

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ІВАНА ФРАНКА

на правах рукопису

Мерлавський Володимир Михайлович

УДК: 612.34:57.017.722:57.053.2:57.037

**Ca²⁺-РЕГУЛЯЦІЯ ДИХАННЯ ГЕПАТОЦИТІВ
ЗА РІЗНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СТАНІВ ОРГАНІЗМУ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Дисертація

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
доктор біологічних наук,
професор Манько В. В.

Львів – 2016

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Роль Ca^{2+} гомеостазу в регуляції процесів мітохондріального дихання...	12
1.1.1. Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій	12
1.1.2. Вплив Ca^{2+} на процеси мітохондріального дихання	14
1.2. НАД- та ФАД-залежний шляхи окиснення субстратів.....	15
1.2.1. Нікотинамідні дегідрогенази	16
1.2.2. Флавінові дегідрогенази.....	17
1.3. Ланцюг транспорту електронів	18
1.4. Цикл трикарбонових кислот і його біологічна роль	19
1.5. Інсулін та його значення у процесах метаболізму	20
1.5.1. Загальна характеристика інсуліну.....	20
1.5.2. Молекулярні механізми дії інсуліну	21
1.5.3. Гормональна активність інсуліну та наслідки її порушення	22
1.5.3.1. Вплив інсуліну на обмін вуглеводів	24
1.5.3.2. Роль інсуліну в обміні ліпідів	25
1.5.3.3. Вплив інсуліну на обмін амінокислот і білків	26
1.5.3.4. Участь інсуліну у процесах клітинного росту	27
1.5.3.5 Цукровий діабет як наслідок патологічних змін гормональної активності інсуліну.....	27
1.5.3.6 Особливості цукрового діабету I типу.....	29
1.6. Біологічна роль таурину в тваринному організмі.....	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	35
2.1. Методи роботи із піддослідними тваринами	35
2.1.1. Умови утримання лабораторних тварин	35
2.1.2. Групи піддослідних тварин.....	35
2.1.3. Основні засади поводження із піддослідними тваринами	35

2.1.4. Моделювання тривалого впливу таурину	36
2.1.5. Моделювання гіперінсулінемії.....	36
2.1.6. Моделювання стрептозотоциніндукованого цукрового діабету	37
2.2. Методика ізолювання гепатоцитів	38
2.3. Полярнографічне вимірювання інтенсивності дихання біологічних суспензій	39
2.4. Методика дослідження дихання ізолюваних інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів.....	40
2.5. Методи визначення активності ензимів	42
2.5.1. Визначення активності супероксиддисмутази	42
2.5.2. Визначення активності каталази	43
2.5.3. Визначення активності сукцинатдегідрогенази	43
2.5.4. Визначення кількості білка за методом Лоурі.....	44
2.5.5. Визначення вмісту ТБК-реактивних продуктів у тканині.....	45
2.6. Розчини.....	45
2.7. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження	46
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	48
3.1. Дослідження дихання мітохондрій <i>in situ</i> пермеабілізованих клітин печінки.....	48
3.2. Залежність інтенсивності дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації Ca^{2+} у середовищі.....	56
3.2.1. Дослідження дихання пермеабілізованих гепатоцитів у номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному середовищах	56
3.2.2. Встановлення закономірностей дихання пермеабілізованих гепатоцитів у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+}	59
3.2.3. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежно від концентрації субстратів циклу Кребса у середовищах із різним вмістом Ca^{2+}	60

3.2.3.1. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежно від концентрації сукцинату в середовищах із різним вмістом Ca^{2+}	61
3.2.3.2. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежно від концентрації пірувату в середовищах із різним вмістом Ca^{2+}	64
3.3. Дослідження впливу Ca^{2+} на кінетичні параметри окиснення субстратів циклу Кребса мітохондріями <i>in situ</i> гепатоцитів за тривалої дії таурину.	67
3.3.1. Вплив Ca^{2+} на кінетичні параметри окиснення сукцинату в пермеабілізованих гепатоцитах за тривалої дії таурину.....	67
3.3.2. Вплив Ca^{2+} на кінетичні параметри окиснення пірувату в пермеабілізованих гепатоцитах за тривалої дії таурину.....	69
3.4. Дослідження процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів за умов експериментальної гіперінсулінемії різної тривалості	71
3.4.1. Дослідження впливу глюкози на процеси дихання гепатоцитів	72
3.4.2. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за дії інсуліну <i>in vitro</i>	74
3.4.3. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за одноразового введення інсуліну	78
3.4.4. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за шестиденного введення інсуліну	83
3.4.5. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за дванадцятиденного введення інсуліну.....	87
3.5. Аналіз впливу Ca^{2+} на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого діабету	92
3.5.1. Оцінка активності ензимів системи антиоксидантного захисту і сукцинатдегідрогенази у гепатоцитах за умов цукрового діабету	92
3.5.2. Інтенсивність ендогенного дихання гепатоцитів за умов цукрового діабету	96

3.5.3. Дослідження дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних щурів у номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному середовищах	97
3.5.4. Встановлення закономірностей дихання пермеабілізованих гепатоцитів у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+} за умов стрептозотоциніндукованого діабету	100
3.5.5. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних тварин залежно від концентрації сукцинату в середовищах із різним вмістом Ca^{2+}	103
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ	110
ВИСНОВКИ.....	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	117

ВСТУП

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 Ca^{2+} здійснюють на них вагомий вплив [43]. Так, відомо про існування взаємодій між Ca^{2+} -сигналізацією та мітохондріальним окисненням у ацинарних клітинах привушних залоз [45], клітинах гладеньких м'язів [48], секреторних клітинах слинних залоз личинки дзвінця [6], ацинарних клітинах підшлункової залози [27, 209] і, особливо важливо, у гепатоцитах [82, 183]. Адже порушення взаємовпливів між цими процесами у клітинах печінки пов'язано з розвитком деяких патологічних станів організму, зокрема, ожиріння чи цукрового діабету [34]. Але досі не досліджено 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 [28, 67, 181,], а також на те, що окисне фосфорилювання регулюється сусідніми органелами зміною споживання АТФ та концентрації Ca^{2+} у цитозолі [182].

Однією з фізіологічно активних речовин, які впливають на дихання змінюючи Ca^{2+} -сигналізацію є таурин. Він належить до найбільш поширених аміносульфонових кислот у ссавців і задіяний у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу та функціонування мітохондрій [109]. Лобо зі співавт. [135] виявили, що найвища концентрація таурину є якраз у мітохондріях. Таурин вже за 1 ммоль/л спричиняє зростання рівня поглинання Ca^{2+} мітохондріями гепатоцитів [168]. Однак, особливості окиснення різних субстратів у мітохондріях пермеабілізованих клітин під впливом таурину та за різних концентрацій Ca^{2+} є недослідженими.

Процеси енергозабезпечення також перебувають під чітким контролем нейрогуморальної регуляції. Чільне місце у метаболізмі вуглеводів належить

інсуліну [134, 185, 213]. Він забезпечує регуляцію транспортування глюкози через плазматичну мембрану багатьох клітин, але не гепатоцитів. Тим не менше, інсулін збільшує активність піруватдегідрогенази клітин печінки щурів [103], підвищує максимальну здатність мітохондрій скелетних м'язів синтезувати АТФ [199]. 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 [76, 165, 189, 224]. Так, у деяких роботах показано зниження споживання кисню мітохондріями серця, печінки діабетичних щурів [165, 189]. І навпаки, Сінг і співавт. [194] зареєстрували інтенсифікацію дихання клітин нирок, а Гартман і співавт. [95] – мононуклеарних клітин периферійної крові. Проте досі не було досліджено впливу 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 науководослідних тем: “Роль фізіологічно активних пептидів у функціонуванні секреторних клітин травних залоз” (2008–2009 рр., № держреєстрації 0108U000747), “Розробка тест-системи для з'ясування взаємозалежності функціонування Ca^{2+} -транспортувальних систем і мітохондріального дихання *in situ*” (2010–2011 рр., № держреєстрації 0110U001356), “Вплив таурину на функціонування 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 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 Ca^{2+} у середовищі.
3. Проаналізувати кінетику процесів дихання клітин печінки у середовищах з різною концентрацією 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 Ca^{2+} у середовищі за умов стрептозотоциніндукованого діабету.

Об'єкт досліджень: процеси енергозабезпечення клітин печінки.

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

Методи дослідження. *Фізіологічні* – дослідження інтенсивності дихання ізольованих гепатоцитів та мітохондрій *in situ*, моделювання гіперінсулінемії, 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 $[Ca^{2+}]$ 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 Ca^{2+} у середовищі. Виявлено, що за окиснення пірувату на тлі малату у пермеабілізованих гепатоцитах з підвищенням концентрації 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 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 $[Ca^{2+}]$. Встановлено, що субстратне інгібування, яке притаманне залежності швидкості дихання від концентрації пірувату за 1 мкмоль/л 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 α -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 клітинного дихання клітин печінки до токсичного рівня Ca^{2+} .

Практичне значення отриманих результатів. Одержані результати поглиблюють знання про закономірності енергетичних процесів у клітинах печін-

ки та вплив на них 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 використані 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 конференціях 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 та обсяг 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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль Ca^{2+} гомеостазу в регуляції процесів мітохондріального дихання

Мітохондрії є унікальними органелами, основна функція яких пов'язана з синтезом АТФ шляхом окисного фосфорилування. Також мітохондрії відіграють важливу роль у Ca^{2+} -сигналізації, оскільки вони виконують функції внутрішньоклітинного депо Ca^{2+} і здатні впливати на характер та поширення Ca^{2+} -сигналу у цитозолі [182]. Крім того, мітохондрії сприяють більшому спустошенню клітинних депо Ca^{2+} і, тим самим, – активації за фізіологічних умов депокерованих Ca^{2+} -каналів плазматичної мембрани [170]. Також мітохондрії підтримують усі АТФ-залежні процеси, а це і роботу Ca^{2+} -помп плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму [23].

1.1.1. Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій

Акумуляція Ca^{2+} у матриксі мітохондрій можлива завдяки наявності у внутрішній мітохондріальній мембрані уніпортера [15]. Процес транспортування Ca^{2+} чи у мітохондрії, чи з них пов'язані з їхнім енергетичним станом [142]. Ефективність роботи Ca^{2+} -уніпортера залежить від мітохондріального мембранного потенціалу і визначається концентраційним градієнтом катіонів Ca^{2+} [2]. У свою чергу мітохондріальний мембранний потенціал генерується внаслідок активності електронтранспортного ланцюга внутрішньої мембрани мітохондрій [114].

У внутрішній мембрані мітохондрій наявний Ca^{2+} -уніпортер, він здійснює транспорт катіонів Ca^{2+} у мітохондрії за рахунок електрохімічного градієнта H^+ [13]. У мітохондріях у вільному стані міститься менше 1% депонованого Ca^{2+} .

Решта катіонів Ca^{2+} перебуває у зв'язаному, проте здатному до обміну стані [92].

Акумуляція кальцію мітохондріями здійснюється значно швидше, ніж процес вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій, який характеризується значною тривалістю [77]. У мітохондріях печінки виявлено і досить детально охарактеризовано $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ - і $\text{H}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінники [30]. Наявність у мітохондріях поряд з Ca^{2+} -уніпортером $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінником і $\text{H}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінника має важливе значення, оскільки попереджує перевантаження цих органел іонами Ca^{2+} [28].

$\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінник забезпечує вихід кальцію з мітохондрій [14], він переважає у збудливих клітинах. Також системою, яка забезпечує вивільнення Ca^{2+} і здебільшого поширена у незбудливих клітинах, є $\text{H}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінник [144]. У внутрішній мембрані мітохондрій наявна циклоспоринчутлива мітохондріальна пора, активація якої відбувається внаслідок перевантаження матриксу катіонами Ca^{2+} [1, 22, 157].

Досліджено, що $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ - і $\text{Ca}^{2+} - \text{H}^+$ - обмінники мітохондрій за фізіологічних $[\text{Na}^+]$ і $[\text{H}^+]$ у цитозолі забезпечують процес виходу Ca^{2+} з цих органел. $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ - обмінник функціонує зі стехіометрією $1\text{Ca}^{2+} : 2\text{Na}^+$, а $\text{Ca}^{2+} - \text{H}^+$ - обмінник – зі стехіометрією $1\text{Ca}^{2+} : 2\text{H}^+$ [30].

Вважається, що активація поглинання мітохондріями Ca^{2+} є результатом тісного контакту між ними й ендоплазматичним ретикуломом [171, 181]. Було запропоновано “концепцію мікродоменів” для транспортування Ca^{2+} мітохондріями [46]. Ця концепція полягає в наступному: надходження Ca^{2+} ззовні чи вивільнення його з депо створює обмежені домени з високою концентрацією Ca^{2+} (20 мкмоль/л і більше), яка є достатньою для активації поглинання Ca^{2+} низько-афінною системою сусідньої мітохондрії.

Власне, одним із аспектів функціонування Ca^{2+} -мікродоменів є їх роль у забезпеченні здійснення мітохондріями накопичення Ca^{2+} . Підвищення концентрації цитозольного Ca^{2+} (цитозольні Ca^{2+} -спайки) веде до підвищення внутрі-

шньо-мітохондріальної концентрації Ca^{2+} (мітохондріальні Ca^{2+} -спайки) і має важливе значення для стимуляції окисного фосфорилування у мітохондріях [61, 149]. Поглинання Ca^{2+} мітохондріями може впливати на динаміку цитозольних Ca^{2+} -сигналів [102, 112].

Встановлено, що мітохондрії починають акумулювати Ca^{2+} вже за концентрації 100 нмоль/л Ca^{2+} у цитозолі [53], не зважаючи на те, що афінність уніпортера 10 мкмоль/л. Крім того, було виявлено, що дихання мітохондрій визначає активаційні/деактиваційні властивості депо-керованого входу Ca^{2+} , що має важливе значення для повторного наповнення депо кальцієм, втраченим під час стимуляції клітин агоністами [87]. Поглинання мітохондріями Ca^{2+} може мати важливе значення для регуляції секреції [154].

1.1.2. Вплив Ca^{2+} на процеси мітохондріального дихання

Поглинання Ca^{2+} мітохондріями має важливе фізіологічне значення, оскільки Ca^{2+} активує три ферменти циклу трикарбонових кислот: піруватдегідрогеназу, α -кетоглутаратдегідрогеназу та ізоцитратдегідрогеназу [12, 150]. Причому стимуляція Ca^{2+} дихання пропорційна швидкоті транспорту катіона в мітохондрії [121]. Активація піруватдегідрогенази здійснюється завдяки збільшенню кількості активної нефосфорильованої форми ензиму через стимуляцію фосфатази піруватдегідрогенази [161]. Тоді як активація ізоцитрат- і α -кетоглутаратдегідрогеназ відбувається алостерично [32], при цьому первинним є зменшення K_m щодо субстратів.

Стимулюючий вплив Ca^{2+} на процеси окисного фосфорилування є можливим лише за мікромолярних його концентрацій у позамітохондріальному середовищі, коли транспорт не спричиняє суттєвого зменшення $\Delta\mu H$ [161]. Так як АТФ-синтаза здатна проявляти зворотну активність, то спад електрохімічного потенціалу, спричинений поглинанням Ca^{2+} , може супроводжуватись не тільки

компенсаторним активуванням дихального ланцюга, але і швидким гідролізом АТФ матриксу [161].

1.2. НАД- та ФАД-залежний шляхи окиснення субстратів

Мітохондрії є одними із депо кальцію [162], проте основна їх біологічна функція у клітині й організмі полягає в синтезі АТФ з АДФ та неорганічного фосфату [66, 152].

Реакції біологічного окиснення складають молекулярну основу тканинного дихання. Саме мітохондріальне дихання є біологічною основою утворення та акумуляції вільної хімічної енергії, яка використовується в ендергонічних процесах [9]. Окиснення субстратів відбувається шляхом дегідрування. Ферменти, які каталізують цей процес, називаються дегідрогеназами. Розрізняють дві групи дегідрогеназ: флавін- та нікотинаміддинуклеотидні.

За окиснення субстратів функцію безпосередніх акцепторів відновлювальних еквівалентів здійснюють коферменти дегідрогеназ [18]. Роль коферментів нікотинамідних дегідрогеназ виконують такі нуклеотиди: нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) та нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфат (НАДФ) [172]. Флавіновими коферментами є флавінаденіндинуклеотид (ФАД) та флавінмононуклеотид (ФМН) [79]. Ці коферменти передають електрони на подальші біохімічні акцептори, утворюючи ланцюги передавання відновлювальних еквівалентів у біологічних системах [164, 210]. Залежно від того, які дегідрогенази окислюють субстрати (ФАД-залежні чи НАД-залежні) та далі передають атоми гідрогену на коензим Q, розрізняють НАД- та ФАД-залежний шляхи окиснення субстратів [19].

1.2.1. Нікотинамідні дегідрогенази

Нікотинамідні дегідрогенази (НАД(Ф)-залежні дегідрогенази) є групою ферментів, коферментом яких є НАД [172]. Кофермент цих дегідрогеназ є акцептором гідрогену. НАД і НАДФ є коферментними формами вітаміну РР – нікотинамідну [80]. У піридинзалежних дегідрогеназ зв'язок між коферментом та білковою частиною ферменту є нестійкий, у процесі каталітичного циклу він утворюється і руйнується, і це дозволяє вважати нікотинамідні нуклеотиди більше субстратами, ніж простетичними групами [132]. Під час ферментативної реакції від субстрату відщеплюються два атоми гідрогену, один з яких приєднується до піридинового кільця у формі гідридїона, а інший надходить у реакційне середовище у вигляді протона. Відділившись від дегідрогеназ, відновлені коферменти (НАДН і НАДФН), внаслідок перенесення електронів до акцептора, зв'язаного з іншим ферментом, знову окислюються [71].

У живих клітинах НАД(Ф)-залежні дегідрогенази виконують функції анаеробних дегідрогеназ і здійснюють процес відщеплення протонів та електронів від субстратів, тим самим відновлюючи НАД чи НАДФ. Далі відновлювальні еквіваленти передаються на інші акцептори [220].

НАД-залежні дегідрогенази каталізують окислювально-відновні реакції гліколізу, циклу трикарбонових кислот, β -окислення жирних кислот, дихального ланцюга мітохондрій. **НАДФ-залежні дегідрогенази** беруть участь у процесах відновлювального синтезу, вони постачають атоми гідрогену у синтезі жирних кислот та стероїдів [220].

У клітині більша частина дегідрогеназ атоми гідрогену від субстратів переносить на НАД⁺, в свою чергу, відновлений НАДН передає електрони на дихальний ланцюг [111], при цьому звільняється енергія, яка запасується у формі АТФ [179].

1.2.2. Флавінові дегідрогенази

Флавінові дегідрогенази за своєю структурою представлені складними білками флавопротеїнами. Як простетичну групу вони містять похідне вітаміну В₂ (рибофлавіну) – ФМН або ФАД [203]. Активною частиною молекули ФАД або ФМН, яка акцептує два атоми гідрогену від субстрату, є ізоалоксазинове кільце рибофлавіну. Флавінові дегідрогенази каталізують реакції дегідрування субстратів. Внаслідок приєднання двох атомів гідрогену коферменти з окисненої форми (ФМН чи ФАД) перетворюються у відновлену (ФМНН₂ чи ФАДН₂). На відмінну від піридинзалежних дегідрогеназ коферменти ФАД та ФМН міцно зв'язані з білковою частиною і не відщеплюються від неї на жодній стадії каталітичного циклу, а також флавінові коферменти зв'язують обидва протони [201].

Розрізняють анаеробні та аеробні дегідрогенази. До анаеробних дегідрогеназ належить НАДН-дегідрогеназа, яка приймає електрони від НАДН і передає їх на більш електропозитивні компоненти дихального ланцюга мітохондрій [208]. Наступні ферменти є ФАД-залежними дегідрогеназами. Сукцинатдегідрогеназа окислює бурштинову кислоту у циклі трикарбонових кислот [17]. Гліцерол-3-фосфат-дегідрогеназа окислює гліцерол-3-фосфат у мітохондріях [155]. Наступним типом згаданих дегідрогеназ є дигідроліпоїлдегідрогеназа. Вона бере участь в окислювальному декарбоксилуванні піровиноградної кислоти [207].

Серед аеробних дегідрогеназ виділяють: дегідрогеназу (оксидаза) L-амінокислот – ФМН-залежний фермент нирок [221], ксантиноксидазу (ксантиндегідрогеназу) – окислює пурини до сечової кислоти [204] та глюкозоксидазу – рослинний фермент, який використовується для кількісного визначення глюкози в біологічних рідинах [176, 218]. Два останні білки належать до ФАД-залежних ферментів.

1.3. Ланцюг транспорту електронів

У матриксі мітохондрій є ферменти, за участю яких відбувається окиснення субстратів. У процесі біологічного окиснення здійснюється дегідрування органічних субстратів. Електрони від субстратів окиснення переносяться на кінцевий акцептор – кисень. Процес транспорту електронів можливий завдяки наявності у внутрішній мембрані мітохондрій проміжних переносників – транспортерів електронів і протонів. Ця система білків-переносників організована у вигляді ланцюга електронного транспорту, або дихального ланцюга мітохондрій [179]. Локалізація білків-переносників та коферментів у дихальному ланцюзі визначається значенням стандартного окисно-відновного потенціалу [131].

У складі дихального ланцюга мітохондрій є 4 білкові комплекси (комплекси I, II, III та IV), які забезпечують його функціонування. Також до складу комплексів входять залізо-сіркові білки, які містять іони негемового заліза (у вигляді FeS) та два рухомі переносники – убіхінон (коензим Q) і цитохром c [49]. Відновні еквіваленти вводяться в дихальний ланцюг за участю НАД- та ФАД-залежних дегідрогеназ, які окислюють відповідні субстрати [31].

Комплекс I (НАДН-дегідрогеназа) передає відновлювальні еквіваленти на убіхінон. НАДН-дегідрогеназа окислює $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$, та переносить від нього 2 електрони на убіхінон, а 4H^+ транспортує з матриксу у міжмембранний простір. [70, 212] Цей комплекс може транспортувати відновні еквіваленти за рахунок того, спочатку відбувається відновлення, а потім окиснення ФМН. Також до складу комплексу, як проміжні транспортери електронів, входять FeS-білки [122].

Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа); сукцинат; убіхінон (коензим Q)-редуктаза) є флавопротеїном, ФАД-залежною сукцинатдегідрогеназою, асоційованою з FeS-білками. Цей комплекс є додатковим шляхом для входу електронів у дихальний ланцюг за рахунок окиснення сукцинату [175]. Коензим Q

(убіхінон) акцептує протони й електрони не тільки від НАДН-дегідрогенази, а й від ФАД-залежних дегідрогеназ мітохондрій [47].

До складу комплексу III (убіхінон-цитохром *c*-оксидоредуктаза; цитохром *c*-редуктаза) входять цитохроми *b*, *c*₁ та FeS-білок. Цитохром *c*-редуктаза транспортує 2 електрони з убіхінону на цитохром *c* та забезпечує викачування 4 протонів з матриксу в міжмембранний простір [130]. У подальшому ці протони будуть використані для утворення води [69].

Цитохром *c* – водорозчинний білок з молекулярною масою 12,5 кДа, який переносить електрони між комплексами III та IV дихального ланцюга. Цитохром *c* є гемвмісним хромопротеїном (гемопропротеїном). Подібно до інших цитохромів, гемова група цитохрому *c* здатна до транспорту електронів шляхом приєднання та відщеплення одного електрона з поперемінним переходом окисної форми заліза [Fe(III)] в закисну [Fe(II)] [105].

Комплекс IV (цитохром *c* оксидаза) складається з цитохромів *a* та *a*₃, а також містить два іони міді змінної валентності (Cu⁺ – Cu²⁺). Цей комплекс транспортує 2 електрони на кисень та одночасно переносить 2 протони в міжмембранний простір. Так послідовністю цитохромів електрони з убіхінону передаються на кисень [127]. У складі цитохрому *a*₃ наявний іон заліза, який зв'язує цей кисень подібно до приєднання кисню у молекулі гемоглобіну. Кожен з атомів O₂ приєднує по 2 протони і 2 електрони – відбувається відновлення кисню до ендогенної води [188].

1.4. Цикл трикарбонних кислот і його біологічна роль

Цикл трикарбонних кислот (цикл лимонної кислоти, цикл Кребса) представлений циклічною послідовністю ферментативних реакцій, у результаті яких ацетил-КоА окислюється до двоокису карбону з утворенням атомів водню. Сам ацетил-КоА (CH₃-CO~S-КоА) є продуктом катаболізму основних видів ме-

таболічного палива (вуглеводів, жирів, амінокислот), а атоми гідрогену використовуються для відновлення нікотинамідних або флавінових коферментів [81].

Цикл трикарбонових кислот – це загальний кінцевий шлях окислювального катаболізму клітини в аеробних умовах. Реакції і ферменти циклу трикарбонових кислот локалізовані у матриксі та внутрішній мембрані мітохондрій. Робота циклу Кребса спряжена з роботою дихального ланцюга мітохондрій, завдяки якому відбувається вивільнення енергії, яка акумульована у відновних еквівалентах НАДН та ФАДН₂ [152].

Послідовність реакцій циклу трикарбонових кислот не лінійна, а циклічна. Цикл починається з конденсації двокарбонової ацетильної групи зі щавлевооцтовою кислотою (з чотирма атомами карбону). У результаті виникає лимонна кислота (з шістьма атомами карбону) [37]. Далі в реакції декарбоксилування виділяються 2 молекули СО₂ і в останній реакції циклу знову утворюється щавлевооцтова кислота [215].

1.5. Інсулін та його значення у процесах метаболізму

1.5.1. Загальна характеристика інсуліну

Інсулін – поліпептидний гормон із молекулярною масою 5,7 кДа. Його молекула складається з двох ланцюгів – А і В, які мають, відповідно, 21 та 30 амінокислотних залишків. Пептидні ланцюги сполучені дисульфідними зв'язками [42]. У різних видів тварин амінокислотний склад інсуліну різний і відрізняється від гормону людини кількома амінокислотними залишками. Найближчим за складом до людського є свинячий інсулін. Він відрізняється від людського гормону лише тим, що замість треоніну містить аланін, тому володіє меншою антигенною активністю, аніж інсуліни інших видів тварин [42].

Інсулін розчинний у воді та у 80%-ному спирті, нерозчинний у більшості органічних розчинників, руйнується нагріванням і протеолітичними фермента-

ми. Він легко полімеризується, утворюючи частинки з молекулярною масою до 48000. Високомолекулярні комплекси інсуліну містять цинк [62].

Із підшлункової залози інсулін потрапляє в кров безперервно, але рівень його секреції змінюється залежно від різних обставин та впливів. У плазмі частина інсуліну зв'язується з білком і це з'єднання називається “зв'язаним інсуліном”. З крові інсулін досить швидко переходить у тканини. Особливо інтенсивно захоплюють його скелетні м'язи [110], печінка [153] і нирки [184]. У цих тканинах відбувається інактивація інсуліну внаслідок розщеплення його молекул різноманітними протеолітичними ферментами. Сукупність таких ферментів, які утворюються в печінці, називаються інсуліназою. Частина інсуліну виводиться з організму зі сечею [184].

Широкий діапазон біологічної дії інсуліну зумовлює досить ефективне його застосування при різних захворюваннях. Зокрема, це основний і специфічний засіб при лікуванні цукрового діабету [57, 123, 206, 211]. Крім того, у медичній практиці його використовують як препарат, який стимулює обмін речовин, зокрема, процеси біосинтезу білків [199], глікогену [60], ліпідів [187], а також для посилення репаративних процесів, зокрема, після травм, при опіках тощо [98, 139].

1.5.2. Молекулярні механізми дії інсуліну

Молекулярні основи біохімічних та фізіологічних ефектів інсуліну залишаються не повністю розшифрованими [118]. Рецептори для інсуліну локалізовані у мембранах гормоночутливих клітин. Вони суттєво відрізняються від рецепторів для білково-пептидних гормонів як за структурною організацією, так і за механізмами трансдукції гормонального сигналу. Інсулінові рецептори мають спільні принципи біохімічної організації та функціонування з рецепторами пептидних факторів росту. Вони отримали назву рецепторних тирозинкіназ

[104]. Цей клас рецепторів поєднує у собі функції як самого рецептора, так і трансдуктора [192].

Для деяких тканин характерний феномен надлишкової продукції інсуліну. Він полягає у тому, що максимальний біологічний ефект реєструється при взаємодії гормону лише з 2–5 % ділянок, які знаходяться на поверхні клітин і зв'язують інсулін. Надлишок рецепторів дозволяє клітині реагувати на гормон навіть при відносно низьких його концентраціях. Однак, гепатоцити володіють невеликим надлишком рецепторів інсуліну [41].

За своєю молекулярною організацією рецептори інсуліну є гетеродимерами, обидві субодиниці яких є глікозильованими. α -Субодиниця розташована ззовні клітини і містить інсулін-зв'язуючі ділянки; β -субодиниця є трансмембранним білком, цитозольний домен якого має тирозинкіназну активність [104].

1.5.3. Гормональна активність інсуліну та наслідки її порушення

Основне фізіологічне значення інсуліну полягає у регуляції вуглеводного обміну [78, 100, 197]. А, отже, цукровий діабет – хвороба, пов'язана з порушенням синтезу, секреції інсуліну чи реактивності інсулінових рецепторів [113, 125] – характеризується стійкою гіперглюкоземією, порушеннями вуглеводного обміну та метаболічно зв'язаних з обміном глюкози перетворень ліпідів і амінокислот [159].

Метаболічні процеси, які відбуваються у печінці, жировій тканині та м'язах, контролюються інсуліном і його антагоністами: глюкагоном, катехоламінами, глюкокортикоїдами і гормонами росту [174, 222]. Як правило, при підвищенні концентрації інсуліну, секреція його антагоністів пригнічується, і, навпаки, при дефіциті інсуліну виникає тенденція до підвищення кількості антагоністів. Надлишок інсуліну також небезпечний для організму. Він зумовлює анаболічні процеси, такі як синтез глікогену, жирних кислот і триацилгліцери-

лів, а також синтез білка [51]. У той же час підвищена кількість антагоністів полегшує катаболічні процеси, тобто гідроліз триацилгліцеролів, окислення жирних кислот, ектогенез, протеоліз, глікогеноліз.

Виділяють 4 групи біологічних ефектів інсуліну: 1) дуже швидкі (секундні) – гіперполяризація мембран деяких клітин, зміна мембранного транспорту глюкози й іонів [133]; 2) швидкі (хвилинні) – активація та гальмування багатьох ферментів, що веде до переважання деяких анаболічних процесів, наприклад, глікогенезу, ліпогенезу і синтезу білка; одночасно відбувається інгібування катаболічних процесів [187]; 3) повільні (від хвилини до декількох годин) – підвищене поглинання амінокислот клітинами, вибіркова індукція чи репресія синтезу ферментів [138]; 4) найповільніші (від годин до днів) – мітогенез і розмноження клітин [141, 198].

За недостатньої секреції інсуліну знижується здатність тканин використовувати глюкозу. Розвивається захворювання – цукровий діабет [205]. При цьому спостерігаються різного роду біохімічні порушення. Їх класифікують так:

1. *Гіперглікемія* (при цукровому діабеті) виникає внаслідок: підвищення надходження глюкози у кров з печінки (розпад глікогену); порушення поглинання глюкози тканинами, активація глюконеогенезу у разі припинення інгібуючої дії інсуліну на синтез ключових ензимів глюконеогенезу, посилення секреції глюкокортикоїдів, які стимулюють активність ферментів глюконеогенезу в печінці та нирках [126, 166].

2. *Глюкозурія та поліурія*, які зумовлені порушенням здатності ниркових каналців до реабсорбції глюкози [85].

3. *Кетонемія та кетонурія*, які виникають, оскільки дефіцит глюкози у клітинах призводить до інтенсивнішого використання ліпідів, як джерела енергії. Зростає ліполіз, ацетил-КоА не цілковито розщеплюється у циклі трикарбонових кислот – частина його витрачається на синтез кетонових тіл (β -

оксималяна, ацетооцтова кислоти, ацетон). Унаслідок цього кетосполуки з'являються у плазмі (кетонемія) і в сечі (кетонурія) [140].

4. Кетосполуки спричиняють *метаболичний ацидоз* [216].

Всі ефекти інсуліну відтворюються при його дії в різних концентраціях і виникають у різний час після введення гормону. Така гормональна дія інсуліну зумовлена певними біохімічними механізмами.

1.5.3.1. Вплив інсуліну на обмін вуглеводів

Вплив інсуліну на обмін вуглеводів реалізується кількома шляхами:

1 Стимуляція транспорту глюкози з екстрацелюлярного простору через плазматичні мембрани всередину клітини. Такий ефект спостерігається здебільшого в клітинах м'язів, адипоцитах жирової тканини та лімфоцитах [72, 115, 195]. Він є основною причиною дуже швидкого зниження глюкоземії після ін'єкції інсуліну. Але інсулін не впливає на мембранний транспорт глюкози в гепатоцитах, клітинах головного мозку, нирок, оскільки стимуляція поглинання глюкози цими тканинами при дії інсуліну спричиняється активацією гормоном швидкої внутрішньоклітинної утилізації глюкози [191].

2. Сприяння утилізації глюкози в м'язах, печінці, жировій тканині тощо через гліколіз, пентозофосфатний шлях та синтез глікогену:

– стимуляція гліколізу в гепатоцитах відбувається за рахунок активації інсуліном синтезу (індукції) глюкокінази – ферменту, який перетворює глюкозу на глюкозо-6- фосфат [145], а також фосфофруктокінази та піруваткінази;

– стимуляція пентозофосфатного шляху глюкози відбувається завдяки активації глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназної реакції [119] (цей ефект інсуліну особливо важливий для жирової тканини та печінки, бо створює метаболічні умови, сприятливі для ліпогенезу);

– інсулінзалежна стимуляція глікогенезу зумовлюється такими ферментативними механізмами, як: а) збільшення глюкокіназної активності, що призво-

дить до додаткового утворення глюкозо-6-фосфату, який може перетворюватися на глюкозо-1-фосфат [146]. Він є безпосереднім субстратом глікогонеу; б) активація глікогенсинтази: інсулін сприяє переходу ферменту в дефосфорильовану – активну форму [129] (ефект зумовлений зниженням під впливом інсуліну рівня цАМФ внаслідок активації фосфодіестерази циклонуклеотидів і, відповідно, зменшення активності протеїнкінази, яка фосфорилує глікогенсинтазу [200]); в) зменшення активності глікогенфосфорилази (що також зумовлено падінням концентрації цАМФ і активності відповідної протеїнкінази). Сукупність цих (б, в) метаболічних ефектів інсуліну спрямована на запасання глікогену в тканинах [167] (анаболічна дія гормону).

3. Гальмування процесів глюконеогенезу в печінці: інсулін призводить до інгібування синтезу глюконеогенних ферментів – фосфоенолпіруваткінази, фруктозо-1,6- дифосфатази, глюкозо-6-фосфатази – цей процес є повільнішим (порівняно із впливом інсуліну на транспорт глюкози, гліколіз та глікогенез) і потребує для свого прояву декілька годин [36, 97].

Отже, якщо немає інсуліну, або його недостатньо, то фосфорилування і засвоєння глюкози затримується, що призводить до нагромадження цукру в крові та виведення його зі сечею.

1.5.3.2. Роль інсуліну в обміні ліпідів

Інсулін характеризується стимуляцією анаболічних шляхів, ліпідного обміну і збільшеним депонуванням нейтральних жирів у клітинах, що проявляється здебільшого в жировій тканині та печінці [116]. Ліпогенні ефекти інсуліну зумовлені такими біохімічними механізмами:

1) активацією синтезу вищих жирних кислот за рахунок збільшення притоку відповідних субстратів: ацетил-КоА та НАДФН, які утворюються при метаболізмі глюкози;

2) активацією синтезу триацилгліцеролів із жирних кислот та гліцерил-3-фосфату, який також постачається у збільшеній кількості при гліколітичному розщепленні глюкози (утворюється з діоксіацетонфосфату в гліцерил-3-фосфатдегідрогеназній реакції) [160];

3) гальмуванням ліполізу в адипоцитах, що зумовлено зменшенням концентрації цАМФ, необхідного для активації тригліцеридліпази та протидією ліполітичному впливу катехоламінів і глюкагону [101].

Згідно із вище зазначеними фактами, цукровий діабет характеризується активацією тригліцеридліпази жирової тканини, утворенням кетонів тіл (кетогенезом) та виникненням при некомпенсованій течії захворювання кетоацидозу. Утворені кетонів тіла дифундують у кров і використовуються поза печінковими тканинами як джерела енергії. У печінці відбувається активне окислення жирних кислот і кетонів тіла утворюються у значних кількостях. При цьому ацетоацетат неферментативно декарбоксилюється, що супроводжується утворенням ацетону, тому для кетозу характерний запах ацетону у видихуваному повітрі [216].

Окрім цього, оскільки інсулін зменшує в печінці утворення основних транспортерів триацилгліцеролів та холестерину – ліпопротеїдів низької щільності та ліпопротеїдів дуже низької щільності, цукровий діабет II типу характеризується розвитком атеросклерозу й ожиріння [68].

1.5.3.3. Вплив інсуліну на обмін амінокислот і білків

Найбільше дія інсуліну на амінокислотний і білковий обмін виражена у м'язах, печінці, нирках, сполучній тканині. Вона має анаболічний ефект і характеризується :

1) стимуляцією транспорту нейтральних амінокислот через плазматичні мембрани (цей ефект найбільше виражений у м'язах);

2) активацією процесів рибосомальної трансляції, синтезу рРНК і деяких мРНК (у м'язах, печінці, нирках, сполучній тканині) [75].

При нестачі синтезу інсуліну порушується надходження амінокислот у клітини і ускладнюється білковий синтез. Порушуються імунологічні властивості організму, у зв'язку з чим погано заживають рани, розвиваються гнійні процеси [90].

