

УДК 577.121.7

## ВЛИЯНИЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ДЛЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ

Абакарова Ш.<sup>1</sup>, Испрапилова А.<sup>1</sup>, Муслимова Р.<sup>1</sup>, Джамалова Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Дагестанский государственный университет, Махачкала, e-mail: [shamaika.98@mail.ru](mailto:shamaika.98@mail.ru)

Митохондрии и кальций могут играть ключевую роль в развитии ряда патологических процессов у гомойотермных животных на начальных этапах развития гипотермии. Исследована проницаемость мембран митохондрий печени крыс для ионов кальция в норме и кратковременной (30 мин) умеренной (30°C) гипотермии. Определение проницаемости митохондрий производили путем измерения кинетики их светопоглощения после добавления ионов кальция. Оказалось, что при гипотермии зависимости оптической плотности от времени инкубации митохондрий с ионами кальция носит менее выраженный относительно контрольных крыс характер. В соответствии с этим, кальций-зависимая скорость набухания митохондрий гипотермированных крыс на 27,4% меньше таковой контроля. Полученные данные указывают на то, что митохондрии гипотермированных крыс обладают меньшей чувствительностью к ионам кальция.

*Ключевые слова:* крысы, гипотермия, митохондрии, проницаемость, кальций

## INFLUENCE MILD HYPOTHERMIA ON THE PERMEABILITY OF THE MEMBRANES OF THE LIVE MITOCHONDRIA ION CALCIUM

Abakarova Sh.<sup>1</sup>, Israpilova A.<sup>1</sup>, Muslimova R.<sup>1</sup>, Djamalova B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dagestan State University, Makhachkala, e-mail: [shamaika.98@mail.ru](mailto:shamaika.98@mail.ru)

Mitochondria and calcium can play a key role in the development of a number of pathological processes in homeotherm animals in the early stages of hypothermia. The permeability of rat liver mitochondrial membranes was studied for normal calcium ions and short-term (30 min) moderate (30 ° C) hypothermia. The permeability of mitochondria was determined by measuring the kinetics of their light absorption after the addition of calcium ions. It turned out that in hypothermia, the dependence of optical density on the time of incubation of mitochondria with calcium ions is less pronounced relative to control rats. In line with this, the calcium-dependent rate of mitochondrial swelling of hypothermic rats is 27.4% less than that of the control. The data obtained indicate that mitochondria of hypothermic rats are less sensitive to calcium ions.

*Keywords:* rats, hypothermia, mitochondria, permeability, calcium

Гипотермия – это состояние гомойотермного животного с пониженной температурой тела. В последние годы гипотермические состояния нашли широкое применение в медицинской практике при обширных операциях на сердце и мозге. Гипотермию применяют в целях защиты различных органов и тканей от ишемических, реперфузионных и травматических повреждений [2]. Однако, на начальных этапах снижения температуры тела гипотермия сопровождается развитием ряда патологических процессов, связанных с нарушением кровоснабжения органов и развитием стрессорной реакции. Все это в совокупности индуцирует развитие окислительного стресса, основой которого является интенсивная генерация активных форм кислорода АФК [7].

АФК могут способствовать окислительной модификации белков и липидов. Окисление липидов, составляющих основу мембран внутриклеточных органелл, может способствовать нарушению их барьерных и транспортных функций. Особо важная роль в развитии различных

патологических процессов при экстремальных состояниях организма принадлежит митохондриям [5]. Это может быть обусловлено тем, что митохондрии играют ключевую роль в энергетическом обмене клетки, сигнальной трансдукции, регуляции кальциевого гомеостаза, в развитии окислительного стресса и апоптоза [10]. Целью данной работы явилось исследование эффектов кратковременной (30 мин) умеренной (30°C) гипотермии на проницаемость мембран митохондрий для ионов кальция, поскольку именно кальцию является регулятором многих процессов, протекающих в клетках.

