательного контроля по Ларди на 12% относительно пролонгированной 1 ч, но ниже на 10% относительно контроля. ДК по Чансу возрастает до уровня контрольных значений. Снижение температуры тела до 20 °C вызывает незначительное повышение ДК по Ларди относительно умеренной гипотермии, при этом ДК по Чансу остается на уровне умеренной гипотермии. При глутамат-зависимом дыхании умеренная кратковременная гипотермия снижает ДК по Ларди на 23%, а по Чансу на 16,6%. Пролонгирование до 1 часа приводит к дальнейшему снижению ДК по Ларди на 16,5% относительно умеренной кратковременной и на 27% относительно контроля. Снижение температуры тела до 20 °C



вызывает незначительное повышение ДК по Ларди относительно умеренной гипотермии, при этом ДК по Чансу остается на уровне контроля. Ни глубокая и умеренные кратковременная и пролонгированные 1ч и 3ч гипотермии не оказывают достоверных изменений отношения V2/V4 как при сукцинат-, так и при глутамат-зависимом дыхании. Это свидетельствует о том, что митохондрии гипотермированных животных сохраняют способность удерживать свой энергетический потенциал. На начальных этапах умеренной гипотермии отношение V5/V4, характеризующее чувствительность митохондрий к протонофору 2,4 ДНФ, снижается при сукцинат-зависимом дыхании. Пролонгирование гипотермии до 1 ч способствует повышению значения этого параметра, а до 3 ч - его полной нормализации, однако значения параметра не достоверны. При глутамат-зависимом дыхании митохондрии сохраняют способность сохранять свой энергетический потенциал. Таким образом, основной вклад в изменение биоэнергетических характеристик митохондрий, при снижении температуры тела, вносит именно начальные этапы развития гипотермического состояния.

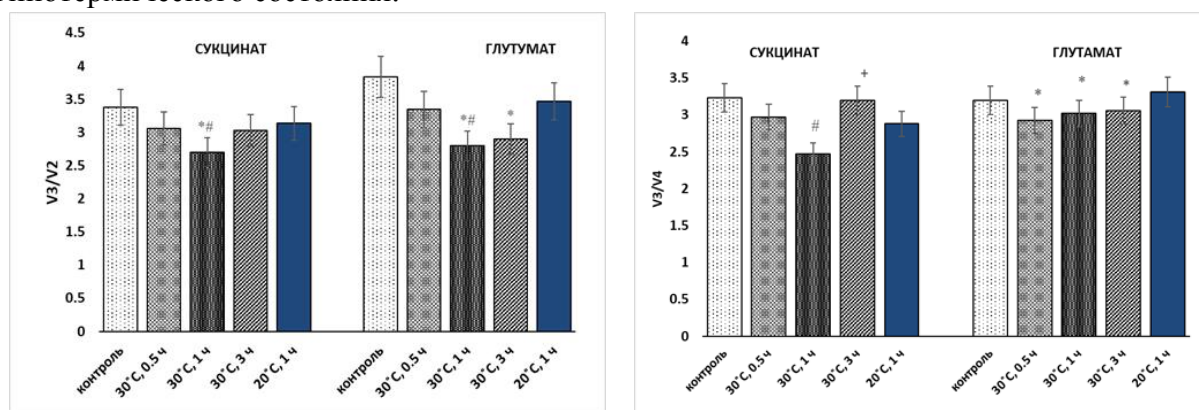


Рисунок 8. Дыхательный контроль по Ларди (V3/V2) и по Чансу (V3/V4) митохондрий печени крыс в норме (1) и при умеренной кратковременной гипотермии (2), умеренной пролонгированной 1ч гипотермии (3), умеренной пролонгированной 3ч гипотермии (4), глубокой кратковременной гипотермии (5). (Mean±SD, n=8).

Примечание, P<0.05: \* относительно контроля, # относительно умеренной кратковременной гипотермии; + относительно пролонгированной 1 ч гипотермии;

**Исследование Ca<sup>2+</sup>-индуцированной проницаемости митохондрий печени крыс в норме и при гипотермии.** Повышение проницаемости митохондрий может происходить в результате образования митохондриальных пор. Повышение проводимости митохондриальных мембран вызывает проникновение в митохондрии молекул воды, что вызывает резкое повышение осмотического давления и набухание митохондрий, и выход митохондриальных компонентов в цитоплазму (Baranov et al., 2008). Открытие неспецифической Ca<sup>2+</sup>-зависимой поры митохондрий, энергизованных путем окисления сукцината в присутствии Ca<sup>2+</sup>, изменяет проницаемость митохондрий (Petronilli, 1993). Таким образом, о проницаемости митохондрий можно судить по степени набухания митохондрий и индукции его ионами кальция.

Кинетику набухания митохондрий можно оценить спектрофотометрически, по снижению оптической плотности инкубационной среды, содержащей митохондрии. Кинетические кривые изменения оптической плотности митохондрий контрольных крыс при добавлении ионов кальция имеют нелинейный характер, свидетельствующий о наличии двух фаз набухания митохондрий: быстрой (в течение первых 160 сек) и

медленной. т.е. открытие митохондриальной поры вызывает резкое изменение проницаемости митохондрий. Кратковременная гипотермия существенно изменяет кинетику  $\text{Ca}^{2+}$  индуцированного набухания митохондрий. Характер набухания митохондрий после добавления ионов кальция у гипотермированных крыс значительно отличается от контроля. Кинетические кривые имеют резко выраженный характер. Удлиняется время развития медленной стадии, а время быстрой стадии составляет - 200 сек. Причем она приобретает стационарный характер на более коротких отрезках времени по сравнению с контролем. Исследование кинетики набухания митохондрий крыс при пролонгированной 1 час гипотермии показало, что динамика набухания их в целом схожа с таковой крыс, подверженных кратковременной гипотермии. Однако следует отметить, что кривые демонстрируют более плавный переход быстрой фазы в медленную, что может являться свидетельством еще более низкой чувствительности митохондрий к кальцию. При этом кривые на изученных временных отрезках не достигают стационарной кинетики.

Исследование кинетики набухания митохондрий печени крыс при 3-часовой гипотермии демонстрирует, что кинетические кривые в целом схожи с таковых контрольных крыс. Время перехода с быстрой фазы в медленную значительно сокращается по сравнению с таковым переходом у крыс, гипотермированных в течение 1 ч. Стационарная кинетика достигается на 600-й секунде. По изменению оптической плотности можно вычислить скорости набухания митохондрий, представляющие производные оптической плотности во времени ( $dD/dt$ ). На рис. 9 видно, что при кратковременной гипотермии скорость набухания митохондрий при добавлении кальция уменьшается на 36,4% относительно контроля. Пролонгирование гипотермического состояния способствует дальнейшему снижению скорости набухания, оно становится меньше контроля на 45,5%. Дальнейшее пролонгирование гипотермического состояния способствует повышению скорости набухания и его нормализации. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что митохондрии печени контрольных крыс имеют большую чувствительность к  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированному открытию митохондриальной поры, по сравнению с митохондриями печени животных, подвергшихся кратковременной и пролонгированной 1 ч гипотермии.

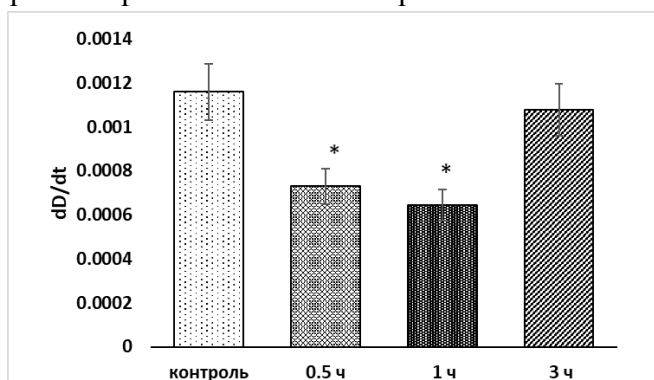


Рисунок 9. Скорость набухания ( $dD/dt$ ) митохондрий печени крыс в норме и гипотермии (Mean $\pm$ SD, n=8): 1 – контроль, 2 – гипотермия 30°C, 30 мин; 3 – гипотермия 30°C, 1 ч; 4 – гипотермия 30°C, 3 ч. Примечание: \* P<0.05 относительно контроля.

**Исследование кальций-аккумулирующей способности митохондрий печени крыс в норме и при гипотермии.** Под кальциевой ёмкостью понимается максимальное количество кальция (мкМ), которое можно закачать в митохондрию, прежде чем в ней образуется митохондриальная пора. Оценка кальциевой ёмкости может производиться полярографическим методом. Нами была исследована кальциевая емкость митохондрий в норме и в гипотермии. Оказалось, что при кратковременной гипотермии она снижается на 19%. Пролонгированная 1 ч гипотермия способствует дальнейшему снижению кальциевой

емкости. Оно составляет относительно контроля 26%. Дальнейшее пролонгирование гипотермии увеличивает кальциевую емкость на 28% относительно часовой гипотермии. Таким образом, начальные этапы гипотермии приводят к снижению кальциевой емкости, однако пролонгированная 3 ч гипотермия способствует нормализации данного параметра.

Таблица 2. Корреляционные связи параметров оксидативного стресса и структурно-функционального состояния митохондрий печени крыс при гипотермии.

Параметры	Карбонильные группы	GSH	ФЭ/ФМ (λвозб=280)	ФЭ/М (λвозб=337)	N1 (1,8-АНС)	Витамин Е	Кальциевая емкость	SH-группы
МДА	$r = 0,71^*$	$r = 0,77$						$r = -0,76^*$
Активность ГР		$r = 0,61^*$						
SH-группы		$r = 0,98^*$					$r = 0,98$	
N1 (1,8-АНС)			$r = -0,96^*$					
Скорость набухания							$r = 0,94^*$	$r = 0,98^*$
V фосф (глут)			$r = 0,95^*$	$r = 0,94^*$	$r = -0,98^*$	$r = -0,9^*$		
P/O (сукц)		$r = 0,99^*$					$r = 0,85^*$	
P/O (глут)	$r = -0,93^*$						$r = 0,88^*$	
V3/V2 (сукц.)		$r = 0,98^*$						
V3/V2 (глут)		$r = 0,87^*$						

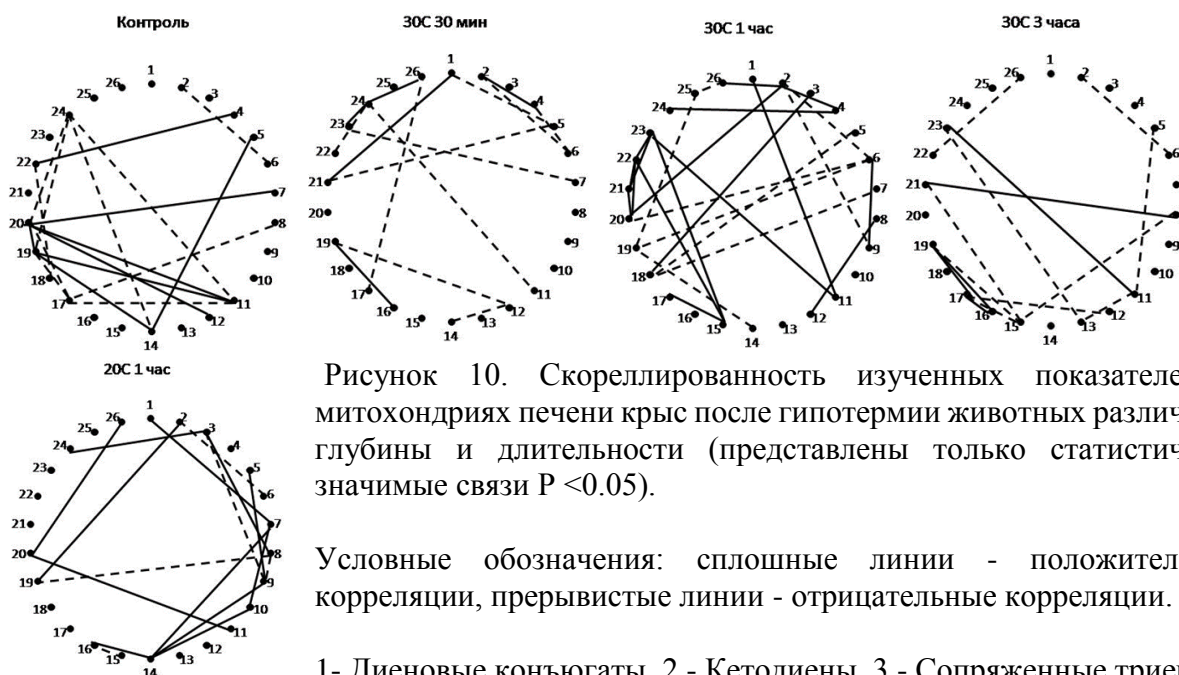


Рисунок 10. Скоррелированность изученных показателей в митохондриях печени крыс после гипотермии животных различной глубины и длительности (представлены только статистически значимые связи  $P < 0,05$ ).

Условные обозначения: сплошные линии - положительные корреляции, прерывистые линии - отрицательные корреляции.

1- Диеновые конъюгаты, 2 - Кетодиены, 3 - Сопряженные триены, 4 - Гидроперекиси липидов, 5 - МДА, 6 - Основания Шиффа, 7 - SH-группы белков мембран, 8 - SH-группы белков матрикса, 9 - Глутатион, 10 - Витамин Е, 11 - Карбонильные группы белков мембран, 12 - Карбонильные группы белков матрикса, 13 - ФЭ/ФМ (λвозб=337), 14 - ФЭ/ФМ (λвозб=280), 15 - N1 (1,8-АНС), 16 - Kd (АНС), 17 - V (фосф.) глут, 18 - P/O (сукц), 19 - P/O (глут), 20 - V3/V2 (сукц), 21 - V3/V2 (глут), 22 - Скорость набухания, 23 - Кальциевая емкость, 24 - СОД, 25 - ГР, 26 - ГП

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашего исследования демонстрируют интенсификацию оксидативных процессов в митохондриях печени крыс при кратковременной и пролонгированной умеренной гипотермии, о чем свидетельствуют высокие уровни продуктов ПОЛ и ОМБ. При этом происходит значительное истощение уровня низкомолекулярных (GSH, вит.Е) и высокомолекулярных (тиоловые группы белков) компонентов АОС митохондрий и снижение активности её ключевых ферментов (СОД, ГП, ГР). Снижение уровня GSH на начальных этапах гипотермии указывает на его использование как для непосредственной нейтрализации АФК, так и для восстановления образующихся перекисей липидов.

Между содержанием GSH и МДА наблюдается отрицательная корреляция ( $r=-0,765$ ;  $p=0,13$ ), однако отсутствие достоверности может свидетельствовать о том, что значительный вклад в снижение уровня пероксидации мембранных липидов может вносить вит.Е, тогда как глутатион участвует в других процессах, связанных с нейтрализацией АФК. Пролонгирование гипотермии до 3-х часов способствует нормализации маркеров оксидативного стресса; вероятно, это связано с повышением активности СОД и ГР.

Окислительная модификация мембранных липидов и белков митохондрий может оказать эффект на ряд структурно-динамических и функциональных характеристик митохондрий. При кратковременной гипотермии происходит существенное снижение вязкости общих и аннулярных липидов, при этом пролонгирование или углубление гипотермического состояния не оказывает дальнейшего эффекта на фазовое состояние липидной матрицы.

Между содержанием GSH и P/O сукцинат-зависимого дыхания имеется положительная корреляция ( $r=0,99$ ;  $P\leq 0,0005$ ). Кроме того, положительная корреляция обнаружена между содержанием GSH и дыхательным контролем по Ларди как глутамат-зависимого ( $r=0,98$ ;  $P\leq 0,005$ ), так и сукцинат-зависимого дыхания ( $r=0,87$ ;  $P<0,05$ ). Следовательно, снижение уровня глутатиона может способствовать активации процессов окислительной модификации липидных и белковых компонентов мембраны митохондрий и привести к соответствующему снижению показателей P/O, дыхательного контроля, чувствительности к 2,4-ДНФ. Между содержанием карбонильных групп в белках мембран митохондрий и P/O глутамат-зависимого дыхания обнаружена отрицательная корреляция ( $r=-0,93$ ;  $P<0,05$ ), что свидетельствует в пользу данного предположения.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о существенной интенсификации глутамат- и сукцинат-зависимого и дыхания митохондрий, что может внести определенный вклад в производство АФК. Поскольку кратковременная гипотермия способствует более значительной стимуляции дыхания митохондрий на глутамате, можно предположить, что на начальных этапах гипотермии наиболее существенные изменения происходят в функционировании комплекса I дыхательной цепи митохондрий.

Пролонгирование гипотермического состояния до 3-х часов способствует усилению сукцинат-зависимого дыхания, при этом скорости глутамат-зависимого остаются высокими. Повышение интенсивности дыхания на сукцинате направлено, скорее всего, на сохранение энергообразующей функции митохондрий. Высокий уровень глутамат-зависимого дыхания и низкие значения ДК при 3-часовой гипотермии указывают на усилении протонной проводимости, снижение разности электрохимических потенциалов на внутренней мембране митохондрий, что обуславливает снижение продукции АФК.

Окислительные модификации структурных компонентов митохондриальных мембран могут существенно изменить проницаемость митохондрий для различных ионов и проапоптических факторов (McStay et al., 2002). Полученные данные указывают на повышение неспецифической проницаемости и снижение кальций-аккумулирующей способности митохондрий на начальных этапах гипотермии. При 3-часовой гипотермии происходит нормализация чувствительности митохондрий к ионам кальция.

Установлено, что у глутатиона наибольшее количество корреляционных связей (табл.2). Из этого следует, что развитие оксидативного стресса на начальных этапах гипотермии связано со снижением уровня GSH, который участвует в нейтрализации АФК, с последующим нарушением тиолового статуса белков. Более детально участие глутатионовой системы демонстрируют коррелограммы (рис.10). После 1-часового холодового воздействия как при 30°C, так и 20°C показатели начинают коррелировать с уровнем GSH, а в первом случае и с активностью ГП и ГР. Максимальное количество корреляционных связей отмечается после 1-часового воздействия температуры 20° С. Таким образом, глутатионовая система преимущественно обеспечивает адаптацию организма к воздействию гипотермии.

### **ВЫВОДЫ**

1. Умеренная кратковременная гипотермия длительностью до 1 ч приводит к повышению уровня всех маркеров оксидативного стресса (ОМБ, ПОЛ) и снижению уровня и активности компонентов АОС, пролонгирование умеренной гипотермии до 3 ч способствует нормализации исследуемых маркеров, тогда как глубокая гипотермия приводит только к повышению уровня ОМБ.
2. Как умеренная, так и глубокая гипотермия обуславливают схожие изменения структурно-динамических характеристик митохондриальных мембран: снижение микровязкости липидного бислоя и зон белок-липидных контактов, увеличение полярности липидного бислоя, конформационные изменения мембранных белков.
3. Кратковременная глубокая и умеренная гипотермия длительностью до 1 ч обуславливают снижение кальциевой ёмкости и скорости набухания митохондрий, увеличение скорости глутамат- и сукцинат-зависимого дыхания, но снижение дыхательного контроля, коэффициента Р/О и чувствительности к разобщителю. Пролонгирование умеренной гипотермии до 3-х часов приводит к нормализации функциональных показателей митохондрий.
4. Характер корреляционных связей между показателями интенсивности оксидативного стресса, активности компонентов АОС, структурно-динамического и функционального состояния митохондрий позволяет предполагать причинно-следственную зависимость между уровнем восстановленного глутатиона и способностью мембран митохондрий сохранять собственный энергетический потенциал.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Халилов Р. А. Биоэнергетические характеристики митохондрий печени крыс при низких температурах тела / Р. А. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, – 2019. – Т. 22, № 5. – С.24–29.
2. Халилов Р. А. Интенсивность свободнорадикальных процессов в митохондриях печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности / Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, С. И. Хизриева, В. Р. Абдуллаев // Цитология, – 2019. – Т. 91, № 7. – С. 1–12.
3. Халилов Р. А. Респираторные характеристики митохондрий печени крыс зависят от длительности умеренной гипотермии / Р. А. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, – 2020. – Т. 169, № 1, – С. 33–38.
4. Халилов Р. А. Флуоресцентные исследования структурно-динамических параметров мембран митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности / Р. А. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев // Биомембраны. – 2021. –Т. 38. № 5. – С. 351-362.
5. Хизриева С. И. Антиоксидантный статус митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии разной длительности / С. И. Хизриева, Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. –2021. –Т. 172. № 9. – С. 292-297.
6. Хизриева С. И., Халилов Р.А., Джафарова А.М., Абдуллаев В.Р. Кальций-аккумулирующая способность митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности / С. И. Хизриева, Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2023. - Т. 59. № 4. С. 311-319.

### Публикации в других изданиях

1. Хизриева С. И. Флуоресцентный анализ в оценке структурных модификаций белков митохондрий печени крыс при гипотермии/ С. И. Хизриева, Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, В. Р. Абдуллаев // Сборник материалов Международной научно-практической конференции «Кислород и свободные радикалы», г. Гродно (Республика Беларусь), -2016, С.179- 181.
2. Хизриева С. И. Влияние умеренной гипотермии на структурную модификацию и антиоксидантную систему митохондрий печени крыс / С. И. Хизриева С. И., З. М. Гаммадаева, З. А. Фатулаева // Сборник тезисов Всероссийской молодежной конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика'17», г. Пущино, - 2017, С.38-39.
3. Хизриева С.И. Интенсивность свободнорадикальных процессов в митохондриях печени крыс при глубокой гипотермии / С. И. Хизриева, Р.А. Халилов, А. М. Джафарова // «Биорадикалы и Антиоксиданты», Т. 5; № 3, -2018, С. 75-77.
4. Хизриева С. И. Исследование биоэнергетических характеристик митохондрий печени крыс при низких температурах тела / С. И. Хизриева С. И., Халилов Р. А., Джафарова А. М. // 23 Международная Пущинская школа-конференция для молодых ученых «Биология – наука XXI века» г. Пущино, - 2019, С. 189.
5. Хизриева С. И. Изменения биоэнергетических характеристик митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности / С. И. Хизриева С. И., Халилов Р. А., Джафарова А. М. // 24 Международная Пущинская школа-конференция для молодых ученых «Биология – наука XXI века» г. Пущино, - 2020, С. 130.
6. Хизриева С. И. Определение степени пермеабиллизации мембран митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности // Теоретические и практические аспекты действия естественной и искусственной гипотермии на организм. Тезисы докладов Всероссийской конференции, г. Махачкала. –2021. – С. 70-71.

7. Хизриева С. И. Влияние гипотермии различной глубины и длительности на антиоксидантный статус митохондрий печени крыс. / С. И. Хизриева, Р. А. Халилов, А. М. Джафарова // Кислород и свободные радикалы. г. Гродно. –2022. – С. 177-180.

### Список сокращений

1,8 АНС - 1-анилинонафталин-8-сульфат; АФК - активные формы кислорода; АОС - антиоксидантная система; АО - антиоксиданты; МДА - малоновый диальдегид; ПОЛ - перекисное окисление липидов; ОМБ - окислительная модификация белков; 2,4-ДНФ - 2,4-динитрофенол; СОД - супероксиддисмутаза; ДК - диеновые конъюгаты; КД – кетодиены; 2ПСФ - вторые производные спектров флуоресценции; СТ – сопряженные триены; ШО – основания Шиффа; ГР - глутатионредуктаза; ГП - глутатионпероксидаза; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; GSH - восстановленный глутатион; GSSG - окисленный глутатион;

### Список цитируемых в автореферате источников

**Alva N.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2013, 2013:10.; **Andresen M. et al.** Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine. 2015, 23(1):2-7.; **Ayala A. et al.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2014, 2014:1-31.; **Baranov S. V. et al.** The journal of biological chemistry. 2008, 283(2):665–676.; **Brookes P. S., Darley-Usmar V. M.** Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004, 286:39–46.; **Brown D. J. et al.** J. Med. 2012, 1930.; **Dalle-Donne I. et al.** Clinica Chimica Acta. 2003, 329:23-38.; **Fernando N. et al.** Plos one. 2016, 11(6):1-15.; **Gasymov O. K., Glasgow B. J.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Proteins and Proteomics. 2007, 1774(3):403–411.; **Habeeb. A. F. S. A.** Meth. Enzymol. 1972, 34457–464.; **Hernansanz-Agustín P., Enríquez J. A.** Antioxidants. 2021, 10:415.; **Hochachka, Somero P.** Biochemical adaptation. Oxford, 2002. – 466 p.; **Klichkhanov N. K. et al.** In Advances in Health and Disease. 2021.; **Kong X. et al.** Frontiers in Physiology. 2020, 11:1–9. **Lakowicz J. R.** Photochem. and Photobiol. 2000. 72(4):421–437.; **Lipinski B.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2011, 2011:1–9.; **Mannervik B.** Curr. Protoc. Toxicol. 2001. Ch. 7. Unit 7.2.; **McStay G. P. et al.** Biochem J. 2002, 367(2):541–548.; **Mihaljević B. et al.** Free Radical Biology and Medicine. 1996, 21:53–63.; **Mozo-Villarias A.** Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 2002, 50(2-3):163–178.; **Onose G. et al.** Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(907):1–36.; **Paal P. et al.** Int. J. Environ. Res. Public Health. 2022, 19 (501):1-25.; **Petronilli V. et al.** J. Biol. Chem. 1993, 268:21939–21945.; **Polderman K. H.** Critical Care Medicine. 2009, 37(7):186–202.; **Schaible N. et al.** Cryobiology. 2018, 81:57–64.; **Schild L. et al.** Biochem. J. 1997, 328:205–210.; **Schönbrunn E.** PNAS. 2000, 97(12):6345–634.; **Sies H. et al.** Annu. Rev. Biochem. 2017, 8 (6):715–748.; **Søreide K.** Injury. 2014, 45 (4):647-654.; **Strapazzon G. et al.** J Appl Physiol. 2021, 130:237–244.; **Tang X. N., Yenari M. A.** Ageing Research Reviews. 2010, 9(1):61–68.; **Yamada K. P. et al.** Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2021, 8:10.; **Yan H. et al.** Ann Cardiothorac. Tian. – 2013, 2 (2):163–168.; **Арутюнян А. В. и др.** Методические рекомендации. – СПб.: ИКФ «Фолиант». 2000, С.104. **Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е.** – М.: Наука. 1980, 430 с.; **Волчегарский И. А. и др.** Вопросы медицинской химии. 1998, 35:127–181.; **Глуткин С. В., Зинчук В. В.** Журнал ГрГМУ. 2009, 2:24-27.; **Добрецов Г. Е.** М.: Наука. 1989, 227с.; **Дубинина Е. Е., Пустыгина А. В.** Укр. біохім. журн. 2008, 80(6):5–18.; **Кличханов Н. К. и др.** Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2016, 1(5):104–109.; **Лысакова Т. И. и др.** Биофизика. 1997, 42(2):408–411.; **Разыграев А. В.** Клинико-лабораторный консилиум. 2004, 4:19.; **Рыбальченко В. К., Коганов М. М.** Киев: ВШ. 1998, 312 с. **Сирота Т. В.** Биомед. химия. 2013, 59(4):399–410.; **Тринеева О. В.** Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2013, 1:212–224.; **Эмирбеков Э. З., Кличханов Н. К.** Монография Минобрнауки РФ, Федеральное гос. авт. образовательное учреждение высш. проф. образования "ЮФУ", 2011.