1.5.3.4. Участь інсуліну у процесах клітинного росту

Інсулін володіє ростостимулюючими властивостями, які пов'язані як зі стимуляцією надходження у клітини енергетичних і пластичних субстратів для росту (глюкози, жирних кислот, амінокислот), так і з безпосереднім активуючим впливом на біосинтез (реплікацію) ДНК. Інсулін здійснює позитивний вплив на проліферацію тваринних клітин у культурі, подібний до дії пептидних факторів росту – фактора росту епідермісу, фактора росту фібробластів, тромбоцитарного фактора росту, біологічні ефекти яких також підсилюються інсуліном [151].

1.5.3.5 Цукровий діабет як наслідок патологічних змін гормональної активності інсуліну

Дефіцит інсуліну зумовлює розвиток найпоширенішого ендокринного захворювання – цукрового діабету. Цукровий діабет – це хвороба, яка характеризується генетично детермінованим або відносним дефіцитом гормону підшлункової залози – інсуліну. В основі розвитку цукрового діабету лежить зниження продукції інсуліну в β -клітинах острівцевого апарату залози або нездатність відповідних клітинних рецепторів реагувати на інсулін. Оскільки виникає дефіцит інсуліну, рівень глюкози значно підвищується [63].

Глюкоза необхідна людському організму, оскільки є головним джерелом енергії. Але постійно підвищений рівень глюкози, який спостерігається при діабеті, викликає пришвидшене старіння організму і збільшується ризик виникнення ускладнень, до яких належать інфаркти, інсульти, тяжкі ураження нирок (нефропатія, ниркова недостатність), сліпота, ураження нервів і судин тощо [33]. Виявлені значні порушення у системі кровообігу, зокрема, напруження кисню в артеріальній крові є значно нижчим від норми, знижений є також і вміст гемоглобіну [202]. У середньому віці у хворих на цукровий діабет спостерігаються симптоми тканинної гіпоксії .

За етіопатогенетичними чинниками розрізняють спонтанний і вторинний цукровий діабет. Спонтанний цукровий діабет спостерігається найчастіше. Розрізняють два його типи, різні за етіологією та патогенезом:

1. Інсулінозалежний цукровий діабет I типу – розвивається внаслідок руйнування значної кількості (до 90%) секретуючих інсулін β -клітин. Інсулінозалежний діабет складає приблизно 5–10% всіх випадків [64]. Він проявляється гіперглікемією і схильністю до кетонемії та кетоацидозу. Ця форма цукрового діабету розвивається звичайно в ранньому віці (до 30 років), найчастіше у дітей та підлітків [33].

2. Інсулінонезалежний цукровий діабет II типу – форма, за якої у більшості хворих зберігаються β -клітини в інсулярній частині підшлункової залози, але порушені специфічні реакції клітин на дію інсуліну або регуляція його секреції під впливом збільшеної концентрації глюкози крові [59]. Такий тип розвивається звичайно у дорослих (осіб після 30 років) та осіб похилого віку і проявляється гіперглікемією та ожирінням.

Точна причина виникнення діабету I типу й досі не з'ясована. Відомо, що у більшості людей з таким типом власна імунна система їх організму помилково знищує острівці Лангерганса, які виробляють інсулін у підшлунковій залозі.

Тобто, у цьому випадку діабет – автоімунне захворювання. Певну роль у цьому процесі відіграє генетична схильність, а також деякі віруси [35].

Діабет II типу дуже рідко діагностується на початкових стадіях, оскільки гіперглікемія розвивається поступово і хворі роками не відчують змін у самопочутті [64].

Майже завжди цукровий діабет буває “первинним”. Проте також є таке поняття, як «вторинний» цукровий діабет, який супроводжує певні захворювання, стани та синдроми. Зокрема, це хвороби підшлункової залози, наприклад, панкреатит, гемохроматоз, пухлини тощо; гормонально активні пухлини органів ендокринної системи – акромегалія, глюкагонома, синдром Кушинга; ускладнення, викликані прийомом лікарських препаратів, наприклад, діаксозиду та глюкокортикоїдів, особливо у великих дозах; генетичні порушення проінсуліну та інсуліну; генетичні синдроми, наприклад спадкове захворювання Прадера-Уіллі тощо. Проте у цих випадках діабет як наслідок виникає рідко.

Окремо виділяють так званий гестаційний діабет, який виникає під час вагітності. У цьому випадку діагностують підвищення рівня глюкози, який в більшості після народження дитини повертається до норми [63].

1.5.3.6 Особливості цукрового діабету I типу

Цукровий діабет I типу – автоімунне захворювання, для якого властиве поступове руйнування β -клітин підшлункової залози із наступним розвитком стійкої нестачі інсуліну. У більшості випадків процес руйнування β -клітин поступовий і повільний, і лише коли 80–95 % їх гине, розвивається абсолютний дефіцит інсуліну з тяжкими метаболічними розладами. При цьому важливу роль відіграє генетично зумовлена низька здатність цих клітин до регенерації. Поєднання зовнішніх несприятливих чинників і спадкової схильності запускає автоімунну реакцію проти клітин Лангерганса у генетично чутливих осіб [35].

У нормі після їди рівень глюкози в крові підвищується, що призводить до виходу інсуліну з підшлункової залози. У людини з цукровий діабет I типу у зв'язку з недостатнім рівнем інсуліну глюкоза не може бути використана, як джерело енергії. Тому організму хворого доводиться використовувати жир і м'язи, а це, в свою чергу, призводить до втрати ваги. Тому одним зі симптомів цукрового діабету I типу є зменшення маси тіла [63].

Після того як розвинувся діабет I типу, не існує способу відновити зруйновані клітини підшлункової залози, які виробляють інсулін. Спроби пересадити нормальну підшлункову залозу або лише її β -клітини, ще перебувають на стадії експерименту [143]. Тому лікування від діабету цього типу інсуліном є обов'язковим протягом усього життя хворого.

Найбільш характерним клініко-біохімічним проявом цукрового діабету є збільшення рівня глюкози в крові натщесерце або після прийому їжі, який перевищує значення, характерні для фізіологічної, так званої аліментарної гіперглюкоземії, досягаючи значень 500 мг% і більше. При легких формах захворювання гіперглюкоземія не спостерігається в постабсорбтивному стані і виявляється лише за умов визначення толерантності організму до глюкози, яке здійснюється шляхом “цукрового навантаження” [147].

Важливо відзначити, що рівень цукру може бути підвищений і в тих осіб, у яких немає цукрового діабету. Це стосується людей, які отримали травму, зазнавали тяжких хірургічних операцій, пацієнтів, які хворіють грипом, ГРВІ, пневмонією, ангіною чи іншими гострими захворюваннями. Окрім цього, підвищує рівень глюкози прийом деяких лікарських препаратів [54, 108].

У разі зростання рівнів глюкоземії більше 180 мг% (це “нирковий поріг” для глюкози), вона починає виводитися зі сечею – глюкозурія. Важкі форми некомпенсованого цукрового діабету супроводжуються значними порушеннями ліпідного обміну, як вже зазначалося – кетонемією та кетонурією. Також відбу-

вається підвищення катаболізму білків і амінокислот із розвитком азотемії та азотурії.

На даний час в багатьох країнах світу проводяться численні дослідження, пов'язані з лікуванням цукрового діабету. Є певні перспективи у застосуванні нікотинаміду, здатного попередити розвиток інсулінозалежного цукровий діабет у посередництві зі зміною функцій макрофагів [25].

1.6. Біологічна роль таурину в тваринному організмі

Таурин був виділений в 1827 р. з бичачої жовчі, у зв'язку з чим і отримав свою назву: “taurus” у перекладі з латинської мови означає “бик”. Ця амінокислота представлена в тваринному організмі у вигляді вільної незв'язаної форми або в поєднанні з жовчними кислотами. Особливої уваги до таурину не було, поки дослідники не встановили, що ця речовина регулює внутрішньоклітинний рівень кальцію в серці [65, 124, 148, 190]. Було також виявлено, що у деяких тварин, наприклад кішок, нестача таурину в їжі призводить до смерті [96, 120]. Показано, що таурин одночасно є потужним антиоксидантом, мембраностабілізатором, регулятором іонних потоків, біоенергетиком, детоксикатором, попереджає передчасну загибель клітин [40, 91].

Одна з основних функцій таурину – участь у синтезі жовчних кислот. Він прискорює утворення таурохолевої кислоти, активуючи гени, відповідальні за синтез ензиму 7-альфа гідроксилази. Жовч складається в основному з холестерину. Жовчні (холева) кислоти сприяють засвоєнню жирів і полегшують перетравлення ліпідів травними ензимами. Таурин у складі жовчних (таурохолевих) кислот виводить холестерин з організму, знижуючи його концентрацію в крові. Таурин знижує також синтез і секрецію тригліцеридів гепатоцитами і зменшує атерогенний індекс (відношення ліпопротеїдів низької щільності до ліпопротеїдів високої щільності), запобігає накопиченню черевного жиру, який вважається найбільш небезпечним для здоров'я, зменшує ін-

сулінорезистентність. Всі перераховані ефекти сприяють профілактиці серцевих захворювань і діабету [52].

Таурин, проявляючи антиоксидатну дію, захищає організм від порушень з боку міокарда і судин. У результаті боротьби з інфекціями імунні клітини вивільняють вільні радикали – нестабільні кисневі метаболіти, які знищують клітинні мембрани чужорідних мікроорганізмів і вбивають їх. Але ті ж вільні радикали здатні пошкоджувати і власні тканини тварини. При нормальному рівні таурину в організмі він сприяє зменшенню надлишку вільних радикалів [93].

Таурин знижує артеріальний тиск, нівелює негативний вплив надмірного споживання солі. Він захищає серце ще й тим, що впливає на осмотичний тиск, який може порушуватися при зміні електролітного складу. Надлишок кальцію може швидко призвести до некротичних змін у клітині – цьому протистоїть таурин. Крім того, таурин регулює баланс натрію і калію в серцевих волокнах, підтримуючи тим самим роботу серця [107].

За даними епідеміологічних досліджень, був виявлений зв'язок між споживанням таурину з їжею (а це в основному рибна дієта і споживання морських продуктів) і смертністю від коронарних захворювань серця – чим більше людина споживає таурину, тим меншою є імовірність летального результату, причиною якого можуть бути порушення з боку серцево-судинної системи [214].

Таурин – необхідний елемент живлення. Регулярне споживання таурину – це профілактика великої кількості захворювань, які виникають при дефіциті цієї сульфоамінокислоти. Існують випадки, при яких необхідно споживати додаткову кількість таурину. Так, наприклад, критичним є момент, коли міокард втрачає таурин і одночасно знижується його концентрація в крові. У людини ризик розвитку подібних подій може виникнути за умов серцевої недостатності або опромінення великими дозами радіації. Дефіцит таурину в

організмі спостерігається також при цукровому діабеті. Прийом таурину в таких випадках дозволяє стабілізувати перебіг хвороби, уникнути несприятливого результату і збільшити тривалість життя [117].

У 25 % людей чутливість організму до інсуліну знижена, тому підшлункова залоза змушена виробляти підвищену кількість гормону. Інсулінорезистентність – одна з причин виникнення метаболічного синдрому, для якого характерні також відкладення жиру, підвищений рівень ліпідів і холестерину в крові та інші порушення обміну речовин. Відомо, що метаболічний синдром є основним фактором ризику розвитку серцево-судинних захворювань, таких як гіпертонічна хвороба, ішемічна хвороба серця, атеросклероз судин нижніх кінцівок, хронічна ішемічна хвороба, захворювання органів травлення [177]. Таурин відіграє значиму роль у терапії вище вказаних захворювань [106]. При серцево-судинній недостатності його прийом сприяє зменшенню застійних явищ в малому і великому колі кровообігу, знижує внутрішньосерцевий діастолічний тиск, збільшує скоротливість міокарда (підвищує максимальну швидкість скорочення і розслаблення, поліпшує індекси скоротливості і релаксації) [219].

За даними кількох клінічних досліджень, таурин здатний ефективно знижувати рівень глюкози в крові у хворих з цукровим діабетом II типу як до прийому їжі, так і після нього. При монотерапії таурином цукрового діабету II типу 20–30% пацієнтів досягали ідеальної компенсації вуглеводного обміну. У низки пацієнтів, які спочатку отримували комбіновану терапію цукро-знижувальними препаратами з таурином, через три місяці лікування спостерігалось достовірне зниження рівня глюкози в крові через дві години після їди. Зниження глікемії під впливом таурину поєднувалось зі зменшенням резистентності до інсуліну, причому, чим вище були вихідні порушення, тим виразніше була позитивна динаміка [50].

Таурин необхідний для обміну речовин кожній клітині будь-якого органу. У цьому сенсі він незамінний. Існує велика потреба у таурині для нормального розвитку людини, починаючи з внутрішньоутробного періоду і до похилого віку [56]. Після пологів концентрація таурину в жіночому молоці протягом вже першої доби зростає в кілька разів. Після того як було встановлено, що відсутність таурину при штучному вигодовуванні немовлят призводить до порушення розвитку м'язів і центральної нервової системи [83, 180], в молочні суміші стали додавати таурин.

Таурин покращує показники скоротливості міокарда і гемодинаміку. На тлі його прийому зникає задишка у денний і нічний час. Хворі відзначають зникнення болів у ділянці серця, збільшення працездатності. Терапія таурином веде до поступової нормалізації артеріального тиску і зниження маси тіла, причому останній показник є чи не найважливішим у терапії цукрового діабету, ускладненого серцево-судинними захворюваннями. Так застосування таурину як у моно-, так і в поєднаній терапії при цукровому діабеті та серцевій недостатності приводить до нормалізації вуглеводного і жирового обміну, що значно покращує перебіг цих захворювань [106].

Таурин міститься у яйцях, рибі, м'ясі, молоці, але не зустрічається в білках рослинного походження [196]. Він синтезується з цистеїну в печінці і з метіоніну в інших органах і тканинах організму, за умови достатньої кількості вітаміну В₆. При генетичних або метаболічних порушеннях, які заважають синтезу таурину, потрібен прийом біологічно активних добавок з цією амінокислотою. Позитивний ефект таурину виявлено також при неалкогольній жировій хворобі печінки (гепатити, цироз печінки та ін.) [136].

Підсумок. Процеси енергозабезпечення та Ca²⁺-сигналювання багатьох типів клітин є детально вивченими, але дослідження залежності дихання мітохондрій *in situ* гепатоцитів від Ca²⁺ за різних функціональних станів організму і досі залишається актуальним.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Методи роботи із піддослідними тваринами

2.1.1. Умови утримання лабораторних тварин

Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні.

2.1.2. Групи піддослідних тварин

Досліди виконували використовуючи нелінійних статевозрілих щурів-самців масою 180–250 г (для розробки моделі пермеабілізованих гепатоцитів, у серії досліджень короткотермінового впливу інсуліну на процеси їх енергозабезпечення, при встановленні особливостей дихання клітин печінки за умов стрептозотоциніндукованого діабету); нелінійних щурів-самців масою 280–360 г (у серії дослідів, які стосувались вивчення довготривалої дії інсуліну на дихання гепатоцитів); щурів-самців лінії Wistar, масою 180–210 г (у експериментах щодо довготривалого введення таурину).

2.1.3. Основні засади поводження із піддослідними тваринами

Декапітацію здійснювали у лабораторії, ізольовано від інших щурів. Тварин наркотизували діетиловим ефіром, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко 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”.

2.1.4. Моделювання тривалого впливу таурину

Для дослідження впливу таурину на процеси дихання гепатоцитів за тривалої його дії, дослідним тваринам впродовж 28-діб щоденно внутрішньошлунково через зонд вводили водний розчин таурину (40 мг/кг маси), а контрольним – воду (рис. 2.1).

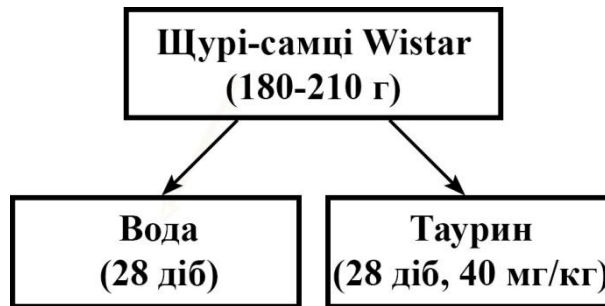


Рис. 2.1. Схема дослідження для моделювання тривалого впливу таурину

2.1.5. Моделювання гіперінсулінемії

З метою дослідження процесів дихання гепатоцитів за умов гіперінсулінемії, тваринам дослідної групи одноразово, або впродовж шести чи дванадцяти днів щоденно в той самий час вводили інсулін МОНОДАР-Б (0,5 од. на 100 г маси тварини) внутрішньочеревно. Контрольним щурам внутрішньочеревно вводили 0,9% водний розчин NaCl (125 мкл). За одноразового введення інсуліну тварин декапітували через 4 год після ін'єкції, а за тривалого – на 7-му чи 13-ту добу (після шестиденного і дванадцятиденного введення відповідно). Ін'єкцію виконували швидко стерильним інсуліновим шприцом. У експериментах *in vitro* ізольовані гепатоцити інкубували протягом 15 хв у базовому середовищі, що містило інсулін МОНОДАР-Б у концентрації (20 нмоль/л).

Тест толерантності до глюкози проводили, вводячи внутрішньочеревно глюкозу (3 мг/г маси тіла), розчинену у 2 мл 0,9% розчину NaCl. Перед тестом тварин не годували протягом 12 годин. Тест розпочинали в один і той самий час доби (о 8 год ранку). Концентрацію глюкози у крові вимірювали за допомо-

гою глюкометра *One Touch Ultra Easy*, до та через 30, 60, 90 і 120 хв після початку тесту.

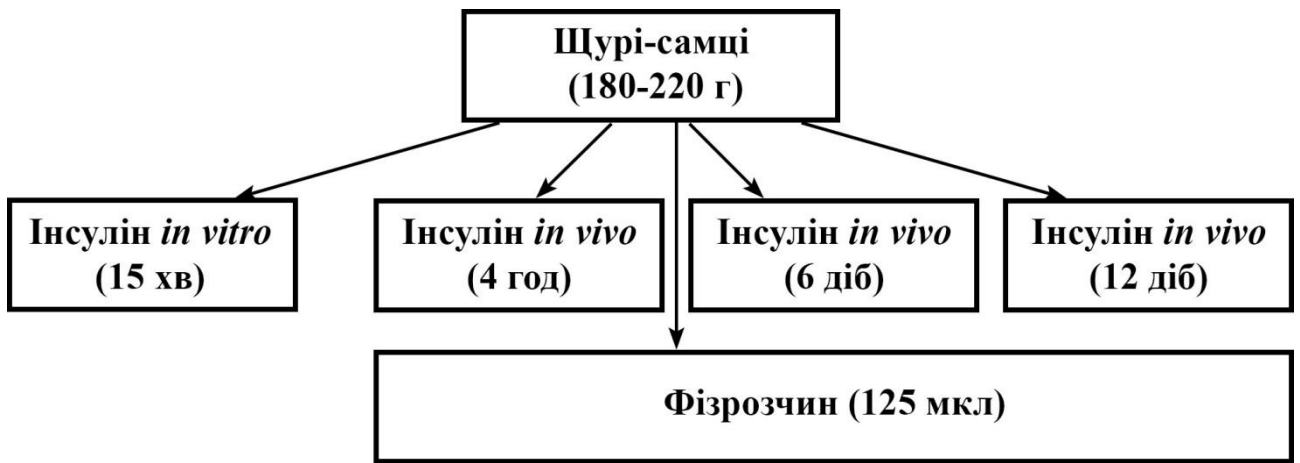


Рис. 2.2. Схема дослідження для моделювання гіперінсулінемії

2.1.6. Моделювання стрептозотоциніндукованого цукрового діабету

У серії експериментів на діабетичних щурах тварин було поділено на контрольну та дослідну групи. Щурам дослідної групи внутрішньоочеревинно вводили стрептозотин (50 мг/кг; 1 мл), а тваринам контрольної групи – фізіологічний розчин (1 мл) (рис.2.3).

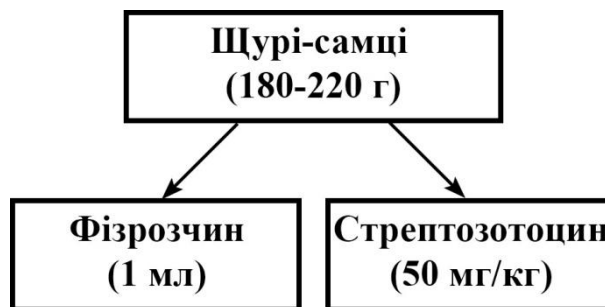


Рис. 2.3. Схема дослідження для моделювання стрептозотоциніндукованого діабету

Розвиток цукрового діабету контролювали за вмістом глюкози у крові, який визначали глюкозооксидазним методом із використанням стандартного набору реактивів (Філісіт-Діагностика, Україна) на 3-тю та 14-ту добу після

введення стрептозотоцину. Для подальших досліджень використовували тварин, рівень глюкози у крові яких становив не менше 14 ммоль/л (після 18-годинного голодування). На 15-у добу експерименту, після наркотизації дієтичним ефіром, тварин декапітували та швидко виділяли печінку.

2.2. Методика ізолювання гепатоцитів

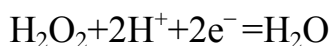
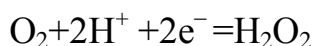
Гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена [193]. Відразу після декапітації тварини печінку виділяли та перфузували безкальцієвим зовнішньоклітинним розчином для відмивання від крові. Наступним етапом була рециркуляторна перфузія печінки протягом 10–15 хв розчином колагенази (120 од./мл). Після завершення руйнування колагенового матриксу з метою вимивання колагенази печінку послідовно промивали базовим зовнішньоклітинним розчином. Для забезпечення безперервної перфузії печінки було сконструйовано спеціальну установку, під'єднану до ультратермостата, аератора та перистальтичної помпи. Всі вище перелічені процедури проводили при 37 °С. Швидкість потоку розчинів була постійною і становила приблизно 20 мл/хв. Зважаючи на здатність колагенази до автопротеолізу, її розчиняли безпосередньо перед дослідом.

Після перфузії печінку поміщали у базовий зовнішньоклітинний розчин та ізолювали гепатоцити легким піпетуванням. Суспензію фільтрували від згустків клітин через нейлоновий фільтр та тричі центрифугували при 50 g для вилучення метаболітів, залишків позаклітинного матриксу та пошкоджених клітин. Для перевірки цілісності плазмалеми 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.

Щоб оцінити здатність мітохондрій гепатоцитів підтримувати мембранний потенціал, 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. Флуоресценція родаміну 123 в пермеабілізованих гепатоцитах свідчить про функціональну активність мітохондрій (здатність зберігати мембранний потенціал) та інтактність їх внутрішньої мембрани.

2.3. Полярографічне вимірювання інтенсивності дихання біологічних суспензій

Метод базується на реєстрації електрохімічного відновлення фізично розчиненого кисню на катоді при накладанні потенціалу 0,6–0,7 В:



Величина струму, який при цьому виникає є прямо пропорційною до кількості молекул кисню, які дифундують до контактної поверхні вимірювального катода. Якщо у замкнутому об'ємі полярографічної комірки є споживачі кисню (наприклад, клітини), то за зменшенням концентрації кисню в цьому об'ємі можна обчислити швидкість дихання [4].

Величину дифузного струму реєстрували за допомогою полярографічної установки, зібраної на базі закритого електрода Кларка, кисневого монітора YSI5300, самописця КСП-4 або мультиметра UT-60E, магнітної мішалки для розмішування суспензії та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл.

Частина експериментів проведена з використанням самописця КСП-4. При цьому реєстрація зміни напруження кисню у суспензії гепатоцитів була виконана на міліметровий папір. Для обчислення інтенсивності споживання кисню клітинами печінки спершу визначали тангенс кута α нахилу кривої запису,

потім множили його на коефіцієнт напруження кисню у полярографічній комірці, який розраховували окремо для кожного дня досліду. Після цього отриманий показник ділили на кількість живих клітин у кожній пробі.

При використанні мультиметра UT-60E дані щодо змін напруження кисню у суспензії гепатоцитів автоматично знімалися з кисневого монітора щосекунди і передавалися на носії оперативної пам'яті комп'ютера через роз'єм RS-232, а дослідник мав змогу їх спостерігати у реальному часі на екрані монітора. Збереження показників напруження кисню у мВ відбувалось у вигляді файлу програми Microsoft Office Excel. У цій же програмі і виконувалось подальше опрацювання результатів досліджень. При цьому тангенс кута α нахилу кривої полярографічного запису розраховували за рівнянням лінії тренду певної ділянки. Потім обчислювали швидкість споживання кисню суспензією клітин виконуючи ті самі кроки, що і за використання самописця.

За допомогою полярографічного методу ми реєстрували дихання цілісних і пермеабілізованих гепатоцитів.

2.4. Методика дослідження дихання ізольованих інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів

Ми адаптували методику вимірювання споживання кисню мітохондріями *in situ* для гепатоцитів. Спочатку ми реєстрували дихання інтактних гепатоцитів. Проте за умов цілісності плазматичної мембрани гепатоцитів неможливо детально вивчити процеси окисного фосфорилування мітохондрій, оскільки мембрана непроникна для екзогенних субстратів [10, 99]. Тому ми пермеабілізували клітини дигітоніном, який утворює комплекси з холестеринем плазматичної мембрани, внаслідок чого у мембрані виникають своєрідні “пори”. Пермеабілізацію здійснювали у внутрішньоклітинному розчині впродовж 10 хв за температури 37 °C.

Споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами 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) при температурі 37 °С. Дихання стимулювали додаванням АДФ (концентрація у полярографічній комірці 750 мкмоль/л). Така висока концентрація була вибрана для перевищення внутрішньоклітинної концентрації АДФ. Для оцінки максимальної окисної здатності мітохондрій до полярографічної комірки вносили динітрофенол (0,1 ммоль/л).

Досліджуючи кінетичні параметри процесів дихання пермеабілізованих клітин печінки субстрати додавали до суспензії гепатоцитів, яка вже містила АДФ, у наростаючих концентраціях: піруват – 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,35, 1, 3 і 5 ммоль/л; сукцинат – 0,1, 0,2, 0,35, 1, 3, 5 ммоль/л. Окиснення пірувату досліджували на фоні малату (1 ммоль/л). Сукцинат додавали у полярографічну комірку або на фоні ротенону (10 мкмоль/л), або без нього.

За даних умов досліду неможливо трактувати результати з точки зору класичних станів за Чансом [49], оскільки у пермеабілізованих гепатоцитах, на відміну від ізольованих мітохондрій, є досить високі концентрації АДФ та ендогенних субстратів. У дослідженнях на пермеабілізованих гепатоцитах ми реєстрували швидкості дихання за трьох метаболічних станів клітин:

1) дихання на ендогенних субстратах окислення за відсутності екзогенного АДФ. За цих умов швидкість дихання мала і лімітується кількістю ендогенних субстратів окислення, а не рівнем АДФ у клітині, оскільки його концентрація є досить високою.

2) до пермеабілізованих гепатоцитів додають екзогенний субстрат. Швидкість дихання зростає порівняно із попереднім станом і лімітується або концентрацією АДФ у клітині, або активністю ферментів циклу трикарбонових кислот і дихального ланцюга.

3) крім екзогенного субстрату, до середовища інкубації додають АДФ. Якщо його концентрація значно перевищує цитозольну, швидкість дихання зростає до субмаксимальних величин і обмежується лише функціональним станом ферментів циклу трикарбонових кислот і дихального ланцюга.

Досліджуючи дихання пермеабілізованих гепатоцитів необхідно мати на увазі, що воно складається не лише з мітохондріального, а й з мінорних мікросомального та ядерного.

2.5. Методи визначення активності ензимів

З метою більш повного аналізу оксигензалежних процесів у мітохондріях гепатоцитів щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом визначали показники активності ензимів системи антиоксидантного захисту, сукцинатдегідрогенази, а також вміст ТБК-реактивних продуктів (малонового діальдегіду).

2.5.1. Визначення активності супероксиддисмутази

Активність СОД у тканині печінки визначали за методом В.А. Костюка, А.І. Потаповича, Ж.І. Ковальнової [21]. Він ґрунтується на окисненні кверцетину (вітаміну Р), який знебарвлюється внаслідок взаємодії з супероксидним радикалом. Реакцію окислення кверцетину реєстрували спектрофотометрично. Використані реактиви: ЕДТА (0,08 мМ); N,N,N,N-тетраметилетилендіамід (ТЕМЕД); 0,1 моль/л фосфатний буфер; кверцетин. Для визначення активності супероксиддисмутази тваринний матеріал гомогенізували в 0,25 моль/л сахарозному буфері (рН 7,8) й екстрагували впродовж 30 хв при кімнатній температурі. Супернатант, отриманий після центрифугування (20 хв, 4500 g), додавали до інкубаційного середовища, що містило 0,33 моль/л ЕДТА, 0,4 моль/л нітросиній тетразолій, 0,01 моль/л феназинметсульфат та 0,8 моль/л НАДФН.

Оптичну густину розчину вимірювали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм. Активність СОД виражали в міжнародних одиницях.

2.5.2. Визначення активності каталази

Активність каталази визначали методом М.А. Королюка, А.І. Іванової, І.Т. Майорової [20]. Використані реактиви: 0,03% водний розчин H_2O_2 ; 0,25 н р-н H_2SO_4 , 0,5 н р-н H_2SO_4 , 4 % молібдат амонію на 0,025 н H_2SO_4 . Принцип методу визначення активності каталази базується на здатності пероксиду гідрогену утворювати з солями молібдену стійкий кольоровий комплекс. Хід визначення. Реакцію запускають додаванням 0,1 мл гемолізату або гомогенату тканини (100 мг тканини на 1 мл тріс-НСІ-буферу 0,05 моль/л рН7,8) до 2 мл 0,03% розчину пероксиду гідрогену. У холосту пробу вносять 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняють через 10 хв. Додаванням 1 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірюють при 410 нанометрів проти контрольної проби, до якої додавали 2 мл дистильованої води. Активність визначають за формулою: $E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{докл}}) \times V \times t \times K$ (мкат/л), де E – активність каталази; $A_{\text{хол}}$ та $A_{\text{докл}}$ – екстинції холостої та до слідної проби; V - об'єм; t - час; K - коефіцієнт мілімолярної екстинції гідроген пероксиду, дорівнює $22,2 \times 10^3$ ммоль/л⁻¹ × см⁻¹.

2.5.3. Визначення активності сукцинатдегідрогенази

Активність сукцинатдегідрогенази визначали за методом Н.Д. Єщенко, Г.Т. Вольського [16]. Принцип методу полягає у відновленні ферриціаніду калію (жовтого кольору) до безколірного ферроціаніду калію сукцинатом під дією сукцинатдегідрогенази. Активність ферменту пропорційна кількості відновленого ферроціаніду. Реакція відбувається за такою схемою: сукцинат + 2 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} = \text{фумарат} + 2\text{H}^+ + [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$.

Ферриціанід є цілком специфічним акцептором електронів від сукцинату. Було використано такі реактиви: 0,1 СКЦ, 25 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 150 ммоль/л азид Na, 25 мМ ЕДТА, тріс-НСІ буфер, 20% ТХО. Надважливим у проведенні даного досліду є чітка послідовність. Розходження активності сукцинатдегідрогенази в паралельних пробах при строгому дотриманні часових і температурних параметрів не перевищує 10%. Активність ферменту (в молях сукцинату/хв. на 1 мг білка) вираховували за формулою: $A = 1000 m / 2 Mat$, де m – кількість відновленого ферроціаніду в пробі (мкг); a – вміст білка у пробі (мг); M – мол. маса ферроціаніду калію; t – час інкубації (хв).

2.5.4. Визначення кількості білка за методом Лоурі

Метод ґрунтується на визначенні інтенсивності забарвлення, яке дає розчин білка в кольорових реакціях – біуретовій і реакції Фоліна (ароматичні амінокислоти і цистеїн) [137]. При взаємодії білка з лужним розчином купруму сульфату утворюються комплексні сполуки (біуретова реакція), які своїми тирозиновими і цистеїновими радикалами відновлюють суміш фосфатно-вольфраматної і фосфатно-молібдатної кислот з утворенням комплексної сполуки синього кольору (реактив Фоліна). Незважаючи на високу чутливість, метод Лоурі має деякі вади, оскільки цю реакцію дають і інші речовини, наприклад фенольної природи, а також вільні ароматичні амінокислоти. Визначення проводять так: 1 мл розчину досліджуваного фармпрепарату, який містить 0,025—0,25 мг білка, поміщають у пробірку, приливають 2 мл реактиву 1 і залишають при кімнатній температурі на 10 хв. Потім додають 0,5 мл реактиву Фоліна, перемішують і через 30–40 хв вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння є суміш цих же реактивів без фармпрепарату.

2.5.5. Визначення вмісту ТБК-реактивних продуктів у тканині

Вміст малонового діальдегіду (МДА) у досліджуваній тканині проводили згідно методу В.Б. Гаврилова, А.П. Гаврилової, Л.М. Мажуль [7]. Використані реактиви: фосфатний буфер (рН=7,4); 1 мМ КМnO₄; 10мМ FeSO₄; 0,7% ТБК. В основі методу лежить реакція між малоновим діальдегідом і тіобарбітуровою кислотою (ТБК), яка при високій температурі та кислому середовищі відбувається з утворенням триметинового комплексу, що містить одну молекулу МДА та дві молекули ТБК. До 0,5 мл проби додають 5 мл 20% фосфорновольфрамової кислоти, пробірки закривають корками, перемішують і залишають стояти на холоді 15 хв. Центрифугують за t +4°C протягом 15 хв при 2500 об/хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають 2 мл H₂O і 1 мл 0,8 % тіобарбітурової кислоти. Перемішують, закривають корками та інкубують одну годину на водяній бані при 100 °С. Охолоджують у воді. Відцентрифугують 10 хв при 6000 об/хв. У центрифугаті вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 535 і 580 нм, щоб виключити поглинання зафарбованих комплексів ТБК-речовинами неліпідної природи. Вміст ТБК-активних продуктів, виражену в нмоль/мл, розраховують за формулою: $C=0,21+26,5 \times \Delta D$, де: ΔD — показник $D_{535}-D_{580}$.

2.6. Розчини

При ізолюванні гепатоцитів використовували 5 розчинів такого складу (ммоль/л):

1. Для відмивання печінки від крові: NaCl – 140,0; KCl – 4,7; HEPES – 10,0; глюкоза – 5,0; EGTA – 1; рН 7,4.

2. Для перфузії печінки після EGTA-вмісного розчину: NaCl – 140,0; KCl – 4,7; HEPES – 10,0; глюкоза – 5,0; рН 7,4.

3. Для рециркуляторної перфузії печінки з метою руйнування її колагенового матриксу: NaCl – 140,0; KCl – 4,7; CaCl₂ – 3; HEPES – 10,0; глюкоза – 5,0; колаген аза (120 од./мл); рН 7,6.

4. Для відмивання гепатоцитів від колагенази: NaCl – 140,0; KCl – 4,7; HEPES – 10,0; глюкоза – 5,0; EGTA – 1; MgCl₂ – 1,0; бичачий сироватковий альбумін – 2%; рН 7,4.

5. Для вилучення зі середовища, у якому перебували гепатоцити, EGTA і бичачого сироваткового альбуміну виконували перфузію базовим зовнішньоклітинним розчином: NaCl – 140,0; KCl – 4,7; CaCl₂ – 1,3; MgCl₂ – 1,0; HEPES – 10,0; глюкоза – 5,0; рН 7,4. Його ж використовували і для подальшої інкубації ізольованих інтактних клітин печінки.

Внутрішньоклітинний розчин, у якому інкубували пермеабілізовані гепатоцити, мав наступний склад, ммоль/л: KCl – 90,0; NaCl – 15,0; MgCl₂ – 1,0; КН₂РО₄ – 2; EGTA – 0,5; HEPES – 10,0; рН 7,2. Клітини печінки пермеабілізували у цьому ж розчині, з додаванням до нього дигітоніну (20 мкг/млн клітин). Склад розчину в основному відповідає іонному складу внутрішньоклітинного середовища гепатоцитів (Gasbarrini et al., 1992). Для створення середовищ інкубації пермеабілізованих клітин печінки з різною концентрацією Ca²⁺ (0,01, 0,1, 1 і 10 мкмоль/л) її розраховували за допомогою програми Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 (<http://maxchelator.stanford.edu>). Для створення номінально безкальцієвого середовища у внутрішньоклітинний розчин не додавали CaCl₂.

2.7. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження

Необхідні статистичні підрахунки проводили за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*. При цьому визначали середнє арифметичне (M), середньоквадратичне відхилення (σ), стандартну похи-

бку (m), коефіцієнт варіації (C_V), коефіцієнт достовірності різниці між двома статистичними групами за Стьюдентом (P), % змін [11].

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 [26]. Вірогідність апроксимації визначали із застосуванням F-статистики. Апроксимацію вважали вірогідною за значення $P < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Дослідження дихання мітохондрій *in situ* пермеабілізованих клітин печінки

Реєстрація швидкості дихання суспензії ізольованих мітохондрій сприяла значному поглибленню знань про перебіг процесів мітохондріального окиснення та контроль їх саме на рівні цих органел. Проте, відсутність структурно-функціональних зв'язків між ізольованими мітохондріями й усіма клітинними компонентами не дає змоги дослідити регуляцію мітохондріальних окисних процесів, у якій задіяні інші органели та цитозольні чинники. У клітині мітохондрії є у тісному контакті з ендоплазматичним ретикуломом та комплексом Гольджі [28, 67, 187], а інтенсивність окисного фосфорилування регулюється сусідніми органелами, наприклад, шляхом зміни споживання АТФ та концентрації Ca^{2+} у цитозолі [182]. Тому дослідження ізольованих мітохондрій не можуть повною мірою відобразити особливостей їх функціонування *in vivo*. З огляду на це, актуальною є адаптація полярографічної реєстрації споживання кисню для дослідження дихання пермеабілізованих клітин (або мітохондрій *in situ*).

Для встановлення залежності ступеня пермеабілізації від співвідношення між концентрацією дигітоніну і кількістю гепатоцитів у суспензії змінювали обидва параметри. Тобто, дигітонін використовували у кінцевих концентраціях 10, 25, 50 і 100 мкг/мл, додаючи його до суспензій з різною кількістю гепатоцитів. Згодом експериментальні дані були об'єднані у три дослідні групи, виходячи із кількості клітин у суспензії. 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 гепатоцитів (контроль) $21,67 \pm 2,94\%$ клітин зафарбовувались трипановим синім. У дослідній групі I повна пермеабілізація плазма-

тичної мембрани спостерігалась вже за концентрації дигітоніну 25 мкг/мл, у дослідній групі II – за 50 мкг/мл, а в дослідній групі III – лише за концентрації 100 мкг/мл (рис. 3.1 А). За додавання детергента в нижчих концентраціях у всіх трьох групах пермеабілізація плазматичної мембрани відбувалась лише у частини гепатоцитів.

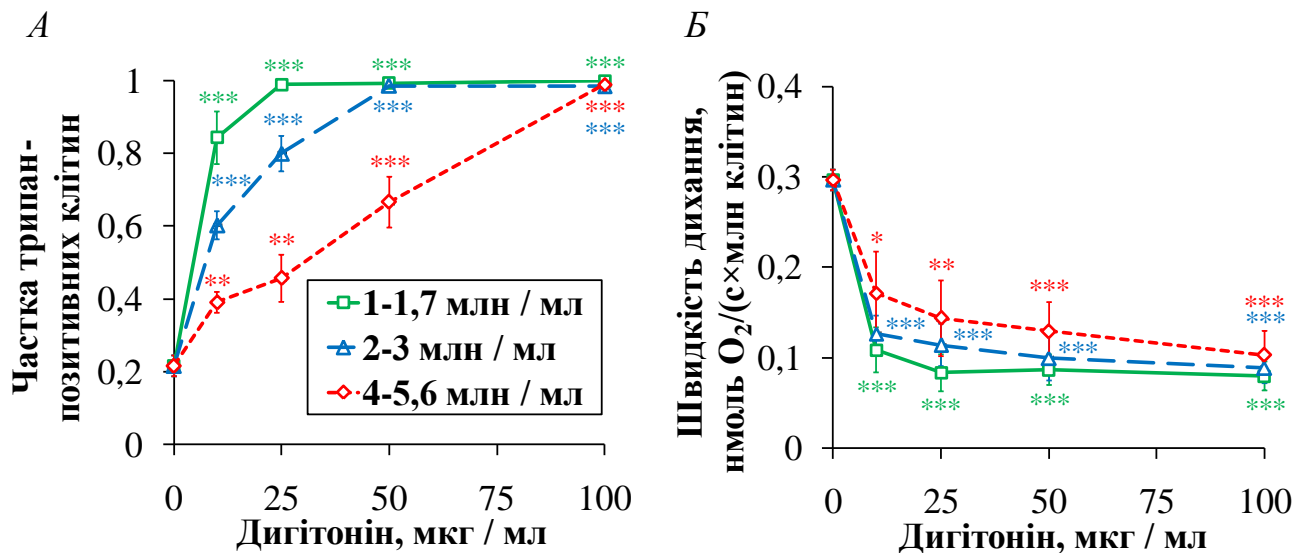


Рис. 3.1. Пермеабілізація плазматичної мембрани гепатоцитів: А – залежність ступеня пермеабілізації від концентрації дигітоніну за різної густини суспензії клітин; Б – швидкість ендогенного дихання пермеабілізованих гепатоцитів (стан S_1); * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,05$); ** – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,01$); *** – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,001$); ($n = 3-5$)

Ступінь пермеабілізації також оцінювали за швидкістю ендогенного дихання та дихання, стимульованого субстратами окиснення й АДФ. Відомо, що клітинам із порушеною цілісністю плазматичної мембрани притаманний низький рівень ендогенного дихання [10]. Причиною цього є зниження концентрації субстратів окиснення у цитоплазмі внаслідок їхньої дифузії у позаклітинне се-

редовище. Обробка дигітоніном призводила до зниження швидкості споживання кисню гепатоцитами за окиснення ендogenous субстратів. У дослідній групі I швидкість ендogenous 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 (рис. 3.1 Б). Ці дані повністю узгоджуються із результатами тесту з трипановим синім.

Внесення у полярографічну комірку з інтактними гепатоцитами α -кетоглутарату і сукцинату практично не впливало на швидкість споживання кисню (рис. 3.2 А), на відміну від пермеабілізованих клітин (рис. 3.2 Б).

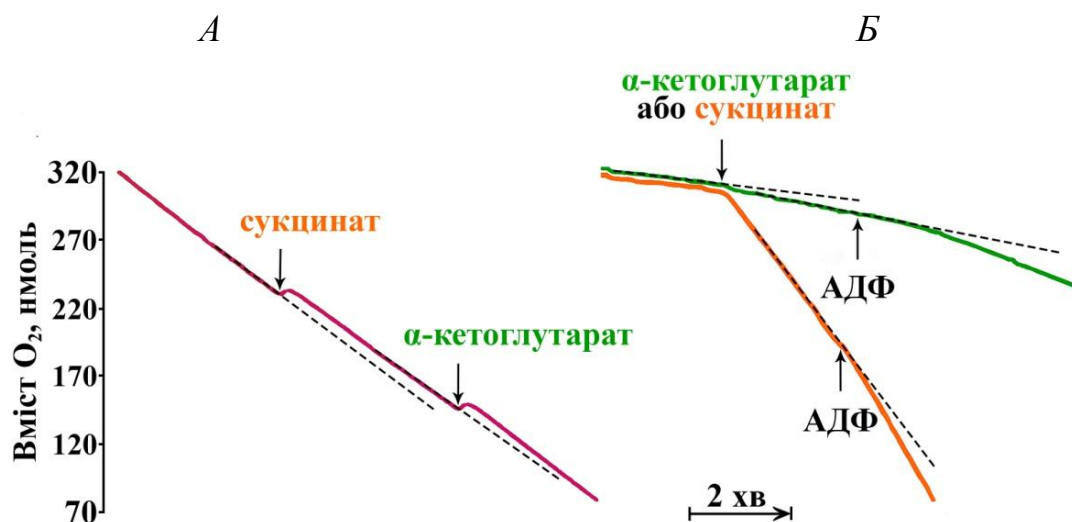


Рис. 3.2. Полярографічний запис змін напруження кисню у суспензії інтактних (А) та пермеабілізованих (Б) гепатоцитів за окиснення ендogenous субстратів і екзogenous α -кетоглутарату чи сукцинату: вертикальними стрілками позначений час додавання субстратів окиснення чи АДФ; [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [α -кетоглутарат] = 1 ммоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л

Додавання до пермеабілізованих гепатоцитів α -кетоглутарату підтримувало показники дихання на стабільному рівні, дещо вищому за рівень ендogenous дихання за відповідної концентрації дигітоніну, але нижчому, ніж у інтактних клітин (рис. 3.3 А). За одночасної присутності α -кетоглутарату й АДФ у

полярографічній комірці швидкість споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами збільшувалась до рівня ендogenousного дихання інтактних клітин (рис. 3.3 Б). Тобто, внесення α -кетоглутарату за наявності АДФ відновлювало окисні процеси пермеабілізованих гепатоцитів.

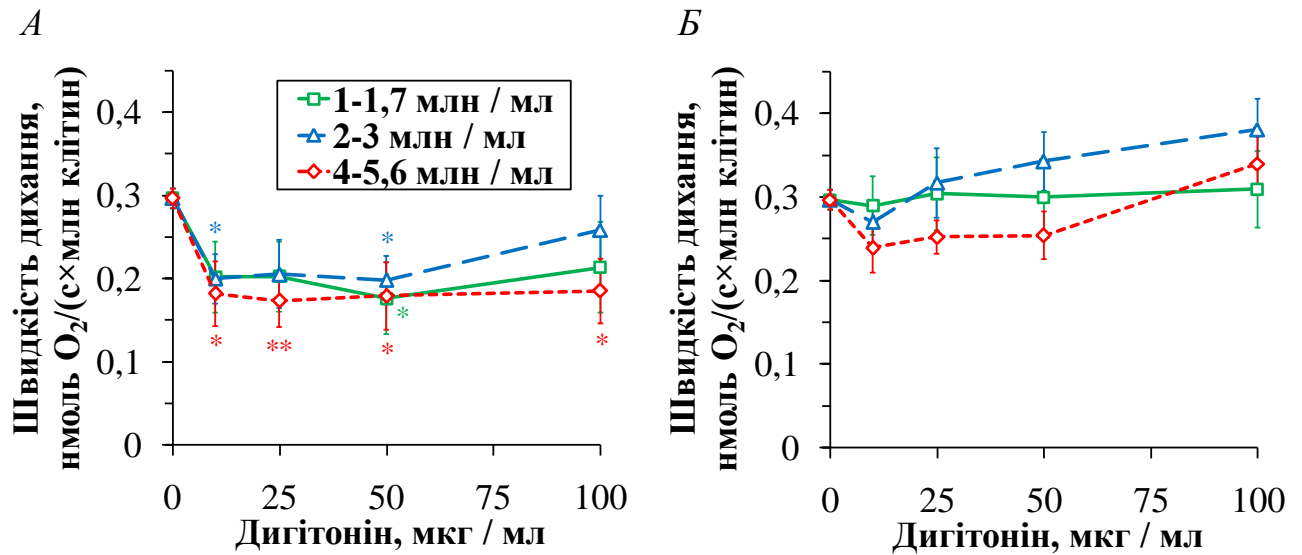


Рис. 3.3. Залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення α -кетоглутарату (А; метаболічний стан, близький до стану S_4) та активації окисного фосфорилування за допомогою АДФ (Б; стан S_3), від концентрації дигітоніну: $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 1$ ммоль/л, $[\text{АДФ}] = 750$ мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,05$); ** – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,01$)

Відомо, що в інтактних клітинах дихання в основному відбувається завдяки окисненню НАД-залежних субстратів. Отже, відновлення α -кетоглутаратом споживання кисню до рівня інтактних гепатоцитів доводить те, що дигітонін не порушує функціонування НАД-залежних компонентів дихального ланцюга мітохондрій.

Внесення у комірку сукцинату значно інтенсифікувало споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами (рис. 3.4 А), швидкість якого зростала ще

більше за додавання АДФ і перевищувала рівень ендogenousного дихання інтактних клітин (рис. 3.4 Б).

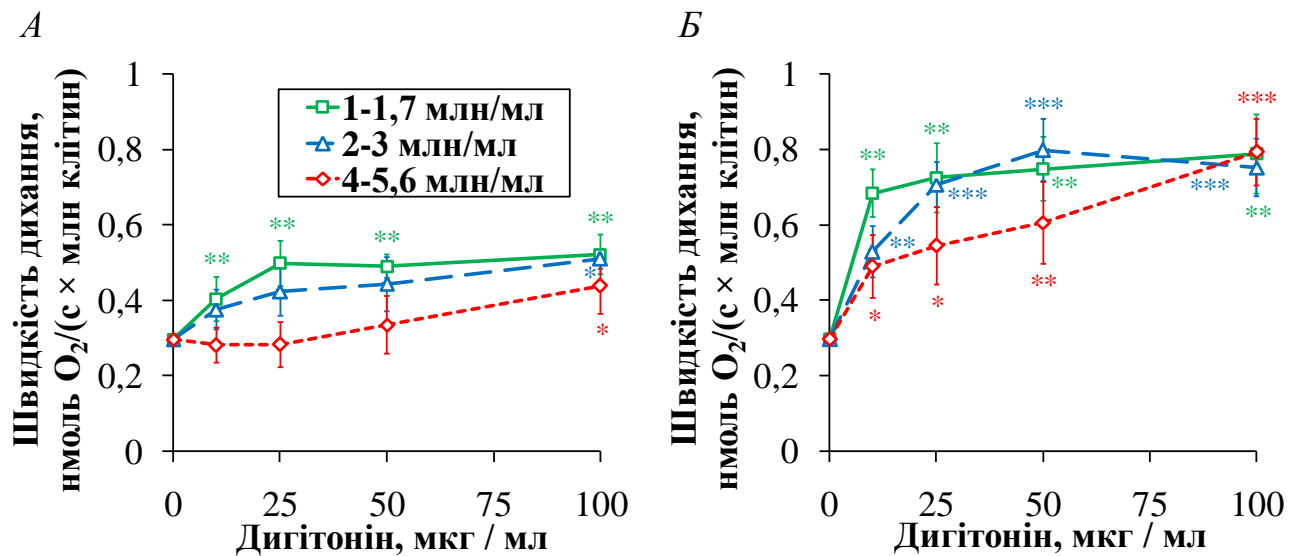


Рис. 3.4. Залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату (А; метаболічний стан, близький до стану S_4) та активації окисного фосфорилування за допомогою АДФ (Б; стан S_3), від концентрації дигітоніну: [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,05$); ** – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,01$); *** – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем ($P < 0,001$)

Це узгоджується з уявленнями про пріоритетність використання сукцинату порівняно з іншими субстратами та про його здатність монополізувати дихальний ланцюг [223], забезпечуючи високий рівень інтенсивності мітохондріальних процесів відповідно до потреб клітини. Залежність швидкості АДФ-стимульованого дихання за окиснення сукцинату від концентрації дигітоніну та кількості клітин добре корелює з результатами тесту з трипановим синім: інтенсивність споживання кисню у дослідній групі I досягала максимуму за вико-

ристання дигітоніну у кінцевій концентрації 25 мкг/мл, у дослідній групі II – за 50 мкг/мл, а у дослідній групі III – за 100 мкг/мл (рис. 3.4 Б).

Зважаючи на це, аналіз отриманих результатів дозволяє стверджувати, що визначальним в ході дослідження дихання мітохондрій *in situ* є співвідношення між кількостями дигітоніну і клітин у суспензії. Оптимальним є співвідношення кількості дигітоніну до гепатоцитів – 20–22 мкг/ млн клітин (рис. 3.5 Б). На рис. 3.5 А показана залежність кількості трипан-позитивних гепатоцитів від співвідношення між кількістю дигітоніну та кількістю клітин печінки у суспензії: видно, що для повної пермеабілізації гепатоцитів теж достатньо 20–22 мкг дигітоніну на один млн клітин. Тобто, результати трипанового тесту повністю узгоджуються з результатами, отриманими при дослідженні процесів дихання.

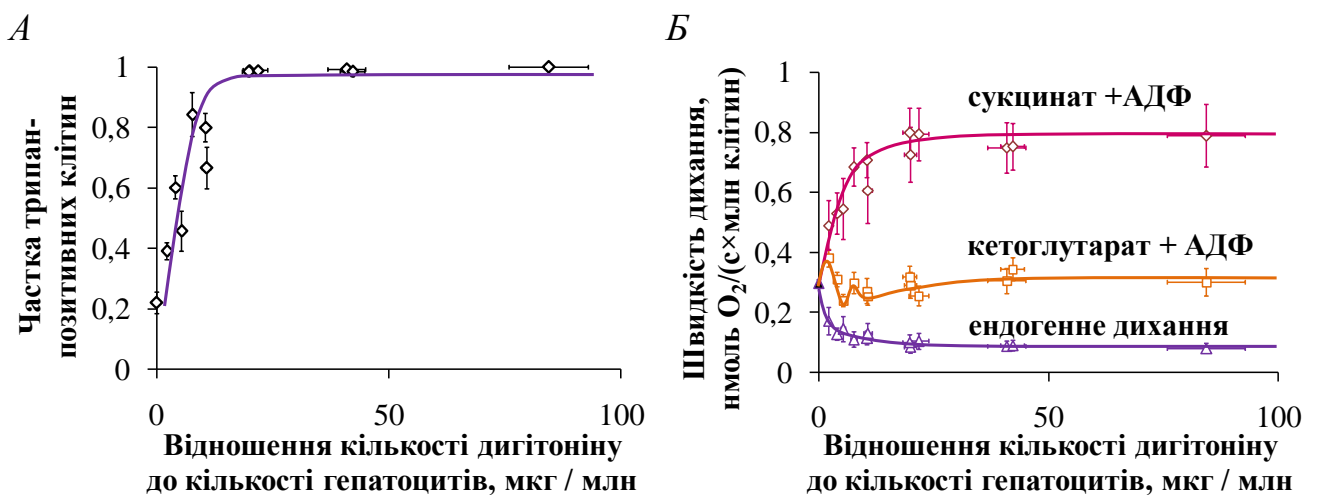


Рис. 3.5. Ступінь пермеабілізації плазматичної мембрани гепатоцитів (А) та швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів (Б) за різного співвідношення кількості дигітоніну і клітин: вихідні експериментальні дані представлені на рис. 3.1, 3.3 і 3.4

Дихальний контроль за Ларді (відношення швидкостей споживання кисню у стані S_3 до швидкості у стані S_4), який характеризує спряженість процесів дихання та окисного фосфорилування [128], теж досягає свого максимуму за

співвідношення дигітоніну до кількості клітин на рівні 20–22 мкг/млн (рис. 3.6). Зокрема, за окиснення α -кетоглутарату залежність дихального контролю від співвідношення кількості дигітоніну до кількості гепатоцитів має дзвоноподібний характер з максимумом у цьому діапазоні. За окиснення сукцинату цей показник досягає найбільшого значення за найменшого співвідношення кількості дигітоніну до кількості клітин, але вже після співвідношення 21,8 мкг дигітоніну до одного млн гепатоцитів – різко знижується.

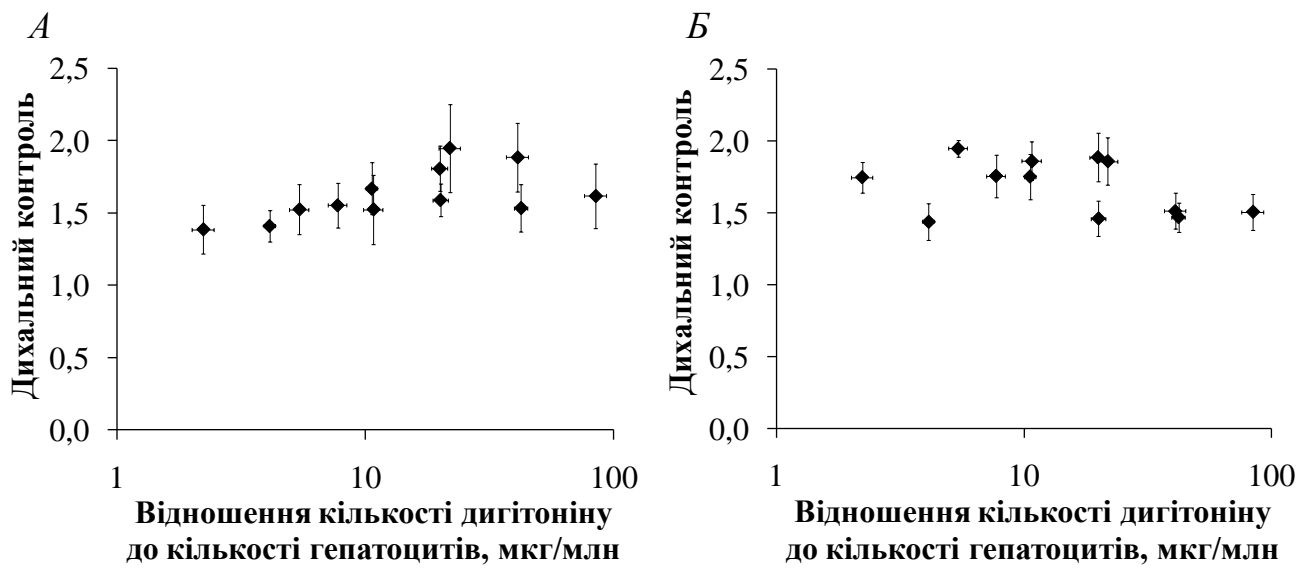


Рис. 3.6. Ступінь спряженості дихання й окисного фосфорилування (дихальний контроль за Ларді) у пермеабілізованих гепатоцитах за окиснення α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) залежно від співвідношення між кількістю дигітоніну та клітин у суспензії

Збільшення співвідношення дигітоніну до кількості клітин зумовлює зменшення показника дихального контролю як за окиснення α -кетоглутарату, так і сукцинату. Це відбувається за рахунок зниження інтенсивності споживання кисню у стані S_3 або/та зростання споживання кисню у стані S_4 , хоча самі зміни швидкостей дихання є незначними і в межах статистичної похибки. Збільшення швидкості споживання кисню у стані S_4 за зменшення дихального контролю

свідчить про необхідність компенсувати витік протонів через плазматичну мембрану мітохондрій внаслідок зміни її проникності.

Низьке співвідношення кількості дигітоніну до клітин не забезпечує пермеабілізацію усіх гепатоцитів і не повністю уможлиблює проникнення екзогенних субстратів окиснення. За високого співвідношення кількості дигітоніну до клітин порушується цілісність не лише плазмалеми, а й мембран внутрішньоклітинних органел, що негативно позначається на функціонуванні гепатоцитів і перешкоджає використанню їх як модельного об'єкта.

Цілком очевидно, що оптимальне співвідношення між кількістю дигітоніну і кількістю клітин у суспензії для різних тканин буде відрізнятися. Для адекватного підбору цього співвідношення необхідно проводити тест не лише на оцінку цілісності плазматичної мембрани (трипановий тест, визначення вивільнення маркерних протеїнів цитоплазми), а й оцінювати функціональну активність органел. Без проведення таких тестів неможливо не лише об'єктивно порівнювати результати різних авторів, але й отримати якісні препарати пермеабілізованих клітин і мінімізувати вплив артефактів дослідження.

Підсумок. Густина суспензії гепатоцитів суттєво впливає на ступінь пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном: чим більша кількість клітин, тим більшу концентрацію дигітоніну необхідно застосувати [Манько та ін., 2010; Merlavsky et al., 2015].

1. 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.
2. 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.

3.2. Залежність інтенсивності дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації Ca^{2+} у середовищі

Дослідження взаємозв'язків між процесами внутрішньоклітинного сигналювання та метаболічними шляхами є актуальною проблемою сучасної фізіології. Процеси енергозабезпечення клітини відіграють винятково важливу роль у життєдіяльності організму, і іони кальцію здійснюють на них вагомий вплив [43]. Зокрема, відомо про існування взаємодій між Ca^{2+} -сигналізацією та мітохондріальним окисненням у клітинах гладеньких м'язів [48], секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дзвінця [6], ацинарних клітинах привушних залоз [45], ацинарних клітинах підшлункової залози [27, 209] і, що особливо важливо, у гепатоцитах [82, 183]. Адже порушення взаємовпливів між цими процесами у клітинах печінки пов'язано з розвитком багатьох патологічних станів цілого організму, зокрема ожиріння чи цукрового діабету [34].

3.2.1. Дослідження дихання пермеабілізованих гепатоцитів у номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному середовищах

Для оцінки впливу Ca^{2+} на процеси дихання мітохондрій *in situ* клітин печінки спершу ми використали два середовища інкубації гепатоцитів. Одне з них було номінально безкальцієвим, а друге містило хелатор Ca^{2+} – ЕГТА (0,5 ммоль/л).

Зважаючи на те, що глюкоза в процесі гліколізу метаболізується у піруват, який окиснюється в циклі трикарбонових кислот, ми оцінювали зміни процесів дихання за додавання суміші субстратів (малату, глутамату і пірувату) до суспензії пермеабілізованих гепатоцитів у різних станах за Чансом.

За додавання лише цієї суміші субстратів (стан S_4) спостерігали інтенсифікацію споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами щурів у обох середовищах (номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному). Проте у розчині,

який не містив ЕГТА ця стимуляція була більш вираженою: 110 % порівняно із 85,1% (рис. 3.7 А).

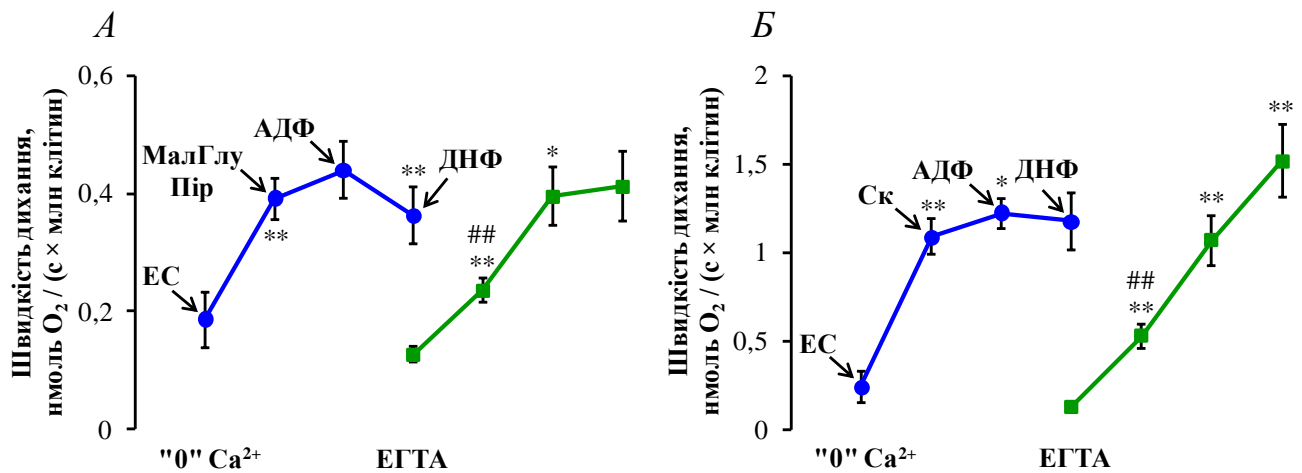


Рис. 3.7. Показники швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату (А) та сукцинату (Б) у номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному середовищах : тут і надалі ЕС –ендогенні субстрати, МалГлуПір – суміш 5 ммоль/л малату, 5 ммоль/л глутамату і 5 ммоль/л пірувату, Ск – 5 ммоль/л сукцинату, [АДФ] = 0,75 ммоль/л, ДНФ – 0,1 ммоль/л динітрофенолу;* – зміни статистично достовірні щодо попереднього показника з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$, ***– з $P < 0,001$, ## – різниця статистично вірогідна щодо аналогічного показника у середовищі без ЕГТА з $P < 0,01$, $n = 5$

Наступне додавання у полярографічну комірку АДФ не спричиняло суттєвих змін швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів щурів у номінально безкальцієвому середовищі. У ЕГТА-вмісному розчині АДФ статистично вірогідно збільшував інтенсивність споживання кисню пермеабілізованими клітинами печінки на 67,6% ($P < 0,05$, $n = 5$).

Додавання динітрофенолу після АДФ статистично достовірно зменшувало швидкість споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами у номінально безкальцієвому середовищі на 17,5% ($P < 0,01$, $n = 5$). У ЕГТА-вмісному

середовищі динітрофенол не впливав на швидкість дихання пермеабілізованих клітин печінки щурів.

За додавання сукцинату швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів зростала в обох середовищах (рис. 3.7 Б). Але, як і за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату більш вираженими зміни інтенсивності споживання кисню були у номінально безкальцієвому середовищі. Так, сукцинат стимулював дихання пермеабілізованих гепатоцитів у розчині без ЕГТА на 352%, а в ЕГТА-вмісному – на 318% ($P < 0,05$, $n = 5$).

Наступне внесення у полярографічну комірку АДФ спричиняло незначну – на 12,2% (порівняно зі швидкістю сукцинатстимульованого дихання), проте статистично вірогідну ($P < 0,05$, $n = 5$) стимуляцію процесів споживання кисню пермеабілізованими клітинами печінки у номінально безкальцієвому середовищі. Додавання динітрофенол не впливало на швидкість споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами у цьому розчині.

Послідовне додавання сукцинату, АДФ і динітрофенолу до середовища, яке містило ЕГТА спричиняло поступове збільшення показників швидкості споживання кисню пермеабілізованими клітинами печінки.

Для детальнішого аналізу процесів дихання у мітохондріях *in situ* гепатоцитів нами було виконано обчислення показників дихального контролю за Ларді (співвідношення швидкості АДФ-стимульованого споживання кисню до субстратстимульованого). Цей параметр характеризує ступінь спряженості дихання і окисного фосфорилування у клітині: чим більший дихальний контроль – тим вищий рівень спряження цих процесів. Нами виявлено, що дихальний контроль був більшим у середовищі, яке містило ЕГТА, як за окиснення суміші малату, глутамату, пірувату, так і сукцинату.

3.2.2. Встановлення закономірностей дихання пермеабілізованих гепатоцитів у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+}

Проаналізувавши результати попередніх досліджень і виявивши певні особливості процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів за різного вмісту Ca^{2+} у середовищі, ми вирішили виконати серію експериментів з використанням середовищ, у яких концентрація Ca^{2+} є чітко задана на етапі виготовлення цих розчинів за допомогою Ca^{2+} -ЕГТА-буфера.

За окиснення лише суміші малату, глутамату і пірувату (стан S_4) спостерігали інтенсифікацію споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за всіх концентрацій Ca^{2+} до практично одного і того ж рівня (рис. 3.8 А). Тоді як внесення АДФ (стан S_3) збільшує швидкість дихання лише за 0,01 і 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі. Динітрофенол не має вираженого ефекту на інтенсивність споживання кисню гепатоцитами щурів за всіх концентрацій Ca^{2+} .

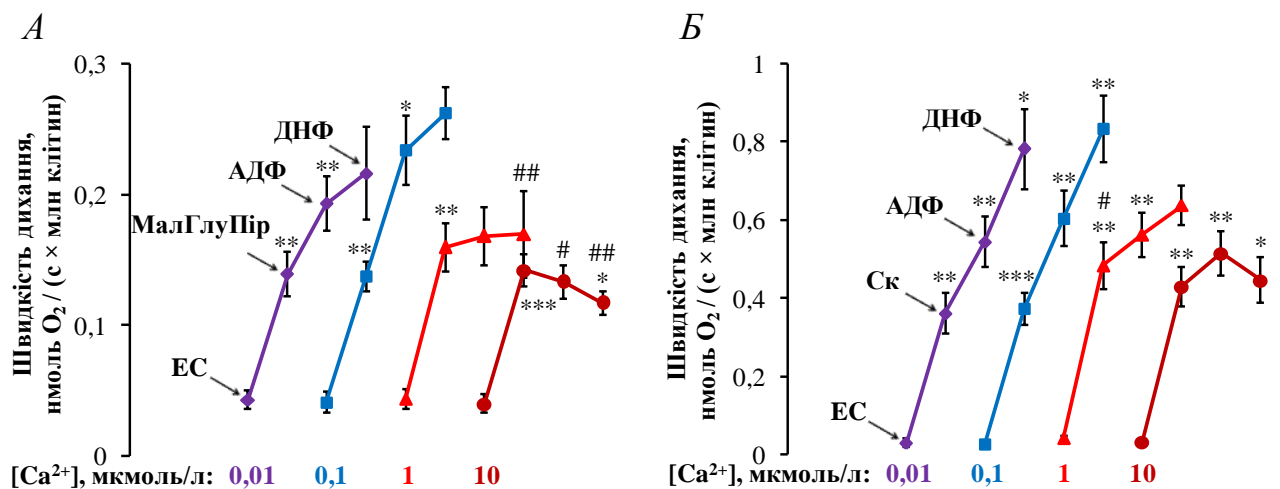


Рис. 3.8. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату (А) і сукцинату (Б) у середовищах з різними концентраціями Ca^{2+} : * – зміни достовірні відносно попереднього показника з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$, # – зміни достовірні, порівняно з відповідним показником за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} з $P < 0,05$, ## – з $P < 0,01$; $n = 5$

За окиснення сукцинату швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів виявилася найвищою за 1 мкмоль/л Ca^{2+} (рис. 3.8 Б), тоді як наступні послідовні додавання АДФ і динітрофенолу істотно стимулювали дихання клітин печінки лише за нижчих концентрацій Ca^{2+} (0,01 і 0,1 мкмоль/л).

3.2.3. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежно від концентрації субстратів циклу Кребса у середовищах із різним вмістом Ca^{2+}

Дослідження кінетичних параметрів дихання розпочаті вже досить давно. Зроблені кінетичні аналізи окиснення сукцинату за умов низьких температур [39], гіпоксії [24], іммобілізаційного стресу [186] та різних фізіологічних станів [44]. Роботами Брауна показано, що відмінності у кінетиці мітохондріальних відповідей при зміні концентрації субстрату забезпечують мітохондріальну регуляцію метаболізму під час заціпеніння [44]. У багатьох роботах відзначається пріоритетне використання сукцинату перед іншими субстратами [39, 44, 169, 173]. Швидкість його окиснення значно вища, ніж інших субстратів циклу Кребса, а потужність процесу генерації трансмембранного потенціалу настільки велика, що забезпечує найбільшу інтенсивність фосфорилування АДФ. Досліджуючи сукцинат переважно використовують його насичуючі концентрації, однак використання більш широкого діапазону концентрацій дозволяє отримати цікаві закономірності. Зокрема у тварин, які впадають у сплячку, більш високі показники дихання отримано за концентрацій сукцинату, нижчих, ніж насичуючі, що забезпечує достатній рівень енергетичних процесів під час сплячки, захищає клітину і мітохондрії від ушкодження і дозволяє швидко перейти в активний стан [44].

Зважаючи на те, що ендогенні субстрати роблять суттєвий внесок в окиснення екзогенних субстратів, з метою нівелювання їхньої дії, ми інкубували пермеабілізовані гепатоцити у дослідних середовищах з дигітоніном протягом

10 хв. Це забезпечує вимивання ендогенних субстратів з органел і дає можливість отримати більш чіткі кінетичні характеристики процесів споживання кисню. Під час розрахунків кінетичних параметрів залежності швидкості дихання від концентрації сукцинату віднімали показник швидкості споживання кисню, який був після додавання АДФ.

3.2.3.1. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежно від концентрації сукцинату в середовищах із різним вмістом Ca^{2+}

У результаті дослідження особливостей споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+} нами було виявлено, що кінетика процесів дихання за окиснення екзогенного сукцинату в цих клітинах добре описується рівнянням Хілла. Причому, такі кінетичні параметри, як коефіцієнт Хілла h і максимальна швидкість V_{max} , практично не змінюються зі зростанням концентрації Ca^{2+} у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л (рис. 3.9). Тоді як константа напівактивації $K_{0,5}$ для сукцинату є у 2,1 рази меншою за $[\text{Ca}^{2+}]$ 1 мкмоль/л ($1,05 \pm 0,06$ ммоль/л), ніж за 0,1 мкмоль/л ($2,25 \pm 0,16$ ммоль/л, $n = 4$; рис. 3.9). Таке підвищення спорідненості до субстрату свідчить про наявність певної залежності між швидкістю окисних процесів у мітохондріях гепатоцитів за окиснення сукцинату і цитозольною концентрацією Ca^{2+} .

За таких умов існує ймовірність активації катіонами Ca^{2+} інших мітохондріальних ензимів – 2-оксоглутаратдегідрогенази, НАД⁺-залежної ізоцитратдегідрогенази, фосфатази піруватдегідрогенази, які є Ca^{2+} -залежними і можуть впливати на загальну інтенсивність процесів дихання [156]. Усунення ефекту цих ферментів є необхідним для дослідження кінетичної залежності і цього можна досягти, наприклад, блокуванням складових дихального ланцюга, які не беруть участі у використанні сукцинату. Тому у подальшому дослідженні кінетичних параметрів окиснення сукцинату перед внесенням його у полярографіч-

ну комірку ми додавали інгібітор комплексу 1 дихального ланцюга – ротенон [74].

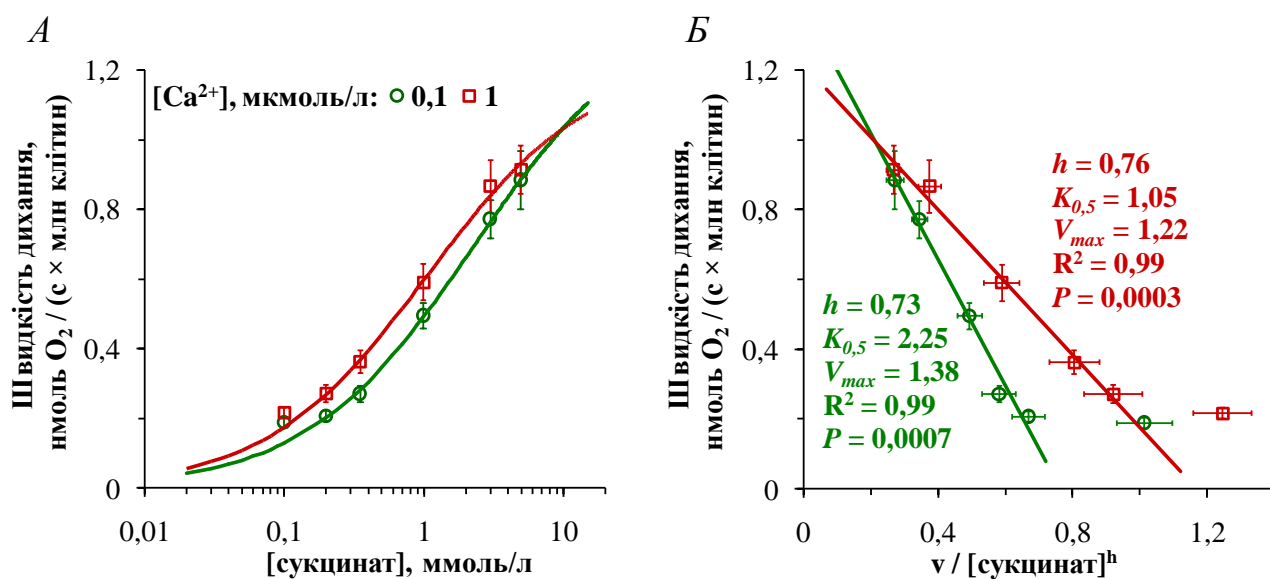


Рис. 3.9. Кінетичні параметри дихання пермеабілізованих гепатоцитів щурів за окиснення сукцинату без ротенону у середовищах з $[Ca^{2+}]$ 0,1 (нижня лінія) і 1 (верхня лінія) мкмоль/л: А – концентраційна залежність впливу сукцинату в напівлогарифмічних координатах; Б – лінеаризація у змінених координатах Іді–Гофсті, позначення, як на графіку А; швидкість споживання кисню, стимульованого АДФ, віднімали; $[succinate] = 0,1-5$ ммоль/л, $n = 4$

Після введення ротенону у суспензію клітин контролю швидкість їх ендogenous дихання у середовищі з $[Ca^{2+}] = 0,1$ мкмоль/л не змінювалась, а у розчині з $[Ca^{2+}] = 1$ мкмоль/л – знижувалась до $0,09 \pm 0,02$ нмоль $O_2/(c \times \text{млн клітин})$, тобто на $33 \pm 9\%$ ($n = 5, P < 0,05$, рис. 3.10). Отже, збільшення концентрації кальцію призводить до обмеження використання ендogenous сукцинату ізольованими гепатоцитами, можливо, як механізм захисту мітохондрій від перервантаження кальцієм, що показано в роботах Саакяна [186].