### **Материалы и методы исследования**

Опыты проведены на белых лабораторных крысах обоего пола весом 150-200 г. Охлаждение животных проводили в специальной камере, в рубашке которой циркулировала холодная вода (5°C). При достижении ректальной температуры 30°C животное декапитировали.

Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы. Все процедуры выполнялись на холоду при температуре 2-4 °С. Печень измельчали и готовили 10% гомогенат в среде выделения с БСА (бычий сывороточный альбумин), после чего центрифугировали при 2000 об/мин 10 минут. Гомогенат центрифугировали при 2000 об/мин 10 мин. Полученный супернатант центрифугировали при 10000 g 10 мин. Митохондрии суспендировали в 2 мл среды выделения, дополнительно содержащей БСА (2 мг/мл), затем добавляли 15 мл среды выделения без БСА и вновь центрифугировали 10 мин при 10000 g. Осадки митохондрий объединили в одну пробирку и центрифугировали при 10000 g 10 мин. Митохондрии суспендировали в небольшом объеме среды, не содержащей ЭДТА, и хранили на льду. Состав среды выделения: 0,2 М сахароза, 10 мМ Hepes, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ KCL; (pH=7.2)

Определение проницаемости митохондрий для ионов кальция производили спектрофотометрически, путем измерения их светопоглощения ( $\lambda = 520$  нм) в реакционной смеси, содержащей KCl (120мМ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3 мМ), Na-сукцинат (5 мМ) и трис-HCl (25мМ. pH-7,4) [8]. Реакцию начинали добавлением в инкубационную среду  $\text{CaCl}_2$  (420  $\mu\text{M}$ ). Скорость набухания митохондрий в результате входа кальция ( $\Delta A_{540}/\text{мин}$  на 1 мг белка) определяли, как изменение оптической плотности суспензии митохондрий в течение первой минуты инкубации с ионами кальция.

Достоверность различия средних определяли с помощью критерия Стьюдента. Каждая кривая на графиках есть среднее 6-ти независимых экспериментов. Различия считали достоверными при значениях  $p < 0.05$ . Обработку данных вели на компьютере с использованием пакета СТАТИСТИКА.

## Результаты исследования и их обсуждение

Исследована проницаемости митохондрий печени нормотермических и гипотермированных крыс для ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Известно, что повышение проводимости митохондриальных мембран для различных ионов вызывает проникновение в митохондрии молекул воды, что вызывает резкое повышение осмотического давления и набухание митохондрии. Кинетику набухания митохондрий можно оценить спектрофотометрически, по снижению оптической плотности инкубационной среды, содержащей митохондрии. На рис. 1 представлены кинетические кривые изменения оптической плотности митохондрий при добавлении ионов кальция ( $420 \mu\text{M}$ ).

Из рисунка видно, что добавление ионов кальция в среду инкубации сопровождается снижением оптической плотности. При этом кинетические кривые имеют нелинейный характер, свидетельствующий о наличии двух фаз набухания митохондрий. Следует отметить, что набухание достигается до постоянного значения оптической плотности. В контроле постоянное значение оптической плотности достигается после 20 минутной инкубации митохондрий, в то время как при гипотермии - после 15 минут. Графики зависимости оптической плотности от времени инкубации митохондрий печени крыс, находящихся в различных физиологических состояниях значительно отличаются. Из рисунка видно, что зависимость у контрольных крыс более ярко выражена, нежели у гипотермированных.

