

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

**Мерлавський Володимир Михайлович**

УДК: 612.34:57.017.722:57.053.2:57.037

**Ca<sup>2+</sup>-РЕГУЛЯЦІЯ ДИХАННЯ ГЕПАТОЦИТІВ  
ЗА РІЗНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СТАНІВ ОРГАНІЗМУ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Львів – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фізіології людини і тварин  
Львівського національного університету імені Івана Франка.

**Науковий керівник:**

доктор біологічних наук, професор  
**Манько Володимир Васильович,**  
Львівський національний університет імені Івана Франка,  
завідувач кафедри фізіології людини і тварин.

**Офіційні опоненти:**

доктор медичних наук, професор, член-кореспондент НАН України  
**Сагач Вадим Федорович,**  
Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України,  
завідувач відділу фізіології кровообігу.

доктор біологічних наук, професор  
**Янчук Петро Іванович,**  
ННЦ «Інститут біології»,  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
професор кафедри фізіології людини і тварин.

Захист відбудеться " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2016 року о \_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2016 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14  
кандидат біологічних наук, доцент

\_\_\_\_\_ О. В. Іккерт

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Дослідження взаємозв'язків між процесами клітинного сигналювання та метаболічними шляхами є актуальною проблемою сучасної фізіології. Процеси енергозабезпечення клітини відіграють винятково важливу роль у життєдіяльності організму, й іони  $\text{Ca}^{2+}$  здійснюють на них вагомий вплив [Brookes et al., 2004]. Так, відомо про існування взаємодій між  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізацією та мітохондріальним окисненням у ацинарних клітинах привушних залоз [Bruce et al., 2004], клітинах гладеньких м'язів [Chalmers, McCarron, 2008], секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця [Великопольська та ін., 2012], ацинарних клітинах підшлункової залози [Voronina et al., 2010; Manko B.O., Manko V.V., 2013] і, особливо важливо, у гепатоцитах [Robb-Gaspers et al., 2008; Garcin, Tordjmann, 2012]. Адже порушення взаємовпливів між цими процесами у клітинах печінки пов'язано з розвитком деяких патологічних станів організму, зокрема, ожиріння чи цукрового діабету [Arruda, Notamisligil, 2015]. Але досі не досліджено  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляції дихання мітохондрій *in situ* у гепатоцитах за умов збереження їхніх морфо-функціональних зв'язків з іншими органелами. Це є дуже важливим з огляду на тісний контакт мітохондрій *in vivo* з ендоплазматичним ретикуломом та комплексом Гольджі [Dolman et al., 2005; Rizutto et al., 2006; Манько, 2011], а також на те, що окисне фосфорилування регулюється сусідніми органелами зміною споживання АТФ та концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі [Rizutto et al., 2006].

Однією з фізіологічно активних речовин, які впливають на дихання змінюючи  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізацію є таурин. Він належить до найбільш поширених аміносульфонових кислот у ссавців і задіяний у підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу та функціонування мітохондрій [Jacobsen, Smith, 1968]. Лобо зі співавт. [Lobo et al., 2000] виявили, що найвища концентрація таурину є якраз у мітохондріях. Таурин вже за 1 ммоль/л спричиняє зростання рівня поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями гепатоцитів [Palmi et al., 1999]. Однак, особливості окиснення різних субстратів у мітохондріях пермеабілізованих клітин під впливом таурину та за різних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  є недослідженими.

Процеси енергозабезпечення також перебувають під чітким контролем нейрогуморальної регуляції. Чільне місце у метаболізмі вуглеводів належить інсуліну [Wiederkehr, Wollheim, 2006; Liu et al., 2009; Rui, 2014]. Він забезпечує регуляцію транспортування глюкози через плазматичну мембрану багатьох клітин, але не гепатоцитів. Тим не менше, інсулін збільшує активність піруватдегідрогенази клітин печінки щурів [Huang et al., 2005], підвищує максимальну здатність мітохондрій скелетних м'язів синтезувати АТФ [Stump et al., 2003]. Але немає відомостей щодо впливу інсуліну на окисні процеси у мітохондріях *in situ* ізольованих клітин печінки. Дані ж щодо змін процесів енергетичного забезпечення у мітохондріях за умов цукрового діабету є суперечливими [Ferreira et al., 1999; Oliveira et al., 2003; Satav, Katyare, 2004; Zavodnik et al., 2011]. Так, у деяких роботах показано зниження споживання кисню мітохондріями серця, печінки діабетичних щурів [Oliveira et al., 2003; Satav, Katyare, 2004]. І навпаки, Сінг і співавт. [Singh et al., 2015] зареєстрували інтенсифікацію дихання клітин нирок, а Гартман і співавт. [Hartman et al., 2014] – мононуклеарних клітин периферійної крові. Проте досі не було досліджено впливу  $\text{Ca}^{2+}$  на перебіг процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого діабету.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана на кафедрі фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у рамках науково-дослідних тем: “Роль фізіологічно активних пептидів у функціонуванні секреторних клітин травних залоз” (2008–2009 рр., № держреєстрації 0108U000747), “Розробка тест-системи для з'ясування взаємозалежності функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем і мітохондріального дихання *in situ*” (2010–2011 рр., № держреєстрації 0110U001356), “Вплив таурину на функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем і мітохондріальне дихання секреторних клітин” (2012–2013 рр., № держреєстрації 0112U001264) та за часткової підтримки Західно-Українського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – дослідити залежність дихання мітохондрій *in situ* гепатоцитів від  $\text{Ca}^{2+}$  за різних функціональних станів організму.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі **завдання**:

1. З'ясувати оптимальні умови дослідження дихання мітохондрій *in situ* гепатоцитів щурів.
2. Дослідити залежність інтенсивності дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі.
3. Проаналізувати кінетику процесів дихання клітин печінки у середовищах з різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  за тривалої дії таурину *in vivo*.
4. З'ясувати особливості дихання гепатоцитів за умов коротко- та довготривалої гіперінсулінемії.
5. Дослідити залежність процесів дихання клітин печінки від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі за умов стрептозотоциніндукованого діабету.

**Об'єкт досліджень:** процеси енергозабезпечення клітин печінки.

**Предмет досліджень:** мітохондріальне дихання гепатоцитів та його  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляція.

**Методи дослідження.** *Фізіологічні* – дослідження інтенсивності дихання ізольованих гепатоцитів та мітохондрій *in situ*, моделювання гіперінсулемії, цукрового діабету та станів після тривалого введення таурину *in vivo*; *препаративні* – отримання ізольованих гепатоцитів та пермеабілізація їхньої плазматичної мембрани; *фізико-хімічні* – полярографічне визначення змін напруження кисню у суспензії клітин, дослідження флуоресценції трипанового синього та родаміну 123; *біохімічні* – визначення активності сукцинатдегідрогенази, каталази, супероксиддисмутази, вмісту ТБК-активних продуктів; *кінетичні* – розрахунок параметрів рівняння Хілла із застосуванням модифікованих координат Іді-Гофсті; *статистичні* – описова статистика, лінійна регресія; t-тест Стьюдента, F-тест Фішера.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше встановлено, що для ефективної пермеабілізації плазматичної мембрани необхідно враховувати співвідношення між кількостями детергента і клітин, а не його концентрацію; оптимальне співвідношення між кількістю дигітоніну та кількістю гепатоцитів у суспензії для дослідження дихання мітохондрій *in situ* становить 20–22 мкг на 1 млн клітин. Уперше показано, що за окиснення як сукцинату, так і суміші малату, глутамату і пірувату найсуттєвіші зміни окисних процесів відбуваються внаслідок збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]$  у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л. Уперше встановлено, що залежність швидкості

дихання мітохондрій *in situ* гепатоцитів від концентрації як сукцинату, так і пірувату на фоні малату описується рівнянням Хілла. З'ясовано, що кінетичні параметри окиснення сукцинату на тлі ротенону не відрізняються за 0,1 і 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Виявлено, що за окиснення пірувату на тлі малату у пермеабілізованих гепатоцитах з підвищенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  показники  $V_{max}$  суттєво зростають, а  $K_{0,5}$  значно знижуються. Показано, що за високих концентрацій і сукцинату, і пірувату за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  розвивається субстратне інгібування окисних процесів мітохондрій *in situ* клітин печінки. Уперше виявлено, що таурин *in vivo* практично не змінює сукцинатстимульованого ротеноннечутливого дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані  $S_3$ , але частково нівелює відмінності у кінетиці за окиснення пірувату на тлі малату за різних  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Встановлено, що субстратне інгібування, яке притаманне залежності швидкості дихання від концентрації пірувату за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, внаслідок тривалої дії таурину розвивається за вищої, ніж у контролі, концентрації субстрату. Уперше показано, що лише після одноразового введення інсуліну *in vivo* швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані  $S_3$  за окиснення сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату збільшується, а за короткочасної дії цього гормону *in vitro*, чи після 6- і 12-денного введення *in vivo* – залишається незмінною. Уперше виявлено, що на ранніх етапах розвитку цукрового діабету знижується чутливість процесів дихання клітин печінки до токсичного рівня  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Практичне значення отриманих результатів.** Одержані результати поглиблюють знання про закономірності енергетичних процесів у клітинах печінки та вплив на них  $\text{Ca}^{2+}$ . За результатами дослідження оформлено Патент України на корисну модель “Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ*”. Отримані дані можуть бути корисними для подальшого пошуку вирішення проблем терапії таких станів, як гіперінсулінемія і цукровий діабет I типу.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес і використовуються у Львівському національному університеті імені Івана Франка при викладі матеріалу загального курсу “Фізіологія людини і тварин” та спецкурсів “Фізіологія травлення”, “Біоенергетика”, “Ендокринологія”. Методичні й експериментальні розробки використовують студенти під час виконання курсових і дипломних робіт. Вони можуть бути застосовані для підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у вищих навчальних закладах України.

