

КАЛЬЦИЙ-АККУМУЛИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

© 2023 г. С. И. Хизриева¹, Р. А. Халилов¹, А. М. Джафарова^{1,*}, В. Р. Абдуллаев¹

¹Дагестанский государственный университет, г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

*e-mail: albina19764@mail.ru

Поступила в редакцию 25.04.2023 г.

После доработки 16.06.2023 г.

Принята к публикации 18.06.2023 г.

Кальций является одним из важнейших внутриклеточных мессенджеров, регулирующих физиологические и биохимические процессы в клетке. Митохондрии способны депонировать ионы кальция и участвуют в регуляции кальциевого сигнала. Гипотермические состояния у гомеотермных животных могут привести к нарушению этой важнейшей функции митохондрий и патологическим последствиям. Целью данного исследования является изучение эффектов умеренной (30°C) гипотермии различной длительности на кальций-аккумулирующую способность митохондрий печени крыс. Опыты проводились на крысах-самцах Вистар. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная вода. Выделение митохондрий из печени декапированных крыс производили методом дифференциального центрифугирования. Кальций-аккумулирующую способность митохондрий оценивали по кинетике кальций-индуцированного набухания митохондрий и их кальциевой емкости. Исследование кинетики кальций-индуцированного набухания митохондрий показало, что при кратковременной умеренной (30°C) гипотермии скорость набухания митохондрий снижается, пролонгирование гипотермии до 1 ч способствует дальнейшему снижению скорости набухания, а до 3 ч – ее нормализации. Между скоростью кальций-индуцированного набухания и кальциевой емкостью митохондрий выявлена положительная корреляционная связь ($r = 0.79$). Таким образом, при длительном воздействии холодового фактора у крыс происходит активация ряда компенсаторно-приспособительных реакций. Снижение скорости Ca^{2+} – индуцированного набухания и кальциевой емкости митохондрий на начальных этапах гипотермии, возможно, связано с образованием митохондриальных пор и носит обратимый характер.

Ключевые слова: крысы, гипотермия, митохондрий, Ca^{2+} – индуцированное набухание митохондрий, кальциевая емкость

DOI: 10.31857/S0044452923040046, **EDN:** YXUJTY

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что митохондрии способны поглощать и удерживать ионы кальция, регулируя клеточные кальциевые сигналы, и одновременно выступать в качестве Ca^{2+} буфера и депо наряду с эндоплазматическим ретикуломом [1]. Поступление в митохондрии Ca^{2+} зависит от электрохимического протонного градиента ($\Delta\mu\text{H}^+$), концентрации Ca^{2+} в матриксе и цитозоле. Захват кальция энерги-

зованными митохондриями связан с метаболизмом, пролиферацией и многими специфическими функциями клеток [2]. Различные патологические и стрессовые состояния организма могут быть связаны с нарушениями митохондриальных структур и функций, участвующих в транспорте и аккумуляции ионов кальция или участвующих в регуляции кальциевого гомеостаза клетки.

Гипотермия – это патологическое состояние гомеотермного животного, развивающееся при снижении температуры тела. Случайная (акцидентальная) гипотермия имеет место у животных, обитающих в регионах со значительными колебаниями температурного режима. Риск развития такой гипотермии подвергаются люди, жизнь или профессиональная деятельность которых связана с длительным пребыванием в условиях низких температур. У здорового человека под воздействием холода наступает первичная случайная гипотермия,

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; Р/О – коэффициент окислительного фосфорилирования; МРТР – митохондриальная Ca^{2+} – зависимая пора; ОМБ – окислительная модификация белков; VDAC – потенциал-зависимый анионный канал; ANT – адениннуклеотид-транслоказа; CyP-D – циклофилин-D; PiC – митохондриальный переносчик фосфата; NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; NADPH – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный.

тогда как вторичная случайная гипотермия вызвана обычно болезнью, интоксикацией или травмой [3–6].

В последние годы искусственную гипотермию активно применяют в медицине, например, при инфаркте миокарда и инсульте, для защиты клеток от ишемических и реперфузионных повреждений [7–10]. Протективные механизмы гипотермии вызывают со снижением скорости метаболизма, уменьшением воспаления и образования активных форм кислорода (АФК), ингибированием эксайто-токсичности и апоптоза [4]. Однако, несмотря на множество позитивных терапевтических эффектов, сама гипотермия, особенно начальные ее этапы, может иметь множество нежелательных последствий для организма. В связи с этим исследование механизмов и путей влияния умеренной гипотермии различной длительности на организм гомеотермных животных является актуальным и представляет несомненный интерес.

Известно, что начальные этапы снижения температуры тела у гомеотермных животных сопровождаются значительными физиологическими и биохимическими изменениями в организме: активизируется мышечный тонус, дрожь и холодовой диурез, происходит выброс катехоламинов и тиреоидных гормонов, наступает вазоконстрикция для снижения теплообмена [5, 6, 11]. Все это, в совокупности, способствует интенсификации процессов генерации АФК и последующему истощению компонентов антиоксидантной системы [12, 13]. В исследованиях, проведенных ранее, было показано, что кратковременная и пролонгированная одночасовая гипотермия приводят к образованию интермедиатов окислительной модификации белков (ОМБ) и перекисного окисления липидов (ПОЛ) в митохондриях печени крыс, а также к снижению содержания восстановленного глутатиона, α -токоферола и падению активности антиоксидантных ферментов [14, 15]. При исследовании респираторных характеристик при гипотермии различной глубины и длительности установлено падение дыхательного контроля и коэффициента окислительного фосфорилирования (Р/О) [16], это может привести к снижению электрохимического протонного градиента и, как следствие, способствовать нарушению кальций-депонирующей способности митохондрий и образованию митохондриальных пор. Другой причиной нарушения кальций-депонирующей способности может стать избыточная проницаемость мембран митохондрий в результате окислительных повреждений [17]. Известно, что образование митохондриальных пор вызывает проникновение в митохондрии молекул воды, набухание митохондрий и выход митохондриальных компонентов в цитоплазму [18], что инициирует апоптоз.

Целью данной работы является исследование кальций-аккумулирующей способности митохон-

дрий печени крыс при умеренной гипотермии. Кальций-аккумулирующую способность митохондрий оценивали по кинетике набухания митохондрий, инкубированных в среде с ионами кальция, и их кальциевой емкости.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на крысах-самцах Вистар 3.5-месячного возраста, с массой тела 200–220 г, полученных из питомника филиал “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл., Чеховский р-н) и содержащихся в стандартных условиях (средняя температура воздуха – 26°C, влажность воздуха – 40–60%) вивария Дагестанского государственного университета. Во избежание возрастных и суточных колебаний на результаты экспериментов, опыты проводили в одно и то же время дня (с 9 до 11 ч). Животных делили на 4–5 групп по 8 в каждой – контрольную (температура тела 38°C) и 3–4 группы – животных, подвергнутых гипотермии. Доступ к пище и воде был круглосуточный.

Моделирование гипотермических состояний

Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала холодная вода. 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 1 ч и 3 ч (пролонгированная гипотермия). Контролем служили интактные животные с температурой тела 38.4°C. Состояние глубокой гипотермии достигалось за 60 мин (0.3°C/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°C, 30 мин).
3. Умеренная гипотермия, пролонгированная до 1 ч (30°C, 1 ч).
4. Умеренная гипотермия, пролонгированная до 3 ч (30°C, 3 ч).

Препаративные методы исследования

Выделение интактных митохондрий производили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [19]. Все процедуры выполнялись на холоде при температуре 2–4°C. После декапитации крыс в течение 60 с выделяли печень и промывали ледяной средой выделения (1°C) в течение 5 мин. Печень измель-

чали, пропускали через пресс и готовили 10%-ный гомогенат в среде выделения, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g на центрифуге MPW-360 (ротор CM-110, Россия). Супернатант отделяли и центрифугировали на центрифуге (Thermo scientific MR 23i, угловой ротор AM 10.17) в течение 15 мин при 20000 g. Полученный осадок суспендировали в 0.25 М сахарозе, приготовленной на среде промывки. Суспензия митохондрий наплаивалась на заранее приготовленный градиент плотности сахарозы, содержащий 3.5 мл — 1.1 М; 7.5 мл — 0.8 М; 7.5 мл — 0.5 М и 5 мл — 0.3 М сахарозы, далее центрифугировали (Eppendorf 5702 R, ротор KL 11A) в течение 45 мин при 3500 об/мин. Градиенты сахарозы готовились на среде промывки.

Полученную фракцию митохондрий (на границе 0.5 М–0.8 М) центрифугировали в течение 15 мин при 15000 об/мин 20000 g (Centrifuge Thermo scientific MR 23i, ротор AM 10.17). Осадок ресуспендировали в среде промывки, центрифугировали 10 мин при 20000 g (Centrifuge Thermo scientific MR 23i, ротор AM 10.17). Митохондрии хранили на льду в среде инкубации.

Среда выделения: 0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА, 0.1% BSA (pH = 7.4).

Среда промывки: 0.25 М сахароза, 5 мМ HEPES, 0.5 мМ ЭДТА (pH = 7.4).

Среда инкубации: 0.3 М сахароза, 3 мМ HEPES, 0.25 мМ ЭДТА, 1 мМ $MgCl_2$, 13 мМ KCl (pH = 7.4). 5l

Белок в митохондриях определяли по Лоури [20].

Определение кинетики и скорости набухания митохондрий при добавлении в среду ионов кальция

Кинетику набухания митохондрий можно оценить по снижению оптической плотности инкубационной среды, содержащей митохондрии. В суспензию митохондрий (0.5 мг белка) добавляли в 1 мл среды, содержащей (мМ): KCl 120, KH_2PO_4 3, сукцинат калия 5 и трис-HCl 25, pH 7.4. Стимуляцию открытия поры производили добавлением в среду $CaCl_2$ (420 мМ). Скорость набухания митохондрий ($\Delta D_{540}/мин \times мг\ белка$) определяли как изменение оптической плотности суспензии в течение первой минуты набухания [21].

Измерение кальциевой емкости митохондрий

Кальциевую емкость изолированных митохондрий печени крыс определяли полярографическим методом. В полярографическую ячейку, содержащую среду инкубации с митохондриями (0.5 мг белка/мл), субстрат окисления сукцинат (5 мМ) и K_2HPO_4 (1 мМ), добавляли раствор $CaCl_2$ (0.1 мМ) несколько раз до получения необратимой стимуляции дыхания. Величину кальциевой емкости вычисляли как количество $CaCl_2$, вызвавшее необра-

тимую стимуляцию дыхания, в расчете на 1 мг митохондриального белка.

Статистическая обработка

Обработка данных произведена с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0. Нормальность распределения и однородность дисперсии экспериментальных данных оценивали с помощью W критерия (Шапиро–Уилка), критериев Левеня и Уэлча. Для множественных сравнений независимых групп использовали непараметрический дисперсионный анализ и критерий Краскела–Уоллиса (H-test). При обнаружении статистически значимых различий между группами проводили апостериорные сравнения с помощью критерия Манна–Уитни с новым критическим уровнем значимости, учитывающим количество сравниваемых групп. Для оценки взаимосвязи использовали корреляционный анализ Спирмена. Данные в таблицах приведены в виде среднее $\pm$ ошибка среднего. Каждая кривая на графиках — среднее 8 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Способность митохондрий к аккумуляции ионов кальция определяется множеством факторов и механизмов. Известно, что кальций быстро входит в митохондрии по градиенту электрохимического потенциала с помощью Ca^{2+} -унипортера и выходит медленно через антипортеры (Ca^{2+}/Na^+ и Ca^{2+}/H^+), либо быстро через митохондриальные поры [22–24].

Одним из способов оценки способности митохондрий к депонированию ионов кальция является исследование кинетики их кальций-индуцированного набухания. Известно, что добавление ионов Ca^{2+} в среду инкубации энергизованных митохондрий способствует их аккумуляции в матриксе до тех пор, пока уровень ионов не достигнет предельных критических значений, вызывающих стимуляцию митохондриальной Ca^{2+} -зависимой поры (MPTP) и пермеабиллизацию митохондриальных мембран.

Активация неспецифической проницаемости приводит к проникновению в митохондрии молекул воды, что вызывает резкое повышение осмотического давления и набухание митохондрии [18]. Скорость кальций-индуцированного набухания является не только маркером чувствительности митохондрий к ионам кальция, но и показателем функционального состояния Ca^{2+} -зависимых митохондриальных пор.

Кинетику кальций-индуцированного набухания можно оценить, регистрируя снижение светопоглощения инкубационной среды при 540 нм. На рис. 1 представлены кинетические кривые

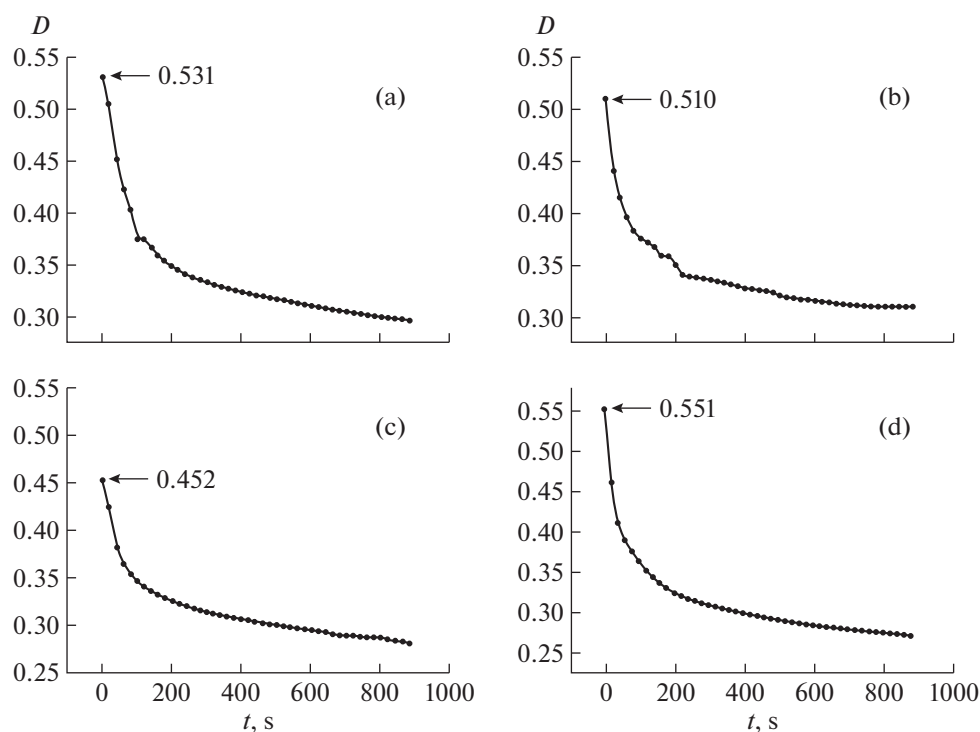


Рис. 1. Кинетика Ca^{2+} – индуцированного набухания митохондрий печени крыс: (a) – контроль; (b) – гипотермия 30°C , 0.5 ч; (c) – гипотермия 30°C , 1 ч; (d) – гипотермия 30°C , 3 ч.

кальций-индуцированного набухания митохондрий крыс в норме и при гипотермии различной длительности. Видно, что все кинетические кривые имеют нелинейный характер, свидетельствующий о наличии двух ясно различимых стадий набухания митохондрий: быстрой и медленной. Медленная фаза набухания регистрировалась до стационарных значений оптической плотности. В контроле быстрая стадия имеет более выраженный характер (оптическая плотность резко снижается в течение первых 160 сек), а постоянное значение светопоглощения достигается после 650–700 с инкубации митохондрий (рис. 1a). Кратковременная гипотермия существенно изменяет кинетику Ca^{2+} -индуцированного набухания митохондрий: удлиняется период быстрой фазы (200 с), характер ее становится менее выраженным по сравнению с контролем, а медленная стадия достигает стационарных значений уже через 500 с (с. 1b).

Исследование кинетики набухания митохондрий крыс при пролонгированной (1 ч) гипотермии показало, что динамика набухания их в целом схожа с таковой у крыс, подверженных кратковременной гипотермии. При этом характер снижения оптической плотности митохондрий на быстрой стадии набухания становится менее выраженным, а переход быстрой фазы в медленную фазу – более плавным, что свидетельствует о существенном

снижении чувствительности митохондрий к ионам кальция (рис. 1c).

Дальнейшее пролонгирование гипотермии (до 3 ч) приводит к тому, что кинетические кривые нормализуются и их характер становится схожим с таковым контрольных крыс (рис. 1d). Время быстрой фазы и перехода ее в медленную значительно сокращается по сравнению с крысами, подверженными 1-часовой гипотермией. При этом стационарные значения оптических плотностей достигаются на 600-й с.

Следует обратить внимание на тот факт, что начальные значения оптической плотности (D_0) митохондрий печени крыс, находящихся в различных физиологических состояниях, значительно отличаются. Так, значение D_0 у контрольных крыс составляет 0.528 ± 0.027 , при кратковременной гипотермии – 0.515 ± 0.011 , при пролонгированной 1-часовой гипотермии – 0.456 ± 0.029 , а при более пролонгированной 3-часовой гипотермии – 0.550 ± 0.034 . Таким образом, гипотермия длительностью 1 ч существенно отражается на осмотическом состоянии митохондрий.

По наклонам кинетических кривых были рассчитаны скорости кальций-индуцированного набухания митохондрий (dD/dt). На рис. 2 показано, что при кратковременном снижении температуры тела dD/dt митохондрий уменьшается на 36.4% относительно контроля. Пролонгирование гипотер-

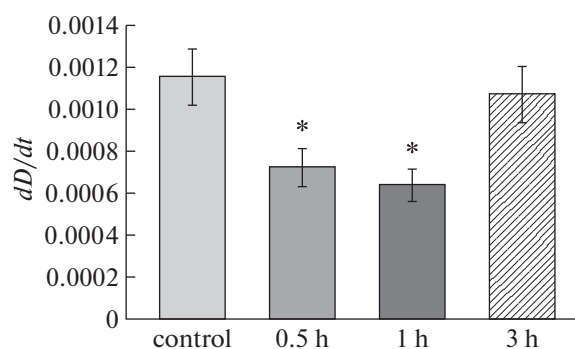


Рис. 2. Скорость набухания (dD/dt) митохондрий печени крыс в норме (control) и при умеренной кратковременной гипотермии (0.5 h), пролонгированной 1-часовой гипотермии (1 h), пролонгированной 3-часовой умеренной гипотермии (3 h) ($M \pm m$, $n = 8$). $p < 0.05$: * — относительно контроля.

