

УДК 577.3

АКТИВНОСТЬ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

© 2022 г. Р. А. Халилов*, А. М. Джафарова*.,#, В. Р. Абдуллаев*

*Дагестанский государственный университет, ул. М. Гаджиева,
43а, Махачкала, Республика Дагестан, 367000, Россия

#E-mail: albina19764@mail.ru

Поступила в редакцию 17.05.2022 г.

После доработки 11.07.2022 г.

Принята к публикации 16.08.2022 г.

Ранее нами было показано, что кратковременная умеренная (30°C) гипотермия способствует существенному повышению интенсивности свободно-радикальных процессов и изменению ряда биоэнергетических параметров митохондрий, а ее пролонгирование в течение трех часов – их нормализации, что может быть связано с модуляцией активности и каталитических свойств сукцинатдегидрогеназы. Данное исследование показывает, что умеренная гипотермия, особенно пролонгированная в течение трех часов, существенно повышает скорость катализа сукцинатдегидрогеназы и влияет на характер ее концентрационной и температурной зависимости. Модуляция активности сукцинатдегидрогеназы в динамике гипотермии происходит за счет изменений ее кинетических и термодинамических характеристик, из которых наиболее значимый вклад в эффективность катализа фермента вносит параметр V_{\max} – максимальная скорость. Эти изменения могут играть важную роль в сохранении энергосинтезирующей функции митохондрий и снижения в них интенсивности свободно-радикальных процессов.

Ключевые слова: гипотермия, крысы, митохондрии, сукцинатдегидрогеназа, кинетические характеристики.

DOI: 10.31857/S0006302922060138, EDN: LKLTTR

Гипотермия – это состояние, развивающееся у гомойотермных животных при снижении температуры их тела. В зависимости от этиологии развития гипотермического состояния различают несколько видов гипотермии – случайная, интраоперационная, искусственная. Случайная гипотермия может иметь место у животных, обитающих в регионах со значительными колебаниями температурного режима [1]. При проведении обширных операций с использованием наркоза человек может подвергаться так называемой «интраоперационной» гипотермии [2]. Искусственные гипотермических состояния широко применяются при операциях на сердце и мозге, а также в терапевтических целях для предупреждения рисков развития ишемических и реперфузионных повреждений жизненно важных органов и защиты от последствий гипоксии, ишемии-реперфузии, инсульта и инфаркта, травм [3–5]. За-

щита, обусловленная понижением температуры тела, является результатом снижения скорости метаболических процессов и уменьшения потребности тканей в кислороде и глюкозе [6]. Наиболее часто для этих целей используют умеренную пролонгированную гипотермию [7].

Наряду с положительными терапевтическими эффектами умеренная гипотермия вызывает ряд нежелательных изменений в организме [6], что ограничивает потенциальные возможности ее применения. Понимание основных механизмов деструктивных или компенсаторно-приспособительных изменений, лежащих в основе терапевтической гипотермии, жизненно важно для разработки надлежащего и эффективного лечения.

На начальных этапах гипотермия сопровождается возбуждением симпатической нервной системы провоцируя дрожь, гипертонию, тахикардию, тахипноэ и сужение сосудов. Изменения микроциркуляции могут снизить скорость кровотока, способствовать седиментации эритроцитов, увеличению вязкости крови. Все это в совокупно-

Сокращения: ЭТЦ – электрон-транспортная цепь, СДГ – сукцинатдегидрогеназа, ФАД – флавинадениндинуклеотид, АФК – активные формы кислорода.

сти приводит к состоянию гипоксии и развитию окислительного стресса [6, 8, 9]. Существенные физиологические изменения при низких температурах тела животного могут сопровождаться адаптивными или патологическими изменениями в энергетическом метаболизме клетки, ключевую роль в которых играют электрон-транспортные цепи (ЭТЦ), локализованные в мембранах митохондрий.

Одним из структурных элементов ЭТЦ митохондрий является комплекс II – сукцинат: убинон-оксидоредуктаза, представленный олигомерным, встроенным в липидную матрицу внутренней мембраны митохондрий ферментом – сукцинатдегидрогеназой (СДГ), окисляющим сукцинат до фумаровой кислоты сопряженно с восстановлением флавинадениндинуклеотида (ФАД). Кроме того, СДГ является функциональным участником цикла трикарбоновых кислот, играющим ключевую роль в промежуточном метаболизме [10]. Полученные относительно недавно экспериментальные данные свидетельствуют о существенном вкладе комплекса II, наряду с комплексами I и III, в продукцию активных форм кислорода (АФК) при различных патологических состояниях организма, сопровождающихся гипоксией [11]. Важной особенностью этого фермента является независимость его активности от соотношения восстановленного и окисленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН/НАД⁺), что позволяет сохранять энергосинтезирующую функцию митохондрий в условиях гипоксии при нарушении НАД-зависимого дыхания клеток [12].

Ранее нами было показано, что кратковременная умеренная (30°C) гипотермия крыс повышает скорости глутамат- и сукцинат-зависимого дыхания изолированных митохондрий печени. При этом коэффициент окислительного фосфорилирования и дыхательный контроль снижаются, а уровни маркеров окислительного стресса, напротив, увеличиваются. Пролонгирование гипотермии до одного часа сопровождается дальнейшей интенсификацией сукцинат-зависимого дыхания и свободно-радикальных процессов в митохондриях, снижением коэффициента окислительного фосфорилирования и дыхательного контроля, в то время как пролонгирование до трех часов приводит к нормализации данных параметров [13, 14]. Обнаруженные изменения респираторных характеристик митохондрий могут быть связаны с модуляцией активности и каталитических свойств СДГ при низких температурах тела.

Целью данной работы явилось исследование эффектов гипотермии различной длительности на активность, кинетические и термодинамические характеристики СДГ митохондрий печени крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и моделирование гипотермии. Опыты выполнены на крысах-самцах Вистар возраста три с половиной месяца с массой тела 200–220 г., полученных из питомника «Филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России» (Чеховский район Московской области) и содержащихся в стандартных условиях вивария Дагестанского государственного университета. В контрольных и экспериментальных группах было использовано по 8–10 животных.

Моделирование гипотермических состояний. Гипотермию вызывали наружным охлаждением животных в плексигласовых камерах с «рубашкой», через которую циркулировала холодная (5°C) вода. Температуру тела крыс снижали равномерно со средней скоростью 0.28°C/мин. При таком способе моделирования в течение 30 ± 1.0 мин температура тела животных снижалась до 30°C (кратковременная умеренная гипотермия). По достижении этой температуры крыс сразу же декапитировали. Для моделирования состояний пролонгированной гипотермии после того, как температура тела животных достигла 30°C, поддерживали этот уровень гипотермии в течение 1 и 3 ч (пролонгированная часовая и трехчасовая умеренная гипотермия) путем контроля температуры воды в «рубашке» камеры. Мониторинг температуры тела проводили с помощью ректального цифрового термометра MS6501. В качестве контроля служили интактные крысы с нормальной (37°C) температурой тела.

Выделение митохондрий. Крыс декапитировали, после чего быстро выделяли печень и промыли ее ледяной средой выделения (1°C) в течение 5 мин. Печень предварительно измельчали, пропускали через пресс и готовили 10%-й гомогенат в среде выделения, после чего центрифугировали 10 мин при 1800 g. Супернатант отделяли и центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин на центрифуге MR 23i (Thermo Fisher Scientific, США). Полученный дважды отмытый осадок доводили до 2 мл и суспендировали в 0.32 М сахарозе. Суспензию митохондрий наслаивали 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) и центрифугировали в бакет-роторе SW32 Ti при 7000 g на ультрацентрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США).

Митохондрии, находящиеся в слоях 0.5–0.8 М, отсасывали специальным приспособлением для отбора фракций и осаждали при 15000 g на центрифуге MR 23i. Полученные митохондрии промыли в среде выделения и повторно центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Полученный осадок ресуспендировали в среде инкубации и замораживали при температуре –70°C.

Все растворы сахарозы, использованные для создания градиента ее плотности в пробирке, были приготовлены на 10 мМ HEPES-буфере, содержащем 1 мМ ЭДТА (pH 7.2) и 0.1% альбумина. Состав среды выделения: 0.25 М сахарозы (AppliChem, Германия), 5 мМ HEPES (AppliChem, Германия), 0.5 мМ ЭДТА (AppliChem, Германия), 0.1% бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США) (pH 7.4). Среда инкубации содержала 0.32 М сахарозы, 3 мМ HEPES, 0.25 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂, 13 мМ KCl (pH 7.4). Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури [15].

Определение активности сукцинатдегидрогеназы. Для оценки активности СДГ применяли метод, в котором в качестве конечного акцептора электронов выступает ферроцианид калия (K₃[Fe(CN)₆]). Принцип метода заключается в восстановлении ферроцианида калия, раствор которого имеет желтую окраску, до бесцветного ферроцианида калия сукцинатом под действием СДГ [16]. Для определения активности СДГ в суспензии митохондрий готовили растворы опытной и контрольной проб, содержащие 1.48 мл 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.8), 0.1 мл янтарной кислоты (Sigma, США) (pH 7.8), 0.1 мл 25 мМ ЭДТА (pH 7.8), 0.1 мл 150 мМ азида натрия (Sigma, США), 0.1 мл дистиллированной воды. В контрольную пробу вносили 2 мл 20% трихлоруксусной кислоты (Acstos Organics, Бельгия), которая приводит к денатурации СДГ с начала инкубации, что препятствует специфическому восстановлению ферроцианида калия сукцинатом. Затем в обе пробирки вносили по 0.1 мл суспензии митохондрий, содержащей 100 мкг белка и инкубировали в течение 5 мин для ингибирования цитохромоксидазы азидом натрия. Реакцию начинали добавлением 0.1 мл 25 мМ ферроцианида калия (Sigma, США), затем пробы инкубировали 15 мин при температуре 30°C, после чего в опытную пробирку добавляли 2 мл охлажденной 20%-й трихлоруксусной кислоты. Растворы центрифугировали при 1800 g и в надосадочной жидкости определяли оптическую плотность при λ = 420 нм. По разнице оптической плотности контрольной и опытной проб определяли количество ферроцианида калия, восстановленного за время инкубации, используя калибровочную кривую.

Поскольку реакция протекает стехиометрически и 1 моль сукцината восстанавливает 2 моля ферроцианида, можно выразить активность СДГ через количество окисленного сукцината.

Активность фермента (в мкМ сукцината/мг белка за 1 мин) вычисляется по следующей формуле:

$$A = \frac{m \cdot 1000}{2M \cdot b \cdot t}, \quad (1)$$

где *m* – количество восстановленного ферроцианида (в мкг); *M* – молекулярная масса ферроцианида калия; *b* – содержание белка в пробе в мг; *t* – время инкубации в мин.

Определение кинетических и термодинамических характеристик сукцинатдегидрогеназы. Концентрационную зависимость активности СДГ определяли, измеряя активность СДГ в диапазоне концентраций сукцината 0.065–35 мМ. В соответствии с литературными данными кинетика СДГ хорошо описывается классической моделью ферментативной кинетики Михаэлиса–Ментен:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \quad (2)$$

где *V* – скорость реакции, *V*_{max} – максимальная скорость, *K*_M – константа Михаэлиса.

Данное уравнение было использовано для расчета кинетических характеристик фермента с помощью многомерного нелинейного регрессионного анализа.

Температурную зависимость активности СДГ определяли, измеряя активность СДГ в диапазоне температур 5–37°C и концентрации субстрата в среде инкубации 4.37 мМ. По полученным результатам вычисляли активность фермента, строили линейные анаморфозы в координатах Аррениуса, по которым определяли энергии активации (*E*_a) и энтальпии активации (Δ*H*_a).

Статистическая обработка. Обработка данных проведена с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро–Уилка. Достоверность различий между нормально распределенными данными определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости *p* ≤ 0.05. Для оценки взаимосвязи между нормально распределенными переменными был использован корреляционный анализ Пирсона. Данные в диаграммах приведены в виде среднего ± ошибка среднего. Каждая кривая на графиках концентрационной и температурной зависимости скорости катализа СДГ – среднее из восьми-десяти независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрационная зависимость активности и кинетические характеристики сукцинатдегидрогеназы. Исследована активность и концентрационная зависимость СДГ митохондрий печени контрольных крыс в диапазоне концентраций сукцината 0.065–35 мМ. Из рис. 1, на котором представлены графики концентрационной зави-

симости активности СДГ, видно, что с повышением концентрации сукцината *in vitro* активность СДГ в митохондриях печени контрольных крыс увеличивается, достигая максимального значения при концентрации 4.37 мМ. Дальнейшее повышение концентрации субстрата не оказывает эффекта на скорость катализа СДГ. Таким образом, кинетика катализа СДГ носит классический характер и может быть адекватно описана классической моделью Михаэлиса–Ментен. При этом необходимо отметить следующую особенность кинетики СДГ: в области низких концентраций сукцината имеет место сигмоидный характер зависимости скорости катализа фермента от содержания субстрата в среде инкубации. Это указывает на то, что в данном диапазоне концентраций янтарной кислоты незначительные изменения ее притока в компартмент локализации фермента приводят к резкому повышению активности фермента.

Снижение температуры тела крыс до 30°C в течение 30 мин (умеренная кратковременная гипотермия) сопровождается существенным повышением активности фермента и изменениями характера его концентрационной зависимости (рис. 1). При этом повышение при различных концентрациях субстрата носит неоднозначный характер: при низких концентрациях оно более выражено, нежели при высоких. Например, у гипотермических крыс активность СДГ при концентрации сукцината 0.065 мМ увеличивается в 3.21 раза (в контроле – 1.07 ± 0.12 мкмоль/мин·мг, при кратковременной гипотермии – 3.44 ± 0.22 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), при 4.37 мМ – на 58.9% (в контроле – 54.6 ± 7.9 мкмоль/мин·мг, при кратковременной гипотермии – 86.71 ± 9.4 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), а при 35 мМ – на 68.7% (в контроле – 54.9 ± 5.6 мкмоль/мин·мг, при кратковременной гипотермии – 92.7 ± 4.9 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$).

Пролонгированная гипотермия в течение 1 ч сопровождается дальнейшими повышениями активности СДГ и изменениями ее концентрационной зависимости (рис. 1). Так, при концентрации 0.065 мМ скорость катализа фермента увеличивается по сравнению с кратковременной гипотермией на 20% (4.13 ± 0.27 мкмоль/мин·мг), при концентрации 4.37 мМ – на 15.4% (100.5 ± 7.9 мкмоль/мин·мг), а при 35 мМ – на 26.1% (116.9 ± 8.6 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$). Трехчасовая гипотермия продолжает повышать активность СДГ: при концентрации сукцината 0.065 мМ она становится в 4.7 раза выше уровня контроля (5.08 ± 0.32 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), при 4.37 мМ – в 2.2 раза (120.3 ± 8.4 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$), а при 35 мМ – в 2.6 раза (142.9 ± 9.4 мкмоль/мин·мг, $p < 0.05$).

Из рис. 1 видно, что в динамике пролонгирования гипотермии насыщение активных центров

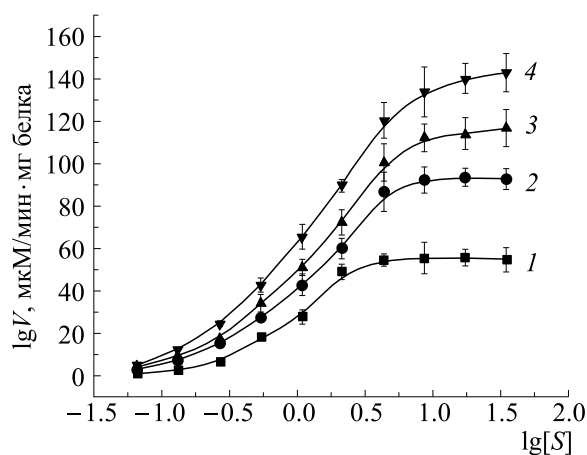


Рис. 1. Концентрационные зависимости активности СДГ митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – логарифм концентрации сукцината, по оси ординат – скорость ферментативной реакции.

молекул СДГ достигается при более высоких концентрациях субстрата, а кооперативная кинетика связывания становится менее выраженной.

Исследование кинетических характеристик показало, что кратковременная гипотермия способствует повышению V_{\max} – на 66.2% (рис. 2а). При этом значение K_M тоже увеличивается – на 26.4% (рис. 2б). Более выраженное повышение V_{\max} по сравнению с K_M способствует тому, что отношение V_{\max}/K_M , приближенно отражающее эффективность катализа фермента при физиологических концентрациях субстрата в клетке, тоже становится выше контрольных значений (на 31.5%, рис. 2в).

Пролонгирование гипотермии до 1 ч способствует значительному повышению V_{\max} СДГ (примерно в два раза). При этом, несмотря на более существенное по сравнению с кратковременной гипотермией повышение K_M (на 35.4% относительно контроля), эффективность катализа продолжает увеличиваться, достигая уровня, который выше уровня контроля на 51.4% (рис. 2).

Дальнейшее пролонгирование гипотермии (до 3 ч) продолжает увеличивать значение V_{\max} . Оно становится в 2.46 раз выше контрольных значений и на 20.1% выше уровня у животных с гипотермией 1 ч. При этом наблюдается незначительное по сравнению с часовой гипотермией снижение K_M . Оно способствует еще более выраженному повышению эффективности катализа, достигающему 95.1% от уровня контрольных животных (рис. 2).

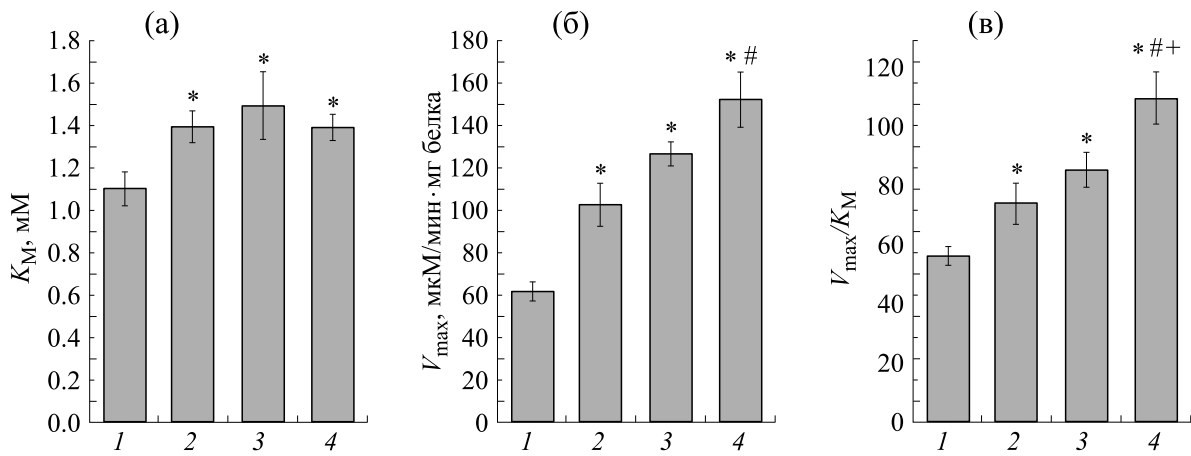


Рис. 2. Кинетические характеристики ((а) – V_{max} , (б) – K_M , (в) – V_{max}/K_M) СДГ митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – состояния животных, по оси ординат – значения кинетических характеристик.

Температурная зависимость активности и термодинамические параметры сукцинатдегидрогеназы. Исследована зависимость активности СДГ митохондрий печени крыс от температуры инкубации фермента *in vitro* (в диапазоне 5–37°C). Результаты исследования, представленные на рис. 3 в виде графиков в координатах Аррениуса ($1000/T - \lg V$), демонстрируют тот факт, что температурная зависимость скорости катализа СДГ носит нелинейный характер (рис. 3). Она представлена двумя линейными анаморфозами, пересекающимися у контрольных животных при тем-

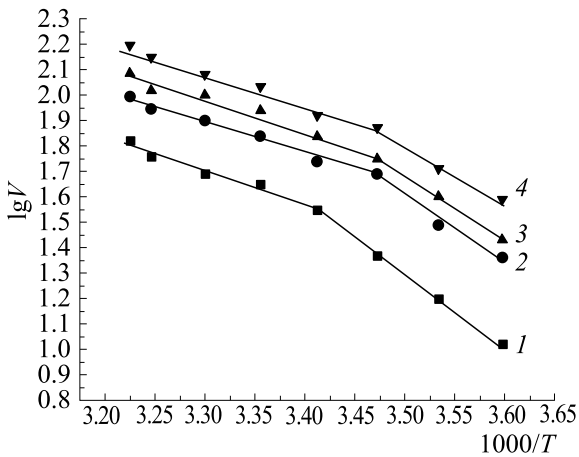


Рис. 3. Температурные зависимости активности СДГ митохондрий печени крыс при умеренной гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – температура в обратных единицах, по оси ординат – логарифм скорости ферментативной реакции.

пературе инкубации $20.0 \pm 1.6^\circ\text{C}$ – точке излома всей температурной кривой.

Умеренная кратковременная гипотермия увеличивает активность фермента при всех температурах его инкубации *in vitro*. Примечателен тот факт, что с повышением температуры инкубации разница в активности СДГ между контрольными и гипотермическими животными становится менее выраженной. Кроме того, кратковременная гипотермия способствует изменению характера температурной зависимости. Позиция излома на графике температурной зависимости смещается в сторону более низких температур – $15.0 \pm 1.3^\circ\text{C}$ ($p < 0.05$). Пролонгирование умеренной гипотермии способствует дальнейшему повышению активности фермента при всех температурах его инкубации и незначительным изменениям в наклонах температурных анаморфозов, при этом паттерны температурной зависимости фермента остаются в совокупности схожими с таковыми для крыс, подверженных кратковременной гипотермии.

Из наклонов линейных анаморфозов были рассчитаны эффективные энергии активации выше (E_{a2}) и ниже (E_{a1}) точки излома. Результаты исследования представлены на рис. 4а. Оказалось, что у всех исследованных групп крыс E_{a1} существенно выше E_{a2} (например, у контрольной группы животных – в 2.15 раза). Кратковременная гипотермия способствует незначительному снижению E_{a1} . Это снижение в динамике пролонгирования гипотермии становится более выраженным, достигая в течение 3 ч гипотермии уровня, который на 21.7% ниже такового нормотермических крыс. При этом значения E_{a2} у гипотермированных животных претерпевают лишь незначительные флуктуации.

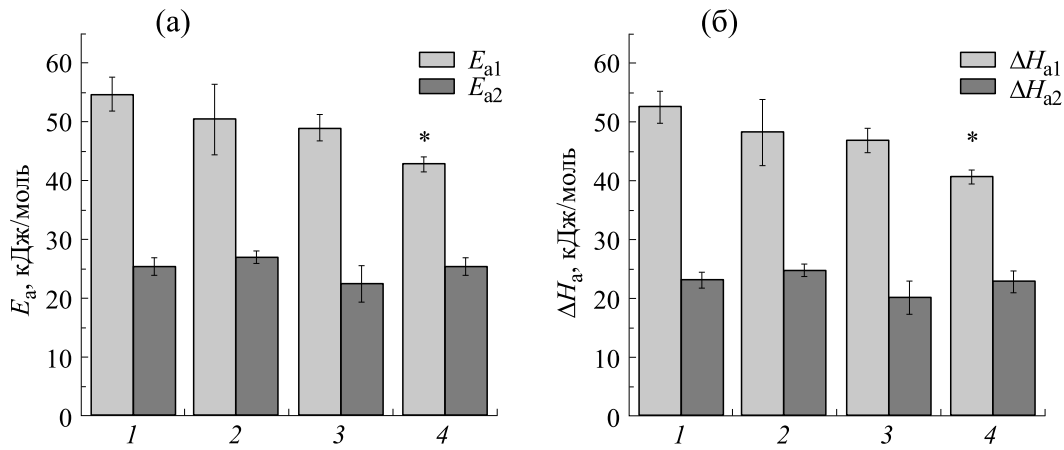


Рис. 4. Термодинамические параметры ((а) – энергия активации ниже точки излома (E_{a1}) и выше точки излома (E_{a2}), (б) – энтальпия активации ниже точки излома (ΔH_{a1}) и выше точки излома (ΔH_{a2})) СДГ митохондрий печени крыс при гипотермии различной длительности: 1 – контроль, 2 – кратковременная гипотермия, 3 – пролонгированная часовая гипотермия, 4 – пролонгированная трехчасовая гипотермия. По оси абсцисс – состояния животных, по оси ординат – величины термодинамических параметров.

Из значений эффективных энергии активации были вычислены значения изменений энтальпии активации СДГ ниже (ΔH_{a1}) и (выше ΔH_{a2}) точки излома в соответствии со следующей формулой:

$$\Delta H = E_a - RT. \quad (3)$$

Из рис. 4б видно, что данный термодинамический параметр СДГ митохондрий печени крыс в период низкотемпературного воздействия претерпевает изменения, характерные для E_a . Кратковременная гипотермия способствует незначительному снижению ΔH_{a1} , однако в динамике пролонгирования значения ΔH_{a1} становятся существенно ниже контрольных. При этом гипотермия не оказывает значительного эффекта на ΔH_{a2} .

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что на начальных этапах развития гипотермия сопровождается стрессорной реакцией, при которой происходит активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [17].

Эта активация может индуцировать терморегуляторные реакции, направленные как на увеличение производства тепла, так и на снижение теплопотерь. Для увеличения теплопродукции включаются механизмы дрожательного и недрожательного термогенеза. Усиливается обмен веществ, увеличивается распад гликогена и липидов, повышается содержание глюкозы и жирных кислот в крови [18].

Дрожь, возникающая при снижении температуры ниже 35.5°C и прекращающаяся при темпе-

ратуре менее 30°C , увеличивает скорость метаболизма и потребление кислорода [19]. Это может увеличить производство метаболического тепла в пять-шесть раз по сравнению с уровнем метаболизма в покое, а также потребление кислорода на 50–400% [20, 21]. Ранее нами было показано, что кратковременная гипотермия способствует значительной интенсификации глутамат- и сукцинатзависимого дыхания митохондрий печени крыс [13].

Реакции, направленные на снижение теплопотерь, основаны на вазоконстрикции и централизации кровотока. Возникновение спазма периферических сосудов повышает вязкость крови и нарушает микроциркуляцию [22]. Все это, в совокупности со сдвигом при низких температурах кривой диссоциации оксигемоглобина влево, приводит к ситуации тканевой гипоксии [9].

Снижение концентрации кислорода в клетках может привести к изменениям редокс-состояния компонентов дыхательной цепи и мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) митохондрий. Результатом таких изменений может стать дисфункция митохондрий и их деэнергизация, сопровождающаяся нарушениями функционально-метаболических показателей, контролирующих жизнедеятельность клетки. Кроме того, накопление восстановительных эквивалентов в митохондриальных цепях переноса электронов при гипотермии может увеличить производство активных форм кислорода в митохондриях и способствовать развитию окислительного стресса [23]. Изменения функциональной активности комплексов ЭТЦ могут играть немаловажную роль в развитии у гомойотермных животных как компенсаторно-приспо-

собоительных, так и патологических реакций при низких температурах тела.

Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что снижение температуры тела крыс сопровождается значительными изменениями как в активности, так и в кинетических характеристиках одного из ключевых компонентов дыхательной цепи — сукцинат:убихинон-оксидоредуктазы. Умеренная гипотермия уже в первые 30 мин снижения температуры тела способствует повышению скорости катализа СДГ при всех исследованных концентрациях субстрата, причем это повышение по мере пролонгирования гипотермического состояния становится более существенным. Особый интерес представляют серьезные изменения характера концентрационной зависимости СДГ. Если у контрольных крыс наблюдается сигмоидальный характер зависимости от концентрации субстрата, то в динамике пролонгирования гипотермии кооперативная кинетика связывания субстрата становится менее выраженной.

Известно, что комплекс СДГ имеет сложную структуру и состоит из четырех субъединиц, включая две гидрофильные субъединицы — СДГ-А и СДГ-В, которые вместе образуют каталитический центр энзима, и две гидрофобные субъединицы — СДГ-С и СДГ-Д [10]. Основная функция СДГ-А заключается в превращении сукцината в фумарат и преобразовании ФАД в ФАДН₂. Электроны ФАДН₂ передаются субъединице СДГ-В. СДГ-В содержит три железосерных кофактора, через которые опосредуется транспорт электронов от СДГ-А к СДГ-С и СДГ-Д и, в конечном счете, к убихинону [10]. Таким образом, механизм катализа СДГ и передачи электронов на убихинон достаточно сложный и определяется функциональным состоянием и взаимодействием нескольких его субъединиц.

Изменения активности СДГ происходят за счет изменения его каталитических параметров — V_{\max} и K_M . Мы обнаружили достаточно выраженные однонаправленные изменения как со стороны K_M , так и со стороны V_{\max} . Обе величины в разной степени увеличиваются. При этом повышение V_{\max} положительно коррелирует с повышением активности СДГ ($r = 0.90$, $p < 0.05$), в отличие от значений K_M , корреляционные связи которой со скоростью катализа СДГ незначительны и статистически недостоверны ($r = 0.30$, $p > 0.05$). Таким образом, основной вклад в повышение эффективности катализа СДГ при гипотермии вносят именно изменения V_{\max} , а не K_M . Можно предположить, что повышение K_M СДГ при гипотермии посредством снижения аффинности субстрата к активному центру фермента направлено на компенсацию резких скачков V_{\max} .

Повышение K_M для СДГ является свидетельством того, что насыщение фермента субстратом происходит при более высоких концентрациях, что увеличивает возможности регуляции активности фермента в широком диапазоне концентраций сукцината. С другой стороны, повышение K_M могло быть обусловлено хорошо описанным в литературе конкурентным ингибированием активности СДГ оксалоацетатом. Однако, учитывая тот факт, что изменения значения K_M при гипотермии не носит драматический характер, а также то, что наряду с повышением K_M активность СДГ и значения V_{\max} тоже увеличивается, вероятность конкурентного ингибирования СДГ оксалоацетатом можно исключить. Возможно на начальных этапах снижения температуры тела, интенсификация дыхания митохондрий *in vivo*, приводит к накоплению оксалоацетата, ингибирующего СДГ до тех пор, пока концентрации сукцината не достигнут достаточно высоких уровней. С этой точки зрения повышение K_M для СДГ при гипотермии может иметь биологический смысл: оно позволит увеличить концентрации субстрата, при которых фермент работает с максимальной эффективностью, и тем самым снять ингибирующий эффект оксалоацетата. Известно, что значения K_M приблизительно соответствуют физиологическим концентрациям субстрата в клетке или ее компартаментах [24].

Исходя из полученных нами экспериментальных данных можно предположить, что при гипотермии содержание сукцината в митохондриях существенно увеличивается. Действительно, было обнаружено, что у гомойотермных животных в период воздействия низких температур окружающей среды уровень циркулирующего сукцината значительно возрастает [25]. Скорее всего, такое повышение является отражением усиленного катаболизма липидов и углеводов на начальных этапах гипотермии.

Кроме этого, накопление сукцината в митохондриях может происходить вследствие дефицита кислорода в клетке. Так, было показано, что при ишемии и гипоксии в митохондриях увеличивается концентрация фумарата, что способствует обращению реакции, катализируемой комплексом II, в сторону образования сукцината. Такая реверсия становится возможной благодаря тому, что комплекс I регенерирует восстановленный убихинон, необходимый для поддержания обратной реакции (превращения фумарата в сукцинат) [26].

V_{\max} — это величина, которая зависит от концентрации фермента и от числа его оборотов (k_{cat}). Повышение концентрации фермента возможно либо вследствие интенсификации процессов его биосинтеза, либо из-за снижения скоро-

сти его деградации. Одним из первичных транскрипционных регуляторов митохондриального биогенеза является респираторный фактор-1 (NRF-1), который индуцирует экспрессию СДГ посредством связывания с промоторами генов SDH-A и SDH-D [27].

Однако в условиях низких температур тела скорости всех энергоёмких процессов, к которым относится и биосинтез белка, сильно снижаются [28]. Кроме того временные рамки гипотермии ограничены и учитывая то, что биосинтез белка является слишком инерционным механизмом, за столь короткий период достижения гипотермического состояния (30 мин) быстрое увеличение концентрации СДГ за счет высоких скоростей процессов транскрипции и трансляции представляется сомнительным. Было показано, что при трехчасовой гипотермии, вызванной анестезией, в печени происходит снижение экспрессии целого ряда белков, связанных с синтезом АТФ, электрон-транспортной цепью и биосинтезом мочевины, а также экспрессии шаперонов Hspa 5, Hsp90b1, Pdia3, Dnajb11 [29]. Следует также учесть, что в отличие от других комплексов дыхательной цепи ни одна из субъединиц комплекса II не кодируется митохондриальной ДНК [30]. Поэтому ко времени и энергоёмкости биосинтеза отдельных субъединиц СДГ и их последующей сборки добавляется время и энергоёмкость их транспорта в митохондрии и последующей сборки.

Вместе с тем имеется ряд работ, в которых показано, что низкие температуры индуцируют синтез небольшого подмножества белков холодового шока, таких как индуцируемый холодом РНК-связывающий белок (CIRP) и мотив 3 холодоиндуцируемого РНК-связывающего белка (RBM3) [31–33], и увеличивают экспрессию мРНК белка теплового шока hsp72 [34]. Таким образом, гипотермия способствует повышенной экспрессии лишь ограниченного числа «стрессорных» белков, при этом биосинтез большинства других белков остается подавленным. Отсюда следует, что обнаруженные изменения V_{\max} связаны с реализацией других механизмов регуляции, направленными на повышение числа оборотов СДГ (k_{cat}).

Срочная регуляция, следы которой остаются *in vitro*, скорее всего, осуществляется посредством посттрансляционной модификации фермента. Посттрансляционные модификации регулируют активность СДГ четырьмя способами: деацетилирование фосфорилирование, сукцинирование и пропионилирование [27]. Обратимое ацетилирование множественных остатков лизина СДГ-А в митохондриях млекопитающих ослабляет ее каталитическую активность. При этом основной деацетилазой, регулирующей уровень ацетилиро-

вания СДГА, является SIRT3 - представитель сиртуинового семейства НАДФ-зависимых деацетилаз митохондрий [35].

Было обнаружено, что в фосфорилировании СДГ принимает участие тирозинкиназа FGR, которая является одной из киназ, нацеленных на аминокислотные остатки тирозина Y535 и Y596 СДГ-А у крыс [36]. Впоследствии было установлено, что АФК опосредуют активацию тирозинкиназы FGR, которая фосфорилирует СДГА по Y604, и что эта функция FGR требуется для корректировки метаболизма в различных условиях, таких как гипоксия/реоксигенация и активация Т-клеток [37]. В митохондриях была обнаружена растворимая аденилатциклаза, которая может активироваться путем изменения содержания АТФ, ионов кальция и бикарбоната. Такая активация может стимулировать внутримитохондриальную протеинкиназу А, которая способна фосфорилировать многие белки ЭТЦ, изменяя их активность [38].

Митохондрии также содержат фосфатазы, которые действуют в обратном направлении по отношению к киназам, то есть осуществляют дефосфорилирование СДГ-А. Примером этого является РТЕН-подобная митохондриальная фосфатаза-1 – фермент, дефосфорилирующий фосфатидилглицеролфосфат (в пути биогенеза кардиолипина) [39], а также СДГ-А. Его ингибирование приводит к усилению фосфорилирования и активации СДГ и, как следствие, к снижению концентрации глюкозы [40].

Сукцинирование является недавно открытой посттрансляционной модификацией, которая превращает катионную боковую цепь лизина в анион с различными последствиями для структуры и функции белка. Десукцинирование Lys в клетках млекопитающих и бактерий осуществляется с помощью SIRT5 (глобальный регулятор сукцинирования Lys в митохондриях) [27].

Изменения кинетических параметров СДГ при гипотермии могут быть связаны и окислительной модификацией аминокислотных остатков фермента посредством АФК. Многочисленные литературные данные свидетельствуют о том, что начальные этапы гипотермии сопровождаются интенсификацией свободно-радикальных процессов в различных тканях животных [6, 8, 14]. Обнаружено, что кратковременная гипотермия увеличивает уровни карбонильных групп в белках мембран митохондрий печени, при этом содержание тиоловых групп значительно снижается. Кроме того, снижается интенсивность собственной флуоресценции мембранных белков митохондрий, что указывает на окисление в них остатков ароматических аминокислот. Обнаружены изменения и в спектрах флуоресценции

белков, которые могут свидетельствовать об их конформационных перестройках [14].

Известно, что сукцинат-связывающий участок СДГ-А и убихинон-связывающий участок, сформированный Гис207 субъединицы В, Сер27 и Арг31 субъединицы С и Тир83 субъединицы D, взаимодействуют между собой с помощью Fe/S участков СДГ-В [41]. Все эти аминокислотные остатки могут оказаться чувствительны к АФК, особенно Сер27, и их модификация может существенно изменить эффективность катализа СДГ. При этом следует отметить, что уровень маркеров окислительной модификации белков при пролонгировании гипотермии в течение 1 ч продолжает увеличиваться, однако через 3 ч происходит его нормализация [14]. В то же время результаты настоящего исследования показали, что активность СДГ в динамике пролонгирования гипотермии продолжает расти.

Поскольку субъединицы СДГ-С и СДГ-D фермента погружены в липидный бислой внутренней мембраны митохондрий, то изменения структурно-динамического состояния липидной матрицы также могут оказать существенный эффект на активность СДГ. Ранее, при исследовании мембран митохондрий с помощью флуоресцентного зонда пирена, нами было обнаружено, что кратковременная умеренная гипотермия и ее пролонгирование увеличивают коэффициент эксимеризации пирена в анулярных и общих липидах митохондриальных мембран, что указывает на снижении их микровязкости [42]. Обнаруженные изменения физического состояния мембранных липидов, скорее всего, обусловлены ремоделированием их жирнокислотного состава. По данным работы [43], при снижении температуры тела до 28–27°C происходят изменения фосфолипидного спектра и содержания полиненасыщенных жирных кислот в липидах митохондрий миокарда белых крыс и собак. Повышение степени ненасыщенности мембранных липидов при умеренной гипотермии приводит к снижению их микровязкости и сдвигу фазового перехода в область низких температур [43].

К сожалению, в доступной нам более современной литературе мы не обнаружили какую-либо новую информацию о влиянии гипотермии на липидный состав митохондриальных мембран гомойотермных животных. При этом имеются работы, в которых показано, что умеренная гипотермия и ее пролонгирование изменяют ЖК состав липидов синаптических и эритроцитарных мембран в направлении повышении степени их ненасыщенности [44, 45].

Вероятнее всего, в митохондриях при гипотермии происходит включение механизмов ремоделирования мембранных фосфолипидов путем их деацилирования и реацилирования. В качестве

субстратов для ремоделирования мембраны могут использоваться ненасыщенные жирные кислоты, содержание которых в крови гипотермированных животных увеличивается [46]. Быстрые изменения индекса ненасыщенности мембранных липидов могут быть связаны и с активностью ферментов десатураз, играющих важную роль в температурных адаптациях не только пойкилотермных, но и, как показала работа [46], гомойотермных животных.

Перестройки в липидной матрице также могут быть связаны с окислительной модификацией мембранных фосфолипидов. Ранее нами было установлено, что кратковременная умеренная гипотермия стимулирует перекисное окисление липидов в митохондриях [14]. Известно, что процессы обновления фосфолипидов могут ускоряться после их окислительной модификации, в результате чего окисленные ацильные цепи быстро удаляются из фосфолипидов мембран под действием фосфолипазы А2 [47].

Таким образом, повышение эффективности катализа СДГ при гипотермии вполне могло бы объясняться снижением вязкости общих и анулярных липидов внутренней мембраны митохондрий. Однако в соответствии с экспериментальными данными, представленными в предыдущем исследовании [42], в динамике пролонгирования гипотермии дальнейший изменений показателей микровязкости не происходит, а интенсивность перекисного окисления липидов и вовсе нормализуется [14], в то время как в настоящей работе активность СДГ продолжает увеличиваться.

Особый интерес представляет исследование температурной зависимости СДГ. Обнаружено, что она носит нелинейный характер, то есть в координатах Аррениуса представлена двумя пересекающимися в точке излома прямыми, имеющими различные энергии активации. Это может быть обусловлено несколькими причинами: фазовыми переходами в отдельных субъединицах СДГ или ее липидном микроокружении, сменой лимитирующей катализ стадии, ассоциацией-диссоциацией субъединиц СДГ в определенном температурном диапазоне или изменением характера взаимодействия комплекса II с другими компонентами ЭТЦ.

Известно, что внутренняя мембрана митохондрий характеризуется необычно высоким содержанием белков (до 75%). Основная часть этих белков – белки, входящие в комплексы ЭТЦ. Было обнаружено, что комплексы при определенных условиях могут интегрироваться в так называемые суперкомплексы, образование которых сопряжено с наиболее эффективным окислительным фосфорилированием. В частности, было показано, что суперкомплексы в митохондриях печени крыс образуются в области температуры

19°C, при этом электронная микроскопия демонстрирует изменение морфологии крист с образованием, так называемых, «сухих крист» [48]. Эта температура примерно соответствует температуре точки излома на графике температурной зависимости СДГ печени крыс, представленном в нашем исследовании. Следовательно, нелинейный характер температурной зависимости СДГ может быть обусловлен температурной зависимостью работы ЭТЦ митохондрий в режиме суперкомплекса.

Известно, что СДГ может быть очень чувствительна к фазовым переходам в липидах внутренней мембраны митохондрий [49], поэтому точка излома на графиках Аррениуса может соответствовать температуре фазового перехода липидной матрицы митохондриальной мембраны

Кратковременная гипотермия и ее пролонгирование смещают точку излома температурной кривой в более низкотемпературную область – 15°C. Такое смещение очень хорошо коррелирует с нашими ранними данными о том, что гипотермия снижает вязкость общих и аннулярных липидов митохондриальных мембран [42], что, вероятнее всего, обусловлено изменением их жирнокислотного состава в сторону повышения индекса ненасыщенности. Повышение текучести мембраны способствует тому, что фазовые переходы аннулярных липидов, в которые погружены гидрофобные субъединицы СДГ, происходят при более низких температурах. Однако нельзя исключать возможности того, что при гипотермии происходят изменения в условиях работы митохондрий в режиме суперкомплекса.

Особое внимание заслуживает тот факт, что при кратковременной гипотермии и в динамике ее пролонгирования эффективные энергии активации и энтальпии активации ниже точки излома снижаются, достигая минимальных значений при трехчасовой гипотермии.

Известно, что константа скорости химической реакции зависит от ее энергии активации в соответствии с уравнением Аррениуса:

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{-\Delta E_a}{RT}}. \quad (4)$$

Таким образом, чем ниже энергия активации, тем больше скорость катализа.

Корреляционный анализ показал, что между E_{a1} , ΔH_{a1} и эффективностью катализа СДГ имеется отрицательная корреляция ($r = -0.99$, $P < 0.05$). При этом следует отметить, что изменения скорости катализа СДГ при гипотермии имеют более резкий и существенный характер по сравнению с энергией и энтальпией активации. Более того, изменения термодинамических параметров E_{a2} , ΔH_{a2} и вовсе незначительны. Следовательно, вклад энтальпии активации в повыше-

ние скорости катализа СДГ, скорее всего, незначителен.

Объяснение данному факту можно дать исходя из элементарных представлений химической кинетики, если обратиться к уравнению Эйринга. Согласно данному уравнению скорость химического процесса определяется изменением его свободной энергии:

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp(-\Delta G^* / RT), \quad (5)$$

где k – константа скорости реакции, k_B – константа Больцмана, h – постоянная Планка, ΔG^* – свободная энергия активации.

Изменение свободной энергии активации (ΔG) химической реакции можно вычислить по следующей формуле:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (6)$$

Из формулы видно, что вклад в изменение ΔG вносит как ΔH , так и энтропия активации – ΔS . Исходя из вышеприведенных предположений, повышение скорости катализа СДГ может быть обусловлено более значимым вкладом энтропийного фактора в снижение свободной энергии активации ферментативной реакции. Возможно, что при гипотермии структурно-динамические изменения в молекуле СДГ или ее окружении способствуют существенному повышению энтропии активации СДГ, что позволяет снизить ΔG СДГ и тем самым, существенно повысить скорость ее катализа. Повышение ΔS , скорее всего, тесно связано с изменениями в липидной подложке фермента и повышением его конформационной подвижности. Оно направлено на компенсацию воздействия на фермент низкотемпературного фактора.

Имеет ли повышение активности СДГ при гипотермии биологическую значимость или является отражением патологических процессов, происходящих в митохондриях на уровне ЭТЦ?

Известно, что в условиях нормоксии в интактных митохондриях основной вклад в работу дыхательной цепи вносит комплекс I ЭТЦ, окисляющий НАД-зависимые субстраты. Только 25–30% митохондриального дыхания в этих условиях связано с комплексом II и окислением сукцината, содержание которого в матриксе митохондрий невелико [50]. В условиях гипоксии происходят изменения работы дыхательной цепи: обратимое подавление функции комплекса I и компенсаторная активация комплекса II. При этом резко возрастают содержание сукцината в крови и тканях [51] и вклад сукцинатаоксидазного окисления в общее дыхание. Дыхание на сукцинате может достигать 70–80% [50].

Переход на преимущественное окисление сукцината представляет собой один из механизмов

повышения устойчивости клетки к гипоксии. Лимитирующими факторами при этом являются наличие достаточного количества сукцината и активность сукцинатдегидрогеназы. Было показано, что содержание сукцината в первые 30 мин гипоксии возрастает на порядок, достигая 4–7 ммоль/л [52]. Одновременно при гипоксии наблюдается активация сукцинатдегидрогеназы и сукцинатоксидазного окисления, а также увеличение вклада последнего в дыхание и синтез энергии [53].

По мнению некоторых авторов, переход на преимущественное окисление сукцината в условиях гипоксии, возможно связан с тем, что наиболее удаленные от кислорода пиридиннуклеотиды – НАД и НАДФ, как правило, восстановлены на 100%, тогда как часть флавопротеидов и цитохромный участок дыхательной цепи остаются в значительной мере окисленными. Такие различия в степени восстановленности пиридиннуклеотидов и флавопротеидов в условиях гипоксии создают возможность для преимущественного окисления янтарной кислоты, поскольку, сукцинатдегидрогеназа в отличие от большинства других дегидрогеназ является флавинозависимым ферментом [54].

Предположено, что переключение путей окисления субстратов дыхательной цепи от НАД-зависимого на сукцинатоксидазный является эволюционно сформированным срочным механизмом адаптации к гипоксии, который снижает характерные для гипоксии нарушения синтеза АТФ и способствует устранению гипоксического ацидоза. Репрограммирование работы субстратного участка дыхательной цепи при гипоксии происходит очень быстро. Было показано, что изменения кинетических показателей основных ферментов Комплексов I и II наблюдаются уже через 30 мин после самых различных гипоксических воздействий [55].

Феномен активного окисления янтарной кислоты сукцинатдегидрогеназой получил название «монополизации дыхательной цепи», биологическое значение которого заключается в быстром ресинтезе АТФ клетками и повышении их антиоксидантной активности [56]. Это важно в условиях гипоксии, когда развивается дефицит НАД-зависимых субстратов, приводящий к нарушению функционирования первого комплекса митохондриальной дыхательной цепи. В этой патологической ситуации янтарная кислота «поставляет» электроны непосредственно на комплекс II дыхательной цепи, восстанавливая электрохимический градиент на митохондриальной мембране и обеспечивая тем самым «бесперебойную» работу митохондрий, что поддерживает уровень и адекватность энергетического обеспечения клетки. В противном случае при ингибировании

первого комплекса происходит деполяризация внутренней мембраны митохондрий, сопровождающаяся тяжелыми нарушениями трансмембранного транспорта, что, в конечном счете, может явиться причиной гибели клетки [57].

Поскольку, многие исследования указывают на высокую вероятность развития гипоксии на ранних этапах индукции гипотермического состояния, то повышение эффективности катализа СДГ за счет V_{max} , скорее всего, является одним из компенсаторно-приспособительных механизмов развития адаптации к условиям дефицита кислорода в митохондриях. Повышение K_M для СДГ, обнаруженное нами на начальных этапах развития гипотермического состояния, может указывать на то, что фермент при гипотермии функционирует в условиях высокого содержания сукцината.

В последние годы внимание многих исследователей привлекает участие СДГ в генерации АФК в митохондриях. Первоначально основными источниками митохондриальных АФК считались дыхательные комплексы I и III, а вклад комплекса II игнорировался. Выявление мутаций в комплексе II, приводящих к увеличению продукции АФК при различных заболеваниях, и доказательства того факта, что он играет решающую роль в продукции АФК посредством обратного переноса электронов через комплекс I, демонстрируют значительный вклад комплекса II в генерацию АФК, который имеет важные физиологические или патологические последствия [11].

Было показано, что во время ишемии и гипоксии в митохондриях происходит накопление сукцината до тех пор, пока не будет исчерпан источник фумарата или не начнется реперфузия, во время которой комплекс II метаболизирует доступный сукцинат с образованием убихинона, что приводит к гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны [58]. Сочетание высоких уровней убихинона и гиперполяризованного мембранного потенциала «заставляет» комплекс I входить в так называемое состояние обратного переноса электронов и продуцировать АФК с чрезвычайно высокой скоростью [26]. Таким образом, накопление сукцината в митохондриях, может стать ключевым фактором ишемически-реперфузионного повреждения [26]. Можно предположить, что высокая активность СДГ при гипотермии предотвращает накопление сукцината в митохондриях и снижает продукцию АФК посредством обратного переноса электронов, оказывая тем самым протекторный эффект.

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу предположения о возможном переключении окисления субстратов дыхательной цепи от НАД-зависимого на сукцинатоксидазный путь, которое происходит уже на

начальных этапах гипотермии и становится более выраженным в динамике ее пролонгирования. Это переключение обусловлено изменениями в каталитических свойствах СДГ, увеличивающими ее активность, и является срочным регуляторным и компенсаторным механизмом адаптации, который реализуется в условиях дефицита кислорода в печени, а возможно и в других органах. Такая модуляция активности СДГ, обеспечивает сохранение энергосинтезирующей функции дыхательной цепи при нарушении кислородного гомеостаза и снижает скорости генерации в них АФК. Действительно, ранее нами было обнаружено, что в динамике пролонгирования гипотермии происходит нормализация ряда биоэнергетических параметров митохондрий (скорости фосфорилирования, значений коэффициента окислительного фосфорилирования и дыхательного контроля) [13], а также интенсивности в них свободно-радикальных процессов [14]. Все эти данные в совокупности указывают на активацию у гомойотермных животных при длительном воздействии низких температур эволюционно сформированных компенсаторных механизмов, способствующих повышению неспецифической резистентности организма к экстремальным факторам окружающей среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Госзадания (FZNZ-2020-0002).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В ходе исследования были соблюдены все нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. Brown, H. Brugger, and J. Boyd, *N. Engl. J. Med.*, **367**, 1930 (2012).
2. Z. Sun, J. E. Dalton, D. Yang, et al., *Anesthesiology*, **122** (2), 276 (2015).
3. X. N. Tang and M. A. Yenari, *Ageing Res. Rev.*, **9** (1), 61 (2010).
4. K. Søreide, *Injury*, **45** (4), 647 (2014).
5. M. Andresen, J. T. Gazmuri, A. Marín, et al., *Scand. J. of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine* **23** (1), 2 (2015).
6. N. Alva, J. Palomeque, and T. Carbonell, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 10 (2013).
7. Л. В. Усенко и А. В. Царев, *Общая реаниматология*, **5** (1), 21 (2009).
8. Э. З. Эмирбеков и Н. К. Кличханов, *Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии* (ЮФУ, Ростов-на-Дону, 2011).
9. V. V. Zinchuk and S. V. Hlutkin, *Asian J. Pharmacy, Nursing and Med. Sci.*, **3** (2), 55 (2015).
10. V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Törnroth, et al., *Science*, **299**, 700 (2003).
11. K. H. Vanova, M. Kraus, J. Neuzil, and J. Rohlena, *Redox Rep.*, **25** (1), 26 (2020).
12. В. В. Афанасьев, Е. Р. Баранцевич и Т. П. Вишневецкая, *Азбука нейроцитопroteкции* (Изд. дом «СТЕЛЛА», С-Пб., 2016).
13. Р. А. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова и В. Р. Абдуллаев, *Бюл. эксперим. биологии и медицины*, **169** (1), 33 (2020).
14. Р. А. Халилов, А. М. Джафарова, С. И. Хизриева и В. Р. Абдуллаев, *Цитология*, **91** (7), 536 (2019).
15. D. H. Lowry, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
16. М. И. Прохорова, *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)* (Изд-во ЛГУ, Л., 1982).
17. М. Т. Д. Маяхи и Н. К. Кличханов, *Изв. Самарского науч. центра РАН*, **14**, 273 (2012).
18. Н. Г. Волжина, *Дис. ... д-ра биол. наук* (Ростовский гос. ун-т, Ростов-на-Дону, 1992).
19. M. E. Nunnally, R. Jaeschke, G. J. Bellingan, et al., *Crit. Care Med.*, **39**, 1113 (2011).
20. D. Danzl, in *Auerbach PS, ed. Wilderness medicine. 6th edn.* (Elsevier, Philadelphia, 2012), pp. 116–142.
21. O. Karcioğlu and N. Koyuncu, *Vasc. Med. Surg.* **6** (1), 1 (2018).
22. N. Alva, T. Carbonell, and J. Palomeque, *J. Thermal Biol.*, **29**, 259 (2004).
23. В. П. Скулачев, А. В. Богачев и Ф. О. Каспаринский, *Мембранная биоэнергетика* (МГУ, М., 2012).
24. P. Hochachka and G. Somero, *Biochemical adaptation* (Oxford University Press, Oxford, 2002).
25. E. L. Mills, K. A. Pierce, M. P. Jedrychowski, et al., *Nature*, **560**, 102 (2018).
26. E. T. Chouchani, V. R. Pell, E. Gaude, et al., *Nature*, **515** (7527), 431 (2014).
27. B. Moosavi, X. Zhu, W.-C. Yang, and G.-F. Yang, *Biol. Chem.*, **401** (3), 319 (2020).
28. M. Erecinska, M. Thoresen, and I. A. Silver, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **23**, 513 (2003).
29. T. Oda, K. Shimizu, A. Yamaguchi, et al., *Cryobiology*, **65**, 104 (2012).
30. G. Cecchini, *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 77 (2003).
31. G. Tong, S. Endersfelder, L. M. Rosenthal, et al., *Brain Res.*, **1504**, 74 (2013).

32. H. K. Hsu, P. L. Shao, K. L. Tsai, et al., *J. Mol. Endocrinol.*, **34** (2), 433 (2005).
33. D. Wang and J. Zhang, *Mol. Med. Rep.*, **11**, 1759 (2015).
34. K. E. Cullen and K. D. Sarge, *J. Biol. Chem.*, **272** (3), 1742 (1997).
35. N. I. Fedotcheva, M. N. Kondrashova, E. G. Litvinova, et al., *Biophysics*, **63**, 743 (2018).
36. M. Salvi, N. A. Morrice, and A. M. Brunati, *FEBS Lett.*, **581**, 5579 (2007).
37. R. Acin-Perez, I. Carrascoso, F. Baixauli, et al., *Cell Metab.* **19**, 1020 (2014).
38. F. Valsecchi, et al., *Physiology (Bethesda)*, **28**, 199 (2013).
39. A. Bezawork-Geleta, J. Rohlena, L. Dong, et al., *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 312 (2017).
40. A. K. Nath, J. H. Ryu, Y. N. Jin, et al., *Cell Rep.*, **10**, 694 (2015).
41. J. Rutter, D. R. Winge, and J. D. Schiffman, *Mitochondrion*, **10** (4), 393 (2010).
42. P. A. Халилов, С. И. Хизриева, А. М. Джафарова и В. Р. Абдулаев, *Биол. мембраны*, **5**, 351 (2021).
43. A. P. Shepelev, *Biofizika*, **23**, 465 (1977).
44. А. М. Каландаров, З. И. Раджабова, С. А. Забелинский и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **54** (2), 81 (2018).
45. З. Г. Раджабова, С. А. Забелинский, М. А. Чеботарева и др., *Биол. мембраны*, **37** (2), 134 (2020).
46. S. Gonzalez, A. M. Nervi, R. O. Peluffo, and R. R. Brenner, *Lipids*, **18**, 7 (1983).
47. J. J. Van den Berg, J. A. Op den Kamp, and B. H. Lubin, *Biochemistry*, **32**, 4962 (1993).
48. Л. С. Ягужинский, Ю. А. Скоробогатова и С. В. Нестеров, *Биофизика*, **62** (3), 518 (2017).
49. J. Rutter, D. R. Winge, and J. D. Schiffman, *Mitochondrion*, **10** (4), 393 (2010).
50. L. D. Lukyanova, E. L. Germanova, Y. I. Kirova, in *The Adaptation Biology and Medicine. Cell Adaptations and Challenges*, Ed. by P. Wang, C. H. Kuo, N. Takeda, and P. K. Singal (New York, 2011), pp. 251–277.
51. D. M. Stroka, T. Burkhardt, and I. Desballerts, *FASEB J.*, **15**, 2445 (2001).
52. A. King, M. A. Selak, and E. Gottlieb, *Oncogene*, **25** (34), 4675 (2006).
53. S. L. Vargas, I. Toma, J. J. Kang, et al., *J. Amer. Soc. Nephrol.*, **20**, 1002 (2009).
54. Э. Ш. Абиева, *Изв. НАН Азербайджана (сер. Биологические и медицинские науки)*, **70**, 55 (2015).
55. Л. Д. Лукьянова, *Фізіол. журн.*, **59** (6), 141 (2013).
56. А. В. Смирнов, О. Б. Нестерова, Р. В. Голубев и др., *Сукцинатсодержащие диализирующие растворы в практике гемодиализа* (Левша, С.-П., 2014).
57. Е. В. Екушева, *Эксперим. клинич. фармакология*, **81** (8), 37 (2018).
58. J. N. Bazil, D. A. Beard, and K. C. Vinnakota, *Biophys. J.*, **110** (4), 962 (2016).

Activity and Catalytic Characteristics of Rat Liver Mitochondrial Succinate Dehydrogenase at Moderate Hypothermia

R.A. Khalilov*, A.M. Dzhafarova*, and V.R. Abdulaev*

*Dagestan State University, ul. Gadjeva 43a, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367000 Russia

Previously, it was shown in our study that short-term moderate hypothermia (30°C) contributes to a significant increase in the intensity of free-radical processes and a change in a number of bioenergetics parameters of mitochondria, and its prolongation for 3 hours leads to their normalization. The detected changes may be associated with modulation of the activity and catalytic properties of succinate dehydrogenase. This study shows that moderate hypothermia, and especially prolonged exposure to a colder environment for 3 hours, significantly increases the rate of succinate dehydrogenase catalysis and affects the nature of its concentration and temperature dependences. Modulation of succinate dehydrogenase activity in the dynamics of hypothermia occurs due to changes in its kinetic and thermodynamic parameters, of which the maximum rate (V_{\max}) makes the most significant contribution to the efficiency of enzyme catalysis. These changes may play an important role in maintaining the energy-synthesizing function of mitochondria and reducing the intensity of free-radical processes in them.

Keywords: hypothermia, rats, mitochondria, succinate dehydrogenase, kinetic characteristics