

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КУПИНЯК НАДІЯ ІГОРІВНА**

УДК 612.062: 57.053.2: 57.042

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

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії  
(кандидата біологічних наук)

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Науковий керівник: **Манько Володимир Васильович** доктор біологічних наук,  
професор

Львів – 2018

## АНОТАЦІЯ

**Купиняк Н.І. Роль  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем у регуляції енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

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

Дисертація присвячена дослідженні участі  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних каналів плазматичної мембрани, ендоплазматичної ретикулуму та мітохондрій у регуляції енергетичних процесів у гепатоцитах щурів. Встановлено, що перфузія печінки еозином  $\text{Y}$  концентрації 20 мкмоль/л, інкубація гомогенату печінки з ним чи його додавання безпосередньо до полярографічної комірки не впливає на процеси дихання та окисного фосфорилування. Це дозволяє припустити, що за умов експерименту роль  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму є незначною в механізмах регуляції енергетичних процесів у гепатоцитах. На відміну від цього, роль  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у регуляції дихання гепатоцитів є суттєвішою, оскільки додавання до полярографічної комірки  $\text{I}\Phi_3$  спричиняло збільшення швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окислення субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ ( $\alpha$ -кетоглутарату та пірувату).

Виявлено вплив ріанодину на вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій, зміни мембранного потенціалу мітохондрій та їхнє дихання. Показано, що ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л спричиняє зменшення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій, яке виявилось найсуттєвішим за окиснення пірувату. Ці дані свідчать про наявність mRyRs у гепатоцитах щурів, які на відміну від RyRs ендоплазматичного ретикулуму у досліджуваному діапазоні концентрацій інгібуються ріанодином. Внаслідок цього мембранний потенціал мітохондрій зменшується за окиснення пірувату чи  $\alpha$ -кетоглутарату, але не сукцинату. Ефект інгібування mRyRs на дихання ізольованих мітохондрій залежить від

концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, субстрату окиснення та часу дії ріанодину: за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі та наявності пірувату швидкість АДФ-стимульованого дихання мітохондрій суттєво зменшується (тим сильніше, чи довше тривала дія), а за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  – навпаки, збільшується. За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату АДФ-стимульоване дихання мітохондрій збільшується після внесення ріанодину у полярографічну комірку з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 мкмоль/л. Коли ж субстратом окиснення був сукцинат, швидкість АДФ-стимульованого дихання мітохондрій внаслідок додавання ріанодину у полярографічну комірку зменшується за обох концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ , але незначно.

Для з'ясування, чи впливає функціональна активність RyRs ендоплазматичного ретикулуму на процеси окиснення у мітохондріях, досліджували вплив ріанодину (0,05, 0,1 і 1 мкмоль/л) на дихання ізольованих інтактних гепатоцитів. Виявилось, що ефекти ріанодину залежать як від концентрації ріанодину, так від часу його дії. Так, споживання кисню інтактними гепатоцитами знижувалось після їхньої попередньої інкубації чи внесення у середовище з ріанодином у концентраціях 0,1 і 1 мкмоль/л. Коли ж ріанодин вносили у полярографічну комірку після гепатоцитів, то найсуттєвіше зниження зареєстровано за його концентрації 0,05 мкмоль/л. А от додавання у полярографічну комірку до ізольованих гепатоцитів ріанодину у концентрації 1 мкмоль/л не спричиняло статистично достовірних змін швидкості їхнього дихання. Така залежність змін споживання кисню гепатоцитами від тривалості дії та концентрації ріанодину зумовлена різною спорідненістю до нього mRyRs та RyRs. Ефекти інгібування RyRs ендоплазматичного ретикулуму інтактних гепатоцитів на мітохондріальне дихання є менш виражені 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.

Для перевірки гіпотези, що агоніст RyRs сурамін може бути агоністом і mRyRs, дослідили його вплив на мембранний потенціал мітохондрій. І дійсно, у концентрації 1 мкмоль/л сурамін активує mRyRs. Внаслідок цього за окиснення

субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ (пірувату і  $\alpha$ -кетоглутарату) і 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі збільшується мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів, а за окиснення сукцинату – навпаки, зменшується.

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

**Ключові слова:** мітохондрії, гепатоцити, клітинне дихання, мембранний потенціал мітохондрій, мітохондріальні ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ендоплазматичного ретикулуму,  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа.

