МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Купиняк Надія Ігорівна

УДК 612.062: 57.053.2: 57.042

РОЛЬ Ca^{2+}-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ У РЕГУЛЯЦІЇ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ У МІТОХОНДРІЯХ КЛІТИН ПЕЧІНКИ

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

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

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

Офіційні опоненти:

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

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

Захист відбудеться «_21_» _грудня__ 2018 року о 13^{00} годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

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

Автореферат розісланий «_19_» _листопада__ 2018 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14
кандидат біологічних наук, доцент _____ М.В. Бура

Актуальність теми. Гепатоцити мають широкий спектр функцій, включаючи певні етапи проміжного метаболізму, синтез і секрецію білків, транспорт і секрецію жовчних кислот [Meldolesi, Pozzan, 1987; Watanabe, 1991; Dupont et al., 2000; Amaya et al., 2013]. Ca^{2+}-сигналізація відіграє важливу роль у регулюванні функціонування гепатоцитів, зокрема глікогенолізу та мітохондріального окислення [Exton, 1987; Mallilankaraman et al., 2012]. Відомо, що концентрація Ca^{2+} у цитоплазмі гепатоцитів визначається Ca^{2+}-транспортувальними системами плазматичної мембрани та ендолазматичного ретикулуму [Gaspers, Thomas, 2005; Hoppe, 2010; Szymański et al., 2017]. Але які Ca^{2+}-транспортувальні системи залучені у регулювання енергетичних процесів у гепатоцитах і за яких умов, ще не до кінця досліджено.

У цитозолі гепатоцитів збільшення концентрації Ca^{2+} переважно відбувається внаслідок гормональної стимуляції та передбачає активацію системи $ІФ_3$, що спричиняє вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума $ІФ_3$-чутливими Ca^{2+} каналами [Taylor, 1998; Marchant et al., 1999]. Однак дані про вплив активації $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+} каналів на клітинне дихання за окиснення різних субстратів у гепатоцитах відсутні. Окрім $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів, на характер Ca^{2+}-сигналів впливає і активація ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів ендоплазматичного ретикулуму (RyRs), які не залучені у процес швидкого вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму, але можуть посилювати $ІФ_3$-індуковані Ca^{2+}-сигнали [Pierebon, 2006]. Крім того, на кардіоміоцитах та нейронах показано, що мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали (mRyRs) мають вищу провідність Ca^{2+}, ніж Ca^{2+}-уніпортер мітохондрій, і, ймовірно, саме mRyRs відповідають за надходження Ca^{2+} з мікродоменів у ділянці мітохондрійасоційованих мембран на стику ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій (MAM) [Gunter, Sheu, 2009; Jakob et al., 2014]. Це забезпечує акумуляцію Ca^{2+} в матриксі мітохондрій у відповідь на зростання його цитозольної концентрації і стимулює споживання кисню [Beutner et al., 2005]. На сьогодні залишається невідомим, чи наявні mRyRs в інших клітинах, зокрема у гепатоцитах, та їхня роль у регуляції енергетичних процесів цих клітин. Варто також встановити, як зміна функціональної активності mRyRs їхніми агоністами та антагоністами за різної позамітохондріальної концентрації Ca^{2+} впливає на мітохондріальне дихання та мембранний потенціал мітохондрій у гепатоцитах. Дослідження ролі різних систем транспортування Ca^{2+} у енергетичних процесах гепатоцитів є важливим для розуміння широкого спектру фізіологічних та патофізіологічних процесів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка у рамках науково-дослідних тем «Ca^{2+}-транспортувальні системи та регуляції клітинного дихання екзокринних залоз у нормі і за дії стресорних чинників» (2015–2017 рр., № держреєстрації 0115U003246), «Адаптаційний потенціал мітохондрій секреторних клітин підшлункової залози і печінки у нормі та за розвитку патології» (2018–2020 рр., № держреєстрації 0118U003604), а також за часткової підтримки

Західно-Українського біомедичного центру (WUBMRC) і Товариства прихильників Львівського національного університету імені Івана Франка.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати роль Ca^{2+}-транспортувальних систем у регуляції енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки.

Для досягнення поставленої мети визначено такі завдання:

1. З'ясувати роль Ca^{2+}-помп плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму у регуляції енергетичного забезпечення гепатоцитів.
2. Дослідити вплив інозитол-1,4,5-трифосфату на енергетичні процеси у пермеабілізованих гепатоцитах.
3. Встановити вплив ріанодину на зміни вмісту Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях.
4. Виявити ефекти ріанодину на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій печінки.
5. Встановити роль mRyRs у регуляції дихання мітохондрій печінки щурів за різних субстратів та позамітохондріальної концентрації Ca^{2+}.
6. З'ясувати вплив ріанодину на енергетичні процеси у інтактних гепатоцитах щура.
7. Дослідити зміни мембранного потенціалу ізольованих мітохондрій за дії агоніста RyRs сураміну.

Об'єкт дослідження: регуляція енергетичного забезпечення клітин.

Предмет дослідження: Ca^{2+}-залежна регуляція мітохондріального дихання гепатоцитів.

Методи дослідження. Ізольовані мітохондрії отримували методом диференціального центрифугування. Чистоту мітохондріальної фракції перевіряли методами визначення АТФазної активності та електронної мікроскопії. Ізольовані гепатоцити отримували методом двостадійної перфузії печінки. Пермеабілізацію плазматичної мембрани гепатоцитів здійснювали за допомогою дигітоніну. Перевірку цілісності плазматичної мембрани гепатоцитів здійснювали за допомогою електронної мікроскопії та за допомогою фарбування трипанового синього. Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом. Мембранний потенціал визначали потенціометрично та за допомогою протокового цитометра. Вміст іонізованого Ca^{2+} вимірювали флуоресцентним методом за допомогою спектрофлуориметра. Концентрацію білка визначали за Лоурі. Вірогідність різниці між двома вибірками визначали за t-тестом Стьюдента.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше ідентифіковані мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали у гепатоцитах печінки щура і вперше проведено комплексне дослідження їхньої ролі у регуляції функціональної активності мітохондрій цих клітин. Зокрема встановлено, що на відміну від ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів ендоплазматичного ретикулуму мітохондріальні ріанодинчутливі Ca^{2+}-канали інгібуються ріанодином у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л. Це інгібування супроводжується зменшенням акумуляції Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, яке виявилося найсуттєвішим за окиснення піровату. Внаслідок цього мембранний потенціал мітохондрій зменшується за $[Ca^{2+}]$ у середовищі 0,1 мкмоль/л та окиснення піровату чи α-кетоглутарату, але не сукцинату.

Ефект інгібування мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів на дихання ізольованих мітохондрій залежить від концентрації Ca^{2+} у середовищі, субстрату окиснення та часу його дії: за 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі та наявності піровату швидкість АДФ-стимульованого дихання мітохондрій зменшується (тим сильніше, чи триваліша дія), а за 1 мкмоль/л – навпаки, збільшується. За окиснення α-кетоглутарату АДФ-стимульоване дихання мітохондрій збільшується після внесення ріанодину у полярографічну комірку з концентрацією Ca^{2+} 0,1 мкмоль/л. Коли ж окиснювався сукцинат, швидкість АДФ-стимульованого дихання мітохондрій під впливом ріанодину зменшилася за цих обох концентрацій Ca^{2+}, але незначно. Ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л пригнічує, здебільшого, базальне дихання інтактних гепатоцитів внаслідок інгібування мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів. Ефекти інгібування ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів ендоплазматичного ретикулуму інтактних гепатоцитів на мітохондріальне дихання є менш виражені, ніж ефекти інгібування мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів, і обмежені у часі, тому реєструються лише за безпосереднього внесення ріанодину в концентрації 1 мкмоль/л до клітин у полярографічну комірку. Агоніст ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів ендоплазматичного ретикулуму сурамін є агоністом і мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів. За окиснення субстратів Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ (піровату і α-кетоглутарату) і 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі він збільшує мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів, а за окиснення сукцинату – навпаки, зменшує.

Практичне значення одержаних результатів. Інтерпретація отриманих результатів дає можливість поглибити та розширити знання про механізми Ca^{2+}-залежної регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів. Отримані дані можуть бути корисними для подальшого пошуку шляхів запобігання набутих патологій та способів модуляції функціональної активності Ca^{2+}-транспортувальних систем клітин печінки.

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

Особистий внесок здобувача полягає у самостійному пошуку та аналізі наукової літератури за темою дисертаційної роботи. Автором самостійно проведено виконання усіх експериментальних досліджень, статистичну обробку результатів, обговорення та аналіз отриманих результатів. Формулювання висновків здійснювалось з науковим керівником.

Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій методом проточної цитометрії та спектрофлуориметричне визначення вмісту Ca^{2+} проведено спільно з співробітниками Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України д.б.н. Бабіч Л.Г. та д.б.н Шликовим С.Г. Потенціометричне вимірювання мембранного

потенціалу мітохондрій проведено спільно з співробітниками Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, а електронно-мікроскопічні дослідження – спільно з провідним спеціалістом міжфакультетської навчальної лабораторії інструментальних методів дослідження к.б.н. Кулачковським О.Р.