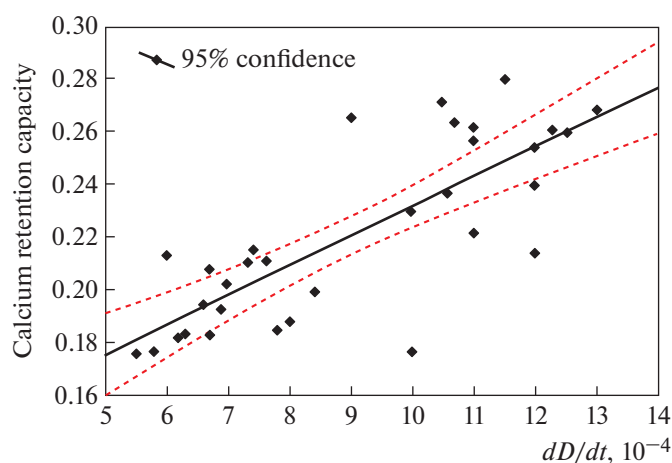


Рис. 3. Корреляционные связи между скоростью кальций-индуцированного набухания и кальциевой емкостью митохондрий ($r = 0.79$, $p < 0.05$).

мического состояния до 1 ч способствует дальнейшему снижению скорости набухания, оно становится на 45.5% меньше контроля. Дальнейшее пролонгирование гипотермии способствует повышению значений dD/dt до уровня контрольных животных.

Еще одной из важнейших характеристик кальций-аккумулирующей способности митохондрий является кальциевая емкость. Под кальциевой емкостью понимается максимальное количество кальция, которое можно закачать в митохондрию, прежде чем в ней образуется митохондриальная пора. В первую очередь вход кальция управляется градиентом электрохимического протонного потенциала митохондрий. Вход в митохондрии положительно заряженных ионов кальция по градиенту электрохимического потенциала ($\Delta\mu$) способствует снижению $\Delta\mu$, стимулируя дыхание митохондрий.

Полярнографический метод определения кальциевой емкости основан на том, что последовательное добавление небольшого количества ионов кальция к суспензии митохондрий, содержащей избыток субстратов дыхания, обратимо стимулирует скорость потребления кислорода, пока очередная добавка Ca^{2+} приведет к необратимой стимуляции дыхания. Предельная концентрация Ca^{2+} будет отражать кальциевую емкость митохондрий.

Результаты нашего исследования позволили обнаружить, что у контрольных крыс она составляет 0.254 ± 0.021 мкмоль/мг белка. Кратковременная гипотермия способствует ее снижению на 19%, а ее пролонгирование до 1 ч — на 26% относительно контроля. Однако в течение 3 ч гипотермии кальциевая емкость, так же как и скорость кальций-индуцированного набухания, нормализуется и становится на 28% выше уровня часовой гипотермии (табл. 1).

Корреляционный анализ показал, что между скоростью кальций-индуцированного набухания и кальциевой емкостью митохондрий имеется тесная взаимосвязь ($r = 0.79$, $p < 0.05$) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипотермия — это состояние гомеотермного животного с пониженной температурой тела. Начальные этапы снижения температуры тела сопровождаются развитием стрессорной реакции, частью которой является генерация АФК [11]. Митохондрии являются одним из источников образования АФК, однако они также подвержены действию оксидантов. В исследованиях, проведенных ранее, было показано, что кратковременная и пролонгированная однократная гипотермия приводит к образованию интермедиатов ОМБ и ПОЛ в митохондриях печени крыс, а также к снижению содержания восстановленного глутатиона, α -токоферола и падению активности антиоксидантных ферментов [14, 15]. Вместе с тем в данной работе показано, что умеренная гипотермия на начальных этапах приводит к снижению чувствительности

Таблица 1. Кальциевая емкость митохондрий печени крыс (мкмоль CaCl_2 /мг белка) в норме и при гипотермии ($M \pm m$, $n = 8$)

Состояния животных	Кальциевая емкость (мкмоль/мг белка)
Контроль	0.254 ± 0.021
Гипотермия 30°C, 30 мин	$0.201 \pm 0.012^*$
Гипотермия 30°C, 1 ч	$0.188 \pm 0.013^*$
Гипотермия 30°C, 3 ч	0.241 ± 0.031

Примечания: $p < 0.05$: * — отличия относительно контроля.

митохондрий к ионам кальция, оцениваемое по кинетике набухания митохондрий и падению кальциевой емкости. Что послужило причиной данных изменений на начальных этапах гипотермии?

Скорость набухания митохондрий является маркером их высокой чувствительности к ионам кальция. Исследование показало, что начальные значения оптической плотности митохондрий печени крыс (до добавления в среду ионов кальция) при кратковременной гипотермии, а особенно при пролонгированной одночасовой гипотермии, — меньше таковых контроля. Это может свидетельствовать о том, что при этих состояниях *in vivo* уже произошли изменения проницаемости митохондрий, отражающиеся на степени их исходного набухания. Это дает основание предполагать, что на начальных этапах гипотермии увеличивается количество митохондриальных пор. В то же время при 3-часовой гипотермии проницаемость мембран нормализуется.

Известно, что в митохондриях может образовываться циклоспорин-А- (ЦсА-) чувствительная кальций-индуцируемая неспецифическая белковая пора (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) [25] и ЦсА-нечувствительная липидная пора, индуцируемая жирными кислотами и ионами Ca^{2+} [26]. Пальмитиновая кислота, связываясь с ионами кальция, приводит к открытию митохондриальной Ca^{2+} -зависимой ЦсА-нечувствительной поры, что обуславливает неспецифическую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны, особенно когда это сопровождается оксидативным стрессом, повышением концентрации фосфора (Pi) и истощением адениннуклеотидов [27].

Свойства МРТР хорошо известны, но ее точный молекулярный состав остается неопределенным. Нокаут-исследования исключили важную роль потенциал-зависимого анионного канала (VDAC) и адениннуклеотид-транслоказы (ANT), хотя регуляторная роль ANT была подтверждена: исследования Хельстрапа свидетельствуют об участии митохондриального переносчика фосфата (PiC) в формировании МРТР [28]. Нокаут-исследования подтвердили роль циклофилина-D (CyP-D). CyP-D способствует конформационным изменениям PiC, вызываемым кальцием, в конечном итоге стимулируя открытие поры. Потеря CyP-D приводит к значительному увеличению пороговой концентрации Ca^{2+} для открытия поры, однако не к устранению самого открытия. Наиболее часто используемый экзогенный ингибитор МРТР — циклоспорин А — связывается с CyP-D в митохондриальном матриксе, блокируя связывание CyP-D с каналом VDAC [29, 30].

Одна из причин образования поры — окисление тиоловых групп белков митохондрий. Считается, что открытие поры вызвано снижением восстано-

вительных эквивалентов. Окисление NADPH в большей степени способствовало появлению поры, чем окисление NADH, так как NADPH играет центральную роль в защите митохондрий от оксидативного стресса [17].

Увеличение Ca^{2+} в среде инкубации до 300 нмоль/л, содержащей 1 мг белка митохондрий, способно привести к открытию поры, если митохондрии были подвергнуты оксидативным модификациям [28, 30]. Специфическое конформационное изменение комплекса I, которое приводит к увеличению продукции H_2O_2 при окислении субстратов, также может привести к открытию МРТР [31]. Открытие поры способствует снижению Ca^{2+} -емкости митохондрий и потере матричных компонентов с последующим набуханием митохондрий [17].

В наших исследованиях показано, что дыхательный контроль восстанавливается при 3-часовой гипотермии до уровня кратковременной гипотермии, а не до уровня контрольных значений, т.е. митохондрии были разобщенными, хотя и незначительно, при данном состоянии, а показатели кальциевого гомеостаза достигли уровня контроля. В то же время при 3-часовой гипотермии происходит восстановление до контрольных значений маркеров ОМБ, таких как тиоловые и карбонильные группы. Полученные результаты позволяют предполагать, что существенную роль в индукции проницаемости митохондрий печени крыс на начальных этапах при умеренной гипотермии вносят оксидативные повреждения мембран митохондрий. Это подтверждается данными других исследователей. Так, например, окисление SH-групп Cys-57 ANT приводит к конформационным изменениям транслоказы, что в свою очередь может влиять на чувствительность CyP-D к ионам кальция, стимулируя открытие МРТР [32]. Результаты скорости кальций-индуцированного набухания сходны с результатами содержания SH-групп мембран митохондрий печени крыс [14]. В соответствии с результатами проведенного нами корреляционного анализа между кальциевой емкостью митохондрий и скоростью их кальций-индуцированного набухания имеется положительная корреляция ($r = 0.79$; $p \leq 0.05$). Это означает, что кальций-аккумулирующая способность митохондрий зависит от состояния митохондриальных пор. Если на кальций-аккумулирующих свойствах митохондрий печени крыс существенное влияние оказывает окислительные модификации мембранных митохондриальных структур, то каким образом нивелировались эффекты повреждений? Результаты исследования влияния умеренной гипотермии на антиоксидантный статус митохондрий печени крыс показали, что пролонгированная 3-часовая гипотермия приводит к повышению активности ферментов антиоксидантной системы и уровня восстановленного глутатиона [15]. Возможно, что ключевую роль в нормализации

параметров кальций-аккумулирующей системы митохондрий играет активация антиоксидантной системы митохондрий. Существуют немногочисленные данные, которые указывают на развитие адаптивных изменений при гипотермии. Подобная толерантная температурная стратегия встречается у млекопитающих, ярким примером ее является спячка.