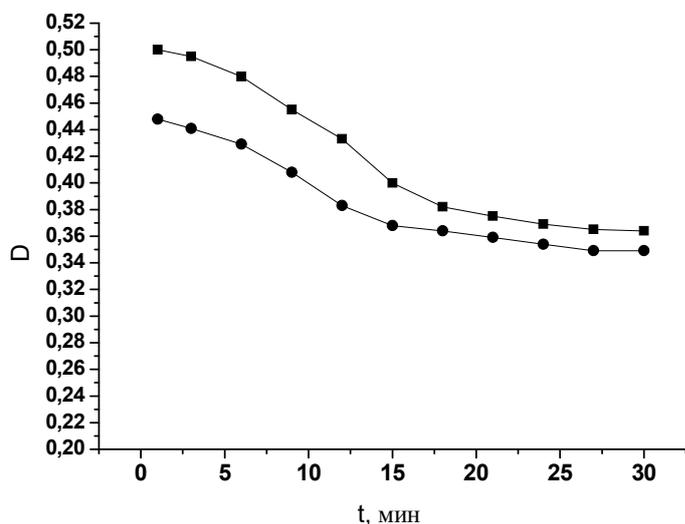


Рис. 1.  $\text{Ca}^{2+}$  индуцированное открытие поры митохондрий печени крыс в норме и при умеренной кратковременной гипотермии. По оси ординат - оптическая плотность на  $\lambda$  540 нм (D). По оси абсцисс - время эксперимента (мин); ■ - контроль, ● - гипотермия

По изменению оптической плотности можно вычислить скорости набухания митохондрий ( $\Delta D/\text{мин}$ ). И таблицы 1 видно, что при гипотермии скорость набухания митохондрий при добавлении кальция уменьшается на 27,4% относительно контроля

Таблица 1

Скорость набухания митохондрий печени крыс в норме и гипотермии ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

| Состояние        | Скорость набухания ( $\Delta D/\text{мин}$ ) |
|------------------|----------------------------------------------|
| Контроль         | 0,0073 $\pm$ 0,0005                          |
| Гипотермия 30 °С | 0,0053 $\pm$ 0,0002*                         |

\*-достоверные относительно контроля изменения

Полученные данные указывает на то, что митохондрии печени контрольных крыс имеют большую чувствительность к ионам  $\text{Ca}^{2+}$ , по сравнению с митохондриями печени гипотермированных животных. Из рисунка видно, что абсолютные значения оптической плотности митохондрий печени гипотермированных крыс ниже таковых контрольных. Это также может свидетельствовать о том, что при умеренной гипотермии *in vivo* уже произошли изменения проницаемости митохондрий, отражающиеся на степени их начального набухания. Все это, в совокупности, дает основание предполагать, что при гипотермии увеличивается проницаемость митохондрий для ионов, поэтому они, по сравнению с контролем, отличаются меньшей реактивностью к экзогенным добавкам кальция.

Изменение проницаемости митохондрий для кальция при гипотермии может быть связано с активацией неспецифических  $\text{Ca}^{2+}$  - зависимых пор митохондрий. Пора образована комплексом белков и представляет собой канал, проходящий через наружную и внутреннюю мембраны митохондрии. Данный канал получил название «Mitochondrial permeability transition pore, МРТР», что в переводе означает «пора, изменяющая проницаемость мембраны митохондрий» [6]. Оказалось, что между количеством митохондриальных пор и чувствительностью митохондрий к кальцию существует зависимость: чем больше открытых МРТР в митохондриях, тем меньше их чувствительность к кальцию.

МРТР – это неспецифичный канал высокой проводимости, который состоит из различных макромолекулярных компонентов и образуется в местах соприкосновения наружной и внутренней митохондриальной мембраны. Универсальным активатором поры являются ионы кальция. Как известно из данных литературы, активация МРТР происходит за счет увеличения концентрации кальция с наружной стороны митохондрии, в частности в цитоплазме [8]. Кроме  $\text{Ca}^{2+}$ , активаторами поры могут являться жирные кислоты, ионы неорганического фосфора и

т.д.. Активация поры также осуществляется при уменьшении мембранного потенциала митохондрии и повышении концентрации свободных радикалов [9].

Показано, что чувствительность МРТР к ионам кальция повышается при окислительном стрессе. В результате открытие поры возможно даже при физиологических концентрациях кальция в матриксе [3]. Итогом активации поры является повышение интенсивности образования АФК и выход в цитоплазму ферментов антиоксидантной системы митохондрий, что в значительной степени снижает процесс обезвреживания АФК. Было показано, что формирование поры стимулирует образование свободных радикалов митохондриальным комплексом I [8]. Это может играть важную роль в развитии патологических процессов.