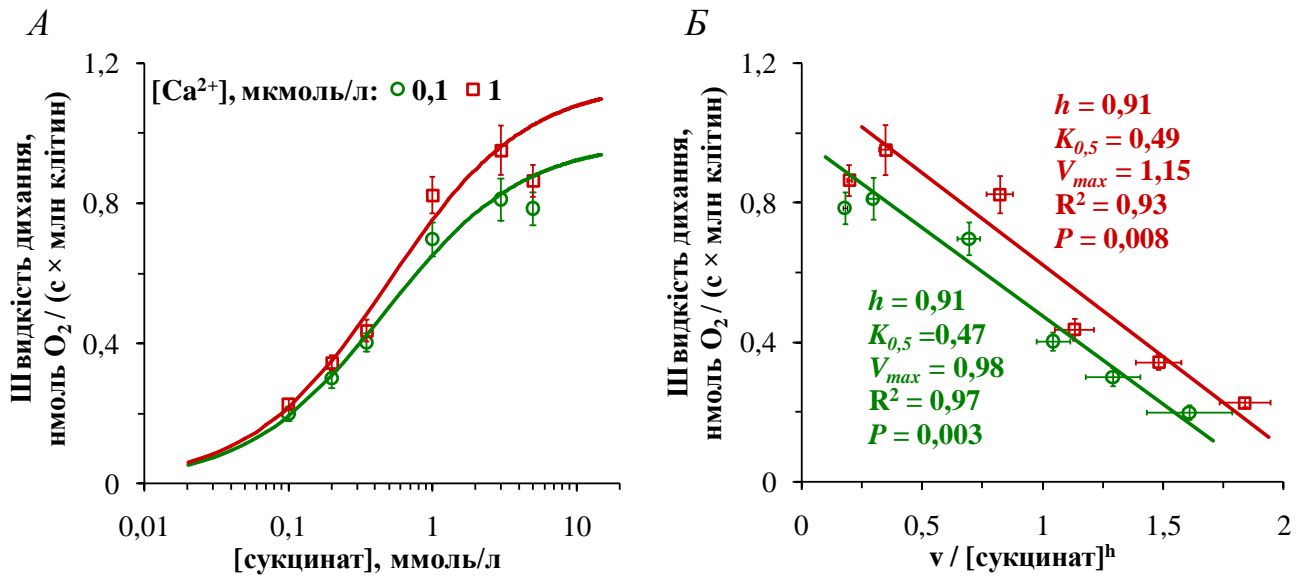


Рис. 3.10. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки від концентрації сукцинату (за наявності ротенону) у середовищах з $[Ca^{2+}]$ 0,1 (нижня лінія) і 1 (верхня лінія) мкмоль/л: під час розрахунку параметрів рівняння Хілла точками, які свідчать про розвиток субстратного інгібування, було знехтувано; $n = 4$.

За умов інгібування комплексу I дихального ланцюга сукцинат дозозалежно збільшує швидкість споживання кисню гепатоцитами. Встановлено, що за концентрації сукцинату 0,1–3 ммоль/л споживання кисню клітинами печінки інтенсифікується. Цей процес досить точно описується кривою Хілла. Константа напівактивації $K_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла h не залежали від $[Ca^{2+}]$ у середовищі і становили, відповідно, 0,47–0,49 ммоль/л та 0,91. Але максимальна швидкість V_{max} характеризується незначною залежністю від $[Ca^{2+}]$: за 0,1 і 1 мкмоль/л вона становила 0,98 і 1,15 нмоль O_2 / (млн клітин × с) відповідно. За концентрації сукцинату 5 ммоль/л в обох випадках спостерігається деяке зменшення швидкості дихання внаслідок, очевидно, субстратного інгібування.

3.2.3.2. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежно від концентрації пірувату в середовищах із різним вмістом Ca^{2+}

Енергетичний метаболізм має вирішальне значення у пристосуванні різних типів тканин до різних навантажень. До чинників, які забезпечують максимальну адаптацію відповідно до потреб є субстрати окиснення, використання яких регулюється Ca^{2+} . Понсот зі співавт. [173] провели дослідження на різних м'язах щурів (литковому, камабалоподібному, серцевому) з оцінкою АДФ-стимульованого дихання за наростаючих концентрацій пірувату, пірувату з малатом, глутамату з малатом, пальмітоїл-карнітину, гліцерофосфату, і зробили висновок про якісні відмінності метаболічних шляхів мітохондрій залежно від функцій. Зокрема, мітохондрії гліколітичних м'язових волокон адаптовані до підтримання необхідно окисно-відновного стану цих волокон, а мітохондрії серцевого м'яза сформували важливу здатність використовувати жирні кислоти. Гелеріх зі співавт. [84] зазначають, що цитозольний Ca^{2+} є ключовим фактором адаптації мітохондріального енергопостачання до потреб інтактних нейронів. При вищих його концентраціях (> 600 нмоль/л), мітохондрії нейронів акумулюють Ca^{2+} , який підвищує рівень активності внутрішньомітохондріальних дегідрогеназ. Кальцій-індуковане зростання споживання кисню мітохондріями у стані S_3 знижується залежно від субстрату окиснення в порядку глутамат $>$ α -кетоглутарат $>$ α -гліцерофосфат $>$ піруват [84].

У наших дослідженнях додавання екзогенного пірувату (0,01–5 ммоль/л) на фоні малату (1 ммоль/л) спричиняє дозозалежне зростання швидкості споживання кисню, як за 0,1, так і за 1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі. Проте нами було виявлено різницю між кінетичними параметрами процесів окиснення субстратів за різних концентрацій Ca^{2+} . Так, $K_{0,5}$ за вищого вмісту Ca^{2+} є у 10,7 рази меншою, а V_{max} – у 1,5 рази більшою порівняно з $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1$ мкмоль/л (0,015 \pm 0,001 – 0,16 \pm 0,01 ммоль/л та 0,4 \pm 0,008 – 0,27 \pm 0,01 нмоль O_2 /(с \times млн клітин)

відповідно, $n = 4$, рис. 3.11). Це свідчить про більшу спорідненість системи до пірувату та більш інтенсивне його окислення за вищої концентрації Ca^{2+} і узгоджується з тим фактом, що, зокрема, піруватдегідрогеназа належить до Ca^{2+} -залежних мітохондріальних ферментів.

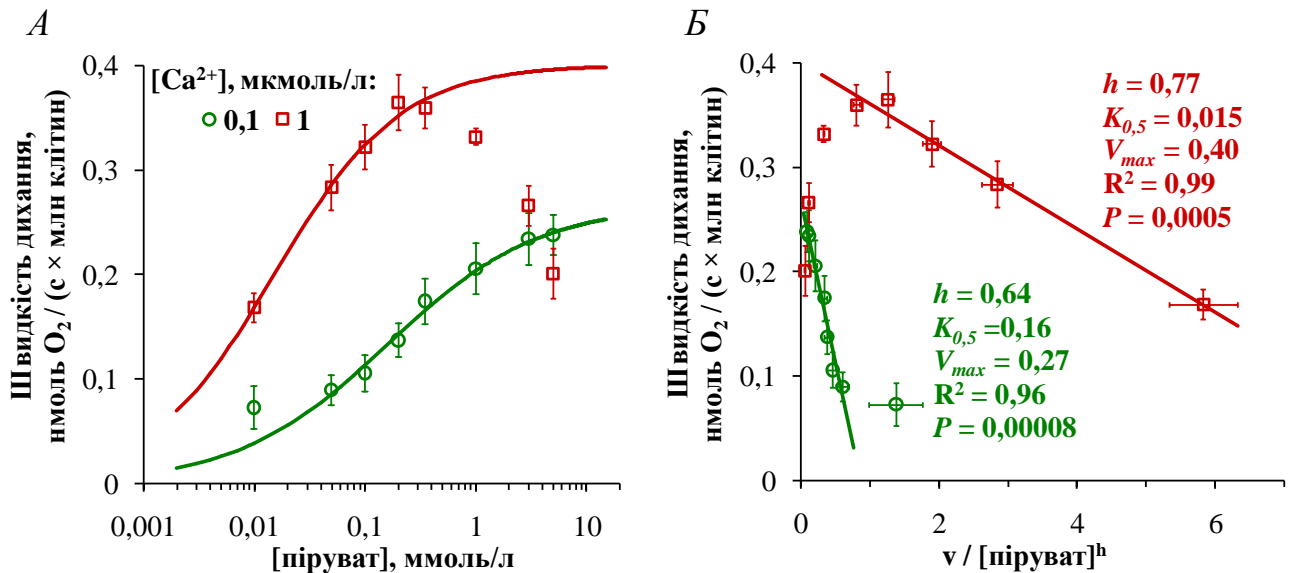


Рис. 3.11. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки від концентрації пірувату (на фоні малату) у середовищах з $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,1 (нижня лінія) і 1 (верхня лінія) мкмоль/л: під час розрахунку параметрів рівняння Хілла точками, які свідчать про розвиток субстратного інгібування, було знехтувано; $n = 4$.

Крім того, з'ясувалось що за $[\text{Ca}^{2+}] = 1$ мкмоль/л зростання інтенсивності споживання кисню гепатоцитами відбувається за внесення пірувату лише у діапазоні концентрацій від 0,01 до 0,2 ммоль/л. При подальшому збільшенні вмісту субстрату (0,35–5 ммоль/л), показники швидкості дихання починають зменшуватись, тобто, спостерігається розвиток “субстратного інгібування”. Цей факт можна пояснити наявністю гомеостатичних механізмів зворотного негативного впливу, які при досягненні максимальної окисної активності мітохондрій (що відбувається за насичуючих концентрацій субстрату), ініціюють процес

пригнічення подальшого зростання мембранного потенціалу цих органел і, тим самим, знижують швидкість дихання.

Частковим підтвердженням попереднього припущення є показники коефіцієнта Хілла. А саме, – вони за обох концентрацій Ca^{2+} у середовищі є меншими за 1 (0,64 за $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1$ мкмоль/л і 0,77 за $[\text{Ca}^{2+}] = 1$ мкмоль/л), що свідчить про існування негативних зворотних зв'язків у системі.

Підсумок. За фізіологічних умов інтенсивність процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежить від концентрації Ca^{2+} у середовищі. Найбільшою швидкість споживання кисню клітинами печінки за окиснення як ФАД-так і НАД-залежних субстратів є за 1 мкмоль/л Ca^{2+} у стані S_4 і за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у стані S_3 [Мерлавський та ін., 2015]. Внаслідок підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ від 0,1 до 1 мкмоль/л зростає V_{max} і знижується $K_{0,5}$ за окиснення пірувату, але не сукцинату (за дії ротенону) [Merlavsky et al., 2015]. Це свідчить про збільшення активності ензимів НАД-залежного шляху окиснення субстратів за зростання $[\text{Ca}^{2+}]$ у цитозолі, що є однією з ланок регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів із залученням прямих позитивних зв'язків. Концентрація Ca^{2+} 10 мкмоль/л є токсичною для мітохондрій гепатоцитів.

1. Мерлавський В. Вплив Ca^{2+} на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотозиніндукованого цукрового діабету / В. Мерлавський, О. Іккерт, В. Манько // Вісн. Львів. ун-ту. Серія біол. – 2015. – Вип. 70. – С. 294–304.
2. Merlavsky V.M. Kinetic parameters of respiration in rat permeabilized hepatocytes upon Ca^{2+} in various 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.

3.3. Дослідження впливу Ca^{2+} на кінетичні параметри окиснення субстратів циклу Кребса мітохондріями *in situ* гепатоцитів за тривалої дії таурину

Таурин – одна з найбільш поширених аміносультфонових кислот у ссавців – є задіяним у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу та функціонування мітохондрій [109]. Лобо зі співавт. [135], використовуючи електронну мікроскопію з імуногістохімічною міткою виявили, що найвища концентрація таурину у клітині є якраз у мітохондріях. Було показано, що таурин вже за мінімальної концентрації 1 ммоль/л спричиняє зростання рівня поглинання Ca^{2+} мітохондріями гепатоцитів [168]. Однак, особливості окиснення різних субстратів у мітохондріях пермеабілізованих гепатоцитів під впливом таурину та за різних концентрацій Ca^{2+} є недослідженими.

Ми дослідили вплив таурину на споживання кисню ізольованими гепатоцитами залежно від концентрації кальцію та субстратів окиснення.

3.3.1. Вплив Ca^{2+} на кінетичні параметри окиснення сукцинату в пермеабілізованих гепатоцитах за тривалої дії таурину

У гепатоцитах тварин, яким вводили таурин додавання у комірку ротенону спричиняло зниження швидкості споживання кисню за окиснення ендогенних субстратів як у середовищі з $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1$ мкмоль/л, так і в середовищі з $[\text{Ca}^{2+}] = 1$ мкмоль/л на $47 \pm 8\%$ ($n = 4$, $P < 0,05$) і $26 \pm 7\%$ ($n = 4$, $P < 0,01$) відповідно.

За дії таурину *in vivo* як і у контрольних тварин, кінетичні параметри (h , $K_{0,5}$ і V_{max}) сукцинат-стимульованого, на фоні ротенону, дихання практично не залежать від концентрації йонів кальцію у цитозолі (рис. 3.12). Проте, показники V_{max} у дослідних щурів є дещо нижчими, ніж у контрольних, як за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} ($0,83 \pm 0,03$ порівняно з $0,98 \pm 0,05$ нмоль $\text{O}_2/(\text{с} \times \text{млн. клітин})$, $n = 4$),

так і 1 мкмоль/л Ca^{2+} ($0,91 \pm 0,06$ порівняно з $1,15 \pm 0,1$ нмоль $\text{O}_2/(\text{с} \times \text{млн. клітин})$, $n = 4$).

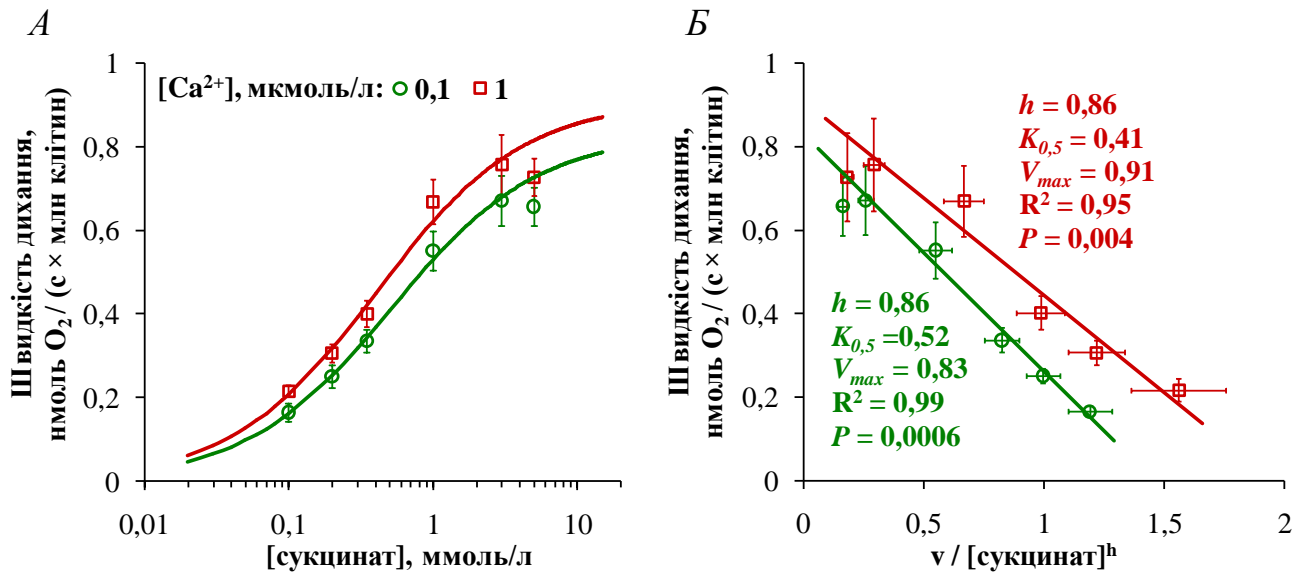


Рис. 3.12. Вплив тривалого введення тваринам таурину на кінетичну залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки від концентрації сукцинату (за наявності ротенону) у середовищах з $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,1 (нижня лінія) і 1 (верхня лінія) мкмоль/л: при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості споживання кисню від концентрації сукцинату чи пірувату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; $[\text{ротенон}] = 10$ мкмоль/л, $[\text{сукцинат}] = 0,1\text{--}5$ ммоль/л, $n = 4$

У щурів, яким вводили таурин, так само, як і в контрольних, за найвищої концентрації сукцинату (5 ммоль/л) ми спостерігали початок розвитку “субстратного інгібування”.

3.3.2. Вплив Ca^{2+} на кінетичні параметри окиснення пірувату в пермеабілізованих гепатоцитах за тривалої дії таурину

Процеси піруватстимульованого споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами зазнають суттєвіших змін під впливом таурину, порівняно зі сукцинатстимульованим. У дослідних тварин зберігається залежність кінетичних параметрів дихання за окиснення пірувату від концентрації цитозольного Ca^{2+} , як і в контрольних. Але показники V_{max} є нижчими у гепатоцитів щурів, яким вводили таурин, як за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} ($0,19 \pm 0,002$ порівняно з $0,27 \pm 0,01$ нмоль $\text{O}_2/(\text{с} \cdot \text{млн. клітин})$, $n = 4$), так і 1 мкмоль/л Ca^{2+} ($0,3 \pm 0,006$ порівняно з $0,4 \pm 0,008$ нмоль $\text{O}_2/(\text{с} \cdot \text{млн. клітин})$, $n = 4$) (рис. 3.13).

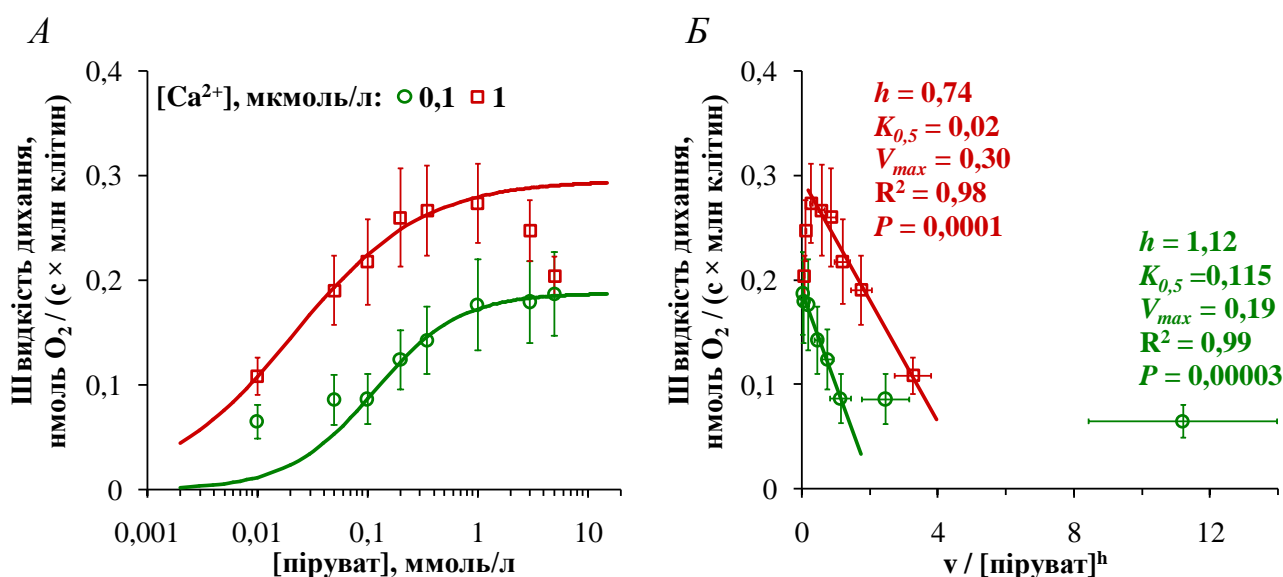


Рис. 3.13. Вплив тривалого введення тваринам таурину на кінетичну залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки від концентрації пірувату (на фоні малату) у середовищах з $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,1 (нижня лінія) і 1 (верхня лінія) мкмоль/л: при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості споживання кисню від концентрації сукцинату чи пірувату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [малат]=1 ммоль/л, [піруват] = 0,01–5 ммоль/л, $n = 4$

Крім того, виявилось, що “субстратне інгібування” за 1 мкмоль/л Ca^{2+} у досліді починає розвиватись за майже на порядок вищої концентрації пірувату, ніж у контролі (3 ммоль/л порівняно з 0,35 ммоль/л). Останні два факти дають нам підстави припустити, що за тривалої дії таурину *in vivo* порушуються механізми Ca^{2+} -залежної регуляції процесів дихання гепатоцитів. Зокрема, очевидно, зазнають змін зворотні гомеостатичні зв'язки у системі контролю мембранного потенціалу мітохондрій, що, у свою чергу, відображається у зниженні інтенсивності споживання кисню і зменшенні регуляторного впливу Ca^{2+} на ці процеси у клітинах печінки щурів, яким вводили таурин. Підтвердженням цього порушення може служити зміна коефіцієнта Хілла у дослідних тварин, який за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} стає більшим, ніж 1, що свідчить про наявність у системі позитивних зворотних зв'язків, тоді, як у контрольних – він за обох концентрацій Ca^{2+} є меншим від 1, тобто, за таких умов є лише негативні зворотні зв'язки.

Підсумок. Тривалий вплив таурину *in vivo* не змінює сукцинатстимульованого ротеноннечутливого дихання та інтенсифікує процеси піруватстимульованого споживання кисню у гепатоцитах щурів. У основі цієї інтенсифікації лежить зміна параметрів Ca^{2+} -регуляції мітохондріального дихання. Це спричиняє зменшення $K_{0,5}$ і появу позитивної кооперативності в окисненні пірувату за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі та зменшення субстратного інгібування за 1 мкмоль/л Ca^{2+} [Merlavsky et al., 2015].

1. Merlavsky V.M. Kinetic parameters of respiration in rat permeabilized hepatocytes upon Ca^{2+} in various 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.

3.4. Дослідження процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів за умов експериментальної гіперінсулінемії різної тривалості

Відомо, що залежність швидкості дихання суспензії гепатоцитів від концентрації цих клітин є нелінійною [10]. І дійсно, чим більше клітин у полярографічній комірці, тим відносна швидкість дихання була меншою (рис. 3.7). Оптимальна (лінійна) залежність спостерігалася у діапазоні 0,8–2,0 млн/мл, тому саме такі кількості клітин використовувалися нами у подальших експериментах.

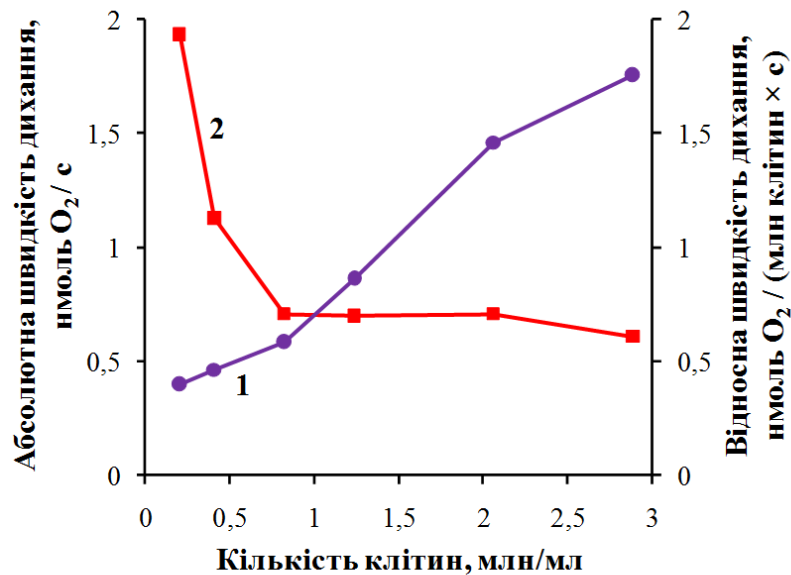


Рис. 3.14. Залежність швидкості дихання суспензії інтактних гепатоцитів від їхньої кількості у полярографічній комірці: 1 – крива залежності швидкості дихання від концентрації гепатоцитів у суспензії, 2 – розраховані швидкості дихання на один млн гепатоцитів за різних їх концентрацій

3.4.1. Дослідження впливу глюкози на процеси дихання гепатоцитів

У живому організмі глюкоза, яка надходить з кров'ю, є основним джерелом енергії для гепатоцитів. Однак інкубація інтактних клітин у розчині без глюкози не зумовлювала статистично вірогідних змін їхнього ендogenous дихання порівняно з контролем (рис. 3.15 А). Рівень ендogenous дихання пермеабілізованих клітин за умов їхньої інкубації у середовищі без глюкози, статистично вірогідно підвищувався на 31,2% щодо контролю ($P=0,017, n=3$, рис. 3.15 Б).

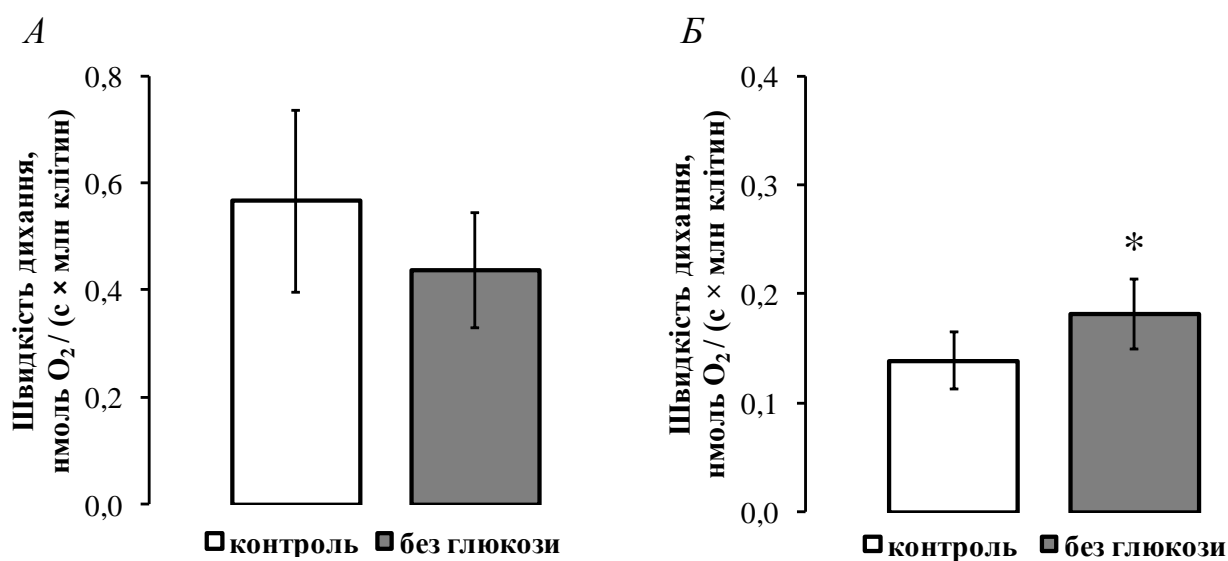


Рис. 3.15. Ендogenous дихання інтактних (А) і пермеабілізованих (Б) гепатоцитів залежно від наявності у середовищі глюкози: * – зміни статистично вірогідні відносно до контролю з $P < 0,05$

Унаслідок додавання екзогенних субстратів окиснення – α -кетоглутарату або сукцинату дихання пермеабілізованих гепатоцитів, попередньо проінкубованих без глюкози, статистично вірогідно не змінювалося порівняно з контролем (рис. 3.16).

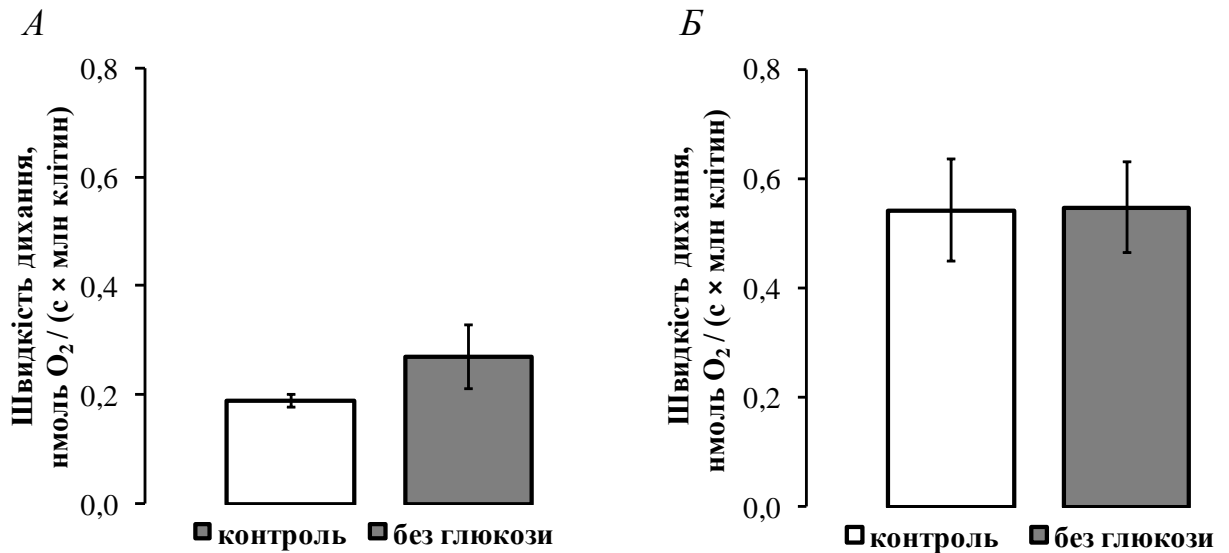


Рис. 3.16. Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення екзогенних α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) залежно від наявності у середовищі глюкози: $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 1$ ммоль/л, $[\text{сукцинат}] = 0,35$ ммоль/л

Аналогічно, відсутність у середовищі глюкози не спричиняє статистично вірогідних змін між показниками швидкості споживання кисню за окиснення α -кетоглутарату або сукцинату і за наявності у полярографічній комірці екзогенного АДФ (рис. 3.17).

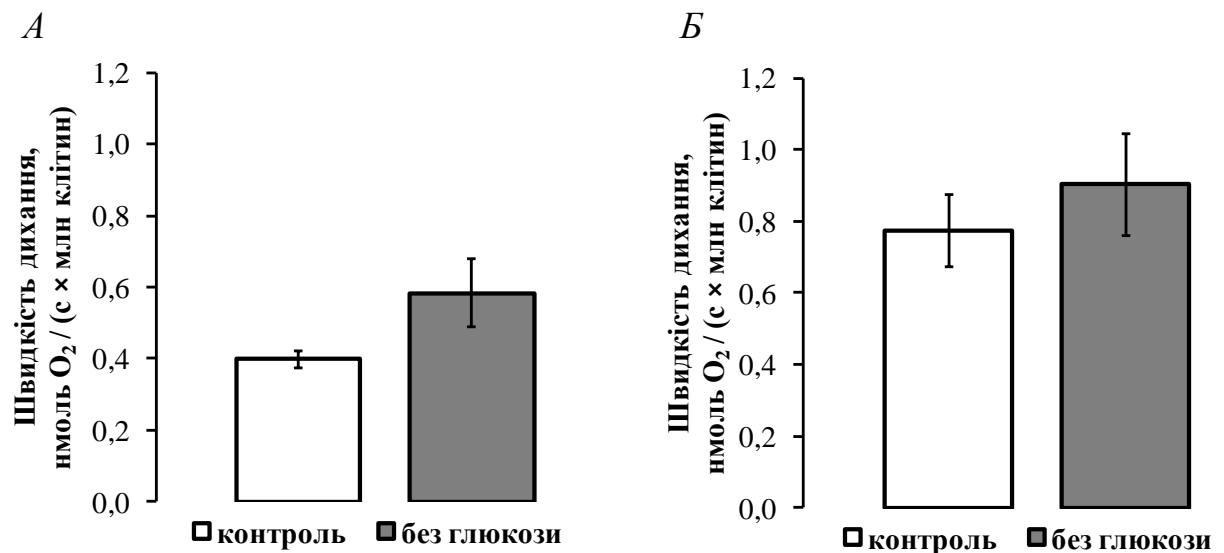


Рис. 3.17. Інтенсивність споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за окиснення екзогенних α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) з АДФ залежно від наявності у середовищі глюкози: $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 1$ ммоль/л, $[\text{сукцинат}] = 0,35$ ммоль/л, $[\text{АДФ}] = 0,75$ ммоль/л

Підвищення рівня ендogenousного дихання пермеабілізованих гепатоцитів, інкубованих у розчині без глюкози, можна пояснити, виходячи з таких міркувань. За відсутності цього вуглевода у середовищі для забезпечення енергетичних потреб у клітинах відбувається розщеплення глікогену, а згодом і ліпідів, що вимагає активації відповідних ферментів. Відомо, зокрема, що ендogenousне дихання пошкоджених гепатоцитів відбувається, в основному, завдяки окисненню ліпідів [73]. Тому ми припускаємо, що гепатоцити, які перебували у розчині без глюкози, після пермеабілізації швидше розщеплювали ендogenousні ліпіди, ніж контрольні, що може пояснюватись активацією відповідних ферментів. У наступних дослідженнях ми додавали глюкозу до базового позаклітинного середовища.

3.4.2. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за дії інсуліну *in vitro*

Зважаючи на провідну роль інсуліну в регуляції обміну вуглеводів, ми вивчали його вплив на дихання ізольованих інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів *in vitro*. У результаті досліджень було встановлено, що додавання інсуліну до середовища інтактних гепатоцитів у концентрації 20 нмоль/л не впливає на їхнє дихання (рис. 3.18 А). Це узгоджується з даними інших авторів, які не виявили впливу інсуліну в концентрації 6 нмоль/л на дихання інтактних гепатоцитів [58].

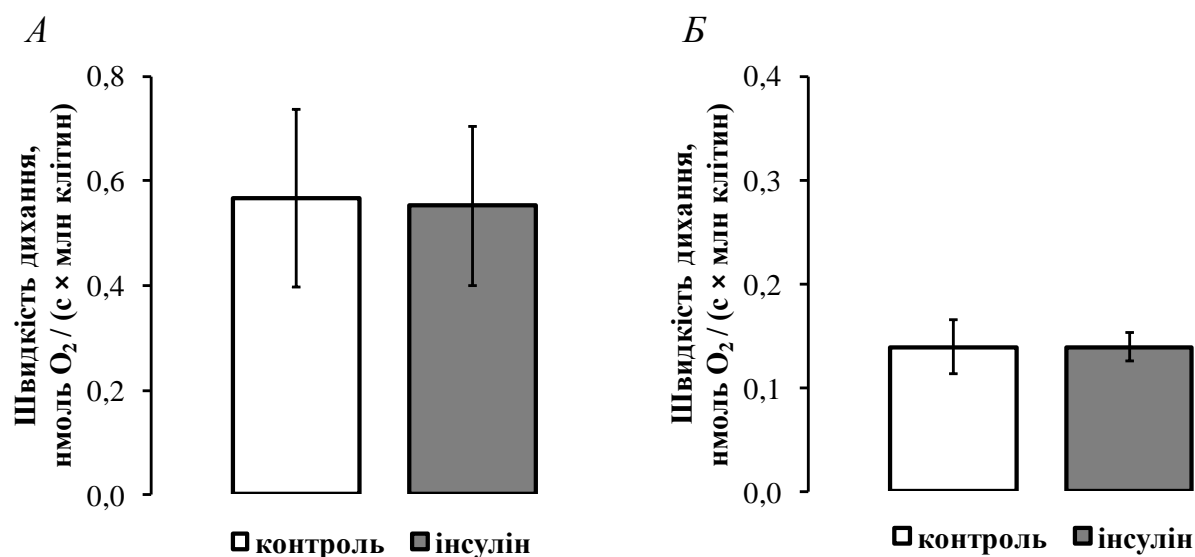


Рис. 3.18. Швидкість ендогенного дихання інтактних (А) і пермеабілізованих (Б) гепатоцитів після 10 хв інкубації з інсуліном: [інсулін] = 20 нмоль/л

Після пермеабілізації клітин печінки, преінкубованих з інсуліном швидкість споживання кисню за окиснення ендогенних субстратів була такою ж, як і у контролі – $0,139 \pm 0,014$ нмоль $\text{O}_2 / (\text{s} \times \text{млн клітин})$ ($n = 3$, рис. 3.18 Б).

Інсулін *in vitro* не впливав на інтенсивність дихання пермеабілізованих клітин печінки і за окиснення екзогенних α -кетоглутарату чи сукцинату. За внесення у полярографічну комірку α -кетоглутарату показник швидкості споживання кисню преінкубованими з інсуліном гепатоцитами практично не відрізнявся від контролю ($0,189 \pm 0,012$ і $0,216 \pm 0,042$ нмоль $\text{O}_2 / (\text{s} \times \text{млн клітин})$ відповідно, $n = 3$, рис. 3.19 А).

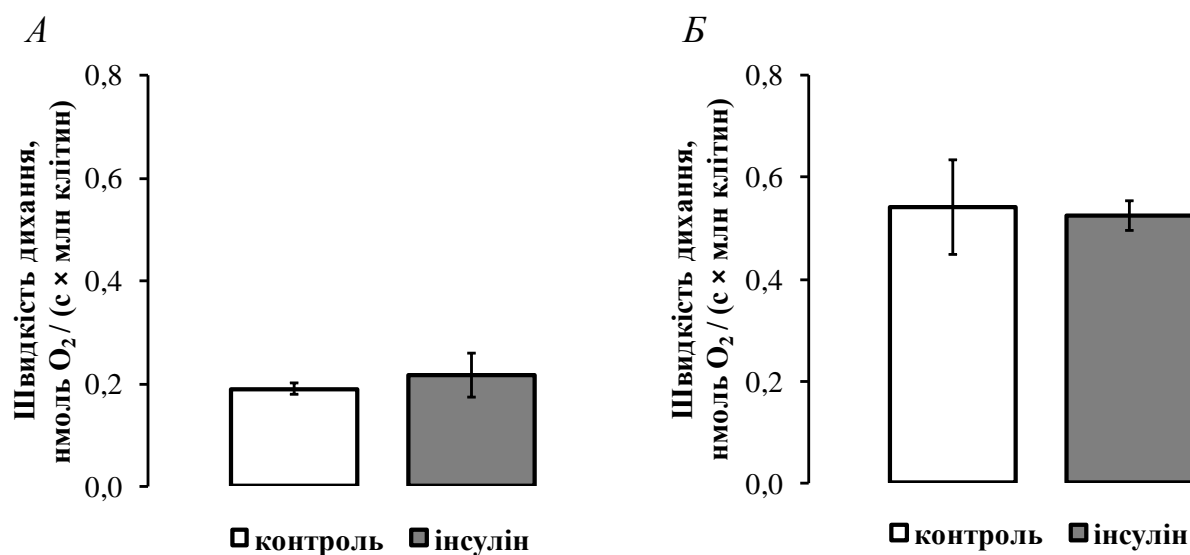


Рис. 3.19. Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення екзогенних α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) після 10 хв інкубації з інсуліном: $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 1$ ммоль/л, $[\text{сукцинат}] = 0,35$ ммоль/л, $[\text{інсулін}] = 20$ нмоль/л

За додавання до суспензії пермеабілізованих клітин сукцинату, між швидкостями споживання кисню за умов інкубації гепатоцитів з інсуліном та у контролі теж не було статистично достовірної різниці ($0,541 \pm 0,093$ та $0,524 \pm 0,029$ нмоль O₂ / (с × млн клітин) відповідно, $n = 3$, рис. 3.19 Б). Така ж закономірність спостерігалась і за окиснення екзогенних α -кетоглутарату або сукцинату з наступним додаванням до полярографічної комірки АДФ (рис. 3.20).

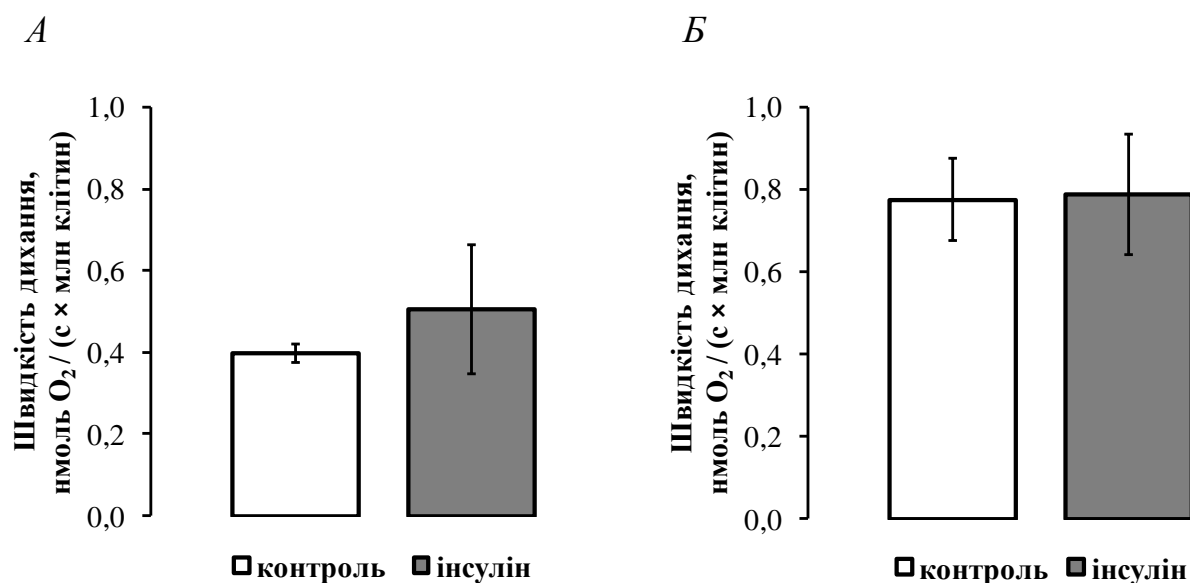


Рис. 3.20. Швидкість споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за окиснення екзогенних α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) з АДФ після 10 хв інкубації з інсуліном: $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 1$ ммоль/л, $[\text{сукцинат}] = 0,35$ ммоль/л, $[\text{АДФ}] = 0,75$ ммоль/л, $[\text{інсулін}] = 20$ нмоль/л

Для визначення впливу інсуліну *in vitro* на ступінь спряження процесів дихання і окисного фосфорилування у пермеабілізованих гепатоцитах ми обчислили показники дихального контролю за Ларді.

Нами встановлено, що інкубація клітин печінки з інсуліном впродовж 10 хв не спричиняє суттєвих змін дихального контролю за окиснення як α -кетоглутарату, так і сукцинату (рис. 3.21).

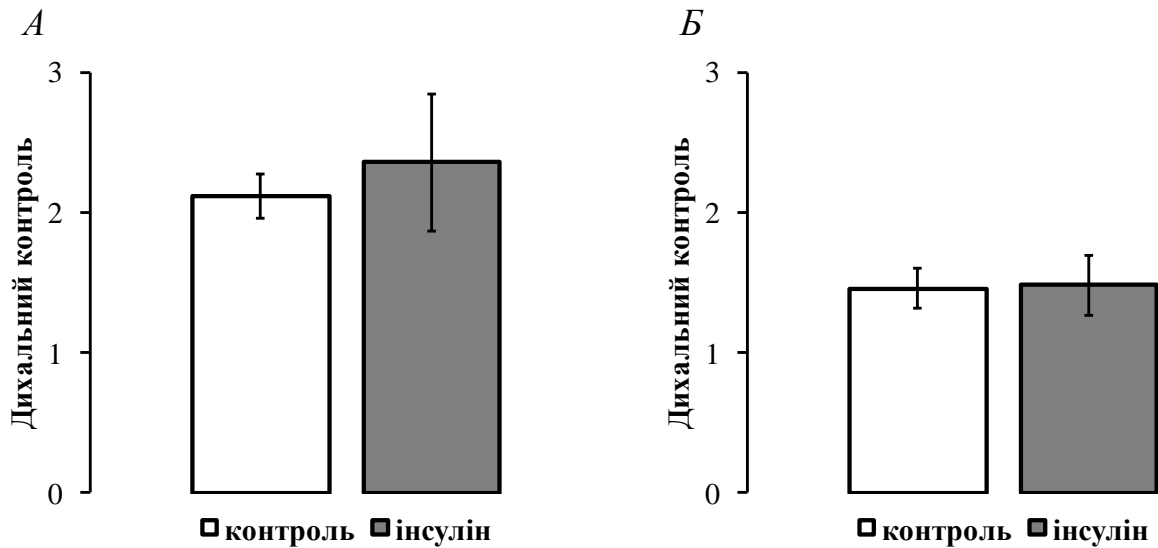


Рис. 3.21. Ступінь спряження процесів дихання і окисного фосфорилування (дихальний контроль за Ларді) у пермеабілізованих гепатоцитах щурів, за дії інсуліну *in vitro* за окиснення α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б)

Отже, підсумовуючи всі вищенаведені акти, можна стверджувати, що за короткочасної дії інсуліну *in vitro* процеси дихання гепатоцитів не зазнають жодних змін.

3.4.3. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за одноразового введення інсуліну

Одноразове введення тваринам інсуліну (0,5 од./100 г маси тварини) також не спричиняло вірогідних змін швидкості споживання кисню інтактними та пермеабілізованими гепатоцитами за окиснення ендогенних субстратів (рис. 3.22).

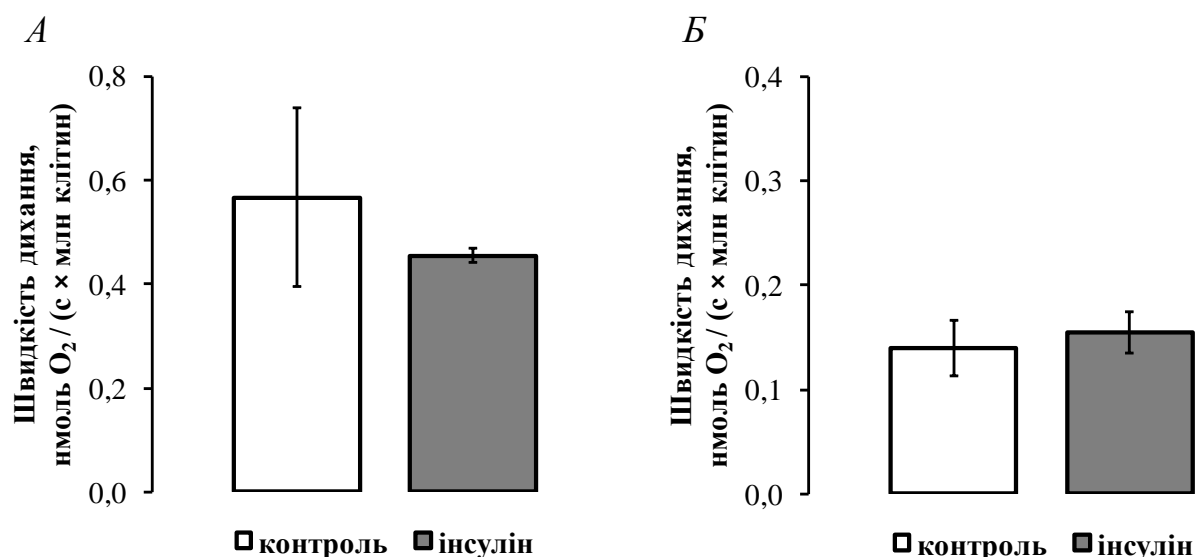


Рис. 3.22. Швидкість ендogenous дихання інтактних (А) і пермеабілізованих (Б) гепатоцитів після одноразового введення інсуліну: [інсулін] = 0,5 од./100 г маси тварини

Проте нами виявлено статистично вірогідне інсулінспричинене підвищення швидкості дихання пермеабілізованих клітин за окиснення α -кетоглутарату на 48,45% порівняно з контролем ($P = 0,032$, $n = 3$; рис. 3.23 А). За окиснення сукцинату швидкість споживання кисню у досліді не відрізнялася від контролю (рис. 3.23 Б).

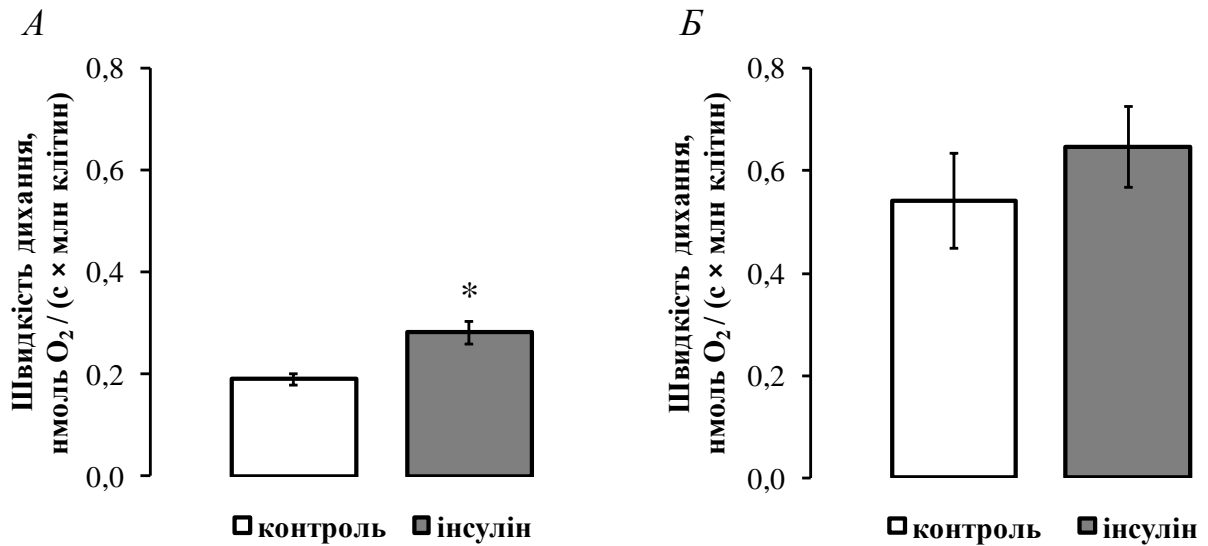


Рис. 3.23. Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення екзогенних α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) після одноразового введення інсуліну: $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 1$ ммоль/л, $[\text{сукцинат}] = 0,35$ ммоль/л, $[\text{інсулін}] = 0,5$ од./100 г маси тварини: * – різниця статистично достовірна щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 3$

Унаслідок додавання АДФ швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення α -кетоглутарату у досліді була статистично вірогідно вищою на 109,02% ($P = 0,026$, $n = 3$; рис. 3.24 А), а за окиснення сукцинату – на 93,93%, ніж у контролі ($P = 0,04$, $n = 3$; рис. 3.24 Б).

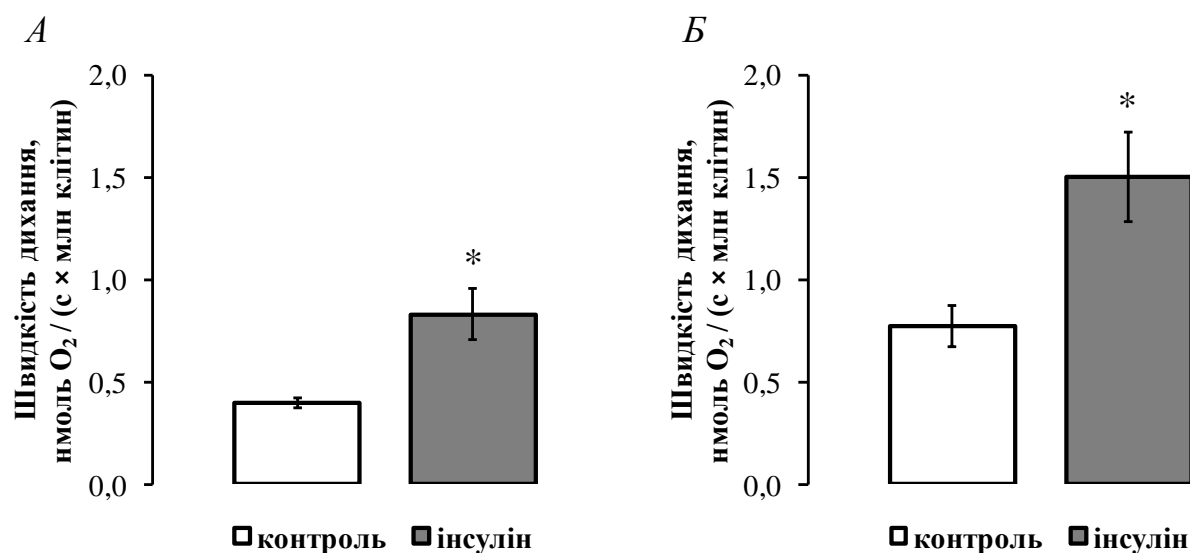


Рис. 3.24. Вплив інсуліну *in vivo* на дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) з АДФ: дослідження проводили через 4 год після введення інсуліну (0,5 од./100 г маси тварини): * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 3$

Як і у попередній серії досліджень, нами було розраховано показники дихального контролю за Ларді – для оцінки спряження процесів дихання й окисного фосфорилування у пермеабілізованих гепатоцитах за одноразового введення інсуліну. Нами виявлено, що за окиснення α -кетоглутарату статистично достовірної різниці між параметрами дихального контролю гепатоцитів щурів контрольної та дослідної груп не було (рис. 3.25 А). Тоді, як за окиснення сукцинату дихальний контроль був на 59% вірогідно вищим у тварин, яким одноразово вводили інсулін, порівняно з контрольними (рис. 3.25 Б).

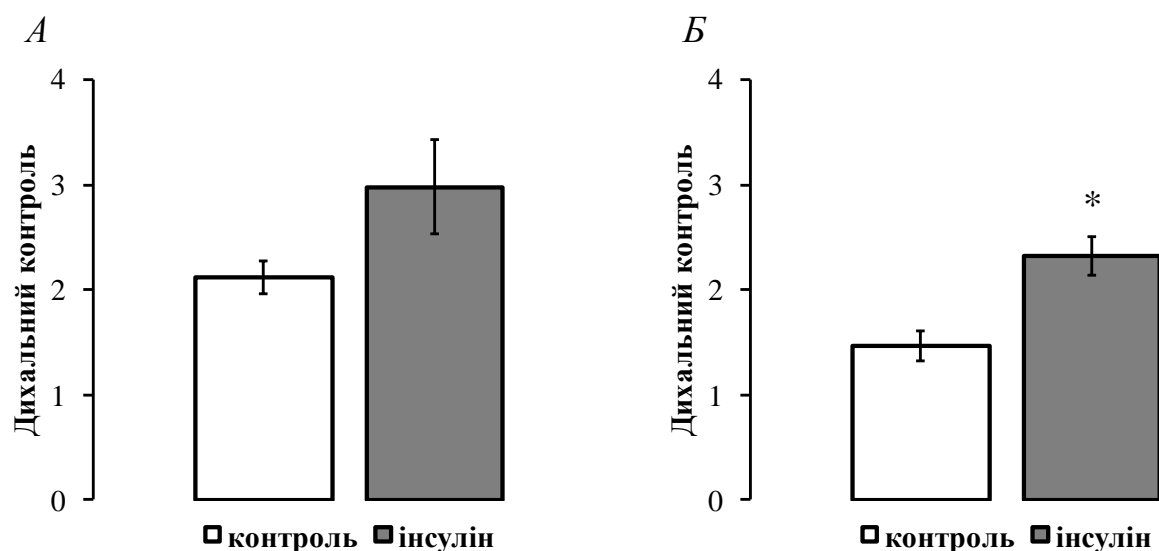


Рис. 3.25. Показники дихального контролю за Ларді за окиснення α -кетоглутарату (А) чи сукцинату (Б) гепатоцитами контрольних щурів і тварин, яким одноразово вводили інсулін: * – різниця статистично вірогідна щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 3$

Модель інтактних ізольованих гепатоцитів найбільше відображає стан цих клітин за фізіологічного спокою тварини. Оскільки під дією інсуліну швидкість дихання інтактних гепатоцитів за окиснення глюкози не зростає, імовірно, що й підвищення рівня інсуліну в крові не впливає на окиснення глюкози в печінці *in vivo*. Тим не менше, за дії інсуліну протягом 4 год *in vivo* у пермеабілізованих гепатоцитах інтенсифікується окиснення α -кетоглутарату (НАД-залежний субстрат) і сукцинату (ФАД-залежний субстрат), особливо за наявності екзогенного АДФ. Ми вважаємо, що цих умов швидкість дихання є субмаксимальною внаслідок високих концентрацій екзогенних субстратів і АДФ, а тому відображає не стан спокою гепатоцитів, а стан високої функціональної активності.

Доцільно зробити висновок, що інсулін за чотиригодинного впливу *in vivo* підвищує максимальну окисну здатність мітохондрій гепатоцитів незалежно від субстрату окиснення, не збільшуючи фактичної швидкості окиснення. З

огляду на це, цілком імовірно, що однією з функцій інсуліну в живому організмі є підтримання високої окисної здатності мітохондрій гепатоцитів. Наші дані доповнюють відомості про підвищення максимальної окисної здатності мітохондрій кардіоміоцитів за дії інсуліну *in vivo* [94].

3.4.4. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за шестиденного введення інсуліну

Виявивши, що інсулін стимулює процеси дихання за чотиригодинного впливу *in vivo*, ми вирішили дослідити, чи будуть спостерігатись подібні тенденції за тривалішої дії цього гормону. У результаті досліджень було встановлено, що у щурів, яким хронічно вводили інсулін протягом 6 діб, швидкість дихання інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення ендогенних субстратів не змінювалась порівняно з контрольними тваринами (рис. 3.26).

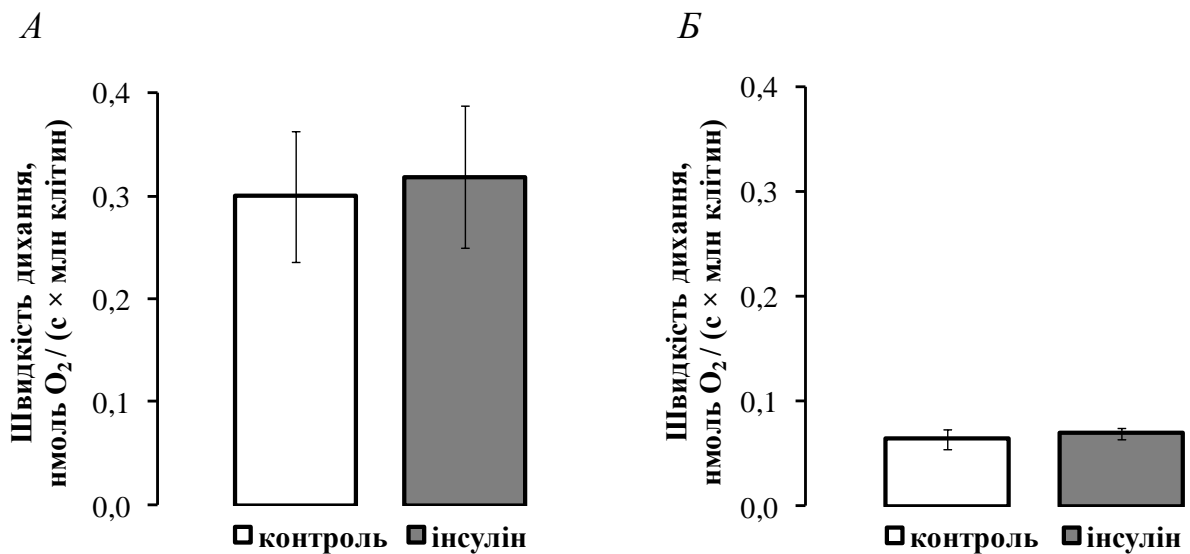


Рис. 3.26. Швидкість ендогенного дихання інтактних (А) і пермеабілізованих (Б) гепатоцитів за хронічного введення інсуліну впродовж 6-ти днів: [інсулін] = 0,5 од./100 г маси тварини

За окиснення екзогенного α -кетоглутарату чи сукцинату суттєвих змін показників швидкості споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами щурів, яким вводили інсулін, порівняно із контрольними тваринами не було виявлено (рис. 3.27).

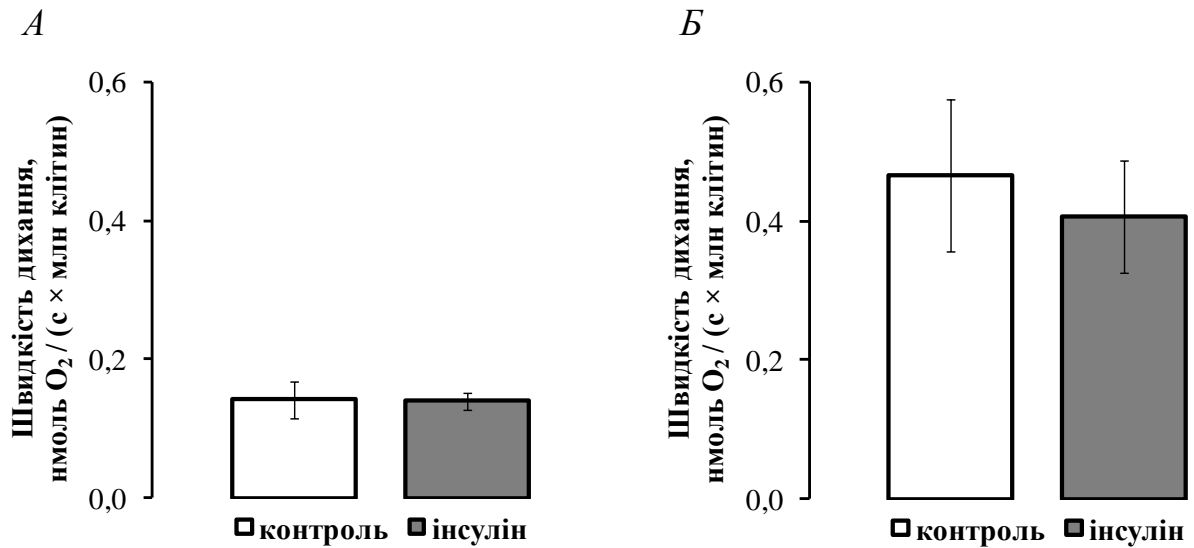


Рис. 3.27. Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення екзогенних α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) після хронічного введення інсуліну впродовж 6-ти днів: [α -кетоглутарат]=1 ммоль/л, [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [інсулін]=0,5 од/100 г маси тварини, n=3–4

Так само, як і за окиснення лише субстратів, після наступного внесення у полярографічну комірку АДФ статистично вірогідних відмінностей між показниками швидкості споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами щурів, яким вводили інсулін і контрольними тваринами не спостерігали (рис. 3.28).

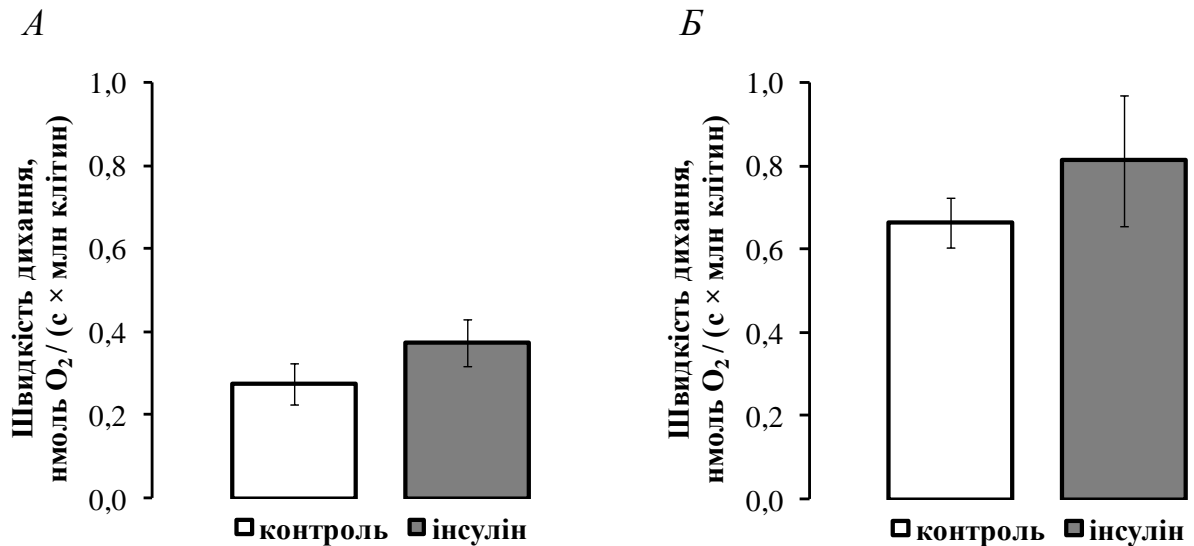


Рис. 3.28. Інтенсивність споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за окиснення екзогенних α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) з АДФ після хронічного введення інсуліну впродовж 6-ти днів: [α-кетоглутарат] = 1 ммоль/л, [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [АДФ] = 0,75 ммоль/л, [інсулін] = 0,5 од./100 г маси тварини, n = 3–4

У результаті аналізу показників дихального контролю за Ларді було виявлено, що за окиснення α -кетоглутарату ступінь спряження дихання і окисного фосфорилування є достовірно вищим на 36,2% у гепатоцитів тварин, яким впродовж шести днів вводили інсулін (рис. 3.29 А). За окиснення сукцинату вірогідної різниці між показниками дихального контролю у контрольних та дослідних тварин не було (рис. 3.29 Б).

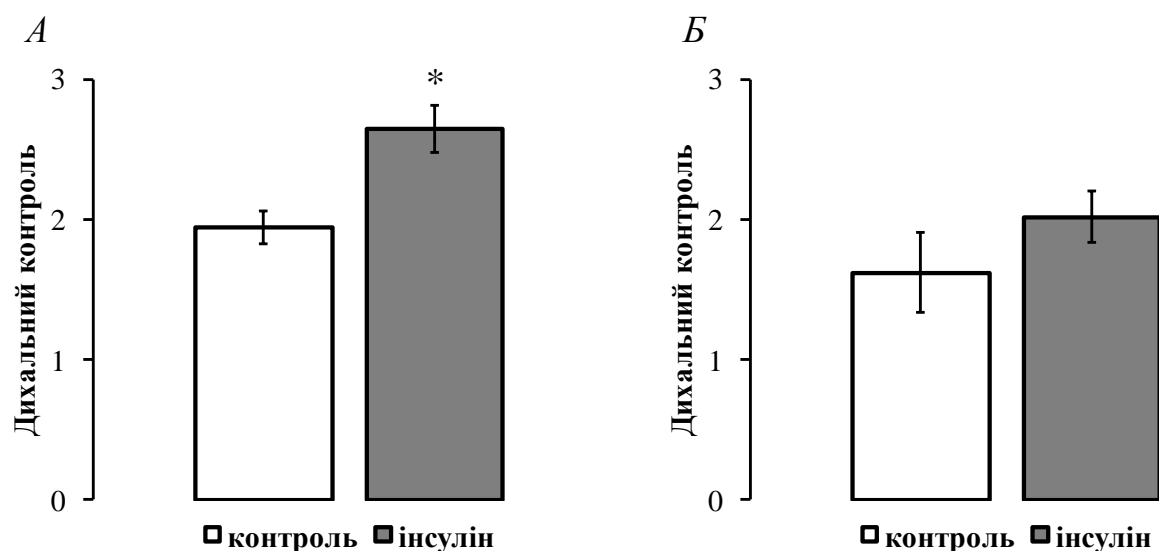


Рис. 3.29. Показники дихального контролю за Ларді за окиснення α -кетоглутарату (А) чи сукцинату (Б) гепатоцитами контрольних щурів і тварин, яким хронічно впродовж шести днів вводили інсулін: * – різниця статистично вірогідна щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 3-4$

Збільшення тривалості дії інсуліну з 4 год до 6 днів повністю нівелювало його вплив на окисні процеси у гепатоцитах. Можливим поясненням цього є виникнення резистентності до інсуліну в 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 статистично вірогідно більше на 69,23%, ніж у контрольних ($P = 0,007$, $n = 4$; рис. 3.30). Через 90 хв концентрація глюкози у крові дослідних щурів була статистично вірогідно вищою на 16,8%, ніж у контрольних ($P = 0,048$, $n = 3$).

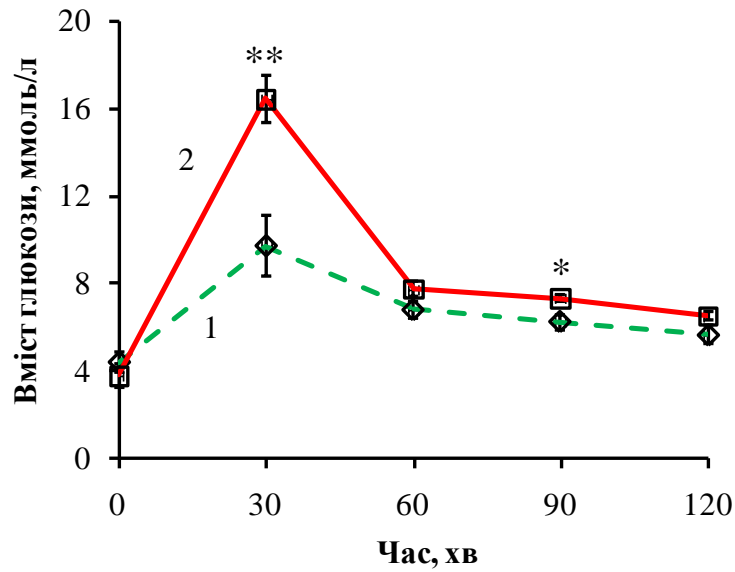


Рис. 3.30. Вплив шестиденного введення інсуліну на толерантність до глюкози у щурів: 1 – контроль, 2 – гіперінсулінемія; тваринам раз на добу вводили інсулін протягом шести днів (0,5 од./100 г маси тварини), на цьому добу їм вводили внутрішньочеревно глюкозу (3 мг/г маси тварини), розчинену в 2 мл фізіологічного розчину

Отже, шестиденне введення інсуліну дійсно спричиняє певні порушення толерантності до глюкози, що і може спричинити порушення чутливості до нього дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення ендогенних та екзогенних субстратів.

3.4.5. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за дванадцятиденного введення інсуліну

Унаслідок збільшення тривалості введення інсуліну з 6-ти до 12-ти діб ми отримали результати, аналогічні до попередньої серії. Тобто, швидкість дихання інтактних та пермеабілізованих гепатоцитів не змінювалась, зокрема, за окиснення ендогенних субстратів (рис. 3.31).

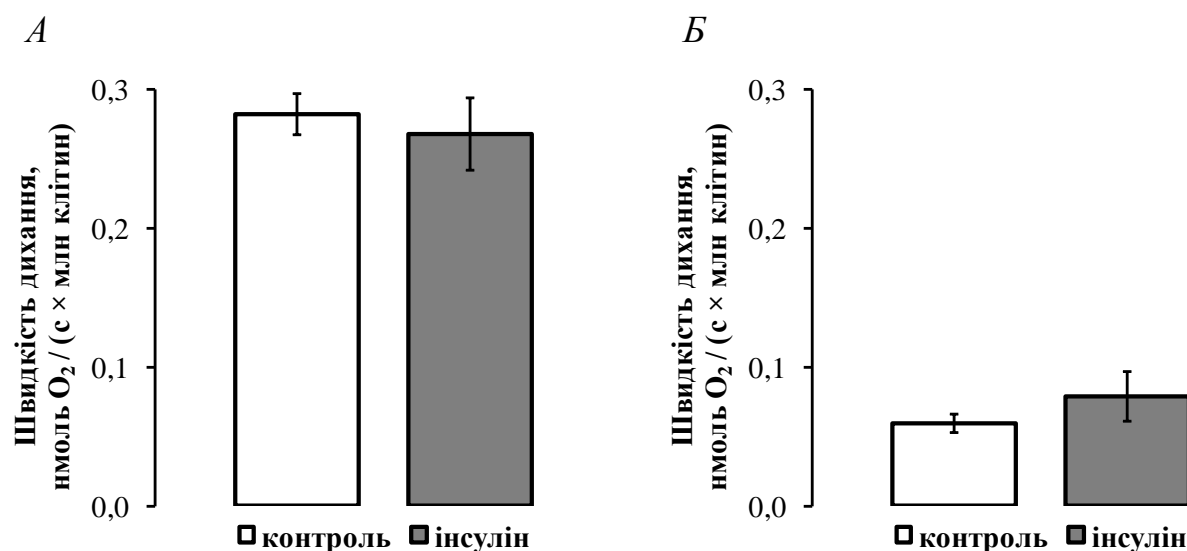


Рис. 3.31. Швидкість ендогенного дихання інтактних (А) і пермеабілізованих (Б) гепатоцитів за хронічного введення інсуліну впродовж 12-ти днів: [інсулін] = 0,5 од./100 г маси тварини

Як і за 6-тиденного введення, різниці у показниках інтенсивності споживання кисню за окиснення екзогенних α -кетоглутарату чи сукцинату між контрольними щурами і тваринами, яким хронічно вводили інсулін впродовж 12-ти днів не було (рис. 3.32).

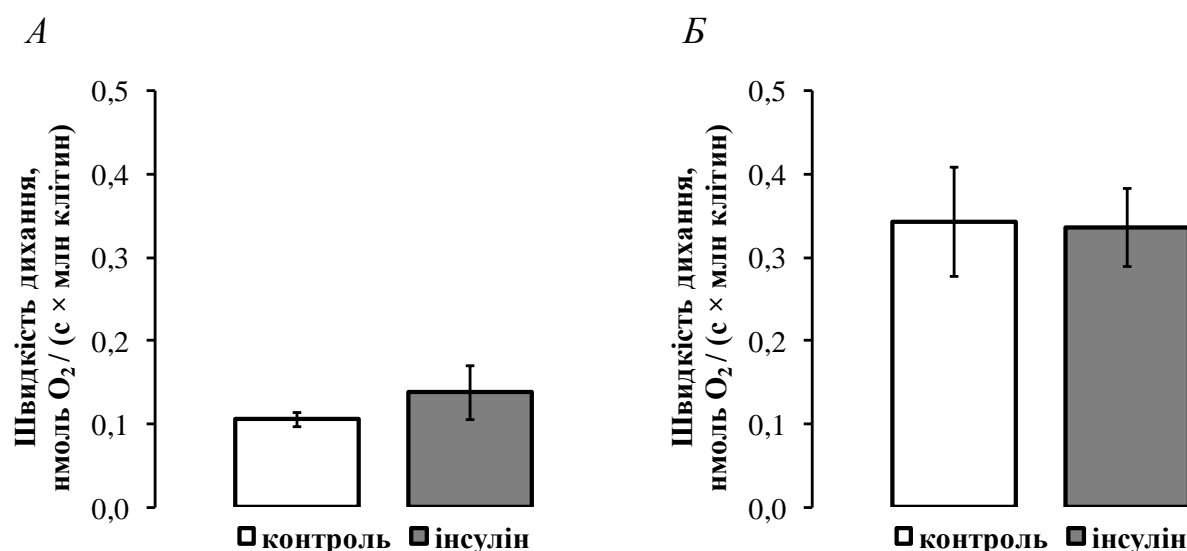


Рис. 3.32. Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) після хронічного введення інсуліну впродовж 12-ти днів: [α -кетоглутарат] = 1 ммоль/л, [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [інсулін] = 0,5 од./100 г маси тварини, n = 4

Аналогічно, і за внесення до полярографічної комірки АДФ після субстратів окиснення не було різниці між швидкостями дихання пермеабілізованих клітин печінки дослідних щурів порівняно з контрольними (рис. 3.33).

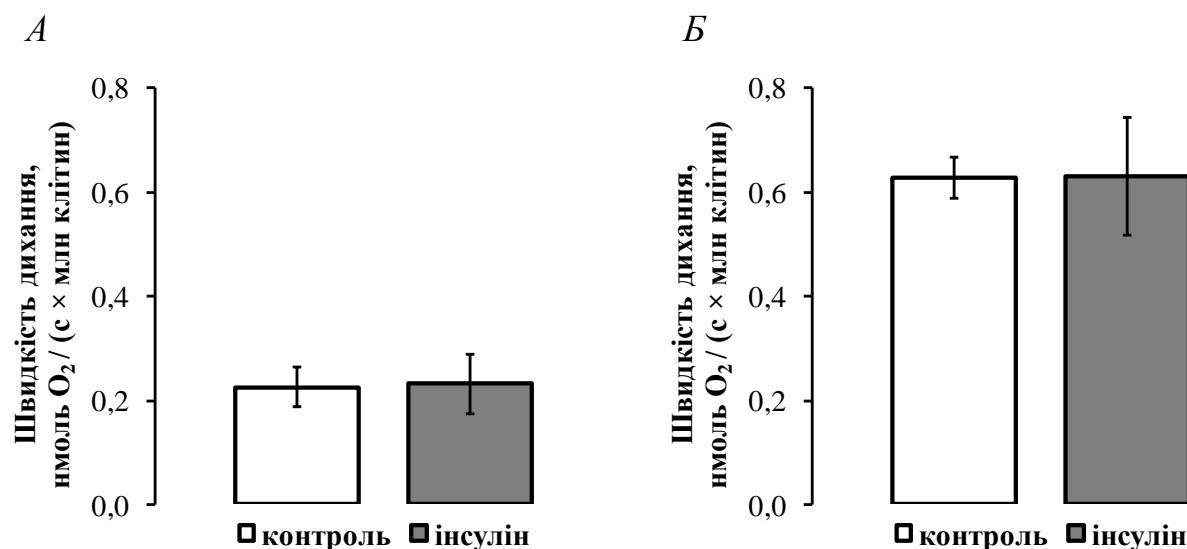


Рис. 3.33. Швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення екзогенного α -кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) з АДФ після введення інсуліну впродовж 12-ти днів: [α -кетоглутарат] = 1 ммоль/л, [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [АДФ] = 0,75 ммоль/л, [інсулін] = 0,5 од./100 г маси тварини, n = 4

Дихальний контроль за Ларді пермеабілізованих клітин печінки за окиснення як α -кетоглутарату, так і сукцинату не зазнавав суттєвих змін під впливом дванадцятиденного введення інсуліну (рис. 3.34).

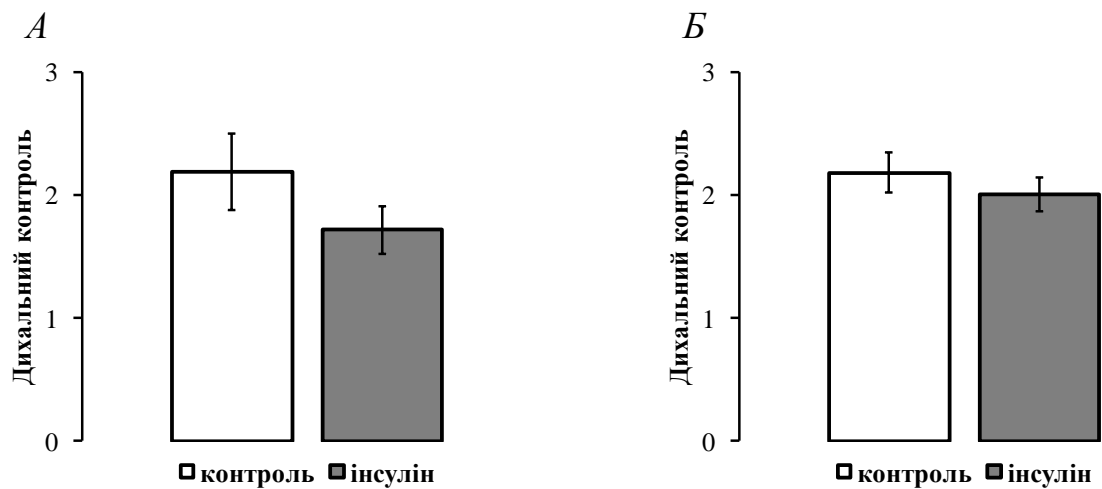


Рис. 3.34. Ступінь спряження процесів дихання й окисного фосфорилування (дыхальний контроль за Ларді) за окиснення α -кетоглутарату (А) чи сукцинату (Б) у пермеабілізованих гепатоцитах контрольних щурів і тварин, яким впродовж дванадцяти днів хронічно вводили інсулін

Інсулін також не спричиняв порушення толерантності до глюкози при збільшенні тривалості його введення, оскільки динаміка змін концентрації глюкози була ідентичною з контролем (рис. 3.35). Очевидно, за цей час у тварин виникають компенсаторні реакції за участю інших гормональних систем регуляції.

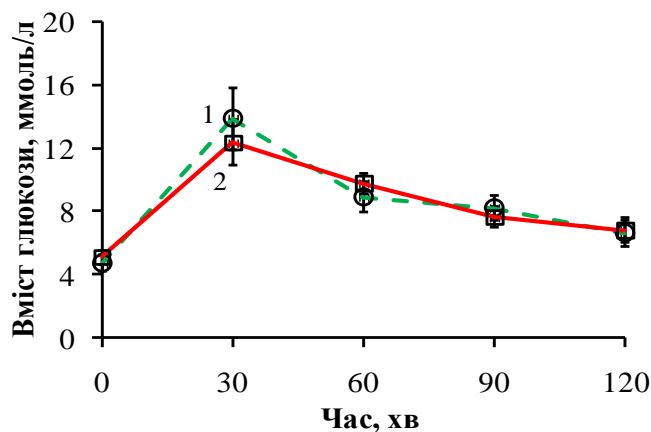


Рис. 3.35. Вплив дванадцятиденного введення інсуліну на толерантність до глюкози у щурів: тваринам раз на добу вводили інсулін протягом дванадцяти днів (0,5 од./100 г маси тварини), на тринадцяту добу їм вводили внутрішньочеревно глюкозу (3 мг/г маси тварини), розчинену в 2 мл фізіологічного розчину

Проведення кореляційного аналізу з метою встановлення взаємозв'язку між процесами дихання гепатоцитів і толерантністю до глюкози показало, що у контрольних тварин кореляції між цими показниками немає. Проте у тварин, яким вводили інсулін протягом 12 діб коефіцієнт кореляції між площею під кривою концентрації глюкози в крові (показник толерантності; чим більша площа, тим гіршою є толерантність) й АДФ-стимульованим диханням при окисненні сукцинату пермеабілізованими гепатоцитами становить -0,86, а при окисненні α -кетоглутарату – -0,96. Отже, чим вищою є толерантність до глюкози, тим вищим є рівень АДФ-стимульованого дихання.

Оскільки порушення (зниження) толерантності до глюкози вказують на виникнення резистентності до інсуліну, то негативне значення коефіцієнта кореляції означає, що максимальна окисна здатність мітохондрій гепатоцитів знаходиться в оберненій залежності від резистентності до інсуліну. Це свідчить на користь припущення про роль інсуліну в підтриманні високої окисної здатності мітохондрій гепатоцитів і узгоджується з нашими даними про активацію ним дихання за одноразового введення. Пояснення відсутності кореляцій між максимальною окисною здатністю пермеабілізованих гепатоцитів і толерантністю до глюкози у контрольних тварин буде предметом наступних досліджень.

Підсумок. Отже, короточасна дія інсуліну *in vitro* не впливає на швидкість дихання інтактних гепатоцитів, ендогенного дихання пермеабілізованих гепатоцитів, а також дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату незалежно від наявності екзогенного АДФ. Інсулін характеризується часовою залежністю впливу на процеси дихання *in vivo* – з активацією АДФ-стимульованого окиснення сукцинату й α -кетоглутарату ізольованих гепатоцитів через 4 год після ін'єкції та відсутністю ефекту при тривалому введенні (6 і 12 діб) [Мерлавський та ін., 2010]. Очевидно, за короткочасної дії реалізуються початкові впливи гормону інсуліну, а тривале його введення зумовлює розвиток резистентності до гіперінсулінемії.

1. 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.

3.5. Аналіз впливу Ca^{2+} на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого діабету

Однією з активно використовуваних моделей цукрового діабету є стрептозотоциніндукований діабет [178, 217]. Стрептозотоцин ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$) – це природний антибіотик, за будовою подібний до глюкози. Тому він надходить у β -клітини за допомогою транспортера глюкози (GLUT2) і зумовлює алкілювання ДНК, що призводить до активації полі-АДФ-рибозилування, і, як наслідок, до виснаження клітинних запасів НАД⁺ та АТФ. Цим і пояснюється його токсичність стосовно β -клітин.

3.5.1. Оцінка активності ензимів системи антиоксидантного захисту і сукцинатдегідрогенази у гепатоцитах за умов цукрового діабету

За цукрового діабету спостерігаються порушення функціонування дихального ланцюга мітохондрій, ступінь прояву яких відрізняється на різних етапах хвороби. Відомо, що зниження активності сукцинатдегідрогенази відбувається вже на початкових етапах розвитку цукрового діабету. Зокрема, у дослідженнях Маркевича В.Е. та Глущенко Н.В. [29], які вивчали особливості енергетичного забезпечення дітей, хворих на цукровий діабет I типу, загальна кількість лімфоцитів з гранулами, які відображають активність сукцинатдегідрогенази, у пацієнтів з цукровим діабетом була майже на 36 % нижчою, ніж у контрольній групі. Проте за нормалізації рівня глюкози ця різниця зменшувалась до 19 %.

Підтримання показників дихання на рівні, вищому, ніж у контролі на тлі зниженої активності сукцинатдегідрогенази (рис. 3.36) забезпечується, на нашу думку, НАД-залежною ланкою системи мітохондріального дихання, зокрема більш активним окисненням пірувату.

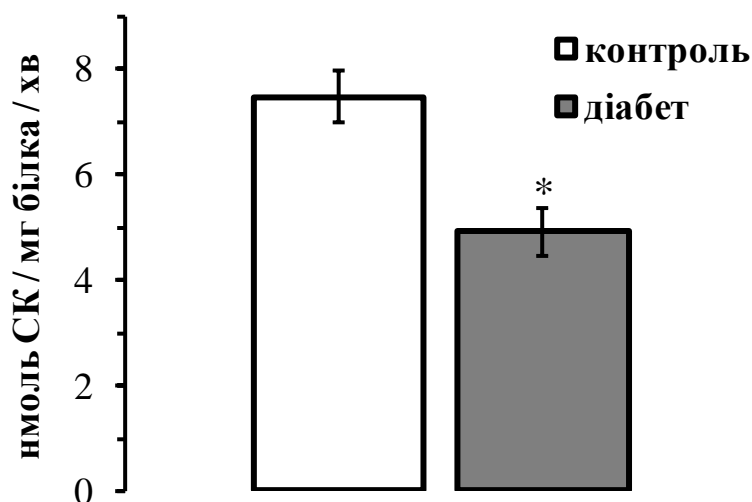


Рис. 3.36. Активність сукцинатдегідрогенази у печінці щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом: * – різниця достовірна відносно контролю з $P < 0,05$, $n = 5$

Гіперглікемія зумовлює аутоокиснення глюкози, яке впливає на зростання кількості активних форм кисню і розвиток оксидативного стресу [88]. Мітохондрії теж роблять важливий внесок у продукцію активних форм кисню. Тому, ми оцінювали рівень процесів пероксидного окиснення ліпідів у печінці щурів. Встановлено, що у печінці тварин зі стрептозотоциніндукованим діабетом вміст ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду; маркер оксидативного стресу) був на 55,9 % вищим, ніж у контрольній групі (рис. 3.37). Отже, активування процесів пероксидного окиснення ліпідів є однією з важливих ланок розвитку цукрового діабету.

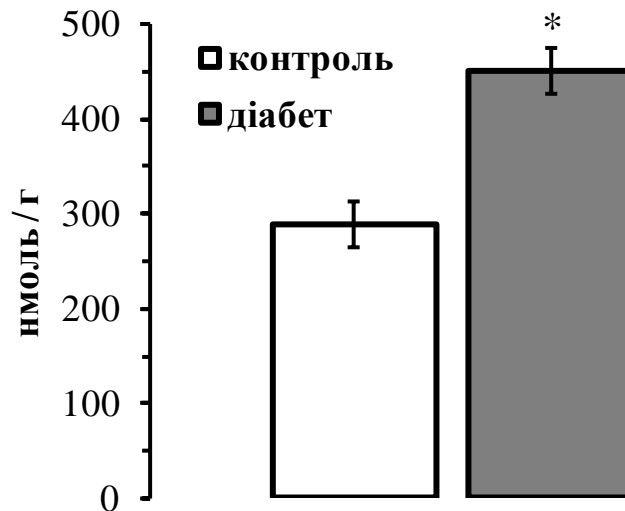


Рис. 3.37. Вміст ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду) у печінці щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом: * – різниця достовірна відносно контролю з $P < 0,05$, $n = 4$

Оскільки інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів, як фізіологічного процесу, регулюється системою антиоксидантного захисту, то ми досліджували активність супероксиддисмутази та каталази. Їхня послідовна скоординована дія підтримує рівень активних форм кисню в межах фізіологічної норми. Так, супероксиддисмутаза знешкоджує супероксидні аніон-радикали шляхом їх дисмутації (диспропорціонування) і перетворення у менш реакційно здатні молекули гідрогену пероксиду. Вміст і активність супероксиддисмутази у тканинах за різних функціональних та патологічних станів змінюється. Дані літератури щодо змін функціонування системи антиоксидантного захисту за умови цукрового діабету неоднозначні [8, 86, 163].

У результаті наших досліджень встановлено, що активність супероксиддисмутази у щурів з експериментальним цукровим діабетом зросла на 23,3 % щодо контролю (рис. 3.38).

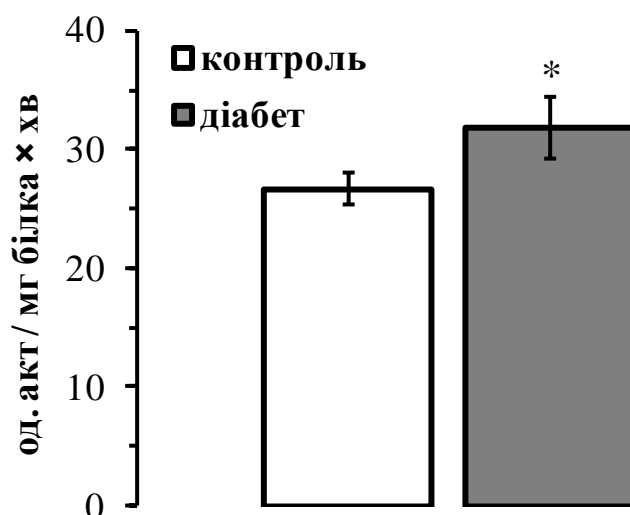


Рис. 3.38. Активність супероксиддисмутази у печінці щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом: * – різниця достовірна відносно контролю з $P < 0,05$, $n = 4$

Каталаза забезпечує підтримання кількості гідроген пероксиду в організмі на фізіологічному рівні [5]. Виявлено, що у печінці щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом активність каталази зросла на 52,0 %, порівняно з контролем (рис. 3.39).

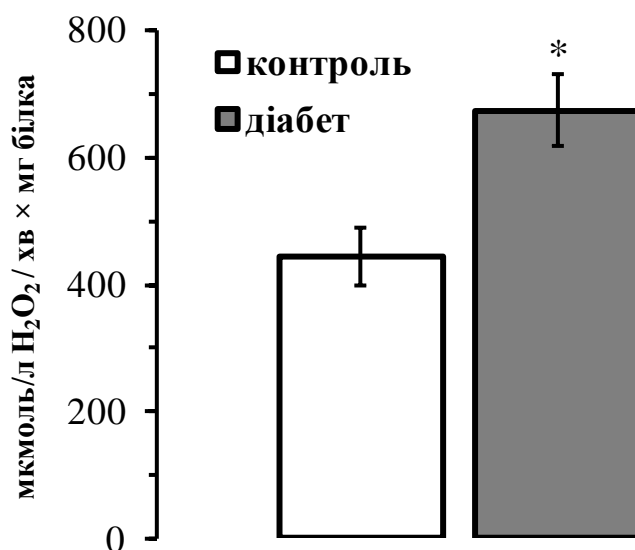


Рис. 3.39. Активність каталази у печінці щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом: * – різниця достовірна відносно контролю з $P < 0,05$, $n = 4$

Отже, отримані результати вказують на те, що на 15-у добу після введення стрептозотоцину у печінці щурів знижується активність сукцинатдегідрогенази, однак це не призводить до порушень енергетичного забезпечення гепатоцитів. Тобто, на ранніх етапах розвитку діабету печінка спроможна підтримувати нормальний енергетичний стан. Однак зростання рівня ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду) не компенсується активуванням системи антиоксидантного захисту.

3.5.2. Інтенсивність ендогенного дихання гепатоцитів за умов цукрового діабету

На сьогодні дані щодо змін процесів енергетичного забезпечення у мітохондріях за умов цукрового діабету є суперечливими [76, 165, 189, 224]. Так, у роботах Олівейри повідомляється про зниження споживання кисню мітохондріями серця щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом [165]. Те ж саме показано в роботах на мітохондріях печінки [189]. І навпаки, Сінг і співавт. [194] зареєстрували збільшення швидкостей дихання клітин нирок, а Гартман і співавт. [95] – мононуклеарних клітин периферійної крові.

Нами встановлено, що на ранніх стадіях розвитку стрептозотоциніндукованого 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 ($P < 0,05$, $n = 5-6$, рис. 3.40).

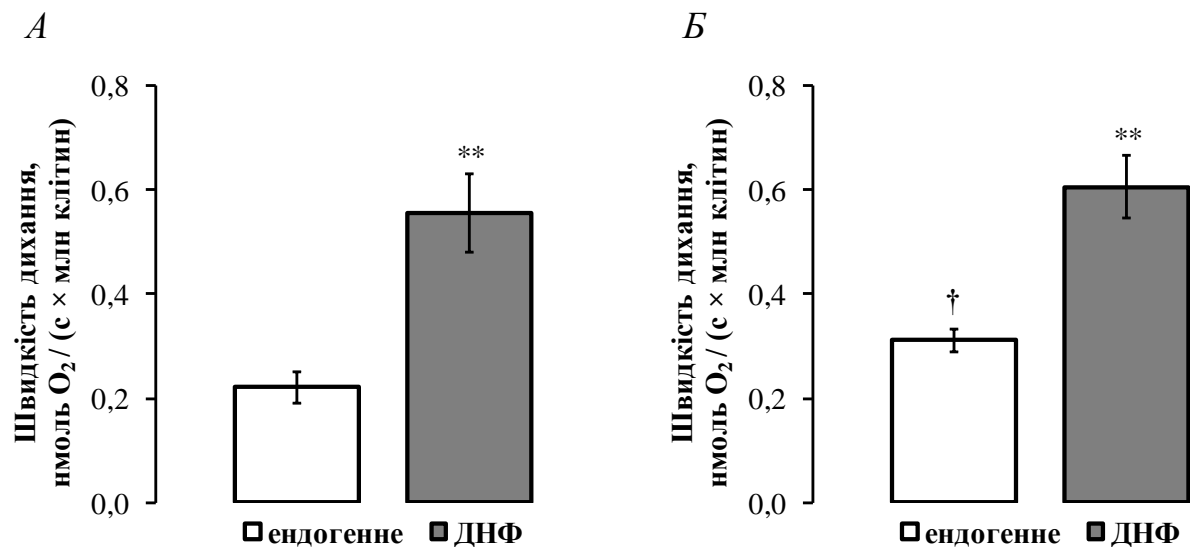


Рис. 3.40. Швидкість споживання кисню інтактними гепатоцитами контрольних (А) та діабетичних (Б) тварин за окиснення ендогенних субстратів і додавання динітрофенолу (ДНФ): [динітрофенол] = 0,1 ммоль/л, ** – різниця статистично вірогідна щодо ендогенного дихання з $P < 0,01$, † – різниця статистично вірогідна порівняно з відповідним показником у контролі з $P < 0,05$, $n = 5-6$

Максимальна окисна здатність, оцінена за дії динітрофенолу, є меншою у тварин з модельованим діабетом (збільшення швидкості споживання кисню під впливом динітрофенолу на 80%, а у контролі – на 145%), що на нашу думку зумовлене, вищим вихідним рівнем клітинного дихання у них. Завдяки чому це відбувається? Щоб відповісти на це питання, необхідно дослідити, за окиснення яких субстратів інтенсифікується дихання у хворих тварин.

3.5.3. Дослідження дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних щурів у номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному середовищах

За окиснення лише суміші малату, глутамату і піруваату (стан S_4) спостерігали інтенсифікацію споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами

контрольних щурів у обох середовищах (номінально безкальцієвому та ЕГТА-вмісному). Проте у розчині, який не містив ЕГТА ця стимуляція була більш вираженою: 110 % порівняно із 85,1% (рис. 3.7 А). Така ж закономірність простежувалась і у тварин зі стрептозотоциніндукованим діабетом: у номінально безкальцієвому середовищі збільшення показників швидкості споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами після додавання суміші малату, глутамату і пірувату відносно ендogenous дихання становило 143%, а в ЕГТА-вмісному – 127% (рис. 3.41 А).

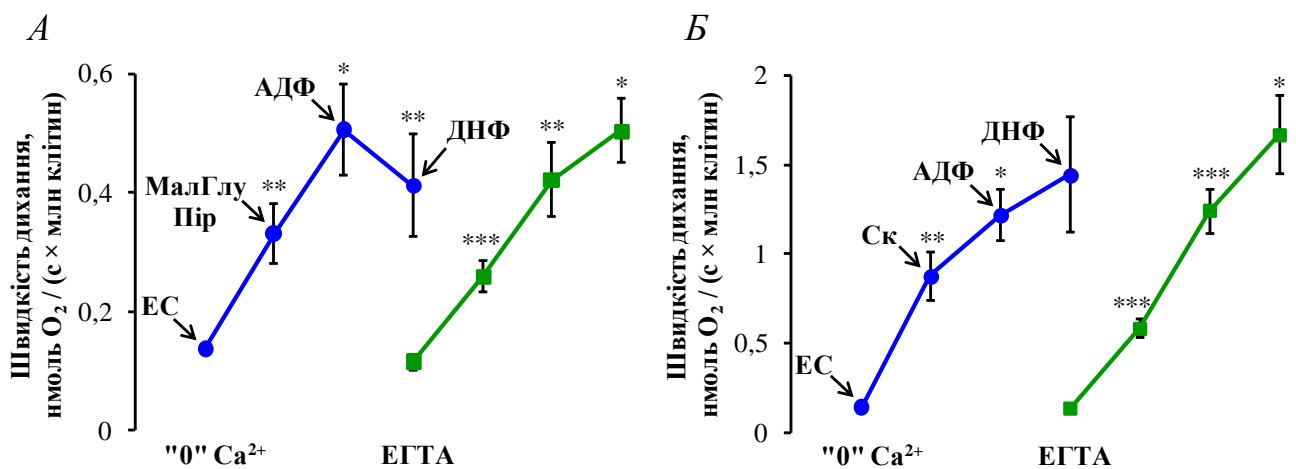


Рис. 3.41. Показники швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних щурів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату (А) чи сукцинату (Б) у номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному середовищах: [АДФ] = 0,75 ммоль/л, [динітрофенол] = 0,1 ммоль/л; * – зміни статистично достовірні щодо попереднього показника з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$, $n = 5-7$

Як і у контрольних тварин наступне внесення у полярографічну комірку АДФ спричиняло незначну, проте статистично вірогідну стимуляцію процесів споживання кисню пермеабілізованими клітинами печінки у номінально безкальцієвому середовищі на 39,1% ($P < 0,05$, $n = 7$). Наступне додавання динітрофенолу не впливало на швидкість споживання кисню пермеабілізованими гепа-

тоцитами у номінально безкальцієвому середовищі, як і у контролі. Послідовне додавання сукцинату, АДФ і динітрофенолу до середовища, яке містило ЕГТА спричиняло поступове збільшення показників швидкості споживання кисню пермеабілізованими клітинами печінки до приблизно однакового рівня як у контрольних, так і дослідних щурів (рис. 3.41 Б).

Нами виявлено, що дихальний контроль був майже завжди більший у середовищі, яке містило ЕГТА (рис. 3.42).

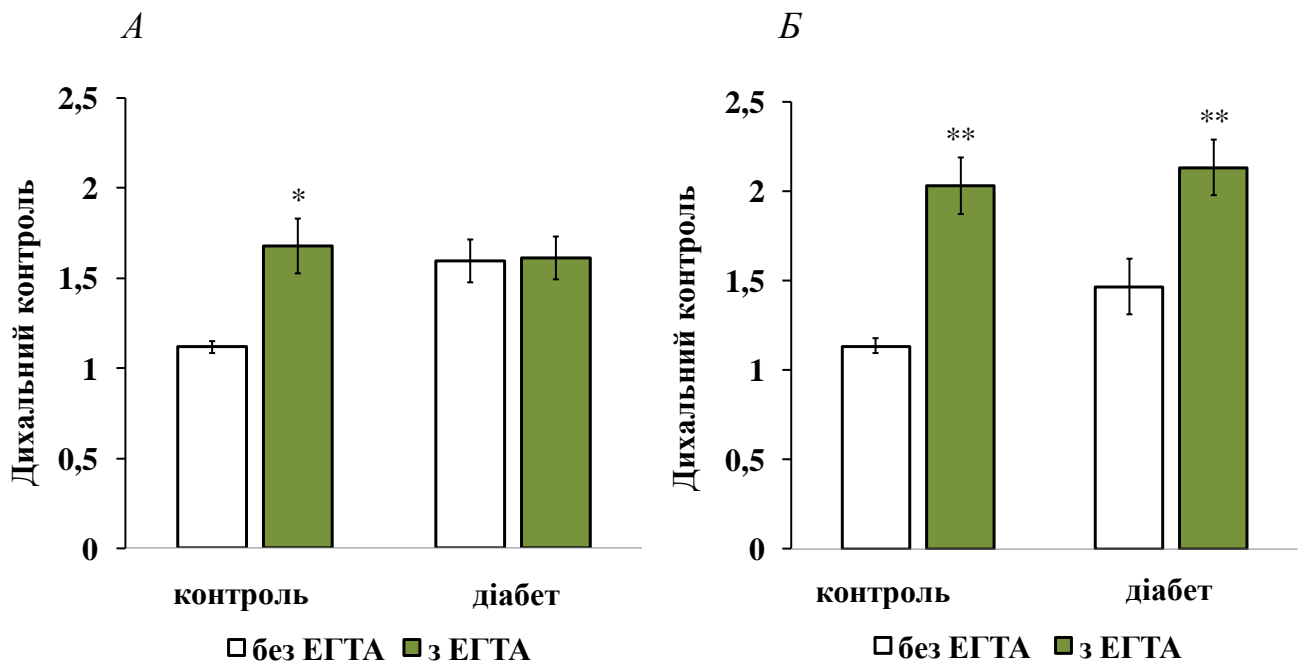


Рис. 3.42. Показники дихального контролю за Ларді за окиснення суміші мала-ту, глутамату і пірувату (А) та сукцинату (Б) у номінально безкальцієвому й ЕГТА-вмісному середовищах в умовах розвитку цукрового діабету: * – різниця статистично вірогідна щодо номінально безкальцієвого середовища з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$

Виняток становив лише випадок окиснення суміші мала-ту, глутамату і пірувату за умов цукрового діабету – тоді показники дихального контролю у різних середовищах були однаковими (рис. 3.42 А). Тобто внаслідок розвитку захворювання на цукровий діабет погіршується спряження між диханням і оки-

сним фосфорилуванням у клітинах печінки за окиснення НАД-залежних субстратів.

3.5.4. Встановлення закономірностей дихання пермеабілізованих гепатоцитів у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+} за умов стрептозотоциніндукованого діабету

У тварин із модельованим діабетом (рис. 3.43 А) за $0,1 \text{ мкмоль/л } \text{Ca}^{2+}$ виявлено такі ж, як і у контрольних закономірності окиснення суміші малату, глутамату і пірувату (рис. 8 А).

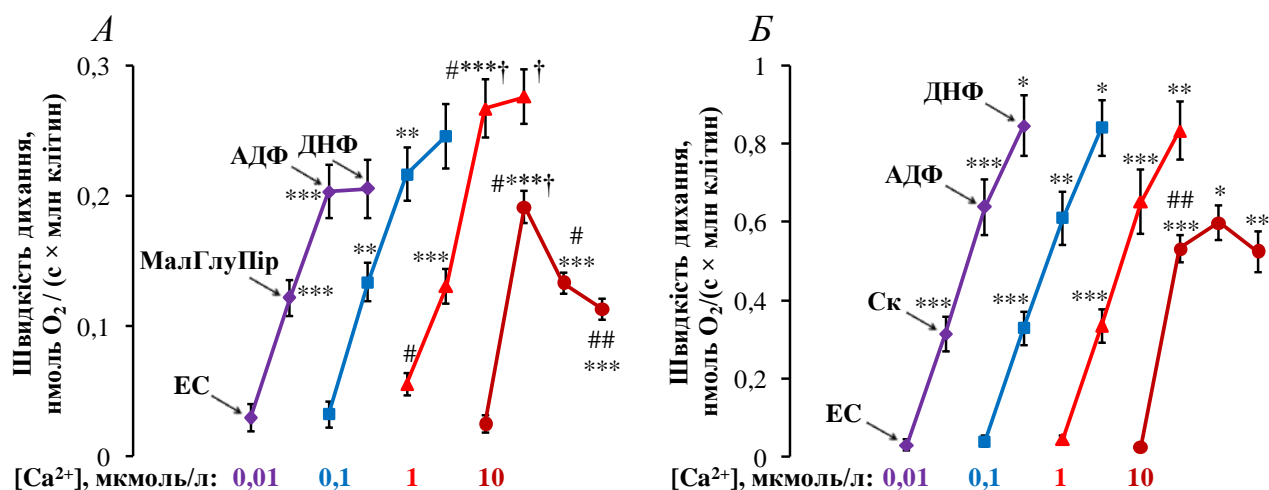


Рис. 3.43. Споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами діабетичних щурів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату (А) чи сукцинату (Б) у середовищах з різними концентраціями Ca^{2+} : [АДФ] = $0,75 \text{ ммоль/л}$, [динітрофенол] = $0,1 \text{ ммоль/л}$; * – зміни достовірні відносно попереднього показника з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$; # – зміни достовірні, порівняно з відповідним показником за $0,1 \text{ мкмоль/л } \text{Ca}^{2+}$ з $P < 0,05$, ## – з $P < 0,01$; † – зміни достовірні, порівняно з відповідним показником у контролі з $P < 0,05$

Але у середовищах з 0,01 та 1 мкмоль/л Ca^{2+} дихальні контролі за Ларді (відношення швидкості дихання у стані S_3 до швидкості дихання у стані S_4) 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 (рис. 3.44).

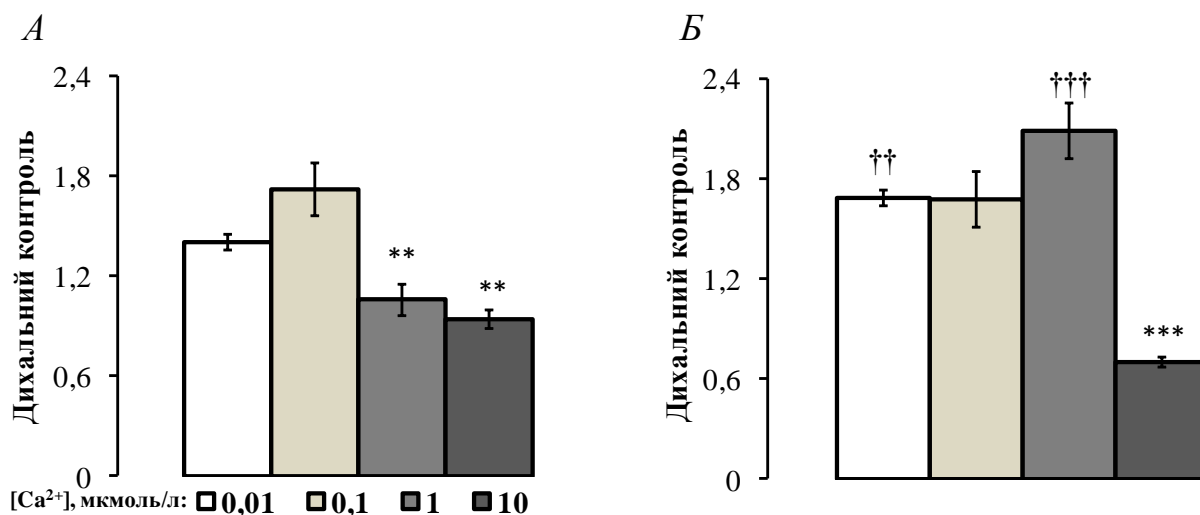


Рис. 3.44. Показники дихального контролю (за Ларді) пермеабілізованих гепатоцитів контрольних (А) і діабетичних (Б) щурів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+} : ** – різниця статистично вірогідна порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$; †† – різниця статистично достовірна щодо аналогічного показника у контролі з $P < 0,01$, ††† – $P < 0,001$

За 10 мкмоль/л Ca^{2+} швидкість дихання гепатоцитів діабетичних щурів у стані S_4 є найбільшою, порівняно зі середовищами з іншими концентраціями Ca^{2+} , але після внесення АДФ за таких умов швидкість споживання кисню є достовірно меншою на 30,6% ($P < 0,001$, $n = 6$); тоді як у контролі статистично достовірних змін не зареєстровано.

У тварин із модельованим діабетом залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації Ca^{2+} у середовищі за окиснення сукцинату (як і суміші малату, глутамату і пірувату) є іншою. Найбільше цей суб-

страт інтенсифікує споживання кисню за 10 мкмоль/л Ca^{2+} , а наступні додавання АДФ і динітрофенолу стимулювали дихання на відміну від контролю вже за трьох концентрацій Ca^{2+} – 0,01, 0,1 і 1 мкмоль/л (рис 3.43 Б).

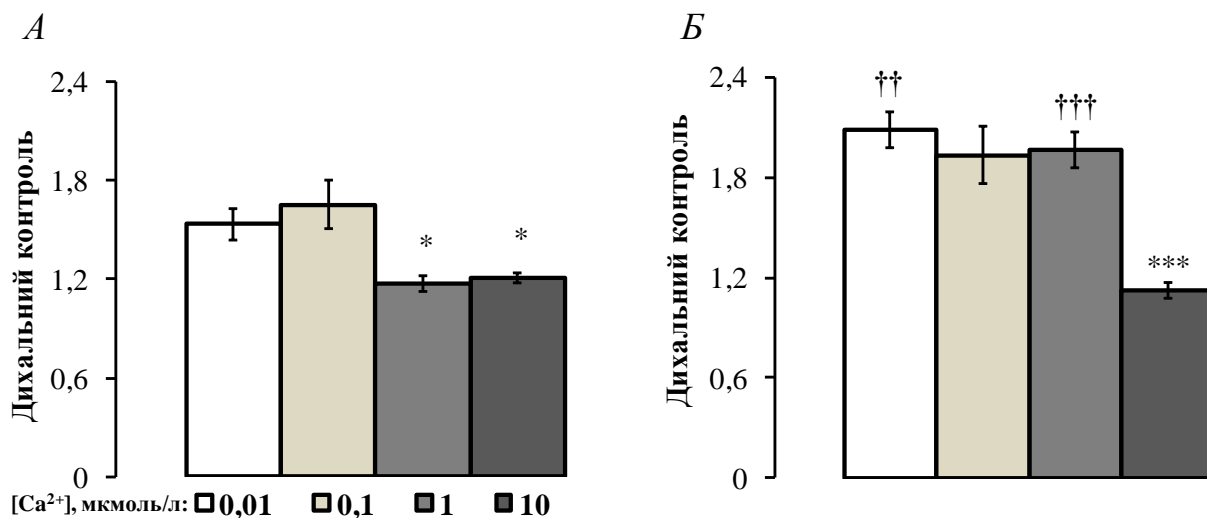


Рис. 3.45. Показники дихального контролю (за Ларді) пермеабілізованих гепатоцитів контрольних (А) і діабетичних (Б) щурів за окиснення сукцинату у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+} : * – різниця статистично вірогідна порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} з $P < 0,05$, *** – з $P < 0,001$; †† – різниця статистично достовірна відносно аналогічного показника у контролі з $P < 0,01$, ††† – з $P < 0,001$

За окиснення сукцинату гепатоцитами тварин-діабетиків у середовищах з 0,01 і 1 мкмоль/л Ca^{2+} дихальні контролю 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 (рис. 3.45).

3.5.5. Аналіз кінетичних параметрів дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних тварин залежно від концентрації сукцинату в середовищах із різним вмістом Ca^{2+}

У подальших дослідженнях ми визначали кінетичні параметри дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату в середовищах з $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,1 і 1 мкмоль/л. Такі концентрації Ca^{2+} було обрано, враховуючи те, що максимальна функціональна здатність мітохондрій (відповідь на додавання АДФ і динітрофенолу) у контрольних тварин спостерігається за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі, а у дослідних – за 1 мкмоль/л Ca^{2+} .

Виявлено, що кінетика процесів дихання гепатоцитів за обох концентрацій Ca^{2+} добре описується рівнянням Хілла як у контролі (рис. 3.46, так і за умов стрептозотоциніндукованого діабету (рис. 3.47). За вищої концентрації Ca^{2+} коефіцієнт Хілла h є дещо більшим, порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} , як у контрольній, так і дослідній групах щурів.

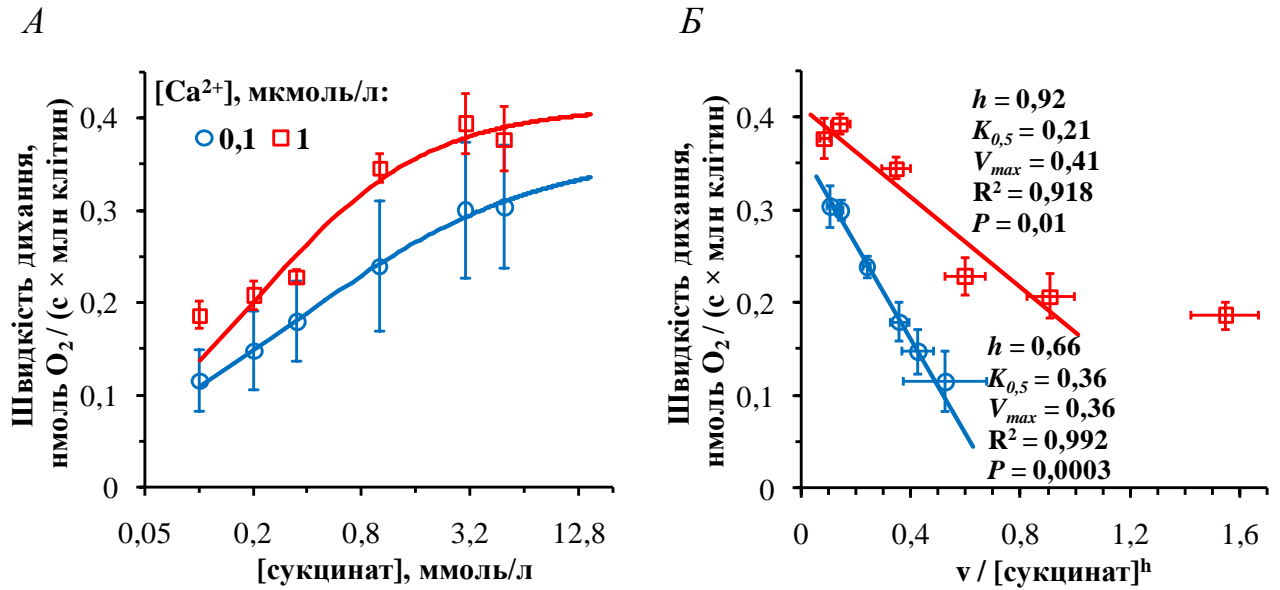


Рис. 3.46. Кінетичні параметри дихання пермеабілізованих гепатоцитів контрольних тварин за окиснення сукцинату у середовищах з 0,1 і 1 мкмоль/л Ca²⁺: А – концентраційна залежність впливу сукцинату в напівлогарифмічних координатах; Б – лінеаризація у видозмінених координатах Іді-Гофсті; при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості дихання від концентрації сукцинату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [сукцинат]=0,1–5 ммоль/л

Близькість коефіцієнта h до 1 за 1 мкмоль/л Ca²⁺ у середовищі свідчить про відсутність вираженої кооперативності за таких умов. За низької ж концентрації Ca²⁺ коефіцієнт h суттєво менший 1 – внаслідок наявності негативної кооперативності, спричиненої підтоком ендогенних субстратів.

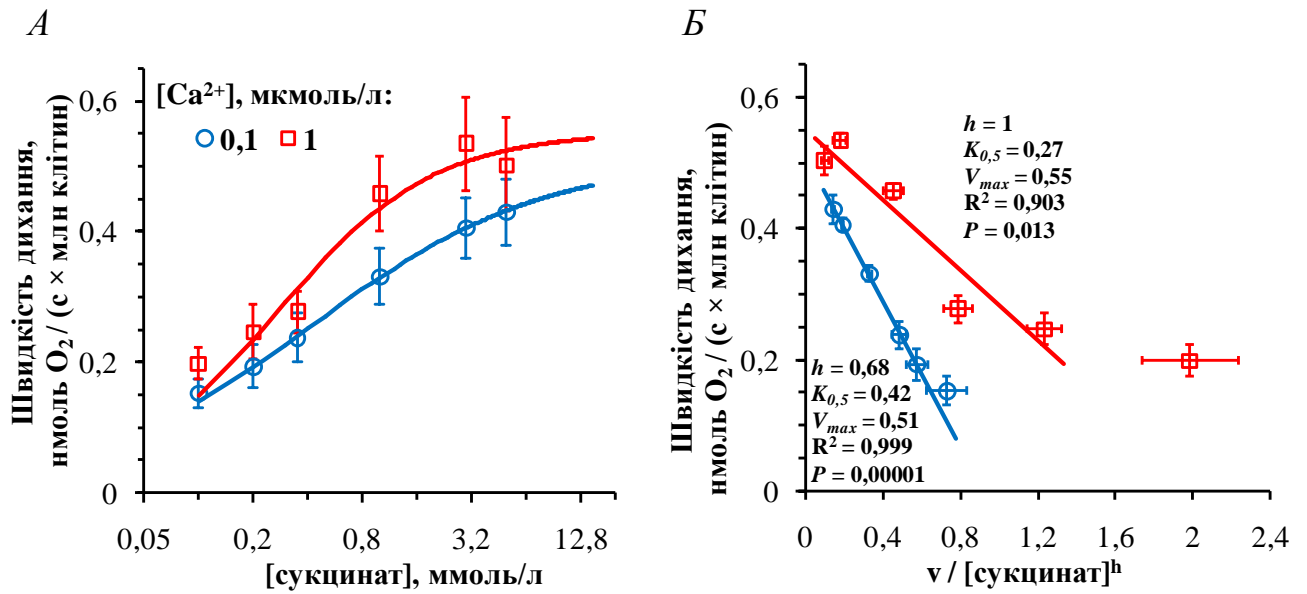


Рис. 3.47. Кінетичні параметри дихання пермеабілізованих гепатоцитів діабетичних щурів за окиснення сукцинату у середовищах з 0,1 і 1 мкмоль/л Ca^{2+} : А – концентраційна залежність впливу сукцинату в напівлогарифмічних координатах; Б – лінеаризація у видозмінених координатах Іді-Гофсті; при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості дихання від концентрації сукцинату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [сукцинат]=0,1–5 ммоль/л

З метою визначення кінетичних параметрів окиснення лише сукцинату, без впливу НАД-залежних субстратів (дегідрогенази яких є Ca^{2+} -регульованими), ми використали інгібітор комплексу I дихального ланцюга мітохондрій – ротенон. Внаслідок його застосування у контролі спостерігається нівелювання різниці між значеннями коефіцієнта Хілла за різних концентрацій Ca^{2+} , причому h стає дещо більшим від 1 в обох випадках.

Як висновок, описана негативна кооперативність за низьких концентрацій Ca^{2+} у попередньому досліді дійсно зумовлена підтоком ендогенних НАД-залежних субстратів. Крім того, слід зазначити, що за 1 мкмоль/л Ca^{2+} у контрольних щурів внаслідок інгібування ротеноном комплексу I дихального лан-

цього нівелюється розвиток субстратного інгібування за найвищої концентрації сукцинату (5 ммоль/л, рис. 3.48). Цілком можливо, що ці два параметри залежності мітохондріального дихання від концентрації сукцинату за відсутності ротенону – негативна кооперативність та розвиток субстратного інгібування – мають одну і ту ж природу.

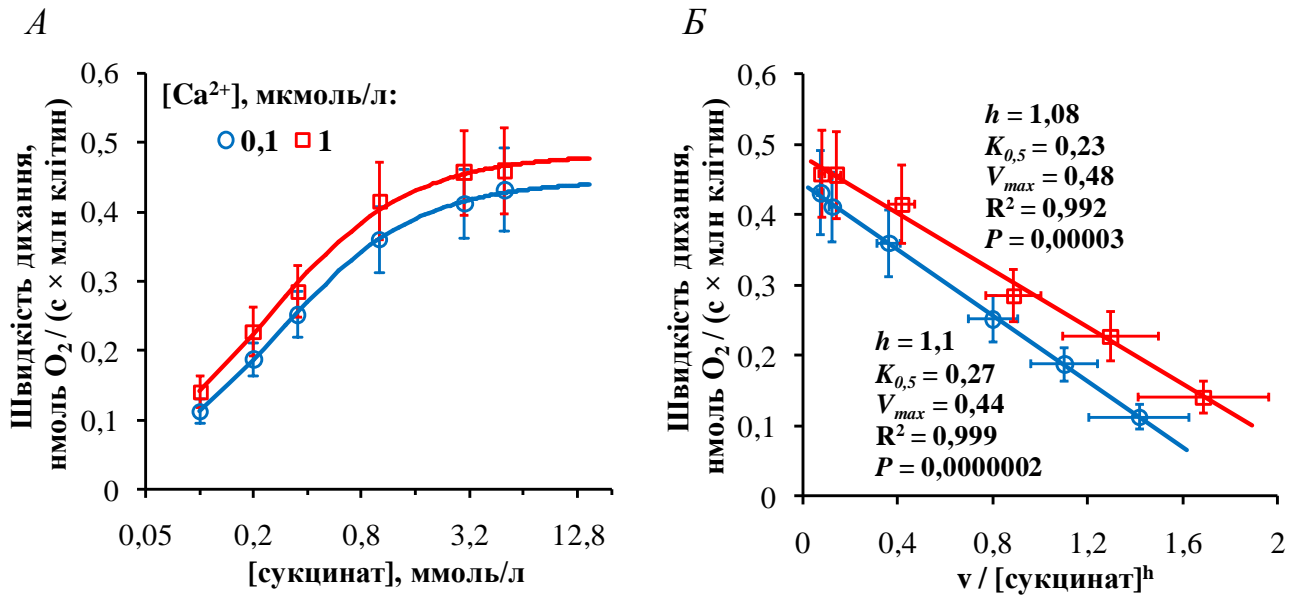


Рис. 3.48. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки контрольних щурів від концентрації сукцинату за наявності ротенону в середовищах з [Ca²⁺] 0,1 і 1 мкмоль/л: А – концентраційна залежність впливу сукцинату на фоні ротенону в напівлогарифмічних координатах; Б – лінеаризація у змінених координатах Іді–Гофсті, позначення, як на графіку А; при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості споживання кисню від концентрації сукцинату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [ротенон] = 10 мкмоль/л, [сукцинат] = 0,1–5 ммоль/л, n = 4

У діабетичних щурів коефіцієнт Хілла за нижчої концентрації Ca²⁺ є меншим від 1 ($h = 0,89$), а за вищої – таким як у контролі ($h = 1,12$, рис. 3.49). Отже, за нижчої концентрації Ca²⁺ і без підтоку НАД-залежних субстратів у ди-

хальній системі мітохондрій діабетичних щурів виникає негативна кооперативність.

У той же час, константа напівактивації $K_{0,5}$ дещо зменшується із збільшенням $[Ca^{2+}]$ (причому, як у контролі, так і за модельованого діабету) лише коли комплекс I дихального ланцюга є незаінгібований ротеноном. Це переконливо доводить, що дещо більша швидкість мітохондріального дихання за окиснення сукцинату зумовлена окисненням ендогенних субстратів Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ.

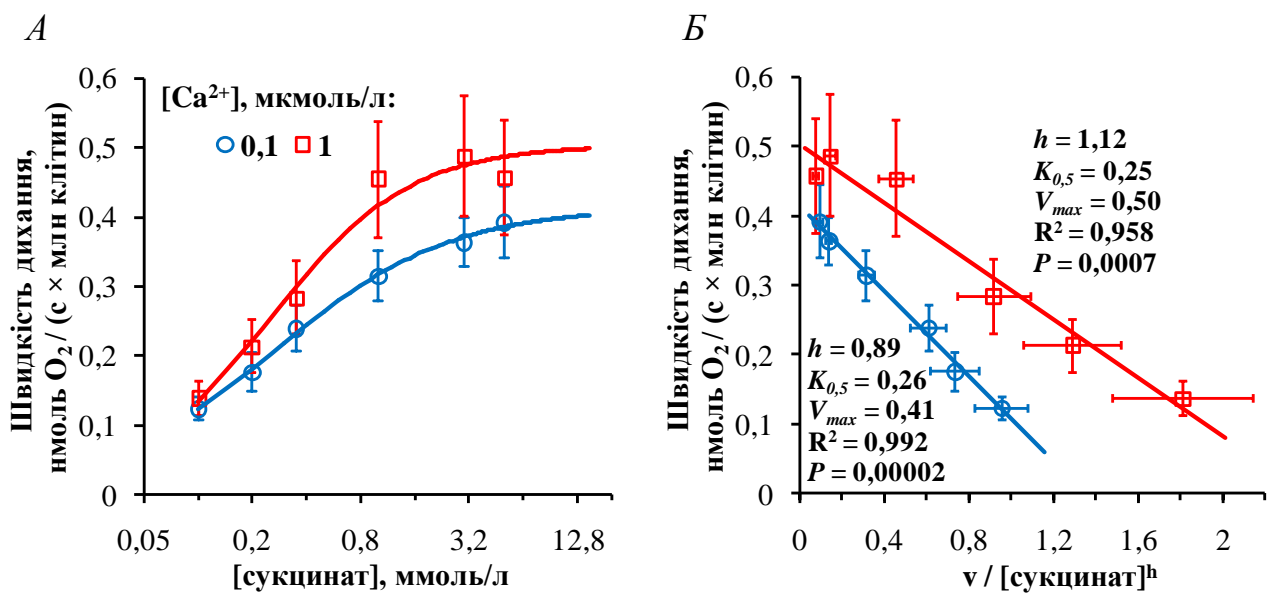


Рис. 3.49. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепаточитів діабетичних тварин від концентрації сукцинату на тлі ротенону в середовищах з $[Ca^{2+}]$ 0,1 і 1 мкмоль/л: А – концентраційна залежність впливу сукцинату на тлі ротенону в напівлогарифмічних координатах; Б – лінеаризація у змінених координатах Іді–Гофсті, позначення, як на графіку А; при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості споживання кисню від концентрації сукцинату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [ротенон] = 10 мкмоль/л, [сукцинат] = 0,1–5 ммоль/л, $n = 4$

Значення максимальної швидкості V_{max} мітохондріального дихання за окиснення сукцинату у всіх випадках (як у контрольних, так і у дослідних тварин, з ротеноном чи без нього) є дещо вищою за вищої концентрації Ca^{2+} у середовищі. Більша різниця між значеннями V_{max} за 0,1 та 1 мкмоль/л Ca^{2+} і наявності ротенону у середовищі спостерігається у діабетичних тварин.

Вважається, що Ca^{2+} -індуковані мітохондріальні дисфункції зумовлюють широкий спектр розладів, включно з цукровим діабетом [43, 55, 89].

Сатав [189] припускає, що на ранніх етапах розвитку цукрового діабету дихального потенціалу достатньо для забезпечення енергетичних потреб клітин печінки. Проте в цій роботі відзначають зниження інтенсивності процесів дихання ізольованих мітохондрій діабетичних тварин за окиснення пірувату і малату, але не сукцинату. У наших попередніх роботах показано зниження активності сукцинатдегідрогенази у печінці діабетичних тварин, яке, тим не менше, не супроводжується зниженням споживання кисню за використання сукцинату. Зниження активності сукцинатдегідрогенази було також показане у гепатоцитах щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом іншими авторами [158] та у лімфоцитах дітей з цукровим діабетом I типу [29].

Одним з можливих механізмів підтримання дихання мітохондрій інсулін-незалежних тканин діабетичних тварин є зростання рівня глюкози у крові. Це призводить до посилення її надходження у гепатоцити, за участю мембранного транспортера глюкози GLUT2, і розщеплення її до пірувату. Аналогічне припущення зроблене і Сінгом та співавт. [194] для клітин проксимальних трубочок нирок. У цих дослідженнях зареєстровано також суттєве зростання максимальної окисної здатності мітохондрій за умов діабету [194]. Нами з'ясовано, що максимальна окисна здатність інтактних клітин печінки є меншою у тварин з модельованим цукровим діабетом. Але, як свідчать результати наших досліджень на пермеабілізованих гепатоцитах, ефекти динітрофенолу залежать від

концентрації Ca^{2+} у середовищі, тому не завжди дані різних авторів можна адекватно порівняти.

Наголошуючи на важливому значенні іонів Ca^{2+} у регуляції процесів дихання, варто зазначити, що на ранніх етапах розвитку діабету мітохондрії гепатоцитів стають менш чутливими до токсичних концентрацій Ca^{2+} . Зокрема, у діабетичних тварин максимальна концентрація Ca^{2+} , за якої ще зберігається здатність мітохондрій відповідати на додавання АДФ, зміщується від 0,1 до 1 мкмоль/л. Крім того, за низької концентрації Ca^{2+} (0,1 мкмоль/л) коефіцієнт Хілла h і V_{\max} сукцинатстимульованого дихання мітохондрій діабетичних тварин зменшуються. За 1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі ці параметри залишаються такими ж, як і в контролі, що теж зумовлено, на нашу думку, зменшенням чутливості мітохондрій до його токсичних концентрацій.

Підсумок. Зменшення чутливості до токсичних концентрацій Ca^{2+} є одним з механізмів, який підтримує утилізацію надмірних кількостей пірувату на ранніх етапах розвитку діабету [Мерлавський та ін., 2015]. Це ж зменшення чутливості мітохондрій до токсичних чи субтоксичних концентрацій Ca^{2+} може бути причиною розбіжності даних різних авторів щодо швидкості клітинного дихання за розвитку цукрового діабету.

1. Мерлавський В. Вплив 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.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

У цій 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 нами 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. 4.1)

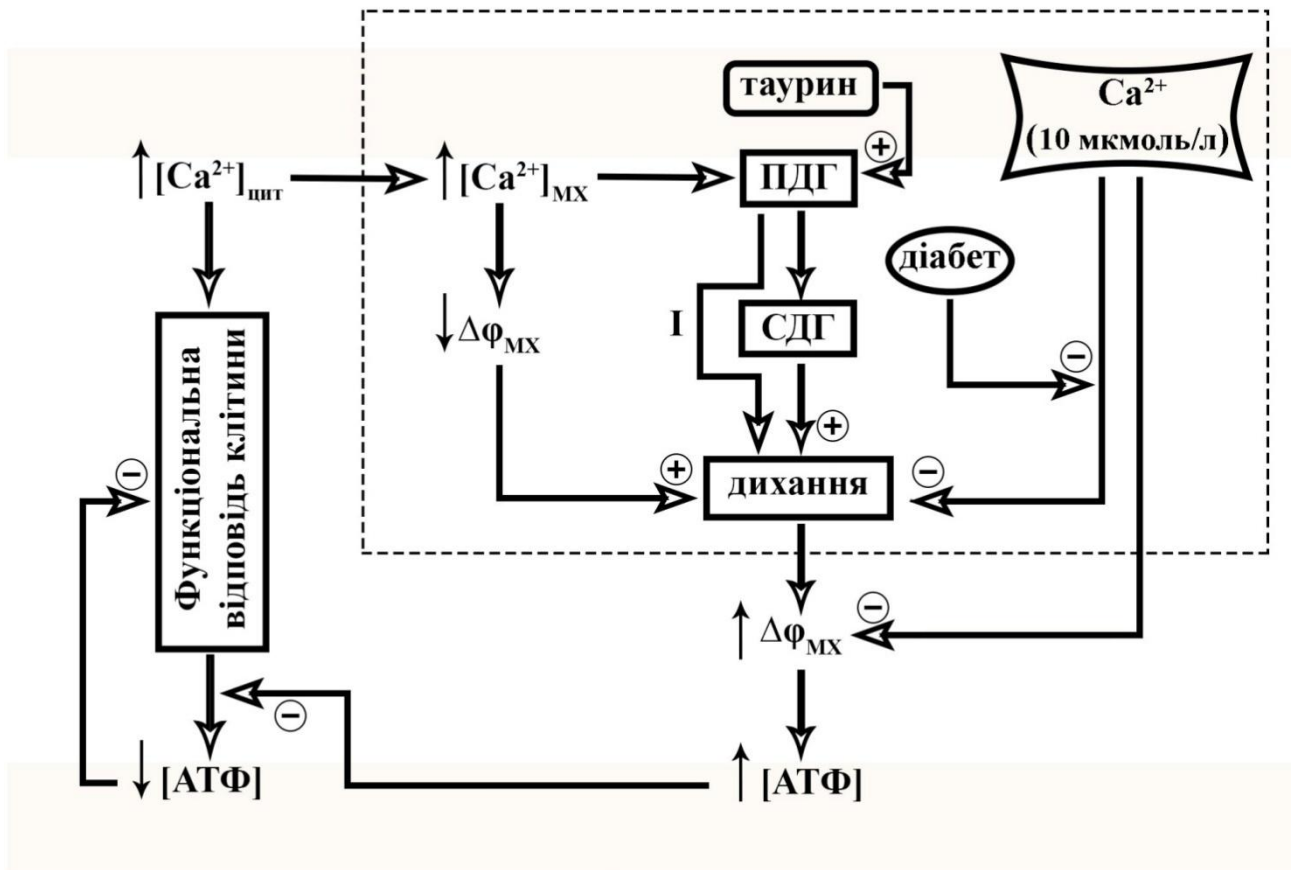


Рис. 4.1. Схема взаємозв'язків між сигнальними та метаболічними шляхами у гепатоцитах за різного вмісту Ca^{2+} у середовищі: ПДГ – піруватдегідрогеназа, СДГ – сукцинатдегідрогеназа, I – комплекс I дихального ланцюга мітохондрій

У ході виконання роботи було розроблено та обґрунтовано модель пермеабілізованих гепатоцитів для дослідження дихання мітохондрій *in situ*. Саме таку експериментальну модель було обрано тому, що використання її дає змогу встановити механізми процесів енергозабезпечення клітини завдяки введенню екзогенних субстратів окиснення у її внутрішнє середовище, а також комплексно оцінити вплив кальцію на ці процеси, оскільки зберігаються морфофункціональні зв'язки між органелами, прямо чи опосередковано задіяними як у генерації Ca^{2+} -сигналу [182], так і у продукції АТФ (мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, ядро). За використання ізольованих мітохондрій такий комплексний підхід до з'ясування основних аспектів поставленої проблеми є неможливим.

Під час розробки моделі пермеабілізованих гепатоцитів було виявлено, що визначальним фактором досягнення повної пермеабілізації плазматичної мембрани та збереження при цьому функціональної здатності клітини є підбір оптимального співвідношення між кількістю детергента (у нашому випадку – дигітоніну) та кількістю клітин. Нами встановлено, що таким співвідношенням для гепатоцитів є 20–22 мкг дигітоніну на 1 млн клітин в 1 мл суспензії.

Для дослідження регулюючого впливу Ca^{2+} на різні ланки процесів дихання пермеабілізованих гепатоцитів ми використовували два типи субстратів – НАД-залежного шляху окиснення (малат, глутамат, піруват) і ФАД-залежного (сукцинат) [3]. Причиною такого вибору субстратів стало те, що дегідрогенази субстратів НАД-залежного шляху вважаються Ca^{2+} -регульованими [12, 150], тоді як ФАД-залежного – такими, які нечутливі до впливу Ca^{2+} .

Першим етапом вивчення безпосередньо впливу Ca^{2+} на процеси дихання гепатоцитів було дослідження змін інтенсивності споживання кисню гепатоцитами в ЕГТА-вмісному середовищі, та середовищі, яке не містило ЕГТА (номінально безкальцієве). Такий підхід до з'ясування особливостей Ca^{2+} -сигналювання є традиційним, наприклад, для електрофізіологічних досліджень

[28]. Нами встановлено, що стимуляція споживання кисню додаванням АДФ за наявності у полярографічній комірці субстратів (чи НАД-, чи ФАД-залежних) є більш вираженою в ЕГТА-вмісному середовищі, ніж у номінально безкальцієвому. Отже, спряження дихання і окисного фосфорилування є кращим за нижчої концентрації Ca^{2+} у суспензії (за наявності хелатора).

Виявивши відмінності в показниках інтенсивності споживання кисню гепатоцитами у ЕГТА-вмісному та номінально безкальцієвому середовищах, ми вважали за доцільне дослідити особливості дихальних процесів клітин печінки за відомого вмісту Ca^{2+} у розчині. З цією метою було обрано чотири концентрації цього іона: 0,01, 0,1, 1 і 10 мкмоль/л. Вибір саме цих значень було зроблено виходячи з таких міркувань: показники 0,01 та 0,1 мкмоль/л відповідають концентрації цитозольного Ca^{2+} за умов фізіологічного спокою ; 1 мкмоль/л відображає зростання вмісту Ca^{2+} у цитоплазмі під час генерації збудливого Ca^{2+} -сигналу [38]; 10 мкмоль/л може досягатись за деяких патологічних станів організму.

Нами встановлено, що за окиснення лише субстратів (як суміші малату, глутамату, пірувату, так і самого сукцинату) швидкість споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами є найбільшою за 1 мкмоль/л Ca^{2+} , а за окиснення субстратів з АДФ – у середовищі з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} . Крім того, ми виявили, що концентрація Ca^{2+} 10 мкмоль/л є токсичною для мітохондрій клітин печінки, оскільки за таких умов додавання АДФ і динітрофенолу не стимулює, а, навпаки, – пригнічує окисні процеси у цих органелах.

З метою більш детального вивчення впливу Ca^{2+} на процеси дихання гепатоцитів нами було виконано дослідження кінетичної залежності швидкості споживання кисню цими клітинами від концентрації субстрату окиснення (сукцинату чи пірувату) у середовищах із різним вмістом Ca^{2+} . У цих експериментах використали середовища із 0,1 і 1 мкмоль/л Ca^{2+} . Це зумовлено тим фактом, що у попередній серії дослідів найбільші відмінності у функціональній здатно-

сті мітохондрій відповідати на вплив субстратів, АДФ чи динітрофенолу нами виявлені саме при переході від 0,1 до 1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі. Крім того, як вже було вказано раніше, ці концентрації є близькими до вмісту цитозольного Ca^{2+} у стані спокою (0,1 мкмоль/л Ca^{2+}) й активації (1 мкмоль/л Ca^{2+}) клітин печінки [38].

Кінетика процесів окиснення як сукцинату, так і пірувату описується рівнянням Хілла за обох концентрацій Ca^{2+} у середовищі. При цьому, параметри сукцинатстимульованого ротенонечутливого дихання не залежать від Ca^{2+} . Тоді як за окиснення пірувату на тлі малату спостерігалось збільшення швидкості споживання кисню і зменшення константи напівнасичення з підвищенням концентрації Ca^{2+} у середовищі. Крім того, у середовищі з 1 мкмоль/л Ca^{2+} виявлено розвиток субстратного інгібування за високих концентрацій пірувату. Ці факти є свідченням того, що НАД-залежна ланка окисних процесів у гепатоцитах, на відміну від ФАД-залежної, перебуває під впливом Ca^{2+} -регуляції, що узгоджується з даними інших авторів [27, 169].

Після встановлення особливостей залежності процесів дихання гепатоцитів від Ca^{2+} за фізіологічних умов, ми досліджували цю ланку регуляції енергозабезпечення клітин за змінених функціональних станів організму: тривалого впливу таурину та стрептозотоциніндукованого цукрового діабету. Нами було обрано саме ці дві експериментальні моделі, оскільки відомо, що як під впливом таурину, так і за розвитку цукрового діабету процеси Ca^{2+} -сигналювання зазнають змін, але залишався недослідженим ефект цих метаморфоз на дихання гепатоцитів.

Ми встановили, що внаслідок тривалої дії таурину показники максимальної швидкості споживання кисню пермеабілізованими клітинами печінки за окиснення як сукцинату, так і пірувату зменшуються, порівняно з контролем, причому як за 0,1, так і за 1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі. Крім цього, субстратне інгібування, яке спостерігалось за окиснення пірувату на тлі малату у середо-

вищі з 1 мкмоль/л розвивалось за вищих концентрацій субстрату, ніж у контролі, що свідчить про інтенсифікацію процесів НАД-залежного шляху окиснення субстратів під впливом таурину.

За умов розвитку стрептозотоциніндукованого діабету нами було виявлено зниження чутливості мітохондрій гепатоцитів до впливу Ca^{2+} у токсичних концентраціях. Підставами для цього твердження послужили такі факти: 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 є такими ж, як і у контролі.

Отже, Ca^{2+} -залежна ланка регуляції процесів клітинного дихання задіяна у пристосуванні гепатоцитів до змін функціонального стану організму.

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 різнотермінової гіперінсулінемії, досліджено залежність дихання клітин печінки від $[\text{Ca}^{2+}]$ 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 спричиняло зменшення швидкості їхнього дихання за окиснення екзогенних субстратів.
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 $[\text{Ca}^{2+}]$ описується рівнянням Хілла. Внаслідок підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ від 0,1 до 1 мкмоль/л зростає V_{max} і знижується $K_{0,5}$ за окиснення піру-

вату, 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 переходу від 0,1 до 1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі зменшується, хоча різниця між V_{max} залишається незмінною. Субстратне інгібування, яке при-таманне залежності швидкості дихання від концентрації пірувату за 1 мкмоль/л 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 клітин, а також дихання пермеабілізованих гепатоцитів у станах S_4 і S_3 за окиснення сукцинату й α -кетоглутарату. Після одноразової ін'єкції інсуліну *in vivo* швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів у стані S_3 за окиснення сукцинату й α -кетоглутарату збільшується, а після 6- і 12-денного введення ефект нівелюється.
6. На ранніх етапах цукрового діабету мітохондрії гепатоцитів є менш чутливими до токсичних $[Ca^{2+}]$. 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 є такими ж, як і в контролі, що підтверджує зменшення чутливості мітохондрій до токсичних $[Ca^{2+}]$.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аكوпова О. В. Индукция открытия митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс / О. В. Аكوпова, В. Ф. Сагач // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т. 76, № 1. – С. 48–55.
2. Бабіч Л. Г. Транспортування іонів Са в мітохондріях гладеньких м'язів / Л. Г. Бабіч, С. Г. Шликов, С. О. Костерін // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, № 6. – С. 18–30.
3. Бабский А. М. Влияние адреналина на окислительное фосфорилирование и обмен ионов кальция в митохондриях печени и слизистой оболочки тонкого кишечника крысы : Автореф. дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.13 физиология человека и животных / Бабский Андрей Мирославович. – Львов – Пущино, 1985. – 20 с.
4. Бабський А.М. Функціональний стан тканин і зміни вмісту іонів натрію за умов патологічної гіпоксії та канцерогенезу : Автореф. дис. ... д-ра біол. наук : 03.00.02 біофізика / Бабський Андрій Мирославович. – К., 2009. – 42 с.
5. Беленічев І. Ф. Антиоксидантна система захисту організму / І. Ф. Беленічев, Е. Л. Левицький, Ю. І. Губський [та ін.] // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – №3. – С. 24–31.
6. Великопольська О. Ю. Ендоплазматично-мітохондріальна Ca^{2+} -функціональна одиниця: залежність дихання секреторних клітин від активності ріанодин- та $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів / О. Ю. Великопольська, Б. О. Манько, В. В. Манько // Укр. Біохім. журн.. – 2012. – Т. 84, № 5. – С. 76–88.
7. Гаврилов В. Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Л. М. Мажуль // Вопр. мед. химии. – 1987. – Т. 33, № 1. – С. 122–188.

8. Гнатів В. В. Активні форми кисню в патогенезі ангіопатій при цукровому діабеті 2-го типу / В. В. Гнатів, Х. С. Демчак, О. М. Бабуленко // Мед. хімія. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 145–149.
9. Гордій С. К. Нейротрансмітери та ефективність дихання секреторних тканин : монографія / С. К. Гордій, О. В. Іккерт, Н. М. Кургалюк [та ін.]. – Львів : Львівський національний університет імені Івана Франка, 2006. – 233 с.
10. Гулак П. В. Гепатоцит: функціонально-метаболические свойства : монографія / П. В. Гулак, А. М. Дудченко, В. В. Зайцев [и др.]. – М.: Наука, 1985. – 272 с.
11. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Є. Курс варіаційної статистики / М. П. Деркач, Р. Я. Гумецький, М. Є. Чабан. – К.: Вища шк., 1977. – 207 с.
12. Доліба М. М. Холінергічна регуляція енергетичного обміну в міокарді і травних залозах: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук : 03.00.13 фізіологія людини і тварин / Доліба Микола Михайлович. – Львів, 1993. – 45 с.
13. Дубицький Л. Залежність Ca^{2+} -акумуляційної функції мітохондрій печінки від віку тварин / Л. Дубицький, Н. Наливайко, Є. Кравенська // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2008. – Вип. 46. – С. 153–158.
14. Дубицький Л. О. Властивості та функціональна роль Na^+ - Ca^{2+} -обмінника секреторних клітин шлункової залози / Л. О. Дубицький, Л. С. Вовканич // Фізіол. журн. – 2002. – 48, № 2. – С. 133–134.
15. Дубицький Л. О. Вплив катіонів перехідних металів на дихання і продукування H^+ мітохондріями печінки / Л. О. Дубицький, Л. С. Вовканич // Укр. біохім. журн. – 1996. – Т. 68, № 5. – С. 59–63.
16. Ещенко Н. Д. Определение активности сукцинатдегидрогеназы / Н. Д. Ещенко, Г. Г. Вольский // Методы биохим. исследований. – 1982. – С. 210–212.

17. Іккерт О. В. Вплив L-аргініну та N-нітро-L-аргініну на функціональний стан мітохондрій печінки щурів з різною резистентністю до гіпоксії : Автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.13 фізіологія людини і тварин / Іккерт Оксана Володимирівна. – Львів, 2003. – 20 с.
18. Іккерт О. Особливості окиснення НАД- та ФАД-залежних субстратів дихального ланцюга мітохондрій під впливом екзогенного L-аргініну та полінітро-L-аргініну у щурів з різною резистентністю до гіпоксії / О. Іккерт, Н. Кургалюк, Г. Ткаченко [та ін.] // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2002. – Вип. 31. – С. 225–232.
19. Кондрашова Н. М. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани / Н. М. Кондрашова // Биохимия. – 1991. – Т. 56, вып. 3. – С. 388–403.
20. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л.И. Иванова, М. Г. Майорова // Лаб. дело. – 1998. – № 1. – С. 16–19.
21. Костюк В. А. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на окислении кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж.И. Ковалева // Вопр. мед. химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
22. Кравенська Є. В. Неспецифічна проникність внутрішньої мембрани мітохондрій та її модифікація катіонами металів : Автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.13 фізіологія людини і тварин / Кравенська Євгенія Вікторівна. – Львів, 2010. – 20 с.
23. Купиняк Н. Інгібітор транспортувальних Ca^{2+} -атфаз еозин Y не впливає на дихання і окисне фосфорилування у печінці щура / Н. Купиняк, О. Іккерт, В. Манько // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2013. – Вип. 61. – С. 180–188.
24. Лукьянова Л. Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптации организма / Л. Д. Лукьянова // Физиол. журн. – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 17–35.

25. Люта М. Я. Морфофункціональні та біохімічні особливості системи еритрону за умов цукрового діабету 1-го типу : Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.11 цитологія, гістологія / Люта Мар'яна Ярославівна / Львів, 2008. – 20 с.
26. Манько В. В. Використання рівняння Хілла для кінетичного аналізу Ca^{2+} -транспортувальних систем секреторних клітин личинки *Chironomus plumosus* // Біологічні студії. – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 5–18.
27. Манько Б. О. Вплив Ca^{2+} на кінетичні параметри дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів / Б. О. Манько, В. В. Манько // Укр. Біохім. журн. – 2013. – Т. 85, № 4. – С. 48–60.
28. Манько В. В. Системи транспортування Ca^{2+} у секреторних клітинах екзокринних залоз : монографія / В. В. Манько ; авт. передмови С. О. Костерін. – Львів : Львівський національний університет імені Івана Франка, 2011. – 271 с.
29. Маркевич В. Е. Особливості енергетичного забезпечення дітей хворих на цукровий діабет 1 типу / В. Е. Маркевич, Н. В. Глущенко // Перинатол. та педіатр. – 2011. – Т. 3, № 47. – С. 114–117.
30. Наливайко Н. В. Порівняльний аналіз механізмів взаємодії катіонів двовалентних металів з $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ і $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінниками мітохондрій печінки / Н. В. Наливайко, Л. С. Вовканич, Л. О. Дубицький // Вісн. Харк. нац. ун-ту. Біофіз. вісн. – 2006. – Вип. 17. – С. 48–53.
31. Acin-Perez R. The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model / R. Acin-Perez, J. A. Enriquez // *Biochim. et Biophys. Acta.* – 2014. – Vol. – 1837, Iss. 4. – P. 444–450.
32. Akerman K. E. O. Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial Ca^{2+} transport / K. E. O. Akerman, D. G. Nicholls // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 1983. – № 95 – P. 149–201.

33. Alberti K. G. M. M. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation / K. G. M. M. Alberti, P. Z. Zimmet // *Diabetic Medicine*. – 1998. – Vol. 15, Iss. 7. – P. 539–553.
34. Arruda A. P. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes / A. P. Arruda, G. S. Hotamisligil // *Cell Metab*. – 2015. Vol. 22, № 3. – P. 381–397.
35. Bach J.-F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease / J.-F. Bach // *Endocr. Rev.* – 2013. – Vol. 15, Iss. 4. – P. 516–542.
36. Barthel A. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis / A. Barthel, D. Schmolz // *Am. J. of Physiol.* – 2003. – Vol. 285, № 4. – P. E685–E692.
37. Berg J. M. The citric acid cycle / J. M. Berg, J. A. Tymoczko, L. Stryer // In *Biochemistry*. – New York, NY: W. H. Freeman and Company. – 2007. – 6th ed. – P. 475–501.
38. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition / P. Bernardi // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79, № 4. – P. 1127–1155.
39. Bigwaneza P. C. Effect of temperature on succinate transport by an arctic and a temperate strain of rhizobia / P. C. Bigwaneza, D. Prevost, L. M. Bordeleau [et al.] // *Can. J. Microbiol.* – 1993. – Vol. 39, P. 907–911.
40. Birdsall T. C. Therapeutic applications of taurine / T. C. Birdsall // *Altern. Med. Rev.: a J. of Clin. Therap.* – 1998. – Vol. 3, № 2. – P. 128–136.
41. Boucher J. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states / J. Boucher, A. Kleinridders, C. R. Kahn // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2014. – Vol. 6: a009191. – P. 1–23.
42. Brange J. Insulin structure and stability / J. Brange, L. Langkjoer // *Pharm. Biotechnol.* – 1993. – Vol. 5. – P. 315–50.

43. Brookes P. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle / P. S. Brookes, Y. Yoon, J. L. Robotham [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 287. – P. C817–C833.
44. Brown J. C. Regulation of succinate-fuelled mitochondrial respiration in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels / J. C. Brown, D. J. Chung, A. N. Cooper [et al.] // *J. Exp. Biol.* – 2013. – Vol. 216, № 9. – P. 1736–1743.
45. Bruce J. I. E. Modulation of $[Ca^{2+}]_I$ signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells / J. I. E. Bruce, D. R. Giovannucci, G. Blinder [et al.] // *The J. of Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 12909–12917.
46. Carafoli E. Calcium signaling: A tale for all seasons / E. Carafoli // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2002. – Vol. 99, Iss. 3. – P. 1115–1122.
47. Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain / G. Cecchini // *Ann. Rev. of Biochem.* – 2003. – Vol. 72. – P. 77–109.
48. Chalmers S. The mitochondrial membrane potential and Ca^{2+} oscillations in smooth muscle / S. Chalmers, J. G. McCarron // *J. of Cell Sci.* – 2008. – Vol. 121, № 1. – P. 75–85.
49. Chance B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization / B. Chance, G. R. Williams // *J. Biol. Chem.* – 1955. – Vol. 217, № 1. – P. 383–393.
50. Chauncey K.B. The effect of taurine supplementation on patients with type 2 diabetes mellitus / K.B. Chauncey, Th. E. Jr. Tenner, J. B. Lombardini [et al.] // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* – 2003. – Vol. 526. – P. 91–96.
51. Cheng Zh. kNOXing on the door of selective insulin resistance / Zh. Cheng, M. F. White // *Arterioscl., Thromb., and Vasc. Biol.* – 2012. – Vol. 32. – P. 1063–1065.

52. Chesney R. W. Taurine: its biological role and clinical implications / R. W. Chesney // *Advances in Pediatrics*. – 1985. – Vol. 32. – P. 1–42.
53. Collins T. J. Mitochondrial Ca^{2+} uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca^{2+} signals / T. J. Collins, P. Lipp, M. J. Berridge [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, Iss. 28. – P. 26411–26420.
54. Conner Th. M. Hyperglycemia in the hospital setting: The case for improved control among non-diabetics / Th. M. Conner, K. R. Flesner-Gurley, J. C. Barner // *Ann. Pharmacother.* – 2005. – Vol. 39, № 3. – P. 492–501.
55. Csordás G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria / G. Csordás, A. P. Thomas, G. Hajnóczky // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18. – P. 96–108.
56. Das Sh. K. Ontogeny of neurotransmitter amino acids in human fetal brains / Sh. K. Das, P. K. Ray // *IUBMB Life*. – 1997. – Vol. 42, Iss. 1. – P. 193–202.
57. DeFronzo R. A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus / R. A. DeFronzo // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – Vol. 131, № 4. – P. 281–303.
58. Dehaye J. P. Insulin inhibition of alpha-adrenergic actions in liver / J. P. Dehaye, B. P. Hughes, P. F. Blackmore [et al.] // *Biochem. J.* – 1981. – Vol. 194. – P. 949–956.
59. Deng S. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects / S. Deng, M. Vatamaniuk, X. Huang [et al.] // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53, № 3. – P. 624–632.
60. Dent P. The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle / P. Dent, A. Lavoinne, S. Nakielny [et al.] // *Nature*. – 1990. – Vol. 348, № 6299. – P. 302–308.
61. Denton R. M. Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues / R. M. Denton, J. G. McCormack // *Annu. Rev. Physiol.* – 1990. – Vol. 52. – P. 451–466.

62. Derewenda U. Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly / U. Derewenda, Z. Derewenda, G.G. Dodson // *Br. Med. Bull.* – 1989. – Vol. 45, № 1. – P. 4–18.
63. Diagnosis and classification of diabetes mellitus / *Diabetes Care.* – 2004. – Vol. 27, Supp. 1. – P. S5–S10.
64. Diagnosis and classification of diabetes mellitus / *Diabetes Care.* – 2009. – Vol. 32, Supp. 1. – P. S62–S67.
65. Dolar P. Effect of taurine on calcium kinetics of guinea-pig heart / P. Dolar, A. Agresti, A. Giotti [et al.] // *Eu. J. of Pharmac.* – 1973. – Vol. 24, Iss. 3. – P. 352–358.
66. Doliba Nic. AMP promotes oxygen consumption and ATP synthesis in heart mitochondria through the adenylate kinase reaction: an NMR spectroscopy and polarography study / Nic. Doliba, A. M. Babsky, Nat. Doliba [et al.] // *Cell Biochem. Funct.* – 2015. – Vol. 33, № 2. – P. 67–72.
67. Dolman N. J. Stable Golgi-mitochondria complexes and formation of Golgi Ca^{2+} gradients in pancreatic acinar cells / N. J. Dolman, J. V. Gerasimenko, O. V. Gerasimenko [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 16. – P. 15794–15799.
68. Du F. Metabolomic analyses for atherosclerosis, diabetes, and obesity / F. Du, A. Virtue, H. Wang [et al.] // *Biomarker Research.* – 2013. – Vol. 1. – P. 1–17.
69. Dudkina N. V. Structure and function of mitochondrial supercomplexes / N. V. Dudkina, R. Kouřil, K. Peters [et al.] // *Bioenergetics.* – 2010. – Vol. 1797, Iss. 6–7. – P. 664–670.
70. Dudkina N. V. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III / N. V. Dudkina, H. Eubel, W. Keegstra [et al.] // *PNAS.* – 2005. – Vol. 102, № 9. – P. 3225–3229.

71. Elving Ph. J. NAD/NADH as a model redox system: Mechanism, mediation, modification by the environment / Ph. J. Elving, W. T. Bresnahan, J. Moiroux [et al.] // *Bioelectrochem. and Bioenerg.* – 1982. – Vol. 9, Iss. 3. – P. 365–378.
72. Estrada D. E. Regulation of glucose transport and expression of GLUT3 transporters in human circulating mononuclear cells: Studies in cells from insulin-dependent diabetic and nondiabetic individuals / D. E. Estrada, E. Elliott, B. Zinman [et al.] // *Metabolism.* – 1994. – Vol. 43, Iss. 5. – P. 591–598.
73. Exton J. H. Metabolism of rat-liver cell suspensions I. General properties of isolated cells and occurrence of the citric acid cycle / J. H. Exton // *Biochem. J.* – 1964. – Vol. 92. – P. 457–467.
74. Fato R. Differential effects of mitochondrial complex I inhibitors on production of reactive oxygen species / R. Fato, C. Bergamini, M. Bortolus [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2009. – Vol. 1787, № 5. – P. 384–392.
75. Felig P. Amino Acid Metabolism in Man / P. Felig // *Ann. Rev. of Biochem.* – 1975. – Vol. 44. – P. 933–955.
76. Ferreira F. M. Alterations of liver mitochondrial bioenergetics in diabetic Goto-Kakizaki rats / F. M. Ferreira, C. M. Palmeira, R. Seiça [et al.] // *Metabolism.* – 1999. – Vol. 48, № 9. – P. 1115–1119.
77. Fierro L. Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (CRAC) in RBL 1 cells / L. Fierro, A. B. Parekh // *J. Membr. Biol.* – 1999. – Vol. 168, № 1. – P. 9–17.
78. Foufelle F. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c / F. Foufelle, P. Ferré // *Biochem. J.* – 2002. – Vol. 366, № 2. – P. 377–391.
79. Fraaije M. W. Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features / M. W. Fraaije, A. Mattevi // *Trends in Biochemical Sciences.* – 2000. – Vol. 25, Iss. 3. – P. 126–132.

80. Fukagawa N. K. Catabolic control of nicotinamide coenzyme level / N. K. Fukagawa // *Nutrit. Rev.* – 1984. – Vol. 42, Iss. 2. – P. 62–64.
81. Galluzzi L. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death / L. Galluzzi, O. Kepp, Ch. Trojel-Hansen [et al.] // *Circ. Res.* – 2012. Vol. 111, № 9. – P. 1198–1207.
82. Garcin I. Calcium signalling and liver regeneration / I. Garcin, T. Tordjmann // *Intern. J. of Hepatol.* – 2012. – Article ID 630670. – 6 p.
83. Gaull G. E. Taurine in human milk: growth modulator or conditionally essential amino acid? / G. E. Gaull // *J. of Pediatric Gastroenterol. & Nutr.* – 1983 – Vol. 2. – P. 266–271.
84. Gellerich F. N. Cytosolic Ca^{2+} regulates the energization of isolated brain mitochondria by formation of pyruvate through the malate-aspartate shuttle / F. N. Gellerich, Z. Gizatullina, S. Trumbekaite [et al.] // *Biochem. J.* – 2012. – Vol. 443, № 3. – P. 747–755.
85. Gerich J. E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications / J. E. Gerich // *Diabetic Medicine.* – 2010. – Vol. 27, Iss. 2. – P. 136–142.
86. Giacco F. Oxidative stress and diabetic complications / F. Giacco, M. Brownlee, A.-M. Schmidt // *Circ. Research.* – 2010. – Vol. 107. – P. 1058–1070.
87. Gilibert J. A. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca^{2+} current ICRAC / J. A. Gilibert, A. B. Parekh // *EMBO J.* – 2000. – Vol. 19. – P. 6401–6407.
88. Giugliano D. Oxidative stress and diabetic vascular complications / D. Giugliano, A. Ceriello, G. Paolisso // *Diabetes Care.* – 1996. – Vol. 19, № 3. – P. 257–267.
89. Gunter T. E. Calcium and mitochondria / T. E. Gunter, D. I. Yule, K. K. Gunter [et al.] // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 567. – P. 96–102.

90. Guo S. Factors affecting wound healing / S. Guo, L. A. DiPietro // JDR. – 2010. – Vol. 89, № 3. – P. 219–229.
91. Gürer H. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress / H. Gürer, H. Özgünes, E. Saygin [et al.] // Arch. of Envir. Contamin. and Toxicol. – 2001. – Vol. 41, Iss. 4. – P. 397–402.
92. Hajnoczky G. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria / G. Hajnoczky, L. D. Robb-Gaspers, M. B. Seitz [et al.] // J. Cell. – 1995. – Vol. 82, № 3. – P. 415–424.
93. Hanna J. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium / J. Hanna, R. Chahine, G. Aftimos [et al.] // Exp. and Toxicol. Pathol. – 2004. – Vol. 56, Iss. 3. – P. 189–194.
94. Hansen P. S. Voltage-dependent stimulation of the Na⁺-K⁺ pump by insulin in rabbit cardiac myocytes / P. S. Hansen, K. A. Buhagiar, D. F. Gray [et al.] // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2000. – Vol. 278. – P. 546–553.
95. Hartman M. L. Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus / M. L. Hartman, O. S. Shirihai, M. Holbrook [et al.] // Vasc. Med. – 2014. – Vol. 19, № 1. – P. 67–74.
96. Hayes K. C. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat / K. C. Hayes, R. E. Carey, S. Y. Schmidt // Science. – 1975. – Vol. 188, Iss. 4191. – P. 949–951.
97. He L. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein / L. He, A. Sabet, S. Djedjos [et al.] // Cell. – 2009. – Vol. 137, Iss. 4. – P. 635–646.
98. Hemmila M. R. Intensive insulin therapy is associated with reduced infectious complications in burn patients / M. R. Hemmila, M. A. Taddonio, S. Arbabi [et al.] // Surgery. – 2008. – Vol. 144, Iss. 4. – P. 629–637.

99. Hems R. Restricted permeability of rat liver for glutamate and succinate / R. Hems, M. Stubbs, H. A. Krebs // *Biochem. J.* – 1968. – Vol. 107. – P. 807–815.
100. Holloszy J. O. The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise / J. O. Holloszy, W. M. Kohrt, P. A. Hansen // *Frontiers in Bioscience.* – 1998. – Vol. 3. – P. d250–268.
101. Horton J. D. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver / J. D. Horton, J. L. Goldstein, M. S. Brown // *J. Clin. Invest.* – 2002. – Vol. 109, № 9. – P. 1125–1131.
102. Hoth M. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes / M. Hoth, C. M. Fanger, R. S. Lewis // *J. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 137. – P. 633–648.
103. Huang B. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor- α ligands, glucocorticoids, and insulin / B. Huang, P. Wu, M. M. Bowker-Kinley [et al.] // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51. – P. 276–283.
104. Hubbard S. R. The insulin receptor: Both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase / S. R. Hubbard // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5: a008946. – P. 1–12.
105. Hüttemann M. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis / M. Hüttemann, P. Pecina, M. Rainbolt [et al.] // *Mitochondrion.* – 2011. – Vol. 11, Iss. 3. – P. 369–381.
106. Imae M. Potential role of taurine in the prevention of diabetes and metabolic syndrome / M. Imae, T. Asano, Sh. Murakami // *Amino Acids.* – 2014. – Vol. 46, Iss. 1. – P. 81–88.
107. Inoue A. Retardation of the development of hypertension in DOCA salt rats by taurine supplement / A. Inoue, H. Takahashi, L.-C. Lee [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 1988. – Vol. 22, Iss. 5. – P. 351–358.

108. Inzucchi S. E. Management of Hyperglycemia in the Hospital Setting / S. E. Inzucchi // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355. – P. 1903–1911.
109. Jacobsen J. G. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives / J. G. Jacobsen, L. H. Smith // *Physiol. Rev.* – 1968. – Vol. 48, № 2. – P. 424–511.
110. James D. E. Heterogeneity of insulin action in individual muscles in vivo: euglycemic clamp studies in rats / D. E. James, A. B. Jenkins, E. W. Kraegen // *Am. J. of Physiol.* – 1985. – Vol. 248, № 5. – P. E567–E574.
111. Jastroch M. Mitochondrial proton and electron leaks / M. Jastroch, A. S. Divakaruni, Sh. Mookerjee [et al.] // *Ess. In Biochem.* – 2010. – Vol. 47. – P. 53–67.
112. Jouaville L. S. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes / L. S. Jouaville, F. Ichas, E. L. Holmuhamedov [et al.] // *Nature* – 1995. – Vol. 377. – P. 438–441.
113. Kahn C. R. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes / C. R. Kahn // *Diabetes.* – 1994. – Vol. 43, № 8. – P. 1066–1085.
114. Kamo N. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state / N. Kamo, M. Muratsugu, R. Hongoh [et al.] // *J. Membr. Biol.* – 1979. – Vol. 49, Iss. 2, P. 105–121.
115. Kern M. Insulin responsiveness in skeletal muscle is determined by glucose transporter (Glut4) protein level / M. Kern, J. A. Wells, J. M. Stephens [et al.] // *Biochem. J.* – 1990. – P. 270, № 2. – P. 397–400.
116. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis / S. Kersten // *EMBO reports.* – 2001. – Vol. 2. – P. 282–286.

117. Kim S.-J. Taurine-diabetes interaction: from involvement to protection / S.-J. Kim; R. C. Gupta; H. W. Lee // *Curr. Diabetes Rev.* – 2007. – Vol. 3, № 3. – P. 165–175.
118. Kleinridders A. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function / A. Kleinridders, H. A. Ferris, W. Cai [et al.] // *Diabetes.* – 2014. – Vol. 63. – P. 2232–2243.
119. Kletzien R. F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress / R. F. Kletzien, P. K. Harris, L. A. Foellmi // *The FASEB J.* – 1994. – Vol. 8, № 2. – P. 174–181.
120. Knopf K. Taurine: An essential nutrient for the cat / K. Knopf, J. A. Sturman, M. Armstrong [et al.] // *J. Nutr.* – 1978. – Vol. 108. – P. 773–778.
121. Kondrashova M. N. Succinic acid oxidation as the only energy support of intensive Ca^{2+} uptake by mitochondria / M. N. Kondrashova, V. G. Goradze, B. I. Medvedev [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1982. – Vol. 109, №2 – P. 376–381.
122. Koopman W. J. H. Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation / W. J. H. Koopman, L. G. J. Nijtmans, C. E. J. Dieteren [et al.] // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2010. – Vol. 12, № 12. – P. 1431–1470.
123. Kramer C. K. Short-term intensive insulin therapy in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis / C. K. Kramer, B. Zinman, R. Retnakaran // *The Lancet Diabetes & Endocrinology.* – 2013. – Vol. 1, Iss. 1. – P. 28–34.
124. Kramer J. H. Effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure / J. H. Kramer, J. P. Chovan, S. W. Schaffer // *Am. J. of Physiol.* – 1981. – Vol. 240, № 2. – P. H238–H246.
125. Kulkarni R. N. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes / R. N.

- Kulkarni, J. C. Brüning, J. N. Winnay // *Cell*. – 1999. – Vol. 96, Iss. 3. – P. 329–339.
126. Kwon S. Glucocorticoid-induced hyperglycemia / S. Kwon; K. L. Hermayer // *Am. J. of the Med. Sci.* – 2013. – Vol. 345, Iss. 4. – P. 274–277.
127. Lapuente-Brun E. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain / E. Lapuente-Brun, R. Moreno-Loshuertos, R. Acín-Pérez [et al.] // *Science*. – 2013. – Vol. 340, Iss. 6140. – P. 1567–1570.
128. Lardy H. Energetic coupling and regulation of metabolic rates // H. Lardy // *Cong. Intern. Biochem. Reports*. – Brussels, 1955. – P. 287–293.
129. Lawrence J. C. Jr. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin / J. C Jr. Lawrence, P. J. Roach // *Diabetes*. – 1997. – Vol. 46, № 4. – P. 541–547.
130. Lenaz G. Mitochondrial respiratory chain super-complex I–III in physiology and pathology / G. Lenaz, A. Baracca, G. Barbero [et al.] // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2010. – Vol. 1797, Iss. 6–7. – P. 633–640.
131. Lenaz G. Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: A new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation / G. Lenaz, M. L. Genova // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* – 2012. – Vol. 748. – P. 107–144.
132. Lesk A. M. NAD-binding domains of dehydrogenases / A. M. Lesk // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1995. – Vol. 5, Iss. 6. – P. 775–783.
133. Leto D. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4 / D. Leto, A. R. Saltiel // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 383–396.
134. Liu H.-Y. Prolonged exposure to insulin suppresses mitochondrial production in primary hepatocytes / H.-Y. Liu, E. Yehuda-Shnaidman, T. Hong [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, № 21. – P. 14087–14095.

135. Lobo M. V. T. Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat / M. V. T. Lobo, F. J. M. Alonso, R. M. Río // *The J. of Histochem. & Cytochem.* – 2000. – Vol. 48, № 3. – P. 313–320.
136. Lourenço R. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease / R. Lourenço, M. E. Camilo // *Nutr. Hosp.* – 2002. – Vol. 27, № 6. – P. 262–270.
137. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin protein reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
138. Mackle T. R. Effects of insulin and postruminal supply of protein on use of amino acids by the mammary gland for milk protein synthesis / T. R. Mackle, D. A. Dwyer, K. L. Ingvarsten [et al.] // *J. of Dairy Sci.* – 2000. – Vol. 83, Iss. 1. – P. 93–105.
139. Madibally S. V. Influence of insulin therapy on burn wound healing in rats / S. V. Madibally, V. Solomon, R. N. Mitchell // *J. of Surg. Res.* – 2003. – Vol. 109, Iss. 2. – P. 92–100.
140. Maletkovic J. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state / J. Maletkovic, A. Drexler // *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* – 2013. – Vol. 42, Iss. 4. – P. 677–695.
141. Maller J. L. A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin / J. L. Maller, J. W. Koontz // *Developmental Biology.* – 1981. – Vol. 85, Iss. 2. – P. 309–316.
142. Mallilankaraman K. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism / K. Mallilankaraman, C. Cárdenas, P. Doonan [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 14, № 12. – P. 1336–1343.
143. Markmann J. F. The use of non-heart-beating donors for isolated pancreatic islet transplantation / J. F. Markmann, S. Deng, N. M. Desai [et al.] // *Transplantation.* – 2003. – Vol. 75, № 9. – P. 1423–1429.

144. Marzo I. The permeability transition pore complex : a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins / I. Marzo, C. Brenner, N. Zamzami [et al.] // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 187, № 8. – P. 1261–1271.
145. Matschinsky F. M. Glucokinase as Glucose Sensor and Metabolic Signal Generator in Pancreatic β -Cells and Hepatocytes / F. M. Matschinsky // *Diabetes.* – 1990. – Vol. 39, № 6. – P. 647–652.
146. Matschinsky F. M. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy / F. M. Matschinsky, M. A. Magnuson, D. Zelent [et al.] // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55, № 1. – P. 1–12.
147. Matsuda M. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp / M. Matsuda, R. A. DeFronzo // *Diabetes Care.* – 1999. – Vol. 22, № 9. – P. 1462–1470.
148. McBroom J. J. Effects of taurine on heart calcium in the cardiomyopathic hamster / J. J. McBroom, J. D. Welty // *J. of Mol. and Cell. Cardiol.* – 1977. – Vol. 9, Iss. 10. – P. 853–858.
149. McCormack J. G. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism / J. G. McCormack, A. P. Halestrap, R. M. Denton // *Physiol. Rev.* – 1990. – Vol. 70. – P. 391–425.
150. McCormack J. The role of intramitochondrial Ca^{2+} in the regulation of oxidative phosphorylation in mammalian tissues / J. McCormack, R. Denton // *Biochem. Soc. Trans.* – 1993 – Vol. 21, № 3. – P. 793–799.
151. McGowan J. A. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: Effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP / J. A. McGowan, A. J. Strain, N. L. R. Bucher // *J. of Cell. Physiol.* – 1981. – Vol. 108, Iss. 3. – P. 353–363.

152. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism / P. Mitchell // *Nature*. – 1961. – Vol. 191. – P. 144–148.
153. Mondon C. E. Removal of insulin by perfused rat liver: Effect of concentration / C. E. Mondon, J. M. Olefsky, C. B. Dolkas [et al.] // *Metabolism*. – 1975. – Vol. 24, Iss. 2. – P. 153–160.
154. Montero M. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion / M. Montero, M. T. Alonso, E. Carnicero [et al.] // *Cell Biol.* – 2000. – Vol. 2. – P. 57–61.
155. Mráček T. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues / T. Mráček, Z. Drahotka, J. Houštěk // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 2013. – Vol. 1827, Iss. 3. – P. 401–410.
156. Murphy A. N. Submicromolar Ca^{2+} regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms / A. N. Murphy, J. K. Kelleherll, G. Fiskurn // *The J. of Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265, № 18. – P. 10527–10534.
157. Nadtochiy S. M. Purine release: A protective signaling mechanism of the mitochondrial permeability transition pore in ischemia / S. M. Nadtochiy, D. Nauduri, T. V. Shimanskaya [et al.] // *Fiziol. zh.* – 2008. – Vol. 54, № 6. – P. 5–14.
158. Narasimhulu G. Hepato-protective effects of Pimpinella tirupatiensis extract on cytosolic and mitochondrial enzymes against streptozotocin (STZ)-injected pathogenic diabetic rats / G. Narasimhulu, S. Kesireddy, P. Rao [et al.] // *Intern. J. of Pharmacy and pharmaceutical sciences*. – 2014. – Vol. 6, Suppl. 2. – P. 792–797.
159. Newsholme P. New insights into amino acid metabolism, β -cell function and diabetes / P. Newsholme, L. Brennan, B. Rubi [et al.] // *Clinical Science*. – 2005. – Vol. 108. – P. 185–194.

160. Nguyen P. Liver lipid metabolism / P. Nguyen, V. Leray, M. Diez [et al.] // *J. of Animal Physiol. and Animal Nutr.* – 2008. – Vol. 92, Iss. 3. – P. 272–283.
161. Nicholls D. G. Mitochondrial and neuronal survival / D. G. Nicholls, S. L. Budd // *Physiol. rev.* – 2000. – Vol. 80, № 1– P. 315–350.
162. Nicholls D. G. The integration of mitochondrial calcium transport and storage / D. G. Nicholls, S. J. Chalmers // *Bioenerg. Biomembr.* – 2004. – Vol. 36, № 4. – P. 277–281.
163. Niedowicz D. The role of oxidative stress in diabetic complications / D. Niedowicz, D. Daleke // *Cell biochem. biophys.* – 2005. – Vol. 43. – P. 289–331.
164. Nohl H. Quinones in Biology: Functions in electron transfer and oxygen activation / H. Nohl, W. Jordan, R. J. Youngman // *Advances in Free Radical Biology & Medicine.* – 1986. – Vol. 2, Iss. 1. – P. 211–279.
165. Oliveira P. Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats / P. Oliveira, R. Seïça, P. Coxito [et al.] // *FEBS Lett.* – 2003. – Vol. 554. – P. 511–514.
166. Opherk Ch. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus / Ch. Opherk, F. Tronche, Ch. Kellendonk // *Mol. Endocrin.* – 2004. – Vol. 18, Iss. 6. – P. 1346–1353.
167. Ortmeyer H. K. Insulin regulates liver glycogen synthase and glycogen phosphorylase activity reciprocally in rhesus monkeys / H. K. Ortmeyer, N. L. Bodkin, B. C. Hansen // *Am. J. of Physiol.* – 1997. – Vol. 272, № 1. – P. E133–E138.
168. Palmi M. Potentiation of mitochondrial Ca^{2+} sequestration by taurine / M. Palmi, G. T. Youmbi, F. Fusi [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 58, № 7. – P. 1123–1131.

169. Panov A. V. Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles / A. V. Panov, R. C. Scaduto // Arch. of Biochem. and Biophys. – 1995. – Vol. 316, № 2. – P. 815–820.
170. Parekh A. Store-operated Ca^{2+} entry : dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane / A. Parekh // J. Physiol. – 2003. – Vol. 547, № 2. – P. 333–348.
171. Park M. K. Local uncaging of caged Ca^{2+} reveals distribution of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in pancreatic acinar cells / M. K. Park., R. B. Lomax, A. V. Tepikin [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2001. – Vol. 98, Iss. 19. – P. 10948–10953.
172. Pollak N. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions / N. Pollak, Ch. Dölle, M. Ziegler // Biochem. J. – 2007. – Vol. 402, № 2. – P. 205–218.
173. Ponsot E. Mitochondrial tissue specificity of substrates utilization in rat cardiac and skeletal muscles / E. Ponsot, J. Zoll, B. N’guessan [et al.] // J. Cell Physiol. – 2005. – Vol. 203, № 3. – P. 479–486.
174. Postic C. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis / C. Postic, R. Dentin, J. Girard // Diabetes & Metabolism. – 2004. – Vol. 30, Iss. 5. – P. 398–408.
175. Quinlan C. L. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions / C. L. Quinlan, A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova [et al.] // The J. of Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287. – P. 27255–27264.
176. Radhakumary Ch. Naked eye detection of glucose in urine using glucose oxidase immobilized gold nanoparticles / Ch. Radhakumary, K. Sreenivasan // Anal. Chem. – 2011. – Vol. 83, № 7. – P. 2829–2833.

177. Reaven G. Metabolic syndrome: Pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease / G. Reaven // *Circ.* – 2002. – Vol. 106. – P. 286–288.
178. Reed M. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat / M. Reed, K. Meszaros, L. Entes [et al.] // *Metabolism.* – 2000. – Vol. 49, № 11. – P. 1390–1394.
179. Rich P. R. The mitochondrial respiratory chain / P. R. Rich, A. Maréchal // *Essays In Biochem.* – 2010. – Vol. 47. – P. 1–23.
180. Rigo J., Senterre J. Is taurine essential for the neonates? / J. Rigo, J. Senterre *Biol. Neonate.* – 1977. – Vol. 32. – 73–76.
181. Rizzuto R. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses / R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington [et al.] // *Science* – 1998. – Vol. 280. – P. 1763–1766.
182. Rizzuto R. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences / R. Rizzuto, T. Pozzan // *Physiol. Rev.* – 2006. – Vol. 86, № 1. – P. 369–408.
183. Robb-Gaspers L. D. Coupling between cytosolic and mitochondrial calcium oscillations: role in the regulation of hepatic metabolism / L. D. Robb-Gaspers, G. A. Rutter, P. Burnett [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta* – 1998. – Vol. 1366. – P. 17–32.
184. Rubenstein A. H. Role of the kidney in insulin metabolism and excretion / A. H. Rubenstein, I. Spitz // *Diabetes.* – 1968. – Vol. 17, № 3. – P. 161–169.
185. Rui L. Energy metabolism in the liver / L. Rui // *Compr. Physiol.* – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 177–197.
186. Saakyan I. R. Activation and inhibition of succinate-dependent Ca^{2+} transport in liver mitochondria during adaptation / I. R. Saakyan, S. G. Saakyan, M. N. Kondrashova // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 66, № 7. – P. 795–802.

187. Saltiel A. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism / A. R. Saltiel, C. R. Kahn // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – P. 799–806.
188. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle / M. Saraste // *Science*. – 1999. – Vol. 283, Iss. 5407. – P. 1488–1493.
189. Satav J. G. Effect of streptozotocin-induced diabetes on oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria – a comparative study of early and late effects / J. G. Satav, S. S. Katyare // *Indian J. of Clinical Biochem.* – 2004. – Vol. 19, № 2. – P. 23–31.
190. Schaffer S.W. Regulation of calcium homeostasis in the heart by taurine / S.W. Schaffer, J. Kramer, J. P. Chovan // *Federation Proceedings*. – 1980. – Vol. 39, № 9. – P. 2691–2694.
191. Scheepers A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function / A. Scheepers, H. G. Joost, A. Schurmann // *J. Parenter. Enteral. Nutr.* – 2004. – Vol. 28, № 5. – P. 364–371.
192. Schlessinger J. Receptor tyrosine kinases: Legacy of the first two decades / J. Schlessinger // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2014. – Vol. 6: a008912. P. 1–13.
193. Seglen P. O. Preparation of isolated rat liver cells / P. O. Seglen // *Methods cell biol.* – 1976. – Vol. 13. – P. 29–83.
194. Singh P. Increased oxygen consumption and basal metabolism of the proximal tubule in early diabetes / P. Singh, J. Thomas, H. Pham [et al.] // *The FASEB J.* – 2015. – Vol. 29, № 1. – Suppl. 963. – 8 p.
195. Slot J. W. Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat / J. W. Slot, H. J. Geuze, S. Gigengack [et al.] // *JCB*. – 1991. – Vol. 113, № 1. – P. 123–135.

196. Spitze A. R. Taurine concentrations in animal feed ingredients; cooking influences taurine content / A. R. Spitze, D. L. Wong, Q. R. Rogers [et al.] // *J. of Anim. Physiol. and Anim. Nutr.* – 2003. – Vol. 87, Iss. 7–8. – P. 251–262.
197. Stanley W.C. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions: Potential for pharmacological interventions / W.C. Stanley, G. D. Lopaschuk, J. L. Hall [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 1997. – Vol. 33. – P. 243–257.
198. Starzl T. E. Effects of insulin, glucagon, and insulin/glucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portacaval shunt in dogs / T. E. Starzl, K. A. Porter, K. Watanabe [et al.] // *The lancet.* – 1976. – Vol. 307, Iss. 7964. – P. 821–825.
199. Stump C. S. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts / C. S. Stump, K. R. Short, M. L. Bigelow [et al.] // *PNAS.* – 2003. – Vol. 100, № 13. – P. 7996–8001.
200. Summers S. A. The role of glycogen synthase kinase 3 β in insulin-stimulated glucose metabolism / S. A. Summers, A. W. Kao, A. D. Kohn [et al.] // *The J. of Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 17934–17940.
201. Tan S. L. J. Differences in proton-coupled electron-transfer reactions of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) between buffered and unbuffered aqueous solutions / S. L. J. Tan, J. M. Kan, R. D. Webster // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – Vol. 117, № 44. – P. 13755–13766.
202. Thomas M. C. Unrecognized anemia in patients with diabetes: A cross-sectional survey / M. C. Thomas, R. J. MacIsaac, C. Tsalamandris [et al.] // *Diabetes Care.* – 2003. – Vol. 26, № 4. – P. 1164–1169.
203. Thorpe C. Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases / C. Thorpe, J. J. Kim // *The FASEB J.* – 1995. – Vol. 9, № 9. – P. 718–725.

204. Tomoko N. Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase / N. Tomoko, K. Okamoto, B. Eger [et al.] // *The FEBS J.* – 2008. – Vol. 275, Iss. 13. – P. 3278–3289.
205. Turner R. C. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: Estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations / R. C. Turner, R. R. Holman, D. Matthews [et al.] // *Metabolism.* – 1979. – Vol. 28, Iss. 11. – P. 1086–1096.
206. Van den Berghe G. Intensive insulin therapy in critically ill patients / G. Van den Berghe, P. Wouters, F. Weekers [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – Vol. 345, № 19. – P. 1359–1367.
207. Vigil M. Adverse effects of high doses of intravenous alpha lipoic acid on liver mitochondria / M. Vigil, B. M. Berkson, A. P. Garcia // *Glob. Adv. in Health and Med.* – 2014. – Vol. 3, Iss. 1. – P. 25–27.
208. Vinothkumar K. R. Architecture of mammalian respiratory complex I / K. R. Vinothkumar, J. Zhu, J. Hirst // *NATURE.* – 2014. – Vol. 515, Iss. 7525. – P. 80–84.
209. Voronina S. G. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells / S. G. Voronina, S. L. Barrow, A. W. Simpson [et al.] // *Gastroenterology.* – 2010. – Vol. 138, № 5. – P. 1976–1987.
210. Walsh Ch. Flavin coenzymes: at the crossroads of biological redox chemistry / Ch. Walsh // *Acc. Chem. Res.* – 1980. – Vol. 13, № 5. P. 148–155.
211. Wang Zh. Pancreatic β cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy / Zh. Wang, N. W. York, C. G. Nichols [et al.] // *Cell Metabolism.* – 2014. – Vol. 19, Iss. 5. – P. 872–882.
212. Weiss H. The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria / H. Weiss, Th. Friedrich, G. Hofhaus [et al.] // *EJB Rev.* – 1991. – Vol. 1991. – P. 55–68.

213. Wiederkehr A. Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action / A. Wiederkehr, C. B. Wollheim // *Endocrinology*. – 2006. – Vol. 147. – P. 2643–2649.
214. Wójcik O. P. The potential protective effects of taurine on coronary heart disease / O. P. Wójcik, K. L. Koenig, A. Zeleniuch-Jacquotte [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2010. – Vol. 208, Iss. 1. – P. 19–25.
215. Wolfe R. R. Recovery of labeled CO₂ during the infusion of C-1- vs C-2-labeled acetate: implications for tracer studies of substrate oxidation / R. R. Wolfe, F. Jahoor // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1990. – Vol. 51, № 2. – P. 248–252.
216. Wolfsdorf J. Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association / J. Wolfsdorf, N. Glaser, M. A. Sperling // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29, № 5. P. – 1150–1159.
217. Wu K. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats / K. Wu, Y. Huan // *Curr. Protoc. Pharmacol.* – 2008.– Suppl. 40. – P. 5.47.1–5.47.14.
218. Xia Yu. Colorimetric visualization of glucose at the submicromole level in serum by a homogenous silver nanoprism–glucose oxidase system / Yu. Xia, J. Ye, K. Tan [et al.] // *Anal. Chem.* – 2013. – Vol. 85, № 13. – P. 6241–6247.
219. Xu Y.-J. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease / Y.-J. Xu, A. S. Arneja, P. S. Tappia [et al.] // *Exp. Clin. Cardiol.* – 2008. – Vol. 13, № 2. – P. 57–65.
220. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences / W. Ying // *Antioxid Redox. Signal.* – 2008. – Vol. 10 № 2. – P. 179–206.
221. Yu Zh. Advances in non-snake venom L-amino acid oxidase / Zh. Yu, H. Qiao // *App. Biochem. and Biotech.* – 2012. – Vol. 167, Iss. 1. – P. 1–13.

222. Yuen K. C. J. Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans / K. C. J. Yuen, L. E. Chong, M. C. Riddle // *Diabetic Medicine*. – 2013. – Vol. 30, Iss. 6. – P. 651–663.
223. Zakharchenko M. V. Burst of succinate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase activity in concert with the expression of genes coding for respiratory chain proteins underlies short-term beneficial physiological stress in mitochondria / M. V. Zakharchenko, A. V. Zakharchenko, N. V. Khunderyakova [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 45. – P. 190–200.
224. Zavodnik I. B. Melatonin and succinate reduce rat liver mitochondrial dysfunction in diabetes / I. B. Zavodnik, E. A. Lapshina, V. T. Cheshchevik [et al.] // *J. of Physiol. and Pharmacol.* – 2011. – Vol. 62, № 4. – P. 421–427.