Апробація результатів. Основні положення дисертації були представлені на V симпозіумі «Особливості формування та становлення психофізіологічних функцій людини у онтогенезі», присвяченому 75-річчю з дня народження проф. М.В. Макаренка (Черкаси, 2012), II Scientific conference of young physiologist «Physiology: from molecules to the body» (Kyiv, 2012), XI і XII Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна» (Київ, 2013; 2014), III Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму» (Київ, 2013), Міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (Київ, 2014), Міжнародній конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, 2014), X та XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2014; 2015), XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Львів, 2015), VI з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк-Світязь, 2015), Conference for Young Scientists «Today's challenges in molecular and cell biology» (Kyiv, 2015), 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 матеріалами дисертації опубліковано 6 статей у фахових наукових виданнях і 14 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 141 сторінці комп'ютерного набору і складається зі вступу, 4-х розділів («Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження», «Результати досліджень та їхнє обговорення» та «Узагальнення»), а також висновків, списку використаних джерел та додатку. Робота містить 31 рисунок та 3 таблиці. Бібліографічний список налічує 241 джерело літератури.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Досліди виконували, використовуючи нелінійних статевозрілих щурів та щурів лінії Wistar (самці масою 180–250 г). Усі маніпуляції з тваринами проводились згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Тварин наркотизували діетиловим ефіром, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко видаляли печінку.

Виділення ізольованих мітохондрій печінки щурів. Мітохондрії виділяли методом диференціального центрифугування [Jonson, Lardy, 1967]. Після видалення печінку зважували та перфузували, подрібнювали через прес і гомогенізували. Гомогенат центрифугували 3 хв за 150 g і 5 хв за 300 g для осадження ула-

мків клітин і ядер, та 15 хв за 4500 g і температури 0–2˚С. Отриманий осад ресуспензували середовищем виділення у співвідношенні на 1 г тканини 0,1 мл середовища і отримували суспензію мітохондрій, яку використовували для подальших досліджень.

Методика ізолювання та пермеабілізації гепатоцитів. Гепатоцити ізолювали двостадійним методом [Seglen, 1976] з використанням розчину колагенази. Усі процедури проводили за 37 °С. Для перевірки цілісності плазмалеми гепатоцити фарбували 0,1 % розчином трипанового синього застосовуючи світлову мікроскопію. Кількість клітин з цілісними плазматичними мембранами становила 80–90 %. Пермеабілізовані гепатоцити отримували методом інкубації ізольованих клітин з дигітоніном впродовж 10 хв за 37 °С, використовуючи внутрішньоклітинний розчин.

Полярографічна реєстрація швидкості споживання кисню мітохондрій. Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом за допомогою установки, зібраної на базі полярографа YSI 5300, електрода Кларка, цифрового вольтметра, комп'ютера, магнітної мішалки (для розмішування гомогенату, суспензії мітохондрій ізольованих чи пермеабілізованих гепатоцитів) та закритої термостатованої комірки об'ємом 1,6 мл. Споживання кисню гомогенатом реєстрували за 26 °С, а дихання ізольованих гепатоциів – 37 °С. Як субстрати окислення використовували сукцинат (5 ммоль/л), піруват (5 ммоль/л) та α-кетоглутарат (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л).

Метод проточної цитометрії. Для реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій $\Delta\psi$ використовувався проточний цитометр COULTER EPICS XL™ з аргоновим лазером та аналізували за допомогою програми SYSTEM II™ Software. Експерименти проводили з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodaminemethyl ester; $\lambda_{збуд.}$ = 488 нм, $\lambda_{фл.}$ = 590 нм) у концентрації 100 нмоль/л. Інтенсивність флуоресценції зонда TMRM у відносних одиницях розраховували як різницю між геометричним положенням піків інтенсивності флуоресценції контрольної чи дослідних проб та автофлуоресценцією цих проб на 3 та 5 хв інкубації з зондом за 20 °С.

Метод потенціометрії. Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали методом потенціометрії, описаним Брендом і співроб. [Brand et al., 1955; Nadtochiy et al., 2006], з використанням ліполітичного катіона – метилтрифенілфосфоніум броміду (triphenyl-methylphos-phonium bromide, $TPMP^+$) і чутливого до нього електрода. У герметичну термостатовану комірку (37 ºС), обладнаною $TPMP^+$-селективним електродом та розміщеною на магнітній мішалці для постійного перемішування, вносили мітохондрії з розрахунку 2 мг/мл білка. Для калібрування $TPMP^+$-селективного електрода (у кожному вимірюванні) чотириразово додавали $TPMP^+$, збільшуючи концентрацію від 10 до 40 мкмоль/л.

Оцінка вмісту іонізованого Ca^{2+} у мітохондріях методом флуоресцентної спектроскопії. Реєстрацію відносних значень рівня Ca^{2+} у матриксі мітохондрій печінки здійснювали із використанням спектрофлуориметра Quanta Master 40 PTI (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 [Бережнов и др.,

2007; Gee et al., 2005]. Мітохондрії навантажували зондом Fluo 4AM ($\lambda_{збуд.}$ = 490 нм, $\lambda_{фл.}$ = 520 нм) у концентрації 2 мкмоль/л впродовж 30 хв за температури 37 °С у розчині, який використовували для суспендування мітохондрій. Внесенням тритону Х-100 спричиняли втрату бар'єрної функції мембрани мітохондрій та підвищення неспецифічної проникності до іонів Ca^{2+}, що відповідає значенням насичуючої концентрації Ca^{2+} (F_{max}). Значення F_{min} отримували внесенням у середовище інкубації EGTA для хелатування іонів Ca^{2+}. За показник F приймали середнє арифметичне всіх значень інтенсивності флуоресценції зонда, що реєструє прилад, за той період часу, в яких діяв той чи інший ефектор. Для обчислення концентрації іонізованого Ca^{2+} в матриксі мітохондрій використовували формулу Гринькевич [Grynkiewicz et al., 1985].

Трансмісійна електронна мікроскопія. Цілісність плазматичної мембрани гепатоцитів та цілісність мітохондрій перевіряли методом електронної мікроскопії. Для цього суспензію мітохондрій чи ізольовані гепатоцити промивали какодилатним буфером (0,2 моль/л), фіксували 1,5 %-м розчином глутарового альдегіду на какодилатному буфері (2 год) та 1 %-м розчином OsO_4 (2 год). Після цього зразки переносили у 1,5 %-й водний розчин уранілацетату на 12 год. Фіксовані зразки промивали і зневоднювали при кімнатній температурі у зростаючих концентраціях етанолу (у діапазоні від 70 до 100 %). Зрізи зразків контрастували на 1,5 %-му розчині уранілацетату та у свинець цитраті за Рейнольдсом [Reynolds, 1963], після чого переглядали і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЭМ-100.

Метод визначення АТФ-азної активності суспензії мітохондрій. Для оцінки ролі немітохондріальних мембранних структур у депонуванні Ca^{2+} визначали АТФ-азну активність суспензії мітохондрій на основі змін вмісту неорганічного фосфату ($P_н$) у середовищі інкубації методом УФ-детекції та методом Фіске-Суббароу [Fiske, SubbaRow, 1925]. З метою інгібування Ca^{2+}-помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму до середовища інкубації додавали еозин Y (20 мкмоль/л), для інгібування Na^+–K^+-помпи – оуабаїн (10 мкмоль/л), для інгібування Ca^{2+}-помпи ендоплазматичного ретикулуму – тапсигаргін (1 мкмоль/л), для блокування дихального ланцюга – натрій азид (10 ммоль/л). АТФазну реакцію запускали додаванням до середовища АТФ (3 ммоль/л).

Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження. Статистично-математичне опрацювання результатів проводили за Стюдентом з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*. Статистично достовірними вважали зміни при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їхнє обговорення

1. Роль Ca^{2+}-помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму у регуляції енергетичного забезпечення гепатоцитів. У клітині існує взаємозалежність між Ca^{2+}-осциляціями й енергетичними процесами [Rooney et al., 1989; Toescu, 2000; Hajnoczky et al., 2005]. Однак на сьогодні не до кінця досліджений внесок різних Ca^{2+}-транспортувальних систем у регуляцію енергетичних процесів у клітині. З метою оцінки ролі Ca^{2+}-помп плазматичної

мембрани і ендоплазматичного ретикулуму у регуляції енергетичного забезпечення клітин використовували їхній інгібітор еозин Y. З'ясувалося, що перфузія печінки позаклітинним розчином, який містив еозин Y (20 мкмоль/л), не спричиняла змін процесів дихання та окисного фосфорилювання мітохондрій за окиснення як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів. Хоча чітко простежується залежність швидкості споживання кисню від субстрату окиснення (рис. 1). Зокрема, найвищою швидкість дихання мітохондрій була за окиснення сукцинату, а найнижчою за використання пірувату, що узгоджується з даними інших авторів [Кондрашова, 1991].

Оскільки перфузія печінки щурів розчином еозину Y не впливала на процеси енергетичного забезпечення ізольованих мітохондрій печінки, ми припустили, що це може бути зумовлено наявністю гематогепатичного бар'єру – як чинника, що регулює надходження екзогенних речовин у печінку [Kmieć, 2001] або швидкоплинністю змін мітохондріального рівня Ca^{2+}.

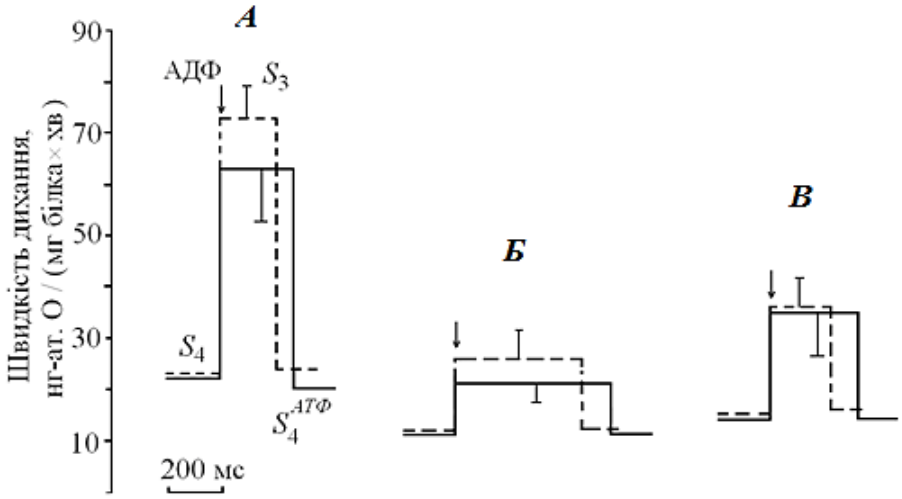

Рис. 1. Дихання мітохондрій після перфузії печінки еозин Y-вмісним розчином за окиснення сукцинату (*А*), пірувату (*Б*) й α-кетоглутарату (*В*): штрихова лінія – контроль; суцільна лінія – дослід; [ротенону] = 10 мкмоль/л, [TTFA] = 10 мкмоль/л, [еозину Y] = 20 мкмоль/л, [субстратів] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, n=6

На наступному етапі досліджень, з метою перевірки цих версій, як модельний об'єкт ми використали гомогенат печінки, в якому крім мітохондрій наявні везикули ендоплазматичного ретикулуму. З'ясувалося, що після попередньої інкубації гомогенату печінки щурів з еозином Y (20 мкмоль/л) швидкість споживання кисню при використанні ФАД- та НАД-залежних субстратів теж статистично достовірно не змінювалася. У наступній серії ми перевірили припущення, чи не спричинена відсутність змін у диханні мітохондрій за перфузії печінки (чи попередньої інкубації гомогенату) еозин Y-вмісним розчином швидкоплинністю змін внутрішньомітохондріального рівня Ca^{2+}. Для цього еозин Y (20 мкмоль/л) додавали безпосередньо до розчину у полярографічній комірці. Однак у цій серії, як і у попередніх, за окиснення сукцинату, пірувату чи α-кетоглутарату статистично достовірних змін дихання та окисного фосфорилювання нами не встановлено.

Отже, енергетичні процеси у гепатоцитах щурів не змінюються внаслідок інгібування Ca^{2+}-помпи еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л як за активації окиснення ФАД-, так і НАД-залежних субстратів.

2. Вплив $ІФ_3$ на енергетичні процеси у пермеабілізованих гепатоцитах. Відомо [Toescu, 2000; Amaya, 2013], що мітохондрії модулюють вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму, поглинаючи цитозольний Ca^{2+} і, таким чином, пригнічують позитивний зворотний вплив його на $ІФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали у пермеабілізованих гепатоцитах. У свою чергу, акумуляція у мітохондріях Ca^{2+} може змінювати їхній функціональний стан. Дані щодо ролі $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів у підтриманні певного рівня клітинного дихання за окиснення різних субстратів у гепатоцитах відсутні, що і зумовило наші дослідження.

Пермеабілізовані гепатоцити розділяли на дві проби: контрольну та дослідну. Гепатоцити контрольної проби вносили у полярографічну комірку з середовищем дихання та субстратом окиснення. Гепатоцити дослідної проби вносили у полярографічну комірку з середовищем дихання, субстратом окиснення та екзогенним $ІФ_3$ у концентрації 2 мкмоль/л. У результаті досліджень показано, що споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за активації $ІФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів збільшувалося за окиснення пірувату – на 22,8%, а за окиснення α-кетоглутарату – на 56,6 % (рис. 2). Показники дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату під впливом $ІФ_3$ змін не зазнавали.

Отже, $ІФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали ендоплазматичного ретикулуму беруть участь у регуляції певного рівня клітинного дихання за окиснення субстратів Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ.

3. Ефекти ріанодину на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій печінки. Раніше вважали, що RyRs локалізовані лише у ендоплазматичному ретикулумі, однак показана їхня наявність у мітохондріях кардіоміоцитів та нейронів смугастого тіла [Beutner et al., 2001; Jakob et al., 2014]. Метою нашого дослідження на цьому етапі було перевірити, чи наявні mRyRs у гепатоцитах. Для цього дослідили дію ріанодину на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій печінки, використавши потенціалчутливий зонд TMRM.

З'ясувалося, що ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л на 3 хв інкубації не впливав на величину мембранного потенціалу мітохондрій як за окиснення сукцинату, так і α-кетоглутарату (рис. 2, *А* і *В*). А за окиснення пірувату ріанодин у концентрації 0,1 спричинив зниження мембранного потенціалу мітохондрій після 3 хв інкубації на 51,7 % (рис. 2, *Б*).

Дещо інша закономірність зареєстрована після 5 хв інкубації мітохондрій з ріанодином: ріанодин у всіх досліджуваних концентраціях суттєво не змінював відносних значень мембранного потенціалу мітохондрій як за окиснення пірувату, так і сукцинату. А за окиснення α-кетоглутарату ріанодин у концентрації 0,05 мкмоль/л спричиняв збільшення відносних значень мембранного потенціалу мітохондрій на 116,2 % ($P \leq 0,05$, $n = 4$).