Повышение проводимости МРТР индуцирует не только выход митохондриальных компонентов в цитоплазму, но и проникновение в митохондрии молекул воды, что вызывает резкое повышение осмотического давления, набухание митохондрии и их разрушение. Поэтому по степени набухания митохондрий и индукции его ионами кальция достаточно объективно можно судить об открытии МРТР

Полученные эффекты гипотермии на кальциевую проводимость митохондрий предположительно обусловлены повреждением митохондриальных мембран, вызванным повышением оксидативных процессов и понижением активности антиоксидантной системы клетки при гипотермии а также деэнергизацией органелл при разобщении [11]. В работе Эмирбекова Э. З. и Кличханова Н. К. [7] было показано, что при гипотермии в различных тканях животных происходит интенсификация свободно-радикальных процессов, сопровождающаяся истощением компонентов антиоксидантной системы.

Известно, что на начальных этапах развития, гипотермия сопровождается стрессорной реакцией, при которой происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [4]. В результате включаются механизмы химической терморегуляции, направленные на увеличение теплопродукции: усиливается обмен веществ, увеличивается распад гликогена и липидов [1]. Усиление липолиза в тканях способствует увеличению в них концентрации свободных жирных кислот, которые являются разобщителями окислительного фосфорилирования. Результатом такого разобщения может стать снижение степени сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях, с последующей их деэнергизацией и снижением кальциевой ёмкости

## Список литературы:

1. Волжина, Н. Г. Углеводный и энергетический обмен головного мозга при адаптации к переохлаждениям: автореферат, диссертация доктора биол. наук: 03.00.04 / Н. Г. Волжина.- Ростов-на-Дону-1992- С.36.
2. Григорьев, Е. В. Терапевтическая гипотермия: возможности и перспективы / Е.В. Григорьев, Д.Л. Шукевич, Г.П. Плотников, Н.С. Тихонов // Клиническая медицина. – 2014. – № 9. – С.9-16.
3. Левченкова, О.С. Митохондриальная пора как мишень фармакологического воздействия / О.С. Левченкова, В.Е. Новиков, Е.В. Пожилова // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. - 2014. - Т. 13., № 4. - С. 24-33.
4. Маяхи, М.Т.Д. Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарно-надпочечникового и гипофизарно-тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии / М.Т.Д. Маяхи, Н.К. Кличханов // Известия Самарского научного центра РАН. – 2012. – Т.14. – С. 273-277.
5. Панов, А.В. Практическая митохондриология / А.В. Панов.- Новосибирск.- 2015 – С.241
6. Пожилова Е. В. Регуляторная роль митохондриальной поры и возможности её фармакологической модуляции / Е.В. Пожилова, О.С. Левченкова, В.Е. Новиков // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2014. - Т. 12, 3. - С. 14-19
7. Эмирбеков, Э.З. Свободно-радикальные процессы и состояние мембран при гипотермии / Э.З. Эмирбеков, Н.К. Кличханов. - Ростов-на-Дону: ЮФУ.- 2011. – С.200
8. Brookes, P.S. Role of calcium and superoxide dismutase in sensitizing mitochondria to peroxynitrite-induced permeability transition / P.S. Brookes, V.M. Darley-Usmar // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. - 2004. V.286. - P. 39-46.
9. Gunter, T.E. Calcium and mitochondria / Gunter, T.E., D.I. Yule, K.K. Gunter, R. Eliseev, J. Salter // FEBS Letters. - 2004. -V. 567, №1. - P. 96-102.
10. Osellame, L.D. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function / L.D. Osellame, T.S. Blacker, M.R. Duchon // Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. – 2012. – Т.26. – P. 711-723.
11. Varanyuwatana, P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore / P. Varanyuwatana, A.P. Halestrap // Mitochondrion. - 2012. – Vol. 12. - P. 120-125.