Таким образом, результаты нашего исследования показывают, что на начальных этапах гипотермии происходит снижение кальций-аккумулирующей способности митохондрий печени крыс и повышение проницаемости митохондрий для ионов кальция. Это снижение, скорее всего, связано с образованием митохондриальных пор. Пермеабилзация митохондриальных мембран при низких температурах тела гомойотермных животных носит обратимый характер, поскольку пролонгирование гипотермического состояния до 3 ч способствует нормализации исследуемых параметров. Отсюда следует, что при длительном воздействии холодового фактора у крыс происходит активация ряда компенсаторно-приспособительных реакций, о чем свидетельствуют не только результаты данно-го, но и предыдущих наших исследований.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации, с соблюдением Приказа Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. (“Правила надлежащей лабораторной практики”).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Госзадания FZNZ-2020-0002.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.И.Х. — получение экспериментальных данных статьи, описание результатов; Р.А.Х. — постановка проблемы, разработка концепции статьи и дизайн исследования; А.М.Д. — статистическая обработка экспериментальных данных и их интерпретация; В.Р.А. — критический анализ литературы и формирование выводов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vasington FD, and Murphy JV* (1962) Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem* 237:2670–2677. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)73805-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)73805-8)
2. *Denton RM* (2009) Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta Bioenergy* 1787(11):1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>
3. *Polderman KH* (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical Care Med* 37 (7):186–202. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181aa5241>
4. *Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li G-Y* (2019) Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci* 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00586>
5. *Paal P, Brugger H, Strapazzon G* (2018) Accidental hypothermia. *Handbook of Clinical Neurology*. 157:547–563. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64074-1.00>
6. *Paal P, Pasquier M, Darocha T, Lechner R, Kosinski S, Wallner B, Zafren K, Brugger H* (2022) Accidental Hypothermia: 2021 Update. *Int J Environ Res Public Heal* 19:501. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010501>
7. *Soreide K* (2014) Clinical and translational aspects of hypothermia in major trauma patients: from pathophysiology to prevention, prognosis and potential preservation. *Injury* 45(4):647–654. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2012.12.027>
8. *Hakim SM, Ammar MA, Reyad MS* (2018) Effect of therapeutic hypothermia on survival and neurological outcome in adults suffering cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis. *Minerva Anestesiol* 84(6):720–730. <https://doi.org/10.23736/S0375-9393.18.12164-X>
9. *Yamada KP, Kariya T, Aikawa T, Ishikawa K* (2021) Effects of Therapeutic Hypothermia on Normal and Ischemic Heart. *Front Cardiovasc Med* 8. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.642843>
10. *Onose G, Anghelescu A, Blendea D, Ciobanu V, Daia C, Firan FC, Oprea M, Spinu A, Popescu C, Ionescu A, Busnatiu S, Munteanu C* (2022) Cellular and Molecular Targets for Non-Invasive, Non-Pharmacological Therapeutic/Rehabilitative Interventions in Acute Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* 23:(907). <https://doi.org/10.3390/ijms23020907>
11. *Кличханов НК, Исмаилова ЖГ, Астаева МД* (2016) Интенсивность свободнорадикальных процессов в крови крыс при глубокой гипотермии и в ходе самонагрева. *Бюл ВСНЦ СО РАМН* 1(5):104–109. [*Klichkhanov NK, Ismailova ZG, Astaeva MD*. Intensity of free radical processes in rats' blood while deep hypothermia and self-warming. *Acta Biomed Sci* 1(5):104–109. (In Russ)]. <https://doi.org/10.12737/23402>
12. *Alva N, Palomeque J, Carbonell T* (2013) Oxidative Stress and Antioxidant Activity in Hypothermia and rewarming: can RONS Modulate the Beneficial Effects of Therapeutic Hypothermia. *Oxidative Med Cel Longevit* 2013:20–28. <https://doi.org/10.1155/2013/957054>

13. Schaible N, Han YS, Tveita T, Siecka GC (2018) Role of Superoxide Ion Formation in Hypothermia/Rewarming Induced Contractile Dysfunction in Cardiomyocytes. *Cryobiology* 81:57–64.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.010>
14. Khalilov RA, Dzhafarova AM, Khizrieva SI, Abdullaev VR (2019) The Intensity of Free Radical Processes on Rat Liver Mitochondria under Moderate Hypothermia of Various Duration. *Cell Tissue Biol* 13:446–456.
<https://doi.org/10.1134/S1990519X1906004X>
15. Khizrieva SI, Khalilov RA, Dzhafarova AM, Abdullaev VR (2022) Antioxidant Status of Rat Liver Mitochondria under Conditions of Moderate Hypothermia of Different Duration. *Bull Exp Biol Med* 172(3):305–309.
<https://doi.org/10.1007/s10517-022-05382-w>
16. Khalilov RA, Khizrieva SI, Dzhafarova AM, Abdullaev VR (2020) The Bioenergetic characteristics of mitochondria of the rat liver at low body temperatures. *Probl Biol Med Pharmaceut Chem* 22(5):35–41.
<https://doi.org/10.29296/25877313-2019-05-07>
17. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* 495(1–2):12–15.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02316-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02316-X)
18. Baranov SV, Stavrovskaya IG, Brown AM, Tyryshkin AM, Kristal BS (2008) Kinetic Model for Ca^{2+} -induced Permeability Transition in Energized Liver Mitochondria Discriminates between Inhibitor Mechanisms. *J Biol Chem* 283(2):665–676.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M703484200>
19. Рыбальченко ВК, Коганов ММ (1998) Структура и функции мембран. — Киев: ВШ. 312 с. [Rybalchenko VK, Koganov MM (1998) Membrane structure and functions. Kiev: VSh. 312 p. (In Russ)].
20. Lowry DH (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
21. Brookes PS, Darley-Usmar VM (2004) Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:39–46.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00742.2003>
22. Marinelli F, Almagor L, Hiller R, Giladi M, Khanashvili D, Faraldo-Gómez J, Kaback HR (2014) Sodium recognition by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in the outward facing conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:5354–5362.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1415751111>
23. Tsai MF, Jiang D, Zhao L, Clapham D, Miller CJ (2014) Functional reconstitution of the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiporter Letm1. *Gen Physiol* 143(1): 67–73.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201311096>
24. Belosludtsev KN, Dubinin MV, Belosludtseva NV, Mironova GD (2019) Mitochondrial Ca^{2+} Transport: Mechanisms, Molecular Structures, and Role in Cells. *Biochemistry (Moscow)* 84(6):593–607.
<https://doi.org/10.1134/s0006297919060026>
25. Petronilli V, Cola C, Massari S, Colonna R, Bernardi P (1993) Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J Biol Chem* 268(29):21939–21945.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)80631-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)80631-0)
26. Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Mironova GD (2005) Possible mechanism for formation and regulation of the palmitate-induced cyclosporin A-insensitive mitochondrial pore. *Biochemistry (Moscow)* 70(7):987–994.
<https://doi.org/10.1007/s10541-005-0189-x>
27. Zoratti M, Szabb I (1995) The mitochondrial permeability transitions. *Biochim Biophys Acta* 1241(2):139–176.
[https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00003-a](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00003-a)
28. Halestrap AP (2009) What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 46:821–831.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.021>
29. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Letters* 567(1):96–102.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.071>
30. Bernardi P, Di Lisa F (2014) The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 78:100–106.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.023>
31. Batandier CC, Leverve X, Fontaine E (2004) Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Reactive Oxygen Species Production at the Level of the Respiratory Chain Complex I. *J Biol Chem* 279(17):17197–17204.
<https://doi.org/10.1074/jbc.m310329200>
32. McStay GP, Clarke SJ, Halestrap AP (2002) Role of critical thiol groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 367:541–548.
<https://doi.org/10.1042/BJ20011672>

CALCIUM-ACCUMULATING ABILITY OF RAT LIVER MITOCHONDRIA DURING HYPOTHERMIA OF VARIOUS DURATIONS

S. I. Khizrieva^a, R. A. Khalilov^a, A. M. Dzhafarova^{a, #}, and V. R. Abdullaev^a

^aDagestan State University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

[#]e-mail: albina19764@mail.ru

Calcium is one of the most important intracellular messengers that regulate physiological and biochemical processes in the cell. Mitochondria are able to deposit calcium ions and are involved in the regulation of the calcium signal. Hypothermic conditions in homoiothermic animals can lead to disruption of this important function of mitochondria and pathological consequences. The aim of this study is to study the effects of moderate (30°C)

hypothermia of varying duration on the calcium-accumulating capacity of rat liver mitochondria. The experiments were carried out on male rats Wistar. Hypothermia was induced by external cooling of the animals in Plexiglas chambers with a jacket through which cold water circulated. Mitochondria were isolated from the liver of decapitated rats by differential centrifugation. The calcium-accumulating capacity of mitochondria was assessed by the kinetics of calcium-induced swelling of mitochondria and their calcium capacity. A study of the kinetics of calcium-induced swelling of mitochondria showed that during short-term moderate (30°C) hypothermia, the rate of swelling of mitochondria decreases, prolongation of hypothermia to 1 h contributes to a further decrease in the swelling rate, and to 3 h, its normalization. A positive correlation was found between the rate of calcium-induced swelling and the calcium capacity of mitochondria ($r = 0.79$). Thus, with prolonged exposure to the cold factor in rats, a number of compensatory-adaptive reactions are activated. The decrease in the rate of Ca^{2+} – induced swelling and calcium capacity of mitochondria at the initial stages of hypothermia may be associated with the formation of mitochondrial pores and is reversible.

Keywords: rats, hypothermia, mitochondria, Ca^{2+} – induced swelling of mitochondria, calcium capacity