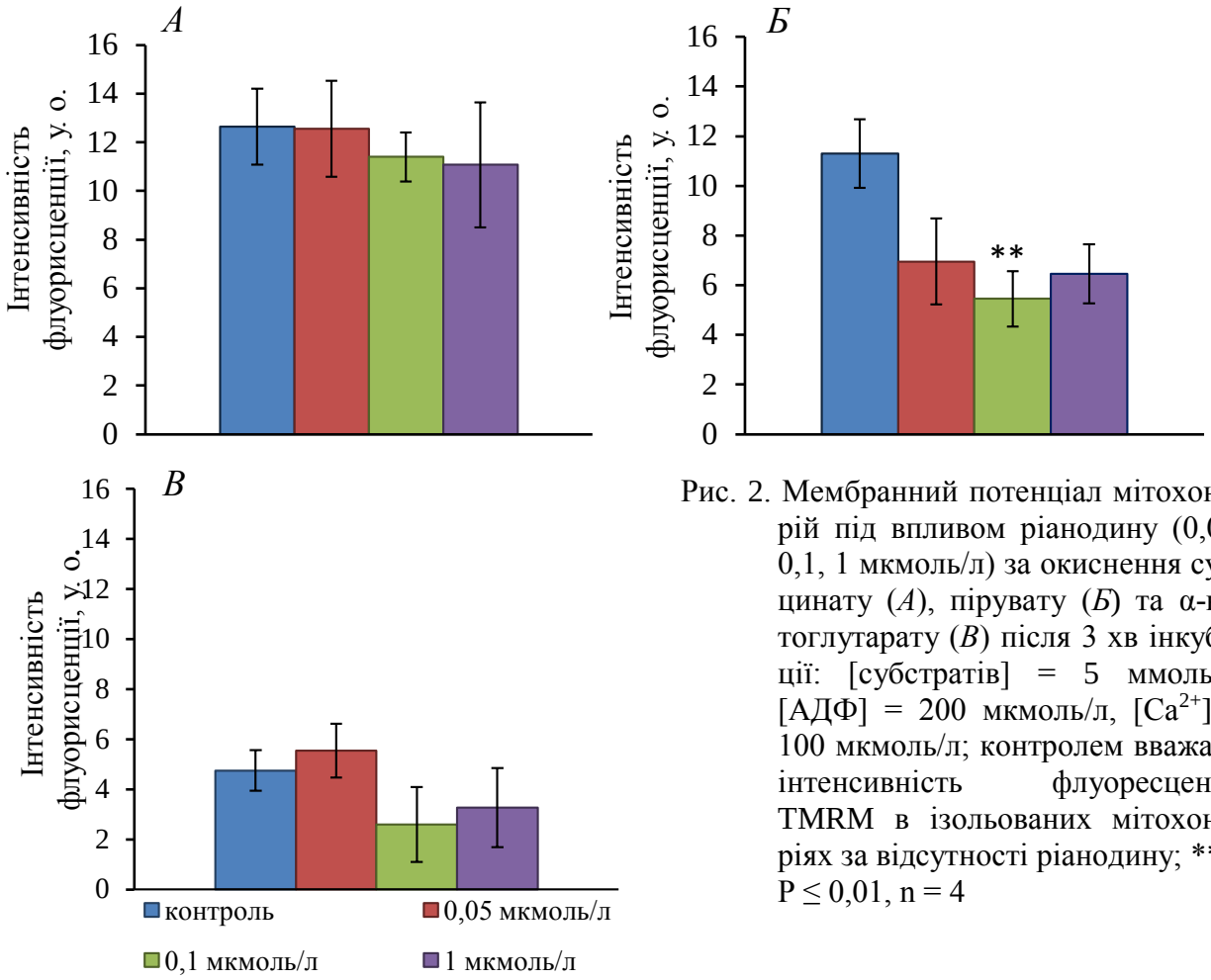

Рис. 2. Мембранний потенціал мітохондрій під впливом ріанодину (0,05, 0,1, 1 мкмоль/л) за окиснення сукцинату (*А*), піровату (*Б*) та α-кетоглутарату (*В*) після 3 хв інкубації: [субстратів] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, [Ca^{2+}] = 100 мкмоль/л; контролем вважали інтенсивність флуоресценції TMRM в ізольованих мітохондріях за відсутності ріанодину; ** – $P \leq 0{,}01$, n = 4

Отже, зміна мембранного потенціалу мітохондрій гепатоцитів щурів під впливом ріанодину після 3 (за окиснення піровату) і 5 хв (за окиснення α-кетоглутарату) інкубації свідчать про наявність mRyRs у їхній мембрані. На електрофоретичне транспортування Ca^{2+} у матрикс мітохондрій використовується енергія електрохімічного градієнта протонів, тому за активації mRyRs можна очікувати, перш за все, зменшення мембранного потенціалу. Але таке зменшення може привести до інтенсифікації процесів дихання – за рахунок зворотних гомеостатичних зв'язків, спрямованих на відновлення мембранного потенціалу мітохондрій. І, нарешті, частина мітохондріальних дегідрогеназ активуються Ca^{2+}, тому активація mRyRs може спричинити, за певних умов, і зростання мембранного потенціалу.

4. Вплив ріанодину на рівень Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях. На наступному етапі ми досліджували залежність рівня Ca^{2+} у мітохондріях печінки від субстрату окиснення та вплив на цей показник ріанодину. Виявилося, що концентрація Ca^{2+} у матриксі мітохондрій печінки дійсно залежить від субстрату окиснення. Найвища концентрація Ca^{2+} спостерігалась за окиснення сукцинату – 764 ± 61,6 нмоль/л (n = 3). Коли у середовищі був наявний піруват чи α-кетоглутарат, концентрація Ca^{2+} становила 68,8 ± 3,31 і 162 ± 12,4 нмоль/л відповідно (n = 3). Після збільшення у середовищі концентрації Ca^{2+} до 100 мкмоль/л його вміст у матриксі мітохондрій теж суттєво збільшувався до практично одного і

того ж самого рівня (контроль на рис. 3, *А–В*), хоча кінетика цього збільшення залежала від субстрату окиснення.

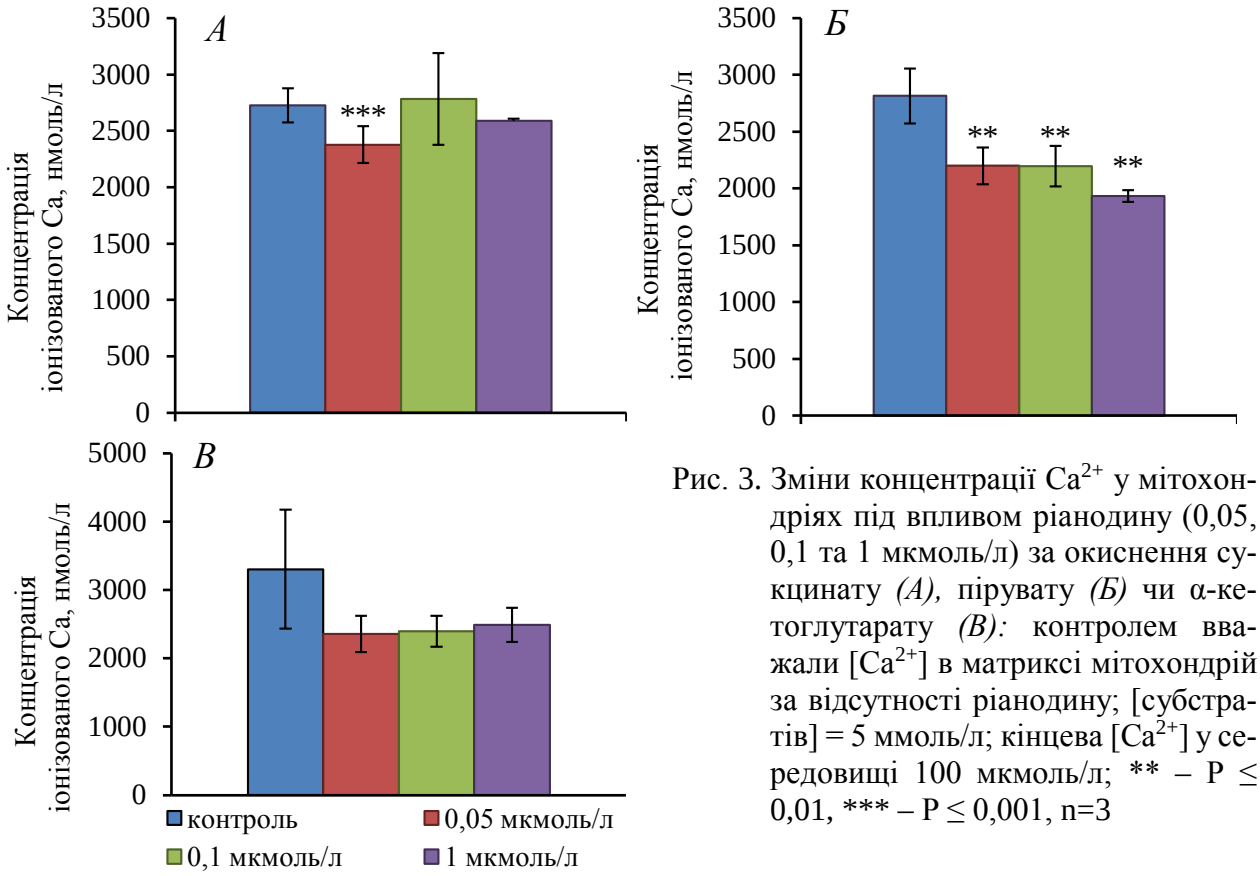

Рис. 3. Зміни концентрації Ca^{2+} у мітохондріях під впливом ріанодину (0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л) за окиснення сукцинату *(А),* піруват *(Б)* чи α-кетоглутарату *(В):* контролем вважали $[Ca^{2+}]$ в матриксі мітохондрій за відсутності ріанодину; [субстратів] = 5 ммоль/л; кінцева $[Ca^{2+}]$ у середовищі 100 мкмоль/л; ** – $P \leq 0{,}01$, *** – $P \leq 0{,}001$, n=3

Наявність у середовищі ріанодину у концентрації 0,05 мкмоль/л за окиснення сукцинату призвела до зменшення Ca^{2+}-активованої акумуляції Ca^{2+} у матриксі мітохондрій на 12,7 % (рис. 3, *А*). Під впливом інших концентрацій ріанодину статистично достовірних змін концентрації Ca^{2+} не зареєстровано. За окиснення піруват ріанодин в концентраціях 0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л знижував Ca^{2+}-активовану акумуляцію Ca^{2+} у матриксі мітохондрій на 21,8, 21,9 та 31,2 % відповідно (рис. 3, *Б*). За наявності у середовищі α-кетоглутарату статистично достовірних змін під впливом ріанодину не зареєстровано внаслідок значної дисперсії отриманих результатів (рис. 3, *В*); такий розкид даних, на нашу думку, пов'язаний з інваріантністю мітохондрій і є неметодичного походження. Відмінність в акумуляції Ca^{2+} мітохондріями за окиснення різних субстратів зумовлена тим, що піруват та α-кетоглутарат є субстратами Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ циклу трикарбонових кислот (піруватдегідрогеназного та α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексів); сукцинатдегідрогеназа, на відміну від них, не є Ca^{2+}-залежним ензимом.

Отже, проведені нами дослідження переконливо свідчать, що у мембрані мітохондрій наявні mRyRs. За їхньої активації (цілком можливо, цитозольним Ca^{2+}) величина протонного градієнта зменшується, оскільки його енергія використовується на електрофоретичне транспортування Ca^{2+} у матрикс мітохондрій. Це первинне зменшення протонного градієнта є миттєвим (первинним) і не ви-

значається фізико-хімічними властивостями Ca^{2+}. У другу фазу внаслідок збільшення концентрації Ca^{2+} у матриксі мітохондрій підвищуються активності Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ (піруватдегідрогеназного і α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексів чи НАД-ізоцитратдегідрогенази), інтенсифікуються процеси мітохондріального дихання та збільшується протонний градієнт.

5. Роль mRyRs у регуляції дихання мітохондрій печінки **щурів за різних субстратів та позамітохондріальної концентрації Ca^{2+}.** Для визначення ролі mRyRs у процесах регуляції мітохондріального дихання отриману суспензію мітохондрій преінкубували з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л за концентрації Ca^{2+} 0,1 мкмоль/л і температури 2–4 °С впродовж 5 або 10 хв. Після цього мітохондрії вносили у полярографічну комірку та реєстрували швидкість споживання кисню.

Після 5 хв преінкубації суспензії мітохондрій з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л за окиснення сукцинату відбувається зниження споживання кисню тільки у стані $S_4^{АТФ}$ – на 22,8 % (рис. 4, *А*). Після преінкубації 10 хв спостерігали зниження сукцинатстимульованого дихання вже у трьох станах –S_4 (на 41,2 %), S_3 (на 38,8 %) та $S_4^{АТФ}$ (на 44,3 %). За окиснення піруват преінкубація мітохондрій з ріанодином упродовж 5 хв зумовлювала зниження споживання кисню у станах S_4 та S_3 на 27,9 і 32,7 % відповідно (рис. 4, *Б*). Після преінкубації впродовж 10 хв спостерігали зменшення споживання кисню мітохондріями у трьох станах – S_4 (на 40,8 %), S_3 (на 44,9 %) та $S_4^{АТФ}$ (на 41,4 %).

Відомо, що активність α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексу зростає зі збільшенням концентрації Ca^{2+} вже від 0,001 мкмоль/л (хоча до тих самих 0,1 мкмоль/л, що й активність піруватдегідрогеназного комплексу) [Denton, 2009]. Але за окиснення α-кетоглутарату статистично достовірних змін швидкості дихання після преінкубації з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л нами не зареєстровано (рис. 4, *В*).

У наступній серії дослідження ріанодин у концентрації 0,1 мкмоль/л вносили безпосередньо у полярографічну комірку до мітохондрій із заданою концентрацією Ca^{2+}. За окиснення сукцинату і концентрації Ca^{2+} 0,1 мкмоль/л ріанодиніндуковане зменшення швидкості дихання у стані S_4 становило 13,4 % ($P \leq 0,01$, n=4), а у стані S_3 – 13,7 % ($P \leq 0,05$, n=4). Коли концентрацію Ca^{2+} збільшили до 1 мкмоль/л, це зменшення у станах S_4 і S_3 становило 9,59 % ($P \leq 0,05$, n=4) і 15,3 % ($P \leq 0,05$, n=4) відповідно. За окиснення піруват внаслідок безпосереднього внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) в полярографічну комірку з концентрацією Ca^{2+} у середовищі 0,1 мкмоль/л швидкість споживання кисню мітохондріями знижувалась у станах S_4, S_3 та $S_4^{АТФ}$ на 22,2, 32,1 та 8,2 % ($P \leq 0,01$, n=4). Коли ж концентрація Ca^{2+} у середовищі становила 1 мкмоль/л, під впливом ріанодину спостерігали не зниження, а підвищення швидкості піруватстимульованого дихання у станах S_4 та S_3 – на 12,2 і 17,2 % відповідно. На відміну від цього, за окиснення α-кетоглутарату і цієї ж концентрації Ca^{2+} швидкість дихання мітохондрій під впливом ріанодину у стані S_4 збільшилася на 19,2 % ($P \leq 0,05$, n=4), а у стані $S_4^{АТФ}$ – навпаки, зменшилася на 14,6 % ($P \leq 0,01$, n=4).

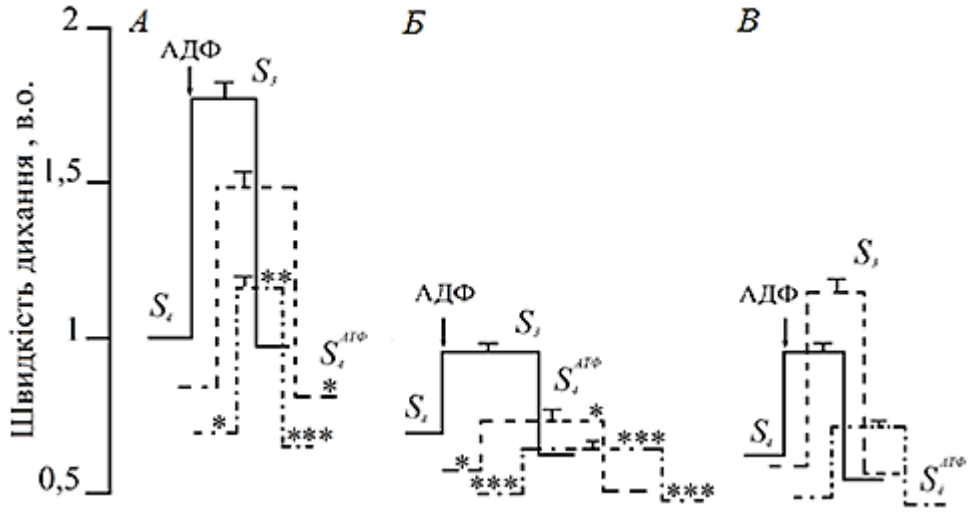

Рис. 4. Дихання мітохондрій, преінкубованих з ріанодином (0,05 мкмоль/л), за окиснення сукцинату *(А)*, піровату *(Б)* та α-кетоглутарату *(В)*; ─ контроль, - - 5 хв, – · – 10 хв; [Ca^{2+}] = 0,1 мкмоль/л; [субстратів] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; за одиницю взято швидкість дихання у контролі в стані S_4 за окиснення сукцинату; * – P ≤ 0,05, ** – P ≤ 0,01, *** – P ≤ 0,001, n=4

Отже, ефект інгібування mRyRs на дихання ізольованих мітохондрій залежить від концентрації Ca^{2+} у середовищі, субстрату окиснення та часу дії ріанодину. Це дає змогу стверджувати, що роль mRyRs у гепатоцитах щурів суттєво відрізняється за окиснення різних субстратів і є важливою ланкою регуляторного зв'язку між значенням мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання, коли позамітохондріальна концентрація Ca^2 є низькою.

6. Вплив ріанодину на енергетичні процеси в інтактних гепатоцитах. Для з'ясування, чи впливає активність RyRs ендоплазматичного ретикулуму на процеси окиснення у мітохондріях, ми модулювали їхню функціональну активність дією ріанодину у різних концентраціях, використовуючи гомогенат печінки та ізольовані гепатоцити. Нами показано, що після преінкубації з ріанодином (0,01 та 0,05 мкмоль/л) спостерігається тенденція до зниження споживання кисню гомогенатом печінки за окиснення α-кетоглутарату, піровату та сукцинату. Але оскільки у гомогенаті взаємозв'язки між мітохондріями та ендоплазматичним ретикулумом є лише частково збережені, ця серія досліджень була проведена на ізольованих інтактних гепатоцитах.

Після преінкубації гепатоцитів з ріанодином у концентрації 0,1 мкмоль/л дихання швидкість споживання кисню ізольованими гепатоцитами зменшилася на 20,9 % (P≤0,05, n=5), а у концентрації 1 мкмоль/л – на 36,6 % (P≤0,001, n=5). У наступній серії дослідів гепатоцити одразу після ізолювання вносили у комірку, де до базового позаклітинного розчину вже був доданий ріанодин. За наявності у комірці ріанодину у концентрації 0,1 мкмоль/л споживання кисню ізольованими гепатоцитами знижувалося на 31,9 %, а у концентрації 1 мкмоль/л – на 29,8 % (P≤0,05, n=5).

У серії дослідів, коли ріанодин у відповідних концентраціях додавали у полярографічну комірку після суспензії ізольованих гепатоцитів, були зареєстро-

вані дещо інші результати. Статистично достовірне зменшення швидкості дихання зареєстровано вже за найнижчої концентрації ріанодину – 0,05 мкмоль/л. Причому, це зменшення було найбільш вираженим – на 38,5 %, тоді як за концентрації ріанодину 0,1 мкмоль/л воно становило 33,8 % ($P \leq 0,01$, n=5). А от додавання у полярографічну комірку до ізольованих гепатоцитів ріанодину у концентрації 1 мкмоль/л не спричиняло статистично достовірних змін швидкості їхнього дихання.

Отже, ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л пригнічує, здебільшого, базальне дихання інтактних клітин внаслідок інгібування mRyRs. Ефекти інгібування RyRs ендоплазматичного ретикулуму інтактних гепатоцитів на мітохондріальне дихання є менш вираженіші і обмежені у часі, тому лише за безпосереднього внесення ріанодину в концентрації 1 мкмоль/л до клітин у полярографічну комірку вони нівелюють ефекти інгібування mRyRs.

7. Зміни мембранного потенціалу ізольованих мітохондрій за дії сураміну. Сурамін є агоністом RyRs ендоплазматичного ретикулуму [Hohenegger et al., 1996; Schöfl et al., 1999]. Ми припустили, що він може бути агоністом і mRyRs, тому дослідили зміни мембранного потенціалу мітохондрій за його дії у концентрації 1 мкмоль/л.

Встановлено, що мембранний потенціал мітохондрій за окиснення сукцинату вищий, ніж окиснення пірувату чи α-кетоглутарату. Це пов’язано з тим, що за окиснення екзогенного сукцинату немає лімітуючого чинника, яким є ще один субстрат циклу Кребса – малат, для окиснення пірувату чи α-кетоглутарату [Bookelman et al. 1978; Rutter, 2010]. За окиснення екзогенного сукцинату сурамін знижує мембранний потенціал мітохондрій у стані S_4 на 5,88 % ($P \leq 0,01$, n=3). Це зниження, на нашу думку, спричинене використанням енергії мембранного потенціалу мітохондрій на транспортування іонів Ca^{2+} у матрикс мітохондрій проти їхнього концентраційного градієнта.

За окиснення екзогенних пірувату та α-кетоглутарату сурамін спричиняв збільшення мембранного потенціалу мітохондрій у стані S_4 на 39,1 і 15,2 % відповідно ($P \leq 0,01$, n=3). Таке збільшення мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну за окиснення α-кетоглутарату і пірувату пов’язане, мабуть, з активацією α-кетоглутаратдегідрогеназного чи піруватдегідрогеназного комплексів. Сурамін активує mRyRs, збільшується надходження Ca^{2+} у матрикс мітохондрій, активуються Ca^{2+}-залежні дегідрогенази, що і спричиняє збільшення мембранного потенціалу мітохондрій.

Отже, агоніст RyRs сурамін дійсно є агоністом і mRyRs. За окиснення субстратів Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ (пірувату і α-кетоглутарату) і 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі він збільшує мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів, а за окиснення сукцинату – зменшує.

Узагальнення

Встановлені нами факти доводять важливу роль Ca^{2+}-транспортувальних систем (зокрема, mRyRs) у регуляції енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки. На основі отриманих результатів та даних літератури пропонуємо

схему Ca^{2+}-залежної регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів за окиснення сукцинату, пірувату та α-кетоглутарату (рис. 5).

Виявлено, що інгібування Ca^{2+}-помп плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму не спричиняє змін споживання кисню мітохондріями. Після додавання екзогенного $IФ_3$ – агоніста $IФ_3$-чутливих Ca^{2+}-каналів – зареєстровано інтенсифікацію дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення пірувату та α-кетоглутарату, яке реалізується шляхом активації Ca^{2+}-залежних піруватдегідрогеназного та α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексів і, як наслідок, посилення енергетичних процесів у пермеабілізованих гепатоцитів.

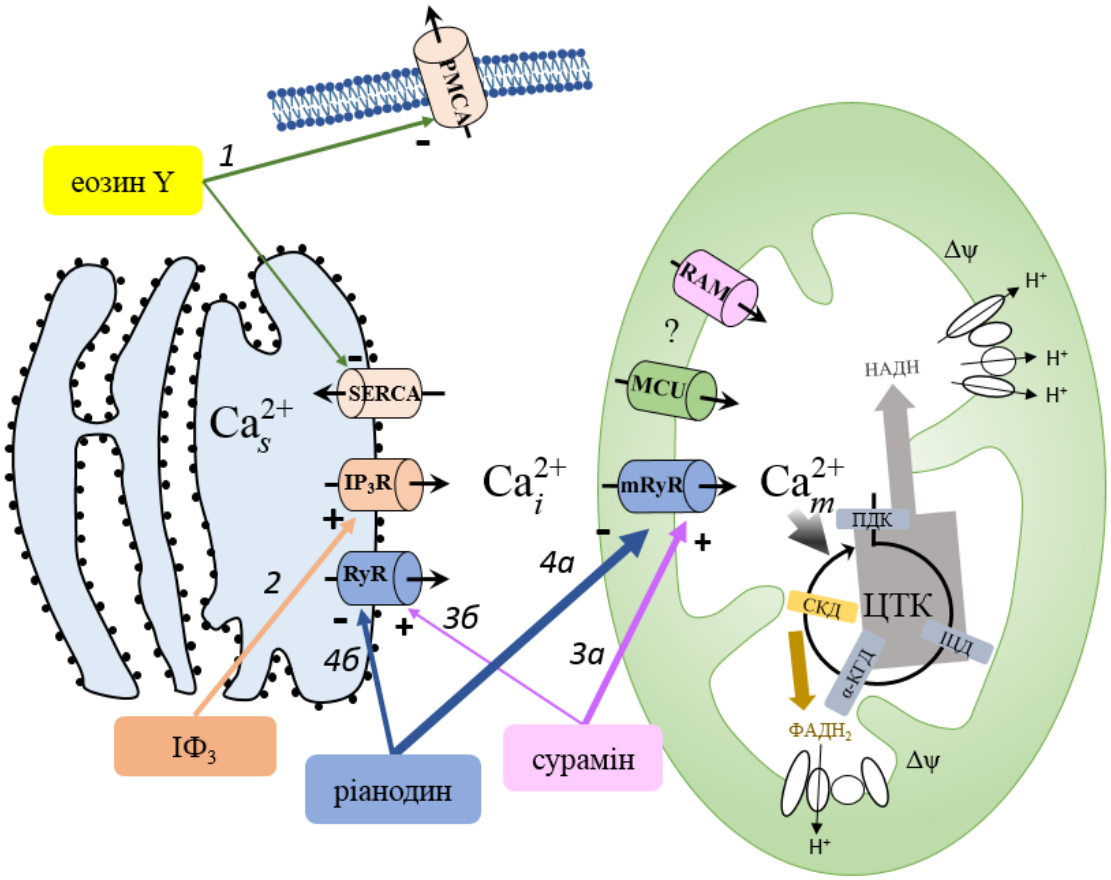

Рис. 5. Узагальнююча схема Ca^{2+}-залежної регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів: «+» – активуючий вплив, «-» – інгібуючий влив. Інші пояснення у тексті

Використання ріанодину та дослідження змін вмісту іонізованого Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, їхнього мембранного потенціалу та дихання дало змогу виявити mRyRs у гепатоцитах. Ідентифіковані mRyRs відіграють суттєву роль у регуляції енергетичних процесів у гепатоцитах. За їхньої активації (цілком можливо, цитозольним Ca^{2+}) мембранний потенціал мітохондрій спочатку зменшується, оскільки його енергія використовується на електрофоретичне транспортування Ca^{2+} у матрикс. Зростання концентрації Ca^{2+} у матриксі мітохондрій опосередковано через підвищення активності Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ інтенсифікує процеси мітохондріального дихання, що, у свою чергу, спричиняє не лише відновлення, а й збільшення мембранного потенціалу мітохондрій. Цілком можливо, mRyRs гепатоцитів є важливою ланкою регуляції під час адаптації до різних фізіологічних навантажень. За окиснення різних субстратів роль mRyRs в

адаптації енергетичних процесів є різною.

Сурамін є не лише агоністом RyRs ендоплазматичного ретикулуму, а й mRyRs. Ефект сураміну на мембранний потенціал мітохондрій залежить від субстратів окиснення та фосфорилювання, наявних у середовищі інкубації. За окиснення екзогенного сукцинату сурамін знижує мембранний потенціал мітохондрій, а за окиснення екзогенних піровату та α-кетоглутарату – навпаки, збільшує. За окиснення сукцинату, активація mRyRs призводить до транспортування Ca^{2+} у матрикс мітохондрій, водночас сукцинатдегідрогеназа не регулюється самими катіонами Ca^{2+}, тому компенсаторної інтенсифікації дихання не відбувається. За використання α-кетоглутарату чи піровату надходження Ca^{2+} інтенсифікує активність ферментів, що веде до збільшення мембранного потенціалу мітохондрій, але лише у стані S_4.

Отже, різні Ca^{2+}-транспортувальні системи клітин здійснюють різний внесок у регуляцію енергетичних процесів мітохондрій печінки. Визначальну роль у Ca^{2+}-залежній регуляції окиснення у мітохондріях печінки відіграють mRyRs.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено Ca^{2+}-залежну регуляцію енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки за участі Ca^{2+}-транспортувальних систем плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій, серед яких визначальну роль відіграють mRYRs.

На основі аналізу отриманих результатів зроблено такі висновки:

1. Енергетичні процеси у гепатоцитах щурів не змінюються за інгібування Ca^{2+}-помпи еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л за активації окиснення як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів.
2. $ІФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали ендоплазматичного ретикулуму беруть участь у регуляції клітинного дихання за окиснення субстратів Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ.
3. Вперше ідентифіковані мітохондріальні mRyRs у гепатоцитах печінки щура, які на відміну від RyRs ендоплазматичного ретикулуму інгібуються ріанодином у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л. Інгібування mRyRs супроводжується зменшенням акумуляції Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, яке виявилося найсуттєвішим за окиснення піровату.
4. Мембранний потенціал мітохондрій внаслідок інгібування mRyRs виражено зменшується за $[Ca^{2+}]$ 0,1 мкмоль/л і окиснення піровату (після 3 хв інкубації) чи α-кетоглутарату (після 5 хв), але не сукцинату. Таке зменшення мембранного потенціалу мітохондрій зумовлене пригніченням Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ, активність яких регулюється катіонами Ca^{2+}.
5. Ефект інгібування mRyRs на дихання ізольованих мітохондрій залежить від $[Ca^{2+}]$ у середовищі та субстрату окиснення. За 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі та окиснення піровату швидкість АДФ-стимульованого дихання мітохондрій суттєво зменшується, а за 1 мкмоль/л – навпаки, збільшується. Збільшення АДФ-стимульованого дихання зареєстровано за і 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} та окис-

нення α-кетоглутарату. Коли ж окиснювався сукцинат, швидкість мітохондріального дихання під впливом ріанодину незначно зменшилася за обох концентрацій Ca^{2+}.

6. Ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л пригнічує, здебільшого, базальне дихання інтактних клітин внаслідок інгібування mRyRs. Ефекти інгібування RyRs ендоплазматичного ретикулуму інтактних гепатоцитів на мітохондріальне дихання є менш вираженіші, ніж ефекти інгібування mRyRs, і обмежені у часі, тому реєструється лише за безпосереднього внесення ріанодину в концентрації 1 мкмоль/л до клітин у полярографічну комірку.
7. Агоніст RyRs сурамін є агоністом і mRyRs. За окиснення субстратів Ca^{2+}-залежних дегідрогеназ (пірувату і α-кетоглутарату) і 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} у середовищі він збільшує мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів, а за окиснення сукцинату – зменшує.

СПИСОК ОУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kupynyak N.I. Mitochondrial ryanodine-sensitive Ca^{2+} channels of rat liver / Kupynyak N.I., Ikkert O.V., Shlykov S.G., Babich L.G., Manko V.V. // Cell Biochem Funct. 2017. Vol. 1. P. 42–49. *(Дисертант опрацювала дані літератури, брала участь у проведенні експериментальних досліджень, аналізі результатів та написанні статті)*
2. Kupynyak N.I. The relationship between the ionized Ca concentration and mitochondrial funct ions / Babich L.G., Shlykov S.G., Kushnarova-Vakal A.M., Kupynyak N.I., Manko V.V., Fomin V.P., Kosterin S.O. // Ukr. Biochem. J., 2018, Vol. 90, N 3. P. 32–40 *(Дисертант опрацювала дані літератури, брала участь у проведенні експериментальних досліджень (визначення швидкості споживання кисню ізольованими мітохондріями за окиснення сукцинату, пірувату та α-кетоглутарату), аналізі результатів та написанні статті)*
3. Купиняк Н.І. Енергетичні процеси у печінці щура за дії інгібітора транспортувальних Ca^{2+}-АТФаз еозину Y / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна 2013. Вип. 61. С.180–188. *(Дисертант особисто провела експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала рукопис статті)*
4. Купиняк Н.І. Роль ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів у регуляції дихання мітохондрій печінки щурів / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2017. Вип. 76. С. 193–205. *(Дисертант особисто провела експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала рукопис статті)*
5. Купиняк Н.І. Енергетичні процеси у печінці щура за дії ріанодину / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Експеримент. та клін. фізіол. і біохім. 2018. Вип. 1 (81). С. 51–61. *(Дисертант особисто провела експериментальні дослідження, статистичний аналіз та узагальнення результатів, підготувала рукопис статті)*
6. Купиняк Н.І. Мембранний потенціал мітохондрій за дії сураміну / Купиняк Н.І., Охай І.Ю., Манько В.В. // Науковий вісник східноєвропейського ун-ту. Сер. біол. наук. 2018. Вип. 4 (377). С. 100–108. *(Дисертант опрацювала дані літератури, брала участь у проведенні експериментальних досліджень, аналізі результатів та написанні статті)*
7. Мацях Н.І. (Купиняк Н.І.) Дихання мітохондрій гепатоцитів за перфузії печінки блокатором Ca^{2+}-помп еозином Y / Мацях Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали V Симпозіуму "Особливості формування та становлення психофізіологічних функцій людини у онтогенезі" (21–22 травня 2012, Черкаси), присвяченому 75-річчю з дня народження проф. М.В. Макаренка. Черкаси, 2012. С. 61.
8. Matsyah N.I. (Kupynyak N.I.) The inhibitor of Ca^{2+}-pump eosin Y doesn't influence on influence on energy processes in the rats liver / Matsyah N.I., Ikkert O.V., Manko V.V. // II Scientific

conference of young physiologist “Physiology: from molecules to the body” (8–9 October 2012, Kyiv). Kyiv, 2012. P. 55.

9. Мацях Н.І. (Купиняк Н.І.) Інгібітор Ca^{2+}-помп еозин Y не впливає на енергетичні процеси у печінці щурів. / Мацях Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали ІІ конференції молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму» (8–9 жовтня 2012 р., Київ). Фізіол. журн., 2012, Т. 58, № 6. С.109.
10. Купиняк Н.І. Вплив ріанодину на енергетичні процеси у печінці щурів / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали XI Міжнародної наукової конференції «Шевченківська весна». Секція «Біологічні науки» (18–22 березня 2013 р., Київ). Київ, 2013. С. 64.
11. Купиняк Н.І. Вплив ріанодину на споживання кисню ізольованими мітохондріями печінки щурів / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // ІІІ Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму» (24–25 жовтня 2013 р., Київ): збірник тез. Київ, 2013. С. 17.
12. Купиняк Н.І. Активація ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів впливає на енергетичні процеси у гепатоцитах щурів. / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // X Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (8–11 квітня 2014 р., Львів): збірник тез. Львів, 2014. С. 249.
13. Купиняк Н.І. Роль окремих Ca^{2+}-транспортувальних систем у регуляції енергетичного стану мітохондрій / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали XII Міжнародної наукової конференції «Шевченківська весна». Секція «Біологічні науки» (26–28 березня 2014 р., Київ). Київ, 2014. С. 41.
14. Купиняк Н.І. Вплив різних концентрації Ca^{2+} на ефекти ріанодину у мітохондріях печінки щурів / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (7–9 жовтня 2014 р., Київ): збірник тез Київ, 2014. С. 92.
15. Купиняк Н.І. Вплив $ІФ_3$ на енергетичні процеси у пермеабілізованих гепатоцитах / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Міжнародна наукова конференція «Механізми функціонування фізіологічних систем» (15–17 жовтня 2014 р., Львів), приурочена до 70-ліття біологічного факультету і 230-ліття фізіології у Львівському університеті: збірник тез Львів, 2014. С. 54.
16. Купиняк Н.І. Залежність мітохондріального дихання гепатоцитів від функціональної активності Ca^{2+}-помп та ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали XIX-го з’їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка Фізіол. журн., 2014, Т. 60, № 3 (Додаток). С. 12.
17. Купиняк Н. Поглинання кисню мітохондріями гепатоцитів щурів за дії модуляторів Ca^{2+}-каналів / Купиняк Н., Мазур Г., Колтун О.І., Іккерт О., Манько В // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (20–23 квітня 2015 р., Львів): збірник тез. Львів, 2015. С. 470–471.
18. Купиняк Н.І. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій печінки щура за дії ріанодину / Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали XIX-го з’їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка (24–6 травня 2015 р.) Фізіол. журн., 2015, Т. 61, № 3. С. 122.
19. Купиняк Н.І. Активація мітохондріальних ріанодинчутливих Ca^{2+}-каналів ріанодином / Купиняк Н.І, Охай І.Ю., Іккерт О.В., Манько В.В. // VI з’їзд Українського біофізичного товариства (Луцьк-Світязь, 28–30 травня 2015): матеріали з’їзду. Луцьк-Світязь, 2015. С. 20.
20. Kupynyak N.I. Effect of ryanodine on membrane potential of rat liver mitochondria / Kupynyak N.I., Ikkert O.V., Shlykov S.G., Babich L.G., Manko V.V. // Conference for Young Scientists. “Today’s challenges in molecular and cell biology” (21–25 September 2015): Abstract book. Kyiv, 2015. P. 140.

АНОТАЦІЯ

Купиняк Н.І. Роль Ca^{2+}-транспортувальних систем у регуляції енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки. – Рукопис

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2018.

Досліджено участь Ca^{2+}-транспортувальних каналів плазматичної мембрани, ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій у регуляції енергетичних процесів у гепатоцитах щурів. Зокрема встановлено, що роль Ca^{2+}-помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму є незначною в механізмах регуляції енергетичних процесів у гепатоцитах. Суттєвіший вплив у регуляції дихання гепатоцитів здійснюють $ІФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали. Виявлено влив ріанодину на вміст Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, зміни мембранного потенціалу мітохондрій та їхнє дихання. Показано, що ріанодин (0,05–1 мкмоль/л) спричиняє зменшення акумуляції Ca^{2+} у матриксі мітохондрій, яке виявилося найсуттєвішим за окиснення піруват. Ці дані свідчать про наявність mRyRs у гепатоцитах щурів, які на відміну від RyRs у досліджуваному діапазоні концентрацій інгібуються ріанодином. Ефект інгібування mRyRs на дихання ізольованих мітохондрій залежить від концентрації Ca^{2+} у середовищі, субстрату окиснення та часу дії ріанодину. Для з'ясування, чи впливає функціональна активність RyRs на процеси окиснення у мітохондріях, досліджували вплив ріанодину (0,05, 0,1 і 1 мкмоль/л) на дихання ізольованих інтактних гепатоцитів. Виявилося, що ефекти ріанодину залежать як від концентрації ріанодину, так від часу його дії. Така залежність змін споживання кисню гепатоцитами від тривалості дії та концентрації ріанодину зумовлена різною спорідненістю до нього mRyRs та RyRs. Для перевірки гіпотези, що агоніст RyRs сурамін може бути агоністом і mRyRs, дослідили його вплив на мембранний потенціал мітохондрій. І дійсно, сурамін (1 мкмоль/л) активує mRyRs. Отже, різні Ca^{2+} транспортувальні системи клітин здійснюють різний вклад у регуляцію енергетичних процесів мітохондрій печінки. Визначальну роль у Ca^{2+}-залежній регуляції окиснення у мітохондріях печінки відіграють mRyRs.

Ключові слова: мітохондрії, гепатоцити, клітинне дихання, мембранний потенціал мітохондрій, RyRs, mRyRs, $ІФ_3$-чутливі Ca^{2+}-канали, Ca^{2+}-помпа.

АННОТАЦИЯ

Купиняк Н.И. Роль Ca^{2+}-транспортных систем в регуляции энергетических процессов в митохондриях клеток печени. – Рукопись

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2018.

Исследовано участие Ca^{2+}-транспортных каналов плазматической мембраны, эндоплазматического ретикулума и митохондрий в регуляции энергетических процессов в гепатоцитах крыс. В частности установлено, что роль Ca^{2+} -

помп плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума незначительна в механизмах регуляции энергетических процессов в гепатоцитах. Однако существенное влияние в регуляции дыхания гепатоцитов осуществляют $ИФ_3$-чувствительные Ca^{2+}-каналы. Выявлено влияние рианодина на содержание Ca^{2+} в матриксе митохондрий, изменения мембранного потенциала митохондрий и их дыхание. Показано, что рианодин (0,05–1 мкмоль/л) приводит к уменьшению аккумуляции Ca^{2+} в матриксе митохондрий, которое оказалось самым существенным при окислении пирувата. Эти данные свидетельствуют о наличии mRyRs в гепатоцитах крыс, которые в отличие от RyRs в исследуемом диапазоне концентраций ингибируются рианодином. Эффект ингибирования mRyRs на дыхание изолированных митохондрий зависит от концентрации Ca^{2+} в среде, субстрата окисления и времени действия рианодина. Для выяснения влияния функциональной активности RyRs на процессы окисления в митохондриях, исследовали эффект рианодина (0,05, 0,1 и 1 мкмоль/л) на дыхание изолированных интактных гепатоцитов. Оказалось, что эффекты рианодина зависят как от концентрации рианодина, так и от времени его действия. Такая зависимость изменений потребления кислорода гепатоцитами от продолжительности действия и концентрации рианодина обусловлена разным сродством к нему mRyRs и RyRs. Для проверки гипотезы, что агонист RyRs сурамин может быть агонистом и mRyRs, исследовали его влияние на мембранный потенциал митохондрий. И действительно, сурамин (1 мкмоль/л) активирует mRyRs. Итак, различные Ca^{2+}-транспортные системы клеток осуществляют различный вклад в регуляцию энергетических процессов митохондрий печени. Определяющую роль в Ca^{2+} зависимых регуляции окисления в митохондриях печени играют mRyRs.

Ключевые слова: митохондрии, гепатоциты, клеточное дыхание, мембранный потенциал митохондрий, RyRs, mRyRs, $ИФ_3$-чувствительные Ca^{2+} -каналы, Ca^{2+} -помпа.

ANNOTATION

Kupynyak N.I. The role of Ca^{2+}-transport systems in regulating energy processes in mitochondria of liver cells. – Manuscript

Thesis for PhD degree in Biology, specialty 03.00.13 – Human and animal physiology. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2018.

The study focuses on the involvement of Ca^{2+} channels of the plasma membrane, endoplasmic reticulum and mitochondria in regulating energy processes in rat hepatocytes. In particular, liver perfusion with 20 μM eosin Y, incubation of the liver homogenate with it or adding it directly into the polarographic chamber were found to have no effect on the oxygen consumption and oxidative phosphorylation. This suggests that in the conditions of the experiment, the role of PMCA and SERCA in the regulatory mechanisms of energy consumption in hepatocytes is insignificant. In contrast, the role of IP_3Rs in regulating oxygen consumption in hepatocytes is more significant, as adding IP_3 into the polarographic chamber resulted in an increased oxygen consumption rate for the permeabilized hepatocytes in comparison with oxidation of the substrates of Ca^{2+}-activated dehydrogenases (α-ketoglutarate and pyruvate). It was found that

ryanodine has effect on Ca^{2+} concentration in the mitochondria matrix, membrane potential of the mitochondria and oxygen consumption in them. 0.05–1 μM ryanodine was shown to cause reduction of Ca^{2+} accumulation in the mitochondria matrix, which appeared the most significant for pyruvate oxidation. This data is indicative of mRyRs presence in rat hepatocytes, which, in contrast to RyRs of the endoplasmic reticulum, are inhibited by ryanodine in the studied range. Due to this, the mitochondria membrane potential drops for oxidation of pyruvate or α-ketoglutarate, but not for succinate. The inhibiting effect of mRyRs on oxygen consumption of isolated mitochondria depends on Ca^{2+} concentration in the medium, substrate of oxidation and duration of exposure to ryanodine. For pyruvate at 0.1 μM Ca^{2+} in the medium, the rate of ADP-induced oxygen consumption by the mitochondria decreases considerably (and the more so, the longer the exposure is); on the contrary, for 1 μM Ca^{2+} it increases. For α-ketoglutarate oxidation, ADP-induced oxygen consumption by the mitochondria rises following the addition of ryanodine into the polarographic cell with Ca^{2+} in the concentration 0.1 μM. If succinate was the substrate of oxidation, adding ryanodine into the polarographic cell results in the reduced rate of ADP-induced oxygen consumption by the mitochondria for both Ca^{2+}concentrations, but only slightly. In order to establish if the functional activity of RyRs of the endoplasmic reticulum influences the oxidation processes in the mitochondria, we studied the effect of ryanodine (0.05, 0.1 and 1 μM) on oxygen consumption in isolated intact hepatocytes. It appears that ryanodine effects depend both on its concentration and on the duration of exposure to it. For instance, oxygen consumption in the intact hepatocytes decreased after their prior incubation or adding them to the media containing ryanodine in the concentrations 0.1 μM and 1 μM. In case of adding ryanodine into the polarographic chamber after the hepatocytes, the most significant drop was recorded for the ryanodine concentration 0.05 μM. At the same time, adding ryanodine into the polarographic cell in the concentration of 1 μM to the isolated hepatocytes did not result in statistically significant changes of their oxygen consumption rate. Such relationship between the oxygen consumption rate of the hepatocytes and duration of exposure to ryanodine and its concentration stems from the fact that mRyRs and RyRs have different affinity to it. The inhibiting effects of RyRs of the endoplasmic reticulum of the intact hepatocytes on the mitochondria oxygen consumption are less marked and have a limited time span, which is why only in case of a direct addition of ryanodine in the concentration of 1 μM into the polarographic cell they neutralize the mRyRs inhibiting effects. To verify the hypothesis that suramin, which is RyRs agonist, can be also mRyRs agonist, we studied its effect on the mitochondria membrane potential. Indeed, in the concentration of 1 μM, suramin activates mRyRs. As a result, for oxidation of substrates of Ca^{2+}-activated dehydrogenases (α-ketoglutarate and pyruvate) and 0.1 μM Ca^{2+} in the medium, the membrane potential of the hepatocytes mitochondria rises, while for oxidation of succinate it decreases. Therefore, different Ca^{2+} channels of the cells contribute differently to energy regulation in the liver mitochondria. A crucial role in Ca^{2+}-activated regulation of oxidation in the liver mitochondria is performed by mRyRs.

Key words: RyRs, mRyRs, ryanodine, cellular respiration, hepatocytes, suramin, $\Delta\psi$, Ca^{2+}, substrates for oxidation.

Підписано до друку 15.11.18
Формат 60×90/16. Папір офсетний.
Друк на різографі. Зам. №
Ум. друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.