### Список публікацій здобувача

1. Куруньяк N.I. Mitochondrial ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels of rat liver / **Куруньяк N.I.**, Ikkert O.V., Shlykov S.G., Babich L.G., Manko V.V. // Cell Biochem Funct. 2017. Vol. 1. P. 42–49.
2. Куруньяк N.I. The relationship between the ionized Ca concentration and mitochondrial functions / Babich L.G., Shlykov S.G., Kushnarova-Vakal A.M., **Куруньяк N.I.**, Manko V.V., Fomin V.P., Kosterin S.O. // Ukr. Biochem. J., 2018, Vol. 90, N 3. P. 32–40
3. Купиняк Н.І. Енергетичні процеси у печінці щура за дії інгібітора транспортувальних  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз еозину Y / **Купиняк Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. // Вісник Львівського університету. Серія біологічна 2013. Вип. 61. С.180–188.
4. Купиняк Н.І. Роль ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -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.
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.

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.
7. Мацях Н.І. (Купиняк Н.І.) Дихання мітохондрій гепатоцитів за перфузії печінки блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -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. (Курунуак N.I.) The inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -помп еозин Y не впливає на енергетичні процеси у печінці щурів. / **Мацях Н.І.,** Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали II 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. // III 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{IФ}_3$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -помп та ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -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 / **Купуныак Н.І.**, 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.

## ANNOTATION

**Kupynyak N.I. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  -transport systems in regulating energy processes in mitochondria of liver cells. – Qualifying scientific work on the manuscript.**

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

Dissertation is dedicated to the research of the involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the plasma membrane, endoplasmic reticulum and mitochondria in regulating energy processes in rat hepatocytes. In particular, liver perfusion with 20  $\mu\text{M}$  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  $\text{IP}_3\text{Rs}$  in regulating oxygen consumption in hepatocytes is more significant, as adding  $\text{IP}_3$  into the polarographic chamber resulted in an increased oxygen consumption rate for the permeabilized hepatocytes in comparison with oxidation of the substrates of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated dehydrogenases ( $\alpha$ -ketoglutarate and pyruvate).

It was found that ryanodine has effect on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the mitochondria matrix, membrane potential of the mitochondria and oxygen consumption in them. 0.05–1  $\mu\text{M}$  ryanodine was shown to cause reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\alpha$ -ketoglutarate, but not for succinate. The inhibiting effect of mRyRs on oxygen consumption of isolated mitochondria depends on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the medium, substrate of oxidation and duration of exposure to ryanodine. For pyruvate at 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  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  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  it increases. For  $\alpha$ -ketoglutarate oxidation, ADP-induced oxygen consumption by the mitochondria rises following the addition of ryanodine into the polarographic cell with  $\text{Ca}^{2+}$  in the concentration 0.1  $\mu\text{M}$ . 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\mu\text{M}$ ) 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  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$ . In case of adding ryanodine into the polarographic chamber after the hepatocytes, the most significant drop was recorded for the ryanodine concentration 0.05  $\mu\text{M}$ . At the same time, adding ryanodine into the polarographic cell in the concentration of 1  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$ , suramin activates mRyRs. As a result, for oxidation of substrates of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated dehydrogenases ( $\alpha$ -ketoglutarate and pyruvate) and 0.1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  in the medium, the membrane potential of the hepatocytes mitochondria rises, while for oxidation of succinate it decreases.

Therefore, different  $\text{Ca}^{2+}$  channels of the cells contribute differently to energy regulation in the liver mitochondria. A crucial role in  $\text{Ca}^{2+}$ -activated regulation of oxidation in the liver mitochondria is performed by mRyRs.

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

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – аденозин 5'-дифосфат;

АТФ – аденозин 5'-трифосфат;

ЕГТА – етиленглікольтетраацетат;

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум;

МПМ – мембранний потенціал мітохондрій;

ЦТК – цикл трикарбонових кислот;

ІФ<sub>3</sub> – інозитол-1,4,5-трифосфат;

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>в</sub> – внутрішньоклітинна (цитозольна) концентрація іонів Ca<sup>2+</sup>;

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>з</sub> – зовнішньоклітинна концентрація іонів Ca<sup>2+</sup>;

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>м</sub> – внутрішньомітохондріальна концентрація іонів Ca<sup>2+</sup> (у матриксі мітохондрій);

RyRs – ріанодинчутливі Ca<sup>2+</sup>-канали ендоплазматичного ретикулуму;

mRyRs – ріанодинчутливі Ca<sup>2+</sup>-канали мітохондрій;

TMRM – тетраметилпродамін-метиловий ефір.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП.....</b>	<b>14</b>
<b>1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....</b>	<b>20</b>
1.1. Системи транспортування $\text{Ca}^{2+}$ у гепатоцитах .....	20
1.1.1. Рецепторкеровані кальцієві канали плазматичної мембрани.....	21
1.1.2. Депокеровані $\text{Ca}^{2+}$ -канали .....	22
1.1.3. $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник.....	23
1.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани .....	24
1.2. $\text{Ca}^{2+}$ - транспортувальні системи ендоплазматичного ретикулуму .....	25
1.2.1. $\text{I}\Phi_3$ -чутливі $\text{Ca}^{2+}$ -канали .....	25
1.2.2. Ріанодинчутливі $\text{Ca}^{2+}$ -канали. ....	26
1.2.3. $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ендоплазматичного ретикулуму .....	28
1.3. $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи мітохондрій.....	29
1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізація гепатоцитів.....	32
1.4.1. $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали у цитозолі.....	32
1.4.2. $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізація мітохондрій.....	33
1.4.3. Взаємозв'язок мітохондрій з ендоплазматичним ретикулумом.....	35
1.5. Дихання мітохондрій у печінці .....	37
1.5.1. Загальна характеристика енергетичних процесів гепатоцитів.....	37
1.5.2. Роль кальцію у процесах мітохондріального дихання .....	39
<b>2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>42</b>