**Особистий внесок здобувача** полягає у виконанні всього обсягу експериментальної частини дисертації, статистичному опрацюванні результатів, пошуку й аналізуванні даних літератури, а також за участю наукового керівника і співавторів публікацій плануванні наукової роботи, інтерпретуванні отриманих результатів.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені на V, VI і X Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2009; 2010; 2014), XVIII з’їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Одеса, 2010), XIX з’їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Львів, 2014), Міжнародній конференції “Механізми функціонування фізіологічних систем” (Львів, 2014), III Міжнародному симпозіумі: “Внутрішньоклітинна сигналізація та дизайн біоактивних молекул” (Львів, 2012), а також на наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин біологічного факультету, щорічних звітних наукових конфе-

ренціях працівників біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах, 1 патент на корисну модель і 7 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

**Структура дисертації.** Дисертація складається з розділів “Вступ”, “Огляд літератури”, “Матеріали та методи досліджень”, “Результати досліджень та їх обговорення”, “Узагальнення”, “Висновки” та “Список використаних джерел”. Робота викладена на 142 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 53 рисунками. Список цитованих джерел містить 224 найменувань.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи досліджень.** Досліди виконували використовуючи нелінійних статевозрілих щурів-самців (масою 180–250 г або 280–360 г) та лінії Wistar (180–210 г). Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Декапітацію здійснювали у лабораторії, ізольовано від інших щурів. Тварин наркотизували діетиловим ефіром чи хлороформом, після чого декапітували, розтинали черевну порожнину і виділяли печінку. Усі маніпуляції зі щурами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження”.

*Моделювання тривалого впливу таурину.* Для дослідження впливу таурину на процеси дихання гепатоцитів за тривалої його дії дослідним тваринам впродовж 28-ми діб щоденно внутрішньошлунково через зонд вводили водний розчин таурину (40 мг/кг маси), а контрольним – воду.

*Моделювання гіперінсулінемії.* З метою дослідження процесів дихання гепатоцитів за умов гіперінсулінемії тваринам дослідної групи одноразово або впродовж шести чи дванадцяти діб щоденно в той самий час внутрішньочеревно вводили інсулін МОНОДАР-Б (0,5 од. на 100 г маси тварини). Контрольним щурам внутрішньочеревно вводили 0,9 % водний розчин NaCl (125 мкл). У експериментах *in vitro* ізольовані гепатоцити інкубували протягом 15 хв у базовому середовищі, яке містило інсулін МОНОДАР-Б у концентрації (20 нмоль/л). Тест толерантності до глюкози виконували, вводячи внутрішньочеревно глюкозу (3 мг/г маси тіла), розчинену у 2 мл 0,9 % розчину NaCl. Перед тестом тварин не годували протягом 12 год. Тест розпочинали в один і той самий час доби (о 8 год ранку). Концентрацію глюкози у крові вимірювали за допомогою глюкометра *One Touch Ultra Easy* до та через 30, 60, 90 і 120 хв після початку тесту.

*Моделювання стрептозотоциніндукованого цукрового діабету.* У серії експериментів на діабетичних щурах тварин було поділено на контрольну та дослідну групи. Щурам дослідної групи внутрішньочеревно вводили стрептозоточин (50 мг/кг; 1 мл), а тваринам контрольної групи – фізіологічний розчин (1 мл). Розвиток цукрового діабету контролювали за вмістом глюкози у крові, який визначали глюкозооксидазним методом на 3-тю та 14-ту добу після введення стрептозоточину. Для подальших досліджень використовували тварин, рівень глюкози у крові яких становив не менше 14 ммоль/л.

*Методика ізолювання гепатоцитів.* Гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена [Seglen, 1976]. Усі процедури проводили при 37 °С. Гепатоцити фарбували 0,1 % розчином трипанового синього, після чого досліджували застосовуючи світлову або флуоресцентну мікроскопію (Nikon Optiphot-2) за довжини хвилі емісії > 600 нм і довжини хвилі збудження < 560 нм. Кількість клітин з цілісними плазматичними мембранами становила 80–90 %. Підрахунок гепатоцитів здійснювали за допомогою камери Горяєва. Вивчали флуоресценцію потенціалчутливого барвника родаміну 123 (1 нмоль/л, 10 хв преінкубації) у діапазоні хвилі випромінювання > 560 нм при збудженні світлом з довжиною хвилі 485 нм.

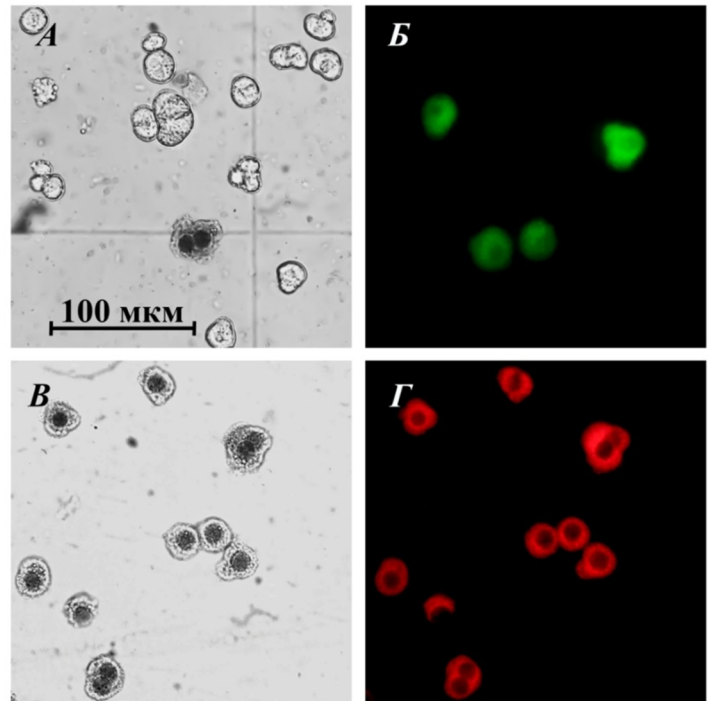


Рис. 1. Зображення ізолюваних гепатоцитів: А – інтактні клітини у видимому світлі, фарбовані трипановим синім; Б – флуоресценція пермеабілізованих гепатоцитів, оброблених родаміном 123; В і Г – пермеабілізовані клітини у видимому та ультрафіолетовому світлі, забарвлені трипановим синім

*Полярографічне вимірювання швидкості дихання біологічних суспензій.* Метод базується на реєстрації електрохімічного відновлення фізично розчиненого кисню на катоді при накладанні потенціалу 0,6–0,7 В. Величину дифузного струму реєстрували за допомогою полярографічної установки, зібраної на базі закритого електрода Кларка, кисневого монітора YSI5300, самописця КСП-4 або мультиметра УТ-60Е, магнітної мішалки та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл. За допомогою полярографічного методу реєстрували дихання цілісних і пермеабілізованих гепатоцитів.

*Методика дослідження дихання ізолюваних інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів.* Спочатку реєстрували дихання інтактних гепатоцитів. Потім здійснювали їх пермеабілізацію дигітоніном у внутрішньоклітинному розчині впродовж 10 хв за температури 37 °С. Споживання кисню пермеабілізованими клітинами реєстрували за окиснення сукцинату (0,35 або 5 ммоль/л), α-кетоглутарату (0,35 або 1 ммоль/л), суміші малату, глутамату і пірувату (по 5 ммоль/л) за 37 °С. Дихання стимулювали додаванням АДФ (750 мкмоль/л), потім вносили ДНФ (0,1 ммоль/л).

Досліджуючи кінетичні параметри процесів дихання пермеабілізованих клітин печінки піруват чи сукцинат додавали до суспензії гепатоцитів, яка вже містила АДФ, у наростаючих концентраціях – від 0,01 до 5 ммоль/л. Окиснення пірувату досліджували на тлі малату (1 ммоль/л). Сукцинат додавали у полярографічну комірку або на тлі ротенону (10 мкмоль/л), або без нього.

*Методи визначення активності ензимів.* Для більш повного аналізу оксигензалежних процесів у гепатоцитах щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом ви-

значали показники активності ензимів системи антиоксидантного захисту: супер-оксиддисмутази – за методом [Костюк и др., 1999], каталази – методом [Королук и др., 1998]. Вміст ТБК-реактивних продуктів визначали методом [Гаврилов и др., 1987]. Також вимірювали активність сукцинатдегідрогенази – за методом [Ещенко, Вольский, 1982]. Проводили визначення кількості білка за методом [Lowry et al., 1951].

*Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження.* Статистичні підрахунки проводили з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*. Визначали середнє арифметичне (M), середньоквадратичне відхилення ( $\sigma$ ), стандартну похибку (m), коефіцієнт варіації ( $C_V$ ), коефіцієнт достовірності різниці між двома статистичними групами за Стьюдентом (P), % змін [Деркач та ін., 1977].

Кінетичні параметри рівняння Хілла обчислювали, лінеаризуючи залежність швидкості дихання від концентрації субстрату у модифікованих координатах Іді-Гофсті  $\{v; v/[S]^h\}$  методом ітерації показника  $h$ , так щоб коефіцієнт апроксимації  $R^2$  був максимально наближеним до 1 [Манько, 2007]. Вірогідність апроксимації визначали із застосуванням F-статистики. Апроксимацію вважали вірогідною за значення  $P < 0,05$ .

## Результати досліджень та їх обговорення

**1. Дослідження дихання мітохондрій *in situ* пермеабілізованих гепатоцитів.** Експерименти з використанням ізольованих мітохондрій не можуть повною мірою відобразити особливостей їх функціонування *in vivo* (через втрату морфофункціональних зв'язків мітохондрій з іншими органелами). Тому нами адаптовано полярографічну реєстрацію споживання кисню для дослідження дихання пермеабілізованих клітин (або мітохондрій *in situ*). Для встановлення залежності ступеня пермеабілізації від співвідношення між концентрацією детергента і кількістю гепатоцитів у суспензії дигітонін використовували у кінцевих концентраціях 10, 25, 50 і 100 мкг/мл, додаючи його до суспензій з різною кількістю клітин. У дослідній групі I було від 0,9 до 1,7 млн клітин/мл суспензії (в середньому  $1,27 \pm 0,09$  млн/мл), у дослідній групі II – 2,0–3,0 млн клітин/мл ( $2,45 \pm 0,11$  млн/мл), а у дослідній групі III – 4,0–5,6 млн клітин/мл ( $4,67 \pm 0,46$  млн/мл).

Серед ізольованих інтактних гепатоцитів  $21,67 \pm 2,94$  % клітин зафарбовувались трипановим синім (рис. 1 А). У дослідній групі I повна пермеабілізація плазматичної мембрани спостерігалась вже за концентрації дигітоніну 25 мкг/мл (рис. 1 В і Г), у дослідній групі II – за 50 мкг/мл, а в дослідній групі III – лише за концентрації 100 мкг/мл. Обробка дигітоніном призводила до зниження швидкості споживання кисню гепатоцитами за окиснення ендогенних субстратів. У дослідній групі I швидкість ендогенного дихання досягала мінімуму за концентрації дигітоніну 25 мкг/мл, у дослідній групі II – за концентрації 50 мкг/мл, а у дослідній групі III – лише за концентрації 100 мкг/мл. Ці дані повністю узгоджуються із результатами тесту з трипановим синім. Додавання у полярографічну комірку з інтактними гепатоцитами  $\alpha$ -кетоглутарату чи сукцинату практично не впливало на швидкість споживання кисню (рис. 2 А), на відміну від пермеабілізованих клітин (рис. 2 Б). Внесення  $\alpha$ -кетоглутарату за наявності АДФ відновлювало окисні процеси пермеабілізованих гепатоцитів. Це доводить, що дигітонін не порушує функціонування НАД-залежних



компонентів дихального ланцюга мітохондрій. Залежність швидкості АДФ-стимульованого дихання за окиснення сукцината від концентрації дигітоніну та кількості клітин добре корелює з результатами тесту з трипановим синім: інтенсивність споживання кисню у дослідній групі I досягла максимуму за використання дигітоніну у кінцевій концентрації 25 мкг/мл, у дослідній групі II – за 50 мкг/мл, а у дослідній групі III – за 100 мкг/мл. Визначальним у ході дослідження дихання мітохондрій *in situ* є співвідношення між кількостями дигітоніну і клітин у суспензії. Це наглядно ілюструють залежності частки трипанопозитивних клітин (рис. 2 B) та швидкості стимульованого субстратами дихання (рис. 2 Г) від кількості дигітоніну у розрахунку на 1 млн клітин, побудовані для аналізу вищенаведених даних для груп I–III. У всіх випадках зміни досягають свого максимального значення за 20–22 мкг дигітоніну на 1 млн клітин. Тобто воно є оптимальним для реєстрації дихання мітохондрій *in situ* печінки щурів. І, нарешті, за цього співвідношення мітохондрії зберігають протонний градієнт (рис. 1 Б), що теж свідчить про їхню інтактність.

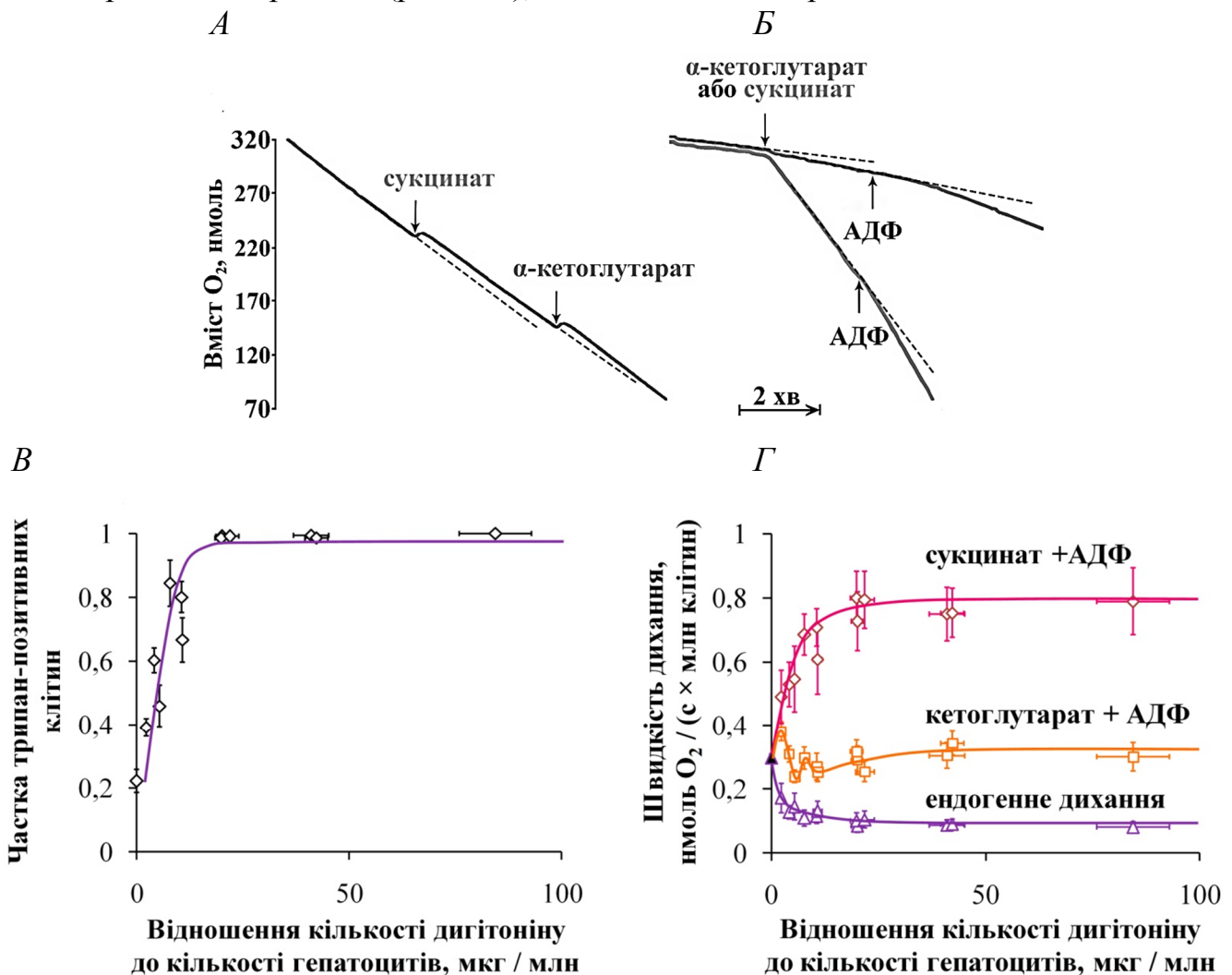


Рис. 2. Запис дихання інтактних (А) і пермеабілізованих (Б) клітин печінки за окиснення сукцината (нижня лінія) чи  $\alpha$ -кетоглутарату (верхня лінія) та ступінь пермеабілізації плазматичної мембрани гепатоцитів (В) і швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів (Г) за різного співвідношення кількості дигітоніну і клітин

У організмі глюкоза, яка надходить із кров'ю, є основним джерелом енергії для гепатоцитів. Однак інкубація інтактних клітин у розчині без глюкози не зумов-

лювала статистично вірогідних змін їхнього ендogenousного дихання щодо контролю. А от рівень ендogenousного дихання пермеабілізованих клітин за умов їхньої інкубації у середовищі без глюкози, статистично вірогідно підвищувався на 31,2 % щодо контролю ( $P < 0,05$ ,  $n=3$ ). Унаслідок додавання  $\alpha$ -кетоглутарату або сукцинату як без, так і за наявності екзогенного АДФ, дихання пермеабілізованих гепатоцитів, попередньо проінкубованих без глюкози, статистично вірогідно не змінювалося порівняно з контролем. У наступних дослідженнях ми додавали глюкозу до базового позаклітинного середовища.

Отже, густина суспензії гепатоцитів суттєво впливає на ступінь пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном: чим більша кількість клітин, тим більшу концентрацію детергента необхідно застосувати. Додавання глюкози до середовища інкубації пермеабілізованих гепатоцитів сприяє збереженню окисної здатності їхніх мітохондрій.

**2. Залежність інтенсивності дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі.**  $\text{Ca}^{2+}$  здійснює вагомий вплив на рівень енергозабезпечення клітини [Brookes et al., 2004]. З метою з'ясування залежності процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів від рівня  $\text{Ca}^{2+}$  спершу ми дослідили споживання кисню клітинами печінки у номінально безкальцієвому та середовищі з ЕГТА. Стимуляція дихання як сукцинатом, так і сумішшю пірувату, малату і глутамату була більш вираженою у номінально безкальцієвому середовищі. Однак показники дихального контролю за Ларді [Lardy, 1955] в обох випадках були вищими у середовищі, яке містило ЕГТА на 78,8 % ( $P < 0,01$ ,  $n=5$ ) та 50,0 % ( $P < 0,05$ ,  $n=5$ ) відповідно. Виявивши цю різницю, ми досліджували споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за чітко детермінованих  $[\text{Ca}^{2+}]$  у середовищі: 0,01, 0,1, 1 і 10 мкмоль/л.

За окиснення сукцинату швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів виявилася найвищою за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 3 А), тоді як наступні послідовні додавання АДФ і ДНФ істотно стимулювали дихання клітин печінки лише за нижчих  $[\text{Ca}^{2+}]$  (0,01 і 0,1 мкмоль/л). За додавання суміші малату, глутамату і пірувату (без АДФ, стан  $S_4$ ) спостерігали інтенсифікацію споживання кисню пермеабілізованими клітинами печінки за всіх  $[\text{Ca}^{2+}]$  до практично одного і того ж рівня (рис. 3 Б). Тоді як внесення на цьому тлі АДФ (стан  $S_3$ ) збільшувало швидкість дихання лише за 0,01 і 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. ДНФ за всіх  $[\text{Ca}^{2+}]$  не мав вираженого ефекту на інтенсивність споживання кисню гепатоцитами, якщо використовували суміш малату, глутамату і пірувату.

Кінетичний аналіз залежності дихання мітохондрій *in situ* гепатоцитів від концентрації субстратів проведено за 0,1 і 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , оскільки саме ці значення відповідають  $[\text{Ca}^{2+}]$  цитозольного у стані спокою та за умов генерації  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів відповідно [Thorn et al., 1993; Straub et al., 2000; Cancela et al., 2002]. Виявлено, що за окиснення сукцинату кінетика процесів дихання гепатоцитів за обох  $[\text{Ca}^{2+}]$  добре описується рівнянням Хілла. За вищої  $[\text{Ca}^{2+}]$  коефіцієнт Хілла  $h$  був дещо більшим, порівняно з 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Близькість коефіцієнта  $h$  до 1 за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі свідчить про відсутність вираженої кооперативності за таких умов. За низької ж  $[\text{Ca}^{2+}]$  коефіцієнт  $h$  був суттєво меншим 1 – внаслідок наявності негативної кооперативності, спричиненої підтоком, мабуть, ендogenousних субстратів.

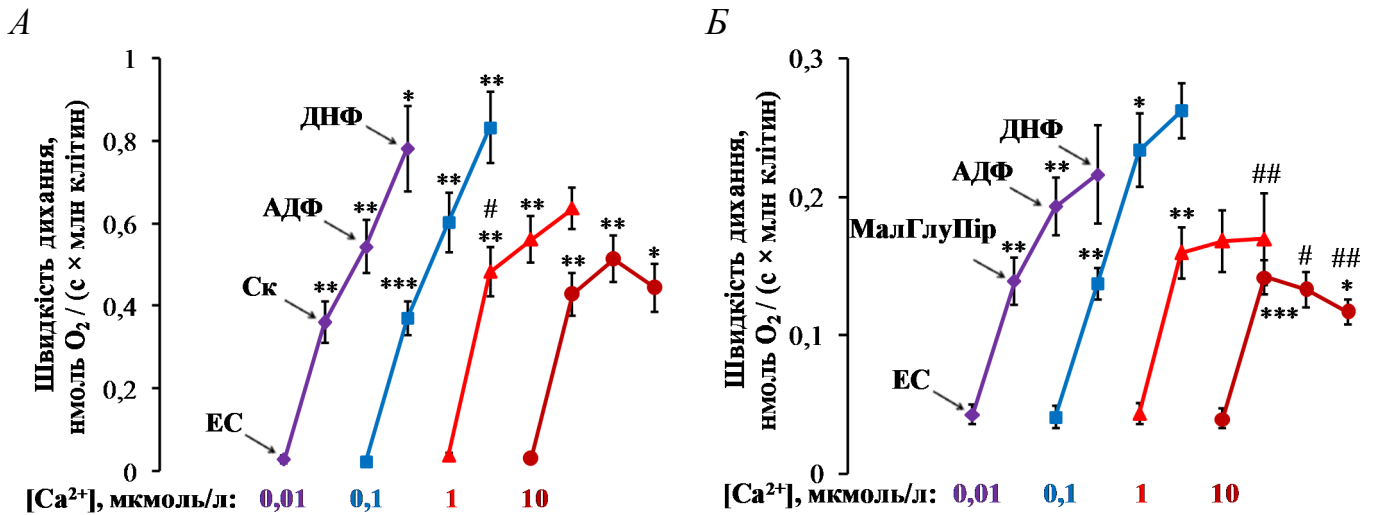


Рис. 3. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату (А) і суміші малату, глутамату і пірувату (Б) у середовищах з різними концентраціями  $Ca^{2+}$ : ЕС – ендогенні субстрати, Ск – сукцинат, МалГлуПір – суміш малату, глутамату і пірувату, ДНФ – динітрофенол; \* – зміни достовірні відносно попереднього показника з  $P < 0,05$ , \*\* – з  $P < 0,01$ , \*\*\* – з  $P < 0,001$ , # – зміни достовірні порівняно з відповідним показником за 0,1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  з  $P < 0,05$ , ## – з  $P < 0,01$

З метою визначення кінетичних параметрів окиснення лише сукцинату, без впливу НАД-залежних субстратів, ми використали ротенон. За цих умов спостерігалось нівелювання різниці між значеннями коефіцієнта Хілла за різних  $[Ca^{2+}]$ , причому  $h$  ставав дещо меншим від 1 в обох випадках (рис. 4 А).

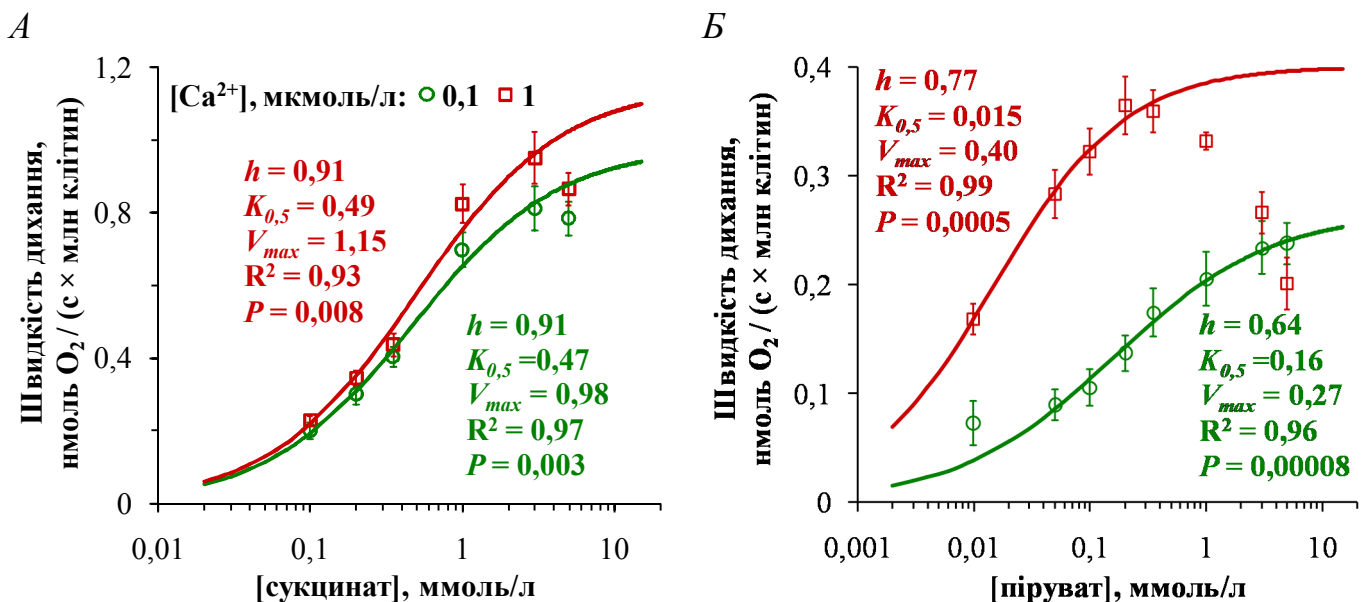


Рис. 4. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки від концентрації сукцинату за наявності ротенону (А) чи пірувату на фоні малату (Б) у середовищах з  $[Ca^{2+}]$  0,1 і 1 мкмоль/л: під час розрахунку параметрів рівняння Хілла точками, які свідчать про розвиток субстратного інгібування, було знехтувано

Константа напівактивації  $K_{0,5}$  дещо зменшувалась зі збільшенням  $[Ca^{2+}]$  лише без дії ротенону.  $V_{max}$  дихання за окиснення сукцинату в обох випадках (з ротеноном чи без нього) була дещо більшою за вищої  $[Ca^{2+}]$  у середовищі. Була виявлена знач-

на різниця між кінетичними параметрами окиснення пірувату на тлі малату за різних  $[Ca^{2+}]$  (рис. 4 Б). Так,  $K_{0,5}$  становила  $0,16 \pm 0,01$  ммоль/л за  $0,1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$  і  $0,015 \pm 0,001$  ммоль/л – за  $1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$ , тобто відрізнялась у  $10,7$  разів.  $V_{max}$  була в  $1,5$  разів більшою за вищої  $[Ca^{2+}]$  порівняно з концентрацією  $Ca^{2+}$   $0,1$  мкмоль/л ( $0,4 \pm 0,008$  і  $0,27 \pm 0,01$  ммоль  $O_2/(с \times \text{млн клітин})$  відповідно,  $n=4$ ). Це свідчить про більшу спорідненість системи до пірувату й інтенсивніше його окиснення у пермеабілізованих гепатоцитах за вищої  $[Ca^{2+}]$ .

Виявлено також, що зростання інтенсивності споживання кисню клітинами печінки за  $1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$  відбувалося за внесення пірувату лише у межах від  $0,01$  до  $0,2$  ммоль/л. Швидкості дихання зменшувались за подальшого зростання концентрації субстрату ( $0,35$ – $5$  ммоль/л), тобто розвивалось субстратне інгібування.

Отже, з підвищенням  $[Ca^{2+}]$  у середовищі зростає інтенсивність окиснення субстратів лише НАД-залежного шляху (суміші малату, глутамату і пірувату чи пірувату на тлі малату), тоді як швидкість ротеноннечутливого сукцинатстимульованого дихання пермеабілізованих клітин печінки не зазнає суттєвих змін. Концентрація  $Ca^{2+}$   $10$  мкмоль/л є токсичною для мітохондрій гепатоцитів.

**3. Вплив  $Ca^{2+}$  на кінетичні параметри окиснення субстратів циклу Кребса мітохондріями *in situ* гепатоцитів за тривалої дії таурину.** Таурин здатний впливати на накопичення  $Ca^{2+}$  у матриксі мітохондрій [Palmi et al., 1999] і бере участь у регулюванні їхнього функціонування [Jacobsen, Smith, 1968]. Нами показано, що тривале введення таурину щурам не змінювало інтенсивності ендogenous дихання пермеабілізованих гепатоцитів. Швидкість споживання кисню клітинами печінки за окиснення ендogenous субстратів зменшувалась внаслідок додавання до полярографічної комірки ротенону, як за  $0,1$ , так і  $1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$  – на  $47 \pm 8$  % ( $P < 0,05$ ,  $n=4$ ) і  $26 \pm 7$  % ( $n=4$ ,  $P < 0,01$ ) відповідно. Ефект таурину нівелювався за вищої  $[Ca^{2+}]$ .

За наявності ротенону  $V_{max}$  сукцинатстимульованого дихання за дії таурину зростала, як і у контрольних тварин, зі збільшенням  $[Ca^{2+}]$  (від  $0,83 \pm 0,03$  за  $0,1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$  до  $0,91 \pm 0,06$  ммоль/л  $O_2/(с \times \text{млн клітин})$  за  $1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$ ). Однак  $K_{0,5}$  за таких умов, навпаки – незначно зменшувалась (з  $0,52$  до  $0,41$  ммоль/л), на відміну від контролю. У той же час коефіцієнт Хілла  $h$  залишався незмінним, як і у контрольних щурів.  $V_{max}$  після тривалого введення таурину були нижчими, ніж у контролі за обох  $[Ca^{2+}]$ . У тварин, які отримували таурин, розвиток субстратного інгібування спостерігався також за найвищої концентрації сукцинату ( $5$  ммоль/л, рис. 5 А). Отже, суттєвих змін кінетики дихання гепатоцитів за окиснення сукцинату після тривалого введення таурину не було зареєстровано, так само, як і залежності цієї кінетики від  $[Ca^{2+}]$ .

$V_{max}$  піруватстимульованого дихання у щурів, яким вводили таурин, зростала у  $1,6$  разів зі збільшенням  $[Ca^{2+}]$  у середовищі від  $0,1$  до  $1$  мкмоль/л (рис. 5 Б) – практично так, як і у контрольних тварин.  $K_{0,5}$ , навпаки, зменшувалась у  $6$  разів – значно менше, ніж у контролі – завдяки її зменшенню під впливом таурину вже за  $0,1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$  у середовищі. Уявний коефіцієнт Хілла був значно вищим за  $0,1$  мкмоль/л  $Ca^{2+}$  у дослідних щурів, порівняно із контрольними і становив  $1,12$ . Тобто негативна кооперативність, властива залежності швидкості дихання від концентрації пірувату в контролі, зникла або навіть була замінена позитивною за тривалої дії таурину. Крім того, за тривалої дії таурину субстратне інгібування, притаманне за-

лежності швидкості дихання від концентрації пірувату за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, починало розвиватись за на порядок вищої концентрації цього субстрату, ніж у контролі (3 ммоль/л порівняно з 0,35 ммоль/л). Таке усунення субстратного інгібування під впливом таурину є доказом активізації окиснення пірувату.

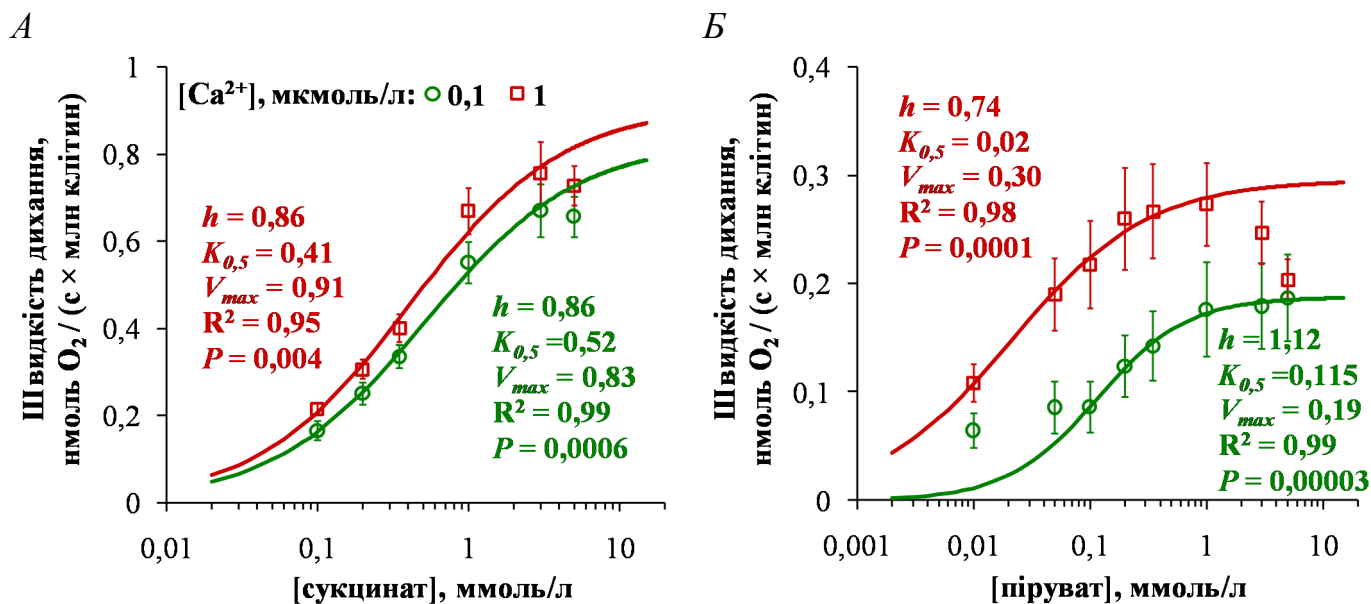


Рис. 5. Вплив тривалого введення тваринам таурину на кінетичну залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки від концентрації сукцинату (за наявності ротенону; А) чи пірувату (на фоні малату; Б) у середовищах з  $[\text{Ca}^{2+}]$  0,1 і 1 мкмоль/л: при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості споживання кисню від концентрації сукцинату чи пірувату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [ротенон]=10 мкмоль/л, [сукцинат]=0,1–5 ммоль/л, [малат]=1 ммоль/л, [піруват]=0,01–5 ммоль/л

Отже, тривале введення щурам таурину спричиняє інтенсифікацію піруват-стимульованого (на фоні малату) дихання, але не сукцинатстимульованого на тлі ротенону.

**4. Процеси дихання пермеабілізованих гепатоцитів за умов експериментальної гіперінсулінемії різної тривалості.** Інсулін відіграє провідну роль у регуляції обміну вуглеводів організму [Stanley et al., 1997; Holloszy et al., 1998; Foufelle, Ferré, 2002]. Нами виявлено, що додавання інсуліну у концентрації 20 нмоль/л до суспензії інтактних гепатоцитів не змінює швидкості споживання кисню ними. Після пермеабілізації клітин печінки, преінкубованих з інсуліном, інтенсивність дихання також не змінювалася як за окиснення ендогенних субстратів, так і екзогенних сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату, незалежно від наявності екзогенного АДФ. Отже, за короткочасної дії інсуліну *in vitro* дихання гепатоцитів не зазнає жодних змін.

Одноразове введення тваринам інсуліну (0,5 од./100 г маси) не впливало на споживання кисню інтактними та пермеабілізованими гепатоцитами за окиснення ендогенних субстратів. Проте виявлено статистично вірогідне інсулінспричинене зростання швидкості дихання пермеабілізованих клітин за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату на 48,5 % щодо контролю ( $P < 0,05$ ,  $n = 3$ ). При додаванні АДФ швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів у досліді була статистично вірогідно вищою на 109,0 %, ніж у контролі ( $P < 0,05$ ). За окиснення сукцинату швидкість спо-

живання кисню у досліді не відрізнялася від контролю, а після внесення екзогенного АДФ – була більшою на 94,0 % ( $P < 0,05$ ).

Виявивши, що інсулін стимулює процеси окиснення екзогенних субстратів за чотиригодинного впливу *in vivo*, вирішено дослідити процеси дихання клітин печінки за тривалішої дії цього гормону. У щурів, яким хронічно вводили інсулін 6 діб, швидкість дихання інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів не змінювалась, порівняно з контрольними, за окиснення як ендогенних, так і екзогенних субстратів, незалежно від екзогенного АДФ. Отже, збільшення тривалості дії інсуліну з 4 год до 6 діб повністю нівелювало його вплив на окисні процеси у клітинах печінки. Можливим поясненням цього є виникнення резистентності до інсуліну у щурів через тривалу гіперінсулінемію. Застосування тесту толерантності до глюкози показало, що через 2 год після введення вуглеводу його концентрація у крові як контрольних, так і дослідних тварин поверталася до норми. Проте виявлено певні зміни толерантності до глюкози у щурів, яким вводили інсулін. Так, через 30 хв після введення глюкози її концентрація у крові дослідних тварин зростала до  $16,45 \pm 1,10$  ммоль/л, що на 69,2 % більше, ніж у контрольних ( $P < 0,01$ ,  $n=4$ ). Через 90 хв концентрація глюкози у крові дослідних щурів була на 16,8 % вищою, ніж у контрольних ( $P < 0,05$ ).

При збільшенні тривалості введення інсуліну з 6 до 12 діб швидкість дихання інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів не змінювалась ні за окиснення ендогенних субстратів, ні за внесення екзогенних субстратів незалежно від наявності екзогенного АДФ. Інсулін також не спричиняв порушення толерантності до глюкози при збільшенні тривалості його введення, оскільки динаміка змін концентрації глюкози була ідентичною з контролем.

Отже, інсулін інтенсифікує окиснення екзогенних субстратів клітинами печінки лише за одноразового введення тваринам цього гормону (діє 4 год). В умовах *in vitro* (15 хв), чи за тривалого введення *in vivo* (6 і 12 діб) суттєвих змін швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів під впливом інсуліну не відбувається.

**5. Залежність процесів дихання гепатоцитів від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі за умов стрептозотоциніндукованого діабету.** Відомості щодо впливу цукрового діабету на процеси енергетичного забезпечення у мітохондріях є суперечливими [Ferreira et al., 1999; Oliveira et al., 2003; Satav, Katyare, 2004; Zavodnik et al., 2011]. Нами встановлено, що на ранніх стадіях цукрового діабету відбувається інтенсифікація енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки. Так, швидкість дихання інтактних гепатоцитів за окиснення ендогенних субстратів діабетичних тварин є на 40,8 % більшою, ніж у контролі ( $P < 0,05$ ,  $n=5-6$ ), а максимальна окисна здатність, оцінена за дії ДНФ, є меншою у тварин з модельованим діабетом (збільшення швидкості споживання кисню під впливом ДНФ на 80 %, а у контролі – на 145 %).

У тварин із цукровим діабетом залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів від  $[\text{Ca}^{2+}]$  у середовищі за окиснення сукцинату (як і суміші малату, глутамату і пірувату) є іншою, ніж у контрольних. Найбільше цей субстрат інтенсифікує споживання кисню за  $10$  мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , а наступні додавання АДФ і ДНФ стимулювали дихання на відміну від контролю вже за трьох  $[\text{Ca}^{2+}]$  –  $0,01$ ,  $0,1$  і  $1$  мкмоль/л (рис. 6). За окиснення сукцинату гепатоцитами тварин-діабетиків у середовищах з  $0,01$  і  $1$  мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  дихальні контролі за Ларді є достовірно більшими,

ніж у контрольних щурів на 35,9 % ( $P < 0,01$ ,  $n = 5-6$ ) та 66,5 % ( $P < 0,001$ ,  $n = 5-6$ ) відповідно.

У щурів із модельованим діабетом за  $0,1$  мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  виявлено такі ж, як і у контрольних закономірності окиснення суміші малату, глутамату і пірувату. Але у середовищах з  $0,01$  та  $1$  мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  дихальні контролю за Ларді у дослідних щурів є достовірно більшими (на 20,0 і 97,4 % відповідно,  $P < 0,01$  і  $P < 0,001$ ,  $n = 5-6$ ), ніж у контрольних тварин. За  $10$  мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  швидкість дихання гепатоцитів діабетичних щурів у стані  $S_4$  є найбільшою, порівняно зі середовищами з іншими  $[\text{Ca}^{2+}]$ , але після внесення АДФ за таких умов швидкість споживання кисню є достовірно меншою на 30,6 % ( $P < 0,001$ ,  $n = 6$ ) (рис. 6); тоді як у контролі статистично достовірних змін не зареєстровано.

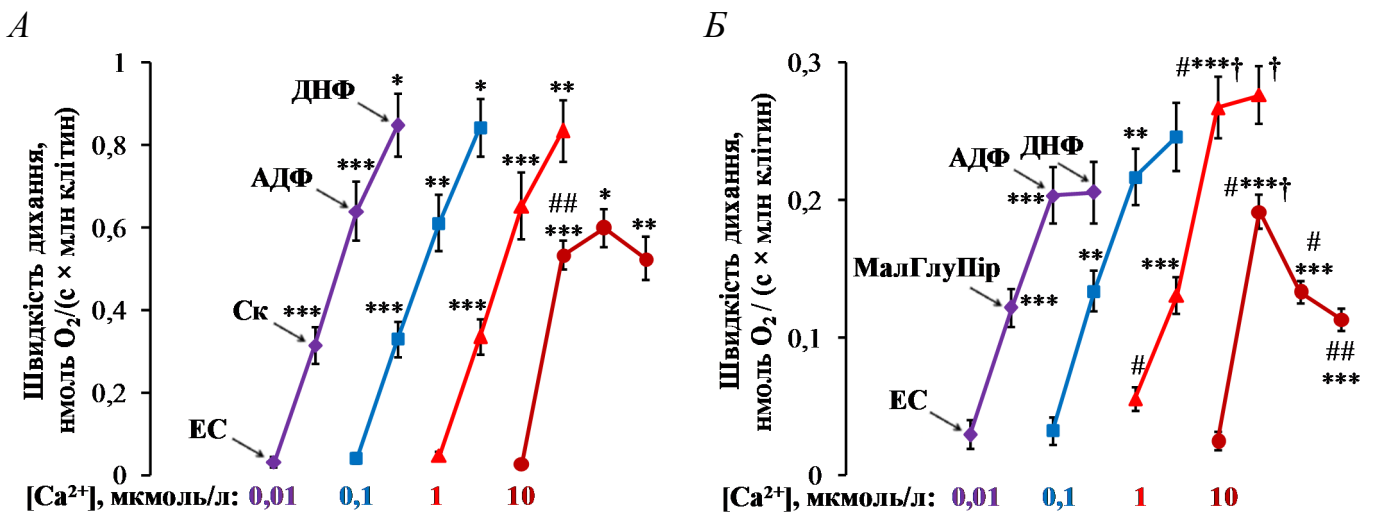


Рис. 6. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних щурів за окиснення сукцинату (А) і суміші малату, глутамату і пірувату (Б) у середовищах з різними концентраціями  $\text{Ca}^{2+}$ : позначення, як на рис. 3, † – зміни достовірні щодо контролю з  $P < 0,05$

Виявлено, що за умов діабету кінетика процесів дихання гепатоцитів за обох  $[\text{Ca}^{2+}]$  добре описується рівнянням Хілла. У дослідній групі щурів, як у контрольній, за вищої  $[\text{Ca}^{2+}]$  коефіцієнт Хілла  $h$  є дещо більшим, порівняно з  $0,1$  мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . За наявності у суспензії ротенону у діабетичних щурів коефіцієнт Хілла за нижчої  $[\text{Ca}^{2+}]$  є меншим від 1 ( $h = 0,89$ ), а за вищої – таким як у контролі ( $h = 1,12$ ; рис. 7).

Без ротенону константа напівактивації  $K_{0,5}$  за модельованого діабету дещо зменшується зі збільшенням  $[\text{Ca}^{2+}]$  (рис. 7 А), як у контролі. Значення максимальної швидкості  $V_{max}$  мітохондріального дихання за окиснення сукцинату в усіх випадках (як у контрольних, так і у дослідних тварин, з ротеноном чи без нього) є дещо вищою за вищої  $[\text{Ca}^{2+}]$  у середовищі. Більша різниця між значеннями  $V_{max}$  за  $0,1$  та  $1$  мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  і наявності ротенону у середовищі спостерігається у діабетичних тварин.

Отримані результати переконливо свідчать про чутливість процесів мітохондріального дихання до рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , що має важливе значення у пристосуванні до енергетичних потреб клітини.

Виявлено, що на 15-у добу розвитку цукрового діабету активність сукцинатдегідрогенази у печінці дослідних щурів знизилась на 35 %, порівняно з контролем

( $P < 0,05$ ,  $n = 5$ ). Встановлено, що у печінці тварин із діабетом вміст ТБК-активних продуктів був на 55,9 % вищим, ніж у контрольній групі. Отже, активування пероксидного окиснення ліпідів є однією з важливих ланок розвитку цукрового діабету. Виявлено, що активність супероксиддисмутази у щурів з експериментальним цукровим діабетом зросла на 23,3 %, а каталази – на 52,0 %, порівняно з контрольними.

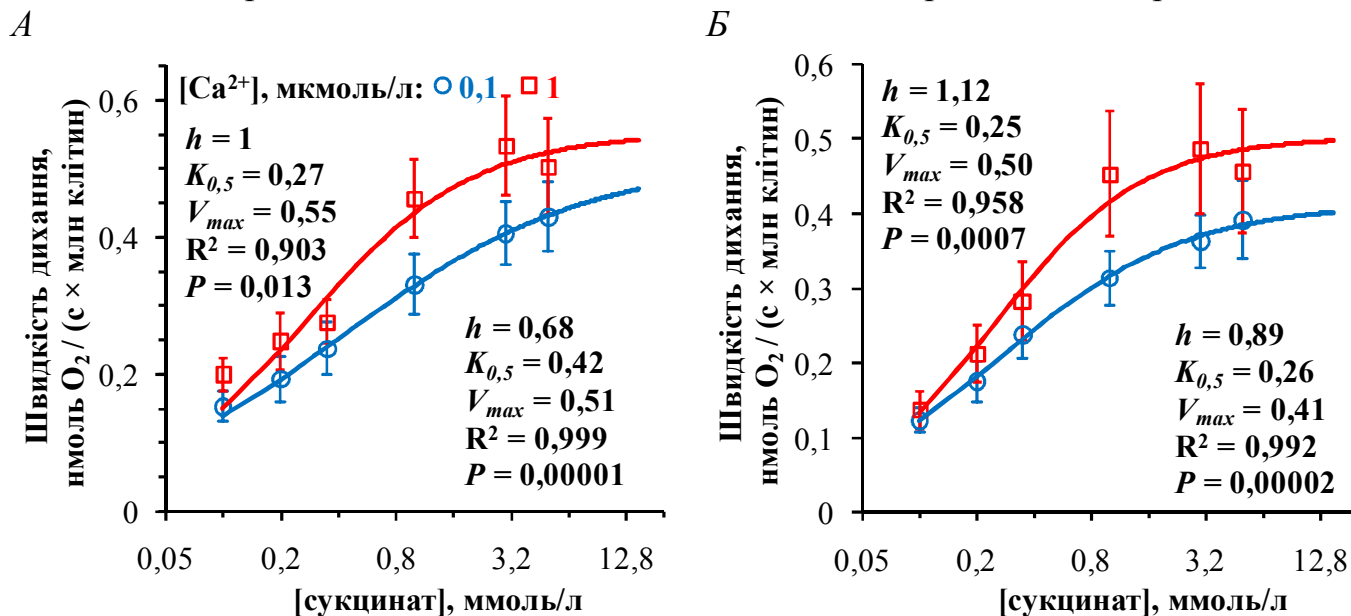


Рис. 7. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних щурів від концентрації сукцинату у середовищах з  $[Ca^{2+}]$  0,1 і 1 мкмоль/л без ротенону (А) та з ротеноном (Б); при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості споживання кисню від концентрації субстрату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ;  $[ротенон] = 10$  мкмоль/л,  $[сукцинат] = 0,1-5$  ммоль/л

Отже, на ранніх етапах розвитку цукрового діабету мітохондрії клітин печінки стають менш чутливими до токсичних  $[Ca^{2+}]$  у середовищі. Крім того, у гепатоцитах знижується активність сукцинатдегідрогенази, але це не призводить до порушень їх енергетичного забезпечення, а зростання рівня ТБК-активних продуктів не компенсується попри активування системи антиоксидантного захисту.

### Узагальнення

У дисертаційній роботі охарактеризовано залежність дихання клітин печінки від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі за різних функціональних станів організму, а саме: за умов стрептозотоциніндукованого діабету, різнотермінової гіперінсулінемії, тривалої дії таурину. Встановлені факти доводять важливу роль  $Ca^{2+}$  у регуляції процесів енергозабезпечення гепатоцитів як за фізіологічних, так і патологічних умов. На основі отриманих результатів і даних літератури пропонуємо схему взаємозв'язків між сигнальними та метаболічними шляхами у гепатоцитах за різного вмісту  $Ca^{2+}$  у середовищі (рис. 8).

Виявлено, що з підвищенням у середовищі  $[Ca^{2+}]$  від 0,1 до 1 мкмоль/л, яке відповідає переходу клітини з неактивного в активний стан, відбувається інтенсифікація споживання кисню мітохондріями гепатоцитів за окиснення різних субстратів (сукцинату, але лише без ротенону; малату, глутамату і пірувату; пірувату на фоні



малату). Це узгоджується із даними про  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляцію активності дегідрогеназ НАД-залежних субстратів [Gunter et al., 2004; Nicholls, 2005].

Наслідком активації окисних процесів у мітохондріях додаванням екзогенного АДФ до суспензії гепатоцитів, яка вже містить субстрати окиснення, є збільшення продукування цими органелами АТФ для забезпечення енергетичних потреб клітини під час здійснення нею функціональної відповіді. За 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  АДФ-стимульоване збільшення швидкості споживання кисню є менш вираженим, ніж за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, оскільки окисне фосфорилування за вищої [ $\text{Ca}^{2+}$ ] швидше пригнічується більш інтенсивним зростанням кількості утвореного АТФ.

За [ $\text{Ca}^{2+}$ ] у середовищі 10 мкмоль/л, яка є токсичною для мітохондрій гепатоцитів, відбувається пригнічення процесів дихання у цих клітинах. Внаслідок цього зменшується кількість синтезованого АТФ, що спричиняє неповноцінне виконання клітиною функціональної відповіді, або, взагалі, зникнення цієї реакції, через нестачу енергії.

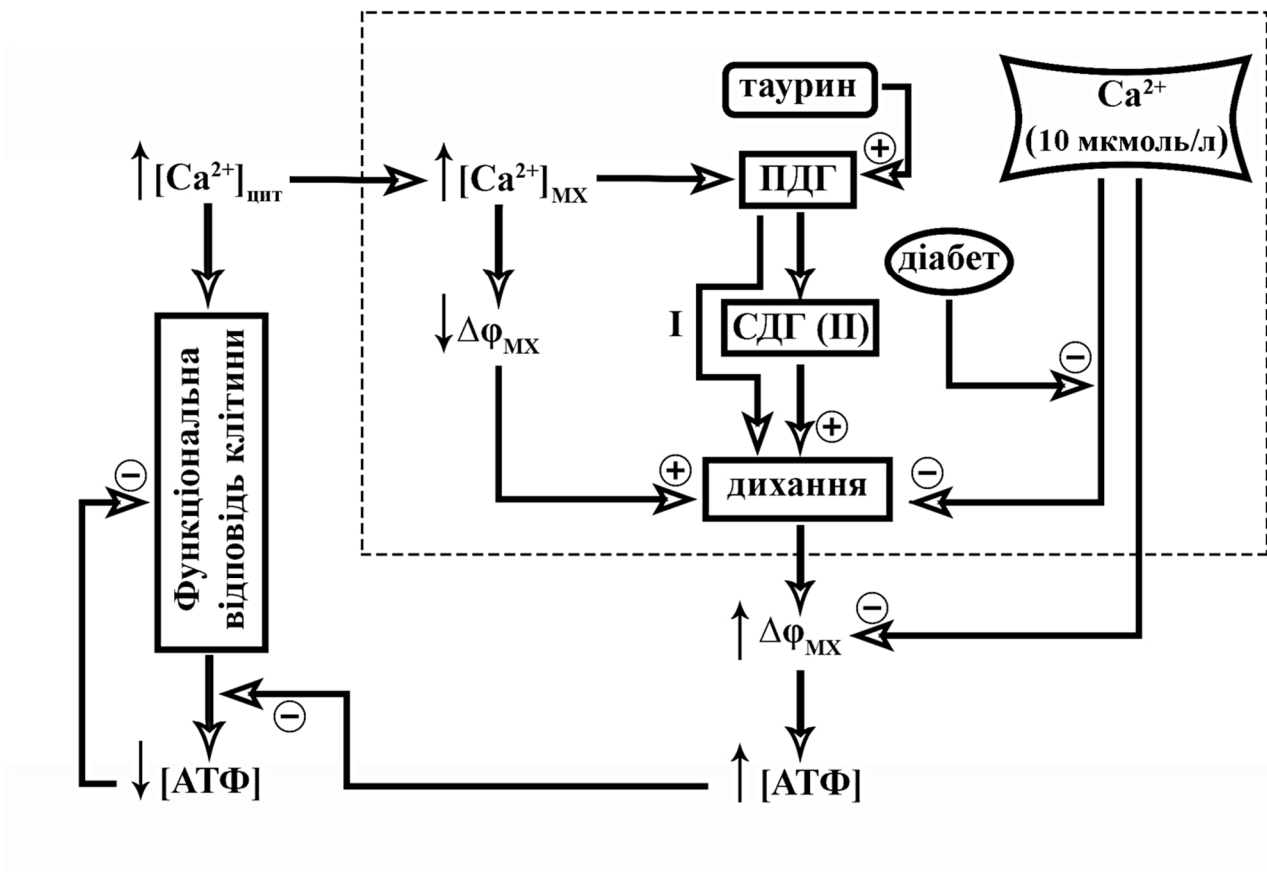


Рис. 8. Схема взаємозв'язків між сигнальними та метаболічними шляхами у гепатоцитах за різного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі: ПДГ – піруватдегідрогеназа, СДГ – сукцинатдегідрогеназа, I – комплекс I дихального ланцюга мітохондрій

З підвищенням [ $\text{Ca}^{2+}$ ] у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л за окиснення пірувату на тлі малату відбувається більш виражена інтенсифікація процесів дихання гепатоцитів внаслідок тривалої дії таурину *in vivo*. Тобто таурин змінює  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляцію НАД-залежної ланки окисних процесів у мітохондріях клітин печінки.

На ранніх етапах розвитку цукрового діабету I типу спостерігається зниження чутливості мітохондрій клітин печінки до токсичних  $[Ca^{2+}]$ . Це виявляється у тому, що швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних тварин у стані  $S_4$  є найбільшою за 10 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  у середовищі, а у стані  $S_3$  – за 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ . За 0,1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  у середовищі коефіцієнт Хілла  $h$  і  $V_{max}$  сукцинатстимульованого дихання мітохондрій у стані  $S_3$  зменшуються, а за 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  ці параметри залишаються такими ж, як і в контролі.

## ВИСНОВКИ

Відповідно до мети і завдань роботи, визначено оптимальні умови дослідження дихання мітохондрій пермеабілізованих клітин печінки, з'ясовано залежність інтенсивності дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі, проаналізовано кінетику процесів дихання клітин печінки у середовищах з різною концентрацією  $Ca^{2+}$  за тривалої дії таурину *in vivo*, встановлено особливості дихання гепатоцитів за умов коротко- та довготривалої гіперінсулінемії, досліджено залежність процесів дихання клітин печінки від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі за умов стрептозотоциніндукованого діабету.

У результаті вирішення наукового завдання зроблено такі висновки:

1. У ході пермеабілізації плазматичної мембрани для дослідження дихання мітохондрій *in situ* необхідно враховувати співвідношення між кількостями детергенту і клітин у суспензії. За співвідношення 20–22 мкг дигітоніну на 1 млн клітин плазматична мембрана гепатоцитів є достатньо проникна для трипанового синього, екзогенних субстратів окиснення й АДФ, а мітохондрії зберігають протонний градієнт, отже воно є оптимальним для реєстрації дихання мітохондрій печінки щурів.
2. Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані  $S_4$  за окиснення як сукцинату, так і суміші малату, глутамату і пірувату є найбільшою за 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  у середовищі, а у стані  $S_3$  – за 0,1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ . Ступінь спряження між диханням і окисним фосфорилуванням був найвищим за 0,1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ . Концентрація  $Ca^{2+}$  10 мкмоль/л є токсичною для мітохондрій гепатоцитів, оскільки додавання динітрофенолу до полярографічної комірки спричиняло зменшення їхньої швидкості дихання як за окиснення сукцинату, так і суміші малату, глутамату і пірувату.
3. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані  $S_3$  від концентрації як сукцинату, так і пірувату (на тлі малату) у середовищах із різною  $[Ca^{2+}]$  описується рівнянням Хілла. Внаслідок підвищення  $[Ca^{2+}]$  від 0,1 до 1 мкмоль/л зростає  $V_{max}$  і знижується  $K_{0,5}$  за окиснення пірувату, але не сукцинату (за дії ротенону). Це свідчить про те, що збільшення активності піруватдегідрогенази за зростання  $[Ca^{2+}]$  у цитозолі є однією з ланок регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів із залученням прямих позитивних зв'язків.
4. Тривале введення таурину *in vivo* практично не впливає на сукцинатстимульоване ротеноннечутливе дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані  $S_3$  і спричиняє часткове нівелювання відмінностей у кінетиці за окиснення пірувату на фоні малату за різних  $[Ca^{2+}]$ . Так, під впливом таурину різниця між  $K_{0,5}$  за 0,1 і 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  у середовищі зменшується, хоча різниця між  $V_{max}$  залишається не-

змінною. Субстратне інгібування, яке притаманне залежності швидкості дихання від концентрації пірувату за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, внаслідок тривалої дії таурину розвивається за вищої, ніж у контролі, концентрації субстрату.

5. Короткочасна дія інсуліну *in vitro* не впливає на швидкість дихання інтактних гепатоцитів, ендогенного дихання пермеабілізованих гепатоцитів, а також дихання пермеабілізованих гепатоцитів у станах  $S_4$  і  $S_3$  за окиснення сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату. Після одноразового введення інсуліну *in vivo* швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані  $S_3$  за окиснення сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату збільшується, а після 6- і 12-денного введення ефект нівелюється.
6. На ранніх етапах розвитку стрептозотоциніндукованого цукрового діабету мітохондрії гепатоцитів стають менш чутливими до токсичних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ . Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних тварин у стані  $S_4$  є найбільшою за 10 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, а у стані  $S_3$  – за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . За 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі коефіцієнт Хілла  $h$  і  $V_{\max}$  сукцинатстимульованого дихання мітохондрій у стані  $S_3$  зменшуються, а за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  ці параметри залишаються такими ж, як і в контролі, що підтверджує зменшення чутливості мітохондрій до токсичних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ .

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Merlavsky V.M. Experimental substantiation of permeabilized hepatocytes model for investigation of mitochondria *in situ* respiration / V.M. Merlavsky, B.O. Manko, O.V. Ikkert [et al.] // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87. – № 6. – P. 113–121. (Здобувач взяв активну участь у експериментальній частині досліджень, аналізі результатів, написанні та оформленні статті)
2. Мерлавський В. Вплив  $\text{Ca}^{2+}$  на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету / В. Мерлавський, О. Іккерт, В. Манько // Вісн. Львів. ун-ту. Серія біол. – 2015. – Вип. 70. – С. 294–304. (Здобувач самостійно виконав усю експериментальну частину досліджень, статистичне опрацювання даних, взяв участь у аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті)
3. Мерлавський В.М. Енергетичні процеси ізольованих гепатоцитів за різної тривалості дії інсуліну / Мерлавський В.М., Манько Б.О., Іккерт О.В. [та ін.] // Біол. студії. – 2010. – Том 4. – № 6. – С. 15 – 22. (Здобувач взяв активну участь у експериментальній частині досліджень, аналізі результатів, написанні та оформленні статті)
4. Merlavsky V.M. Kinetic parameters of rat permeabilized hepatocytes respiration upon various  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in medium and prolonged influence of taurine / V.M. Merlavsky, R.D. Ostapiv, O.V. Ikkert [et al.] // Stud. Biol. – 2015. – Vol. 9. – № 2. – P. 71–84. (Здобувач самостійно виконав усю експериментальну частину досліджень, статистичне опрацювання даних, взяв участь у аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті)
5. Іккерт О.В. Особливості оксигензалежних процесів у щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом / О.В. Іккерт, В.М. Мерлавський, Й.В. Царик [та ін.] // Експер. та клін. фізіол. і біохім. – 2015. – № 4. – С. 7–14. (Здобувач взяв активну участь у експериментальній частині досліджень, аналізі результатів, написанні та оформленні статті)
6. Пат. 60528 Україна, МПК G01N 33/50 (2006.01), A01N 61/00 (2006.01). Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ* // Манько В.В., Манько Б.О., Мерлавський В.М., Великопольська О.Ю. ; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201013449 ; заявл. 12.11.2010 ; опубл. 25.06.2011, Бюл. № 12. – 6 с. (Здобувач взяв активну участь у експериментальній частині досліджень і аналізі результатів)
7. Мерлавський В.М. Мембранозв'язаний  $\text{Ca}^{2+}$  та дихання ізольованих гепатоцитів щурів за дії інсуліну / В.М. Мерлавський, Б.О. Манько, О.В. Іккерт // V Міжнар. конф. студ. і аспірант.

- «Молодь і поступ біології», Львів, 12–15 травня 2009 р. : збірник тез. – Т. 1. – Львів, 2009. – С. 266.
8. Манько Б.О. Дихання інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів за дії інсуліну / Б.О. Манько, В.М. Мерлавський, М.О. Гальків, М.Ю. Клевець // XVIII з'їзд Укр. фізіол. т-ва з міжнар. участю, Одеса, 20–22 травня 2010 р. – Одеса, 2010. – Фізіол. журн. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 190–191.
  9. Мерлавський В. Вплив тривалого введення інсуліну на дихання ізольованих гепатоцитів щурів / В. Мерлавський, Б. Манько, М. Клевець [та ін.] // VI Міжнар. конф. студ. і аспірант. “Молодь і поступ біології”, Львів, 21–24 вересня 2010 р. : збірник тез. – Львів, 2010. – С. 223–224.
  10. Merlavs'ky V.M. Permeabilized cells as a test system for studying of mitochondrial respiration *in situ* / V. M. Merlavs'ky, B. O. Manko, O. Yu. Velykopolska [et al.] // Programme and abstracts of 3<sup>rd</sup> International Symposium : “Intracellular Signaling and Bioactive Molecules Design”, Lviv, 17–23 of September 2012. – Lviv, 2012. – P. 142.
  11. Полігас Ю. Вплив  $\text{Ca}^{2+}$  на окиснення сукцинату в ізольованих гепатоцитах за умов цукрового діабету / Ю. Полігас, О. Гринюх, В. Мерлавський [та ін.] // X Міжнар. конф. студ. і аспірант. “Молодь і поступ біології”, Львів, 8–11 квітня 2014 р. : збірник тез. – Львів, 2014. – С. 259–260.
  12. Іккерт О.В. Вплив стрептозоточину на систему антиоксидантного захисту у печінці щурів / О.В. Іккерт, В.М. Мерлавський, В.В. Манько // Міжнар. наук. конф. “Механізми функціонування фізіологічних систем”, приурочена до 70-ліття біологічного факультету та 230-ліття фізіології у Львівському університеті, Львів, 15–17 жовтня 2014 р. : тези доп. – Львів, 2014. – С. 41.
  13. Мерлавський В.М. Вплив таурину на залежність дихання пермеабілізованих гепатоцитів щурів від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  / В.М. Мерлавський, Р.Д. Остапів, В.В. Манько // Матеріали XIX-го з'їзду Укр. фізіол. т-ва ім. П.Г. Костюка з міжнар. участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка. – Фізіол. журн. – 2014. – Т. 60, № 3 (Додаток). – С. 120–121.

## АНОТАЦІЯ

### **Мерлавський В.М. $\text{Ca}^{2+}$ -регуляція дихання гепатоцитів за різних функціональних станів організму. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2016.

Досліджено роль  $\text{Ca}^{2+}$  у регуляції дихання клітин печінки щурів. Проаналізовано залежність швидкості дихання мітохондрій *in situ* гепатоцитів від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Ступінь спряження між диханням і окисним фосфорилуванням є найвищим за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  за окиснення як сукцинату, так і суміші малату, глутамату і пірувату. Виявлено, що концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  10 мкмоль/л є токсичною для мітохондрій гепатоцитів. Тривале введення таурину *in vivo* практично не впливає на сукцинатстимульоване ротеноннечутливе дихання пермеабілізованих гепатоцитів і спричиняє часткове нівелювання відмінностей у кінетиці за окиснення пірувату на фоні малату за різних  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Короткочасна дія інсуліну *in vitro* не впливає на швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату. Після одноразового введення інсуліну *in vivo* швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату збільшується, а після 6- і 12-денного введення ефект нівелюється. На ранніх етапах розвитку стрептозоточиніндукованого цукрового діабету мітохондрії гепатоцитів стають менш чутливими до токсичних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Ключові слова:** гепатоцити, дихання,  $\text{Ca}^{2+}$ , мітохондрії *in situ*, кінетика, таурин, інсулін, цукровий діабет.

## АННОТАЦИЯ

**Мерлавский В.М.  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляция дыхания гепатоцитов при разных функциональных состояниях организма. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2016.

Исследовано роль  $\text{Ca}^{2+}$  в регуляции дыхания клеток печени крыс. Проанализировано зависимость скорости дыхания митохондрий *in situ* гепатоцитов от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде. Степень сопряжения между дыханием и окислительным фосфорилированием является наибольшей при 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  при окислении как сукцината, так и смеси малата, глутамата и пирувата. Обнаружено, что концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  10 мкмоль/л является токсичной для митохондрий гепатоцитов. Продолжительное введение таурина *in vivo* практически не влияет на сукцинат-стимулированное роте-нон-нечувствительное дыхание пермеабелизованных гепатоцитов и приводит к частичному нивелированию различий в кинетике при окислении пирувата на фоне малата при разных  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Кратковременное действие инсулина *in vitro* не влияет на скорость дыхания пермеабелизованных гепатоцитов при окислении сукцината и  $\alpha$ -кетоглутарата. После однократного введения инсулина *in vivo* скорость дыхания пермеабелизованных гепатоцитов при окислении сукцината и  $\alpha$ -кетоглутарата возрастает, а после 6- и 12-дневного введения эффект нивелируется. На ранних этапах развития стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета митохондрии гепатоцитов становятся менее чувствительными к токсичным концентрациям  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Ключевые слова:* гепатоциты, дыхание,  $\text{Ca}^{2+}$ , митохондрии *in situ*, кинетика, таурин, инсулин, сахарный диабет.

## ANNOTATION

**Merlavsky V.M.  $\text{Ca}^{2+}$ -regulation of hepatocytes respiration upon various functional states of organism. – Manuscript.**

Thesis for PhD degree in Biology, specialty 03.00.13 – Human and animal physiology. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2016.

Mechanisms of regulation of rat hepatocytes respiration by  $\text{Ca}^{2+}$  were investigated. Suspension of isolated liver cells was obtained using collagenase by Seglen method. Rate of oxygen consumption was registered at 37°C using Clark electrode.

A model of permeabilized hepatocytes for mitochondria *in situ* respiration studying was developed. It was revealed that hepatocytes permeabilization depends on digitonin concentration in medium and on cell number in suspension: the higher is suspension density, the higher digitonin concentration is required. Optimal ratio of digitonin amount to cell number equaled 20–22  $\mu\text{g}/\text{million}$ .

The dependence of permeabilized hepatocytes oxygen consumption on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration within the medium (0.01 – 10  $\mu\text{M}$ ) was investigated. The highest respiration rate upon either succinate along or malate, glutamate and pyruvate mixture oxidation was in the solution with 1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . ADP-stimulated oxygen consumption was the most intensive within the medium containing 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Concentration of 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  has been revealed to be toxic for hepatocytes mitochondria as ADP and dinitrophenol did not stimulate oxidative processes upon such conditions.

The dependence of permeabilized hepatocytes respiration rate on oxidative substrates concentration was studied at different  $[Ca^{2+}]$  – 0.1 and 1  $\mu M$  in the medium. Parameters of Hill equation were calculated applying modified Eadie-Hofstee coordinates –  $\{v; v/[S]^h\}$ . The kinetic dependence of respiration upon either succinate or pyruvate oxidation was well described by Hill equation in the mediums with concentrations of  $Ca^{2+}$  mentioned earlier. Hill coefficient  $h$  and semi activation constant  $K_{0.5}$  for succinate, at rotenone presence, were not changed after increase of  $Ca^{2+}$  concentration from 0.1 to 1  $\mu M$ . And maximal velocity  $V_{max}$  slightly increased under such conditions. There was more essential difference between kinetic parameters of pyruvate-stimulated respiration at various  $Ca^{2+}$  concentrations. Thus,  $V_{max}$  was 1.5 times lower, and  $K_{0.5}$  – 10.7 times higher at 0.1  $\mu M$   $Ca^{2+}$  in comparison with 1  $\mu M$   $Ca^{2+}$ . Hill coefficient became less than 1 at both  $Ca^{2+}$  concentrations.

Prolonged influence of taurine on kinetic parameters of rat permeabilized hepatocytes respiration upon various  $Ca^{2+}$  concentrations in medium was investigated. The kinetic dependence of respiration upon succinate and pyruvate oxidation was well described by Hill equation under taurine action, similar to control. Kinetic parameters of respiration, upon succinate oxidation at both  $Ca^{2+}$  concentrations, were not changed significantly under prolonged taurine injection. As a result of taurine injection,  $V_{max}$  upon pyruvate oxidation was 1.6 times less at low  $Ca^{2+}$  and  $K_{0.5}$  was higher, but only 6 times. Hill coefficient of this process increased at 0.1  $\mu M$   $Ca^{2+}$  and was 1.12, upon taurine impact. Substrate inhibition, inherent to the dependence of respiration rate on pyruvate concentration within the medium with 1  $\mu M$   $Ca^{2+}$ , started developing, under taurine effect, at higher concentration of this substrate in comparison with control (3mM comparatively to 0.35 mM).

Insulin effect on energy supplying processes in isolated rat hepatocytes at different duration of hormone action at succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate oxidation was investigated. Short-term insulin action *in vitro* did not influence the examined processes. *In vivo* insulin effect was characterized by time dependence with activation of ADP-stimulated succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate oxidation in isolated hepatocytes in 4 hours after injection and absence of influence in case of prolonged action (6, 12 days).

$Ca^{2+}$  influence on respiration processes of permeabilized hepatocytes upon streptozotocin-induced diabetes mellitus was studied. The greater intensification of respiration by mixture of malate, glutamate and pyruvate in diabetic animals was observed at 10  $\mu M$   $Ca^{2+}$ . ADP-stimulated respiration rate in diabetic rats was maximal at 1  $\mu M$   $Ca^{2+}$ . Upon succinate oxidation the maximal mitochondrial functional ability in control animals was observed at 0.1  $\mu M$   $Ca^{2+}$  within the medium and in experimental rats at 1  $\mu M$   $Ca^{2+}$ . Hill coefficient  $h$  and  $V_{max}$  of succinate-stimulated mitochondrial respiration in diabetic animals were decreased upon low  $Ca^{2+}$  concentration (0.1  $\mu M$ ). These parameters remained similar to the control at 1  $\mu M$   $Ca^{2+}$  in the medium. So, at the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus development, the hepatocytes respiration was intensified thanks to, in particular, the increase of resistance to toxic  $Ca^{2+}$  amounts within mitochondrial matrix.

*Key words:* hepatocytes, respiration,  $Ca^{2+}$ , mitochondria *in situ*, kinetics, taurine, insulin, diabetes mellitus.