2.1. Умови роботи з тваринами при проведенні фізіологічних досліджень.....	42
2.2. Виділення ізольованих мітохондрій печінки щурів.....	42
2.3. Методика ізолювання та пермеабілізації гепатоцитів .....	43
2.4. Полярографічна реєстрація швидкості споживання кисню мітохондріями .....	44
2.5. Метод проточної цитометрії.....	46
2.6. Метод потенціометрії .....	49
2.7. Оцінка вмісту $Ca^{2+}$ в мітохондріях методом флуоресцентної спектроскопії .....	51
2.8. Трансмісійна електронна мікроскопія .....	53
2.9. Метод визначення АТФ-азної активності суспензії мітохондрій .....	55
2.10. Визначення концентрації білка за Лоурі .....	57
2.11. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження .....	57
<b>3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ .....</b>	<b>59</b>
3.1. Роль $Ca^{2+}$ -помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулулу у регуляції енергетичного забезпечення гепатоцитів .....	59
3.2. Вплив $IF_3$ на енергетичні процеси у пермеабілізованих гепатоцитах .....	67
3.3. Ідентифікація mRyRs .....	71
3.3.1. Ефекти ріанодину на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій печінки .....	71
3.3.2. Вплив ріанодину на рівень $Ca^{2+}$ в ізольованих мітохондріях .....	76
3.4. Роль mRyRs у регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за різних субстратів та позамітохондріальної концентрації $Ca^{2+}$ .....	82

3.4.1. Дихання ізольованих мітохондрій за дії ріанодину з різною тривалістю преінкубації.....	82
3.4.2. Дослідження процесів мітохондріального дихання ізольованих гепатоцитів за дії ріанодину за умов різної концентрації $Ca^{2+}$ у середовищі .....	84
3.5. Енергетичні процеси у печінці щура за дії ріанодину .....	96
3.5.1. Споживання кисню гомогенатом печінки після преінкубації з ріанодином у різних концентраціях .....	96
3.5.2. Вплив ріанодину на споживання кисню ізольованими гепатоцитами	99
3.6. Зміни мембранного потенціалу ізольованих мітохондрій за дії сураміну .....	108
<b>4. УЗАГАЛЬНЕННЯ .....</b>	<b>116</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>121</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>123</b>

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Гепатоцити мають широкий спектр функцій, включаючи певні етапи проміжного метаболізму, синтез і секрецію білків, транспорт і секрецію жовчних кислот [35, 86, 165, 234].  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізація відіграє важливу роль у регулюванні функціонування гепатоцитів, зокрема глікогенолізу та мітохондріального окислення [90, 158]. Відомо, що концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі гепатоцитів визначається  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальними системами плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму [102, 122, 216]. Але які  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи залучені у регулювання енергетичних процесів у гепатоцитах і за яких умов, ще не до кінця досліджено.

У цитозолі гепатоцитів збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  переважно відбувається внаслідок гормональної стимуляції та передбачає активацію системи  $\text{I}\Phi_3$ , що спричиняє вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума  $\text{I}\Phi_3$ -чутливими  $\text{Ca}^{2+}$  каналами [159, 219]. Однак дані про вплив активації  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів на клітинне дихання за окиснення різних субстратів у гепатоцитах відсутні. Окрім  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, на характер  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів впливає і активація ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ендоплазматичного ретикулуму (RyRs), які не залучені у процес швидкого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму, але можуть посилювати  $\text{I}\Phi_3$ -індуковані  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали [184]. Крім того, на кардіоміоцитах та нейронах показано, що ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали мітохондрій (mRyRs) мають вищу провідність  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер мітохондрій, і, ймовірно, саме mRyRs відповідають за надходження  $\text{Ca}^{2+}$  з мікродоменів у ділянці мітохондрійасоційованих мембран на стику ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій (МММ) [110, 128]. Це забезпечує акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій у відповідь на зростання його цитозольної концентрації і стимулює споживання кисню [51]. 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  $\text{Ca}^{2+}$  впливає на мітохондріальне дихання та мембранний потенціал мітохондрій у гепатоцитах. Дослідження ролі різних систем транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  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 « $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем у регуляції енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки.

Для досягнення поставленої мети визначено такі завдання:

1. З'ясувати роль  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ .

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:**  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  вимірювали флуоресцентним методом за допомогою спектрофлуориметра. Концентрацію білка визначали методом за Лоурі. Вірогідність різниці між двома вибірками визначали за t-тестом Стьюдента.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше ідентифіковані мітохондріальні ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ендоплазматичного ретикулуму мітохондріальні ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали інгібуються ріанодином у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л. Це інгібування супроводжується зменшенням акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій, яке виявилось найсуттєвішим за



окиснення пірувату. Внаслідок цього мембранний потенціал мітохондрій зменшується за  $[Ca^{2+}]$  у середовищі 0,1 мкмоль/л та окиснення пірувату чи  $\alpha$ -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 пірувату швидкість АДФ-стимульованого дихання мітохондрій зменшується (тим сильніше, чи триваліша дія), а за 1 мкмоль/л – навпаки, збільшується. За окиснення  $\alpha$ -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 (пірувату і  $\alpha$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних 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  $\text{Ca}^{2+}$  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 та списку використаних джерел та додатку. Робота містить 31 рисунок та 3 таблиці. Бібліографічний список налічує 241 джерело літератури.

## 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Системи транспортування $\text{Ca}^{2+}$ у гепатоцитах

Кальцій відіграє важливу роль в клітинній сигналізації гепатоцитів [35, 86, 102]. Зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  регулює багато функцій печінки зокрема, скорочення жовчних проток, секрецію жовчі [234, 235], синтез глюкози та енергетичний обмін, які регулюються зміною  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  [113, 201], контроль клітинного циклу який включає модуляцію транскрипції [117, 187] та анти- і проапоптичних білків [40, 151, 166] для регуляції проліферації та смерті клітин регулюється змінами  $[\text{Ca}^{2+}]$  у ядрі [203].

Щоб контролювати функції гепатоцитів концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у клітині жорстко регулюється та підтримується на рівні 100–200 нмоль/л вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі та 0,5 ммоль/л в ендоплазматичному ретикулумі – це набагато нижчі концентрації порівняно з позаклітинною – 1-2 ммоль/л [166]. Щоб запобігти утворенню небезпечної для клітин високої  $[\text{Ca}^{2+}]_v$ , регуляція кальцієвого гомеостазу здійснюється завдяки  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальним системам та  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналам, які їх формують.  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали строго організовані за часом ( $\text{Ca}^{2+}$ -транзієнт або  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляція), простором (локальні або глобальні  $\text{Ca}^{2+}$ -хвилі) та локалізацією джерела  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів (наприклад,  $\text{Ca}^{2+}$ -спарки зумовлені активацією ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів чи  $\text{Ca}^{2+}$ -паффи, які спричинені активацією  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів) [22, 35, 86].

Активація багатьох мембранних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем зумовлює збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  внаслідок мобілізації  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо через ріанодинчутливі та  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали на надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину за градієнтом концентрації. Іони  $\text{Ca}^{2+}$  проникають у гепатоцити за участю депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів (активуються при вичерпанні внутрішньоклітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$ ) та рецепторкерованих каналів (відкриваються у відповідь на дію

специфічних лігандів) [131]. Вихід катіонів з клітини зумовлений роботою  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани [152].

### 1.1.1. Рецепторкеровані кальцієві канали плазматичної мембрани

Рецепторкеровані канали це канали які активуються внаслідок взаємодії з позаклітинними лігандами. Виділяють три типи рецепторкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів.

1) Рецепторкеровані канали, в яких рецептор або сам виконує функцію каналу або безпосередньо взаємодіє з каналною структурою. Прикладом такого каналу є нікотинний холінорецептор, що являє собою неселективний катіонний канал. До таких рецепторкерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів відносять також канали, що активуються глутаміновою кислотою (NMDA-рецептор) і аденіловими нуклеотидами (пуринові рецептори) [97].

2)  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, що активуються вторинними посередниками. У цю групу входять  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, спряження яких з рецепторами відбувається за участю сигнальних молекул – вторинних посередників. У ролі активаторів  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних каналів плазматичної мембрани можуть виступати  $\text{IP}_3$ ,  $\text{IP}_4$ , іони  $\text{Ca}^{2+}$  та циклічні нуклеотиди [138].

3)  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, що регулюються вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо [165].

Показано, що у гепатоцитах такі гормони, як вазопресин, ангіотензин II і  $\alpha_1$ -адренергічні агоністи індукують тимчасове підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  через активацію рецепторкерованих каналів плазматичної мембрани [138]. Механізм підвищення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  може відбуватися шляхом синтезу інозитол 1,4,5-трисфосфату та активацію G-білка, або інозитолом-1,4,5-трисфосфат-нечутливим механізмом [138].

У клітинах печінки виявлені пуринові рецептори родини P2X та P2Y [64, 81]. Обидва типи P2X та P2Y рецепторів спричиняють зростання рівня внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  за рахунок швидкого вивільнення з депо та

деполяризацію плазматичної мембрани [92] та активуються АТФ: метаботропні P2Y рецептори, спряжені з GTP-зв'язуючими білками (G-білки), та іонотропні P2X – ліганд-керовані катіонні канали [62, 63].

### 1.1.2. Депокеровані $\text{Ca}^{2+}$ -канали

Одним з основних механізмів входу  $\text{Ca}^{2+}$  у гепатоцитах є депокерований вхід  $\text{Ca}^{2+}$ . Депокеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали плазматичної мембрани характеризуються високим ступенем селективності для  $\text{Ca}^{2+}$  і низькою провідністю та блокуються дво- та тривалентними катіонами [183]. Депокеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали активуються у відповідь на вичерпання внутрішньоклітинного депо  $\text{Ca}^{2+}$  (ендоплазматичного ретикулуму), це призводить до надходження позаклітинного кальцію для повторного депонування  $\text{Ca}^{2+}$ . Надходження  $\text{Ca}^{2+}$  через депокеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали називається «ємнісним» входом  $\text{Ca}^{2+}$  який опосередковується двома родинами білків: Orai і STIM [183, 188]. Orai – трансмембранний білок у плазматичній мембрані є складовою частиною депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів, забезпечує надходження  $\text{Ca}^{2+}$  з зовнішньоклітинного середовища (Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) [94, 229]. STIM – молекули стромальної взаємодії (STIM 1 і 2) в ендоплазматичному ретикулумі, які зв'язуються з білками Orai, що приводить до відкриття каналів CRAC [154, 240]. STIM – це білки, які активуються після зменшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в ендоплазматичному ретикулумі у відповідь на стимуляцію рецепторів плазматичної мембрани, які індукують синтез інозиту 1,4,5-трисфосфату та відкриття  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів в ендоплазматичному ретикулумі [93].

У гепатоцитах, як і в інших клітинах зростання  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  через депокеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали відбувається за участі  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів та забезпечують адекватну концентрацію депонованого  $\text{Ca}^{2+}$  в ЕПР [39]. Методом петч клемп та експериментами з використання флуоресцентного барвника  $\text{Ca}^{2+}$  фура-2

показано наявність лише одного типу депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у клітинах печінки щурів, які характеризуються високою селективністю до  $\text{Ca}^{2+}$  [39].

Депокеровані  $\text{Ca}^{2+}$ -канали відіграють важливу роль у підтриманні  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостазу у клітинах печінки.

### 1.1.3. $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник

Встановлено, що вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з різних клітин в зовнішнє середовище залежить від присутності у внутрішньоклітинному середовищі іонів натрію. На основі цього було висунуто припущення, що в плазматичній мембрані існує система,  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обміну яка забезпечує спряжений різнонаправлений трансмембранний транспорт іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Na}^+$  та підтримання відносно сталої  $[\text{Ca}^{2+}]_v$ . Роль  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника полягає в перенесенні  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми: спочатку  $\text{Na}^+$  зв'язується з обмінником на зовнішньому боці, транспортується та звільняється і тоді  $\text{Ca}^{2+}$  зв'язується і транспортується в протилежному напрямку [137, 139].

$\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник переносить три іона  $\text{Na}^+$  на один  $\text{Ca}^{2+}$ . Така стехіометрія  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника вказує на його електрогенне походження.  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник має високу  $V_{\max}$  і низьку спорідненість для  $\text{Ca}^{2+}$  це свідчить про те, що він ефективніше працює при високій внутрішньоклітинній концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . При зменшенні  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  у клітині до 1 мкмоль/л виведення цього катіона забезпечує  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани, яка характеризується меншою активністю, але є високо афінною [66].

Bernstein et al. (1985) дослідили наявність  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у плазматичній мембрані гепатоцитів щура. У гепатоцитах, як і в інших типах клітин [66]  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінник забезпечує вивільнення внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини в обмін на надходження  $\text{Na}^+$  у клітину [45]. Іншими авторами Nakamura et al. (1998) за допомогою вестерн-блот аналізу виявлено експресію білків  $\text{Na}^+$ – $\text{Ca}^{2+}$ -обмінника у печінкових клітинах Іто *in vitro* та *in vivo* після

індукції фізброзу. Автори вважають, зростання експресії мРНК  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -обмінника є корисним діагностичним маркером фіброзу або цирозу печінки [173].

#### 1.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани

Виведення  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми є функціональною необхідністю для підтримання низького рівня  $\text{Ca}^{2+}$  в клітині в стані спокою і здійснюється  $\text{Ca}^{2+}$ -помпами плазматичної мембрани (PMCA) і ендоплазматичного ретикулуму (SERCA).

$\text{Ca}^{2+}$ -помпа при гідролізі АТФ виводить іони  $\text{Ca}^{2+}$  з клітини в обмін на протони в найбільш вірогідній стехіометрії 1:2, тобто за електронейтральним механізмом. Незважаючи на те, що  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани широко експресується у різних типах клітин, для неї характерна тканинна специфічність ізоформ.

Встановлено, що існують специфічні властивості  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани клітин печінки, які впливають на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізацію зокрема, гормональну регуляцію. Методом полімеразної ланцюгової реакції у печінці людини ідентифіковано PMCA1, PMCA2 та PMCA4, але не з PMCA3, а у печінці щурів, навпаки, виявлено лише PMCA1 та PMCA2 [125].

Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани стимулюється кальмодуліном, який збільшує спорідненість максимальну швидкість транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  та кофакторами  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Mg}^{2+}$ , але має інгібуючу чутливість до ванадату та лантану [75]. Окрім кальмодуліну, фосфоліпіди здатні підвищувати спорідненість  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани до  $\text{Ca}^{2+}$  [175].  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа плазматичної мембрани відіграє важливу роль у підтриманні внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостазу різних секреторних клітин [22] в тому числі і у гепатоцитах [75, 175].



## 1.2. $\text{Ca}^{2+}$ - транспортувальні системи ендоплазматичного ретикулуму

Багато функцій печінки залежить від рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  у гепатоцитах у яких основним депо  $\text{Ca}^{2+}$  є ендоплазматичний ретикулум.

Концентрація вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі є нижчою (100-200 нмоль/л) порівняно з позаклітинною (1-2 ммоль/л) і внутрішньоклітинною (0,5 ммоль/л) концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [166]. Цитозоль, з дуже низькою концентрацією вільного  $\text{Ca}^{2+}$ , знаходиться на межі двох середовищ з високим вмістом  $\text{Ca}^{2+}$ . Це призводить до того, що у цитозоль являє собою місце основних, швидких змін концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок надходження  $\text{Ca}^{2+}$  із позаклітинного середовища або вивільнення з ендоплазматичного ретикулуму [48]. До  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем ендоплазматичного ретикулуму належать інозитол-1,4,5-трифосфат або  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали які забезпечують вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа яка депонує  $\text{Ca}^{2+}$  в ендоплазматичний ретикулум.

### 1.2.1. $\text{I}\Phi_3$ -чутливі $\text{Ca}^{2+}$ -канали

Інозитол-1,4,5-трифосфат, або  $\text{I}\Phi_3$ , є єдиним серед ізомерів інозитолфосфатів, здатним вивільняти  $\text{Ca}^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо, взаємодіючи з рецептором у мембрані ендоплазматичного ретикулуму. Білок складається з восьми трансмембранних доменів, які формують провідний канал для катіонів. Решта частини молекули розташована на цитоплазматичній стороні, де є місця зв'язування  $\text{I}\Phi_3$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , АТФ, а також два залишки серину, які фосфорилуються протеїнкіназою G і протеїнкіназою A. На сьогодні ідентифіковано три ізоформи  $\text{I}\Phi_3$  – чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, кожен з яких кодує інший ген [226] та кожен з яких здатен формувати  $\text{Ca}^{2+}$ -канал, що регулюється  $\text{I}\Phi_3$  та цитозольним кальцієм [219]. Їх відмінність полягає у ступені чутливості до  $\text{I}\Phi_3$  та  $\text{Ca}^{2+}$ , а також у здатності мобілізувати різну кількість  $\text{Ca}^{2+}$ . Тип II  $\text{I}\Phi_3$  – чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів зосереджено близько апікального полюсу в гепатоцитах,

в той час як тип I  $I\Phi_3$  – чутливих  $Ca^{2+}$ -каналів були знайдені в інших місцях. У гепатоцитах ідентифіковано три типи  $I\Phi_3$  – чутливих  $Ca^{2+}$ -каналів. Тип 1 становить приблизно 20%, тип 2 - 80%, та можливо, є невелика кількість (<1%) 3-го типу [119, 160, 238,].

$I\Phi_3$  в клітині утворюється в результаті рецептор-опосередкованої активації певних ізоформ фосфоліпази. Зовнішній сигнал, після взаємодії з рецептором, через G-білок активує посилюючий фермент фосфоліпазу C. Цей фермент розщеплює мембранний фосфоліпід фосфатидилінозитол-4,5-дифосфат на дві сполуки, два внутрішньоклітинних месенджери: водорозчинний фосфатидилінозитол-1,4,5-трифосфат і ліпідорозчинний диацилгліцерол [46].

Клітинні рецептори, які відповідають за мобілізацію  $Ca^{2+}$  взаємодіють з особливим G-білком ( $G_q$ ), що активує фосфоліпазу C і як наслідок утворення  $I\Phi_3$  і диацилгліцеролу.  $G_q$  діє таким самим чином як і G-білки, які регулюють активність аденілатциклази [174]. Гідрофільний  $I\Phi_3$  дифундує в цитоплазму і викликає вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо (ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії).

Після зв'язування  $I\Phi_3$  відбувається значна конформаційна перебудова рецептора, що зумовлює активацію каналу. Канали активуються при додаванні  $I\Phi_3$  (2 мкмоль/л) з цитоплазматичної сторони і мають чотири стани провідності (20, 40, 60, 80 pS) [236].  $I\Phi_3$  канали активуються додатково аденіловими нуклеотидами (АТФ, АМФ). Активність каналу залежить від концентрації вільного цитоплазматичного  $Ca^{2+}$  [236]. Відомо, що  $I\Phi_3$ -чутливі  $Ca^{2+}$ -канали модулюють  $Ca^{2+}$  сигнали у гепатоцитах [160, 219] регулюють синтез глюкози у печінці при голодуванні та цукровому діабеті [233].

### **1.2.2. Ріанодинчутливі $Ca^{2+}$ -канали.**

Ріанодинчутливі  $Ca^{2+}$ -канали (RyRs) є каналами вивільнення  $Ca^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму, які контролюють скорочення скелетних та

серцевих м'язів [228]. Проте показано, що RyRs відіграють важливу роль забезпеченні  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостазу у печінці [184].

Методом полімеразної ланцюгової реакції на ізольованих гепатоцитах показано експресію RyRs ріанодинного рецептора ізоформи 1 [184], загалом є ізоформи (RyR1, RyR2, RyR3). RyR1 експресується у скелетних м'язах [218, 241], RyR2 знаходиться в основному в ендоплазматичному ретикулумі кардіоміоцитів [114, 172] та RyR3 спочатку був ідентифікований в клітинах мозку [114], хоча кожна ізоформа зустрічається у багатьох різних типах клітин [130, 145].

Відмінною рисою RyRs є їхня модифікація рослинним алкалоїдом ріанодинном, звідси походить їхня назва. RyRs складаються з чотирьох поліпептидів, кожен з  $\sim 5000$  амінокислот та чотирьох зв'язуючих білків (FKBP) по 110 амінокислот в кожному. RyRs - це канали з високою провідністю для моновалентних та двовалентних іонів регульовані численними факторами, що включають  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ, кальмодулін (CaM), протеїнкінази та фосфатази, а також окисно-активні речовини [228].

Основним фізіологічним активатором ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів є  $\text{Ca}^{2+}$ . У структурі ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів є  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливі сенсори, які зв'язують  $\text{Ca}^{2+}$  та полегшують відкриття каналу, що приводить до вивільнення депонованого у ендоплазматичному ретикулумі  $\text{Ca}^{2+}$ . За цих умов ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали діють як підсилювачі сигналу і цей процес відомий як  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  [87, 91]. Зростання цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  може спричиняти і закриття ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів. Це свідчить про існування кількох сайтів зв'язування з різною спорідненістю до  $\text{Ca}^{2+}$ . Було показано, що ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали за низьких концентрацій цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  (1–100 мкмоль/л) активуються, а за високих ( $> 500$  мкмоль/л) – інгібуються [59]. Алкалоїд ріанодин (5-50 нмоль/л) збільшує вірогідність відкритого стану каналу, а в мікромольних концентраціях блокує цей канал [59, 60].

Відомо, що ці  $\text{Ca}^{2+}$ -канали в мембрані ендоплазматичного ретикулуму

активуються цитоплазматичним АТФ, кофеїном, ІФ<sub>3</sub> та сураміном, інгібуються Mg<sup>2+</sup>, рутенієвим червоним і La<sup>3+</sup> [88, 95, 164]. Pierebon et al. [184] дослідили, що ріанодин сам по собі не спричиняє осциляцій Ca<sup>2+</sup> в ізольованих гепатоцитах чи у культурі клітин, однак значно збільшує частоту осциляцій цитозольної концентрації Ca<sup>2+</sup>, спричинених агоністом α<sub>1</sub>-адренергійного рецептора. Експерименти на інтактних гепатоцитах показали лише повільне вивільнення Ca<sup>2+</sup> за дії ріанодину у концентраціях 1–5 мкмоль/л, а за концентрацій 1–100 мкмоль/л зміни базального рівня Ca<sup>2+</sup> були відсутні. RyRs гепатоцитів відіграють важливу роль в посиленні ІФ<sub>3</sub>-індукованого вивільнення Ca<sup>2+</sup> з ЕПР.

### 1.2.3. Ca<sup>2+</sup>-помпа ендоплазматичного ретикулуму

Ca<sup>2+</sup>-помпа ендоплазматичного ретикулуму (SERCA) складається з 10 трансмембранних сегментів, порівняно з Ca<sup>2+</sup>-помпою плазматичної мембрани - коротшого N<sup>+</sup>-кінця та двох основних цитозольних фрагментів, один з яких містить каталітичний сайт. За структурою активного центру та високою спорідненістю до Ca<sup>2+</sup> є дуже подібною до Ca<sup>2+</sup>-помпи плазматичної мембрани але має деякі відмінності. Характерною особливістю Ca<sup>2+</sup>-помпи ендоплазматичного ретикулуму є відсутність довгого С-кінцевого хвоста у Ca<sup>2+</sup>-помпами ендоплазматичного ретикулуму, що містить сайт зв'язування кальмодуліну. Ще однією характерністю Ca<sup>2+</sup>-помпи ендоплазматичного ретикулуму є те, що вона транспортує два катіони Ca<sup>2+</sup> при розщепленні однієї молекули АТФ специфічно інгібується тапсигаргіном [222] і циклопіазоною кислотою [217]. Ca<sup>2+</sup>-помпу ендоплазматичного ретикулуму кодують 3 гени – SERCA1, SERCA2, SERCA3, але кількість ізоформ за рахунок альтернативного сплайсингу є більшою [107]. У клітинах печінки переважає Ca<sup>2+</sup>-помпа ендоплазматичного ретикулуму ізоформи SERCA2 [61]. Всі три ізоформи містять білкові послідовності, необхідні для зв'язування з АТФ та ацилфосфатом

[129].  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ендоплазматичного ретикулуму забезпечує акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у ньому та запобігає збільшенню цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 1.3. $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи мітохондрій

Мітохондрії – клітинні органели, основна функція яких пов'язана з синтезом АТФ у клітині, проте вони також відіграють важливу роль у  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації. Зокрема, виконують функції внутрішньоклітинного депо  $\text{Ca}^{2+}$  і здатні впливати на характер та поширення  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу у цитозолі [113]. У мітохондріях печінки ідентифіковано і досить детально охарактеризовано  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, який транспортує катіони  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії за рахунок електрохімічного градієнта  $\text{H}^+$  [10],  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ - і  $\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обмінники [24], (але у мітохондріях гепатоцитів переважає –  $\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обмінник), циклоспоринчутливу мітохондріальну пору, активація якої відбувається внаслідок перевантаження матриксу катіонами  $\text{Ca}^{2+}$  [35, 109].

Мітохондріальний  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер за своєю природою є глікопротеїном, перенесення  $\text{Ca}^{2+}$  всередину мітохондрій блокується рутенієвому червоним. Вхід кальцію в матрикс через  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер супроводжується виходом  $\text{H}^+$  в цитоплазму у певних стехіометричних співвідношеннях 1  $\text{Ca}^{2+}$ : 1  $\text{H}^+$  [10].  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер є основним шляхом споживання  $\text{Ca}^{2+}$ -мітохондріями, який алостерично активується  $\text{Ca}^{2+}$ .

$\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ - і  $\text{H}^+-\text{Ca}^{2+}$ -обмінники мітохондрій забезпечують вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з мітохондрій. З'ясовано, що ефективність інгібування мітохондріальних обмінників іонами одно- і двовалентних металів залежить від спорідненості їх до кисневмісних груп лігандів (EDTA, глутамат), величини потенціалу іонізації та електронегативності атомів цих металів, а також від ентальпії їхньої гідратації та кристалографічного радіуса іонів цих металів [109]. Модифікація катіонами металів кооперативних взаємодій з іон-зв'язувальними центрами

мітохондріальних обмінників є одним із механізмів інгібування ними цих іон-транспортувальних систем. Транслокація  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$  і  $\text{Na}^+$  мітохондріальними обмінниками та інгібування її катіонами металів пов'язані із взаємодією їх з кисневмісними групами іон-транспортувальних центрів цих  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем і супроводжуються процесами дегідратації-гідратації іонів цих металів [109].

Важливу роль у кальцієвому обміні виконує циклоспоринчутлива мітохондріальна пора – неселективний канал, відкриття якого активується іонами  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріального матриксу [115]. Відомо, що основними структурними одиницями мітохондріальної пори є білки зовнішньої та внутрішньої мітохондріальних мембран.  $\text{Ca}^{2+}$  і сам по собі виконує регуляторну роль у функціонуванні пори - активує її відкриття з боку матриксу, і, навпаки, блокує її із зовнішнього боку мітохондріальної мембрани [115]. Важливу роль у регуляції циклоспоринчутливої мітохондріальної пори виконують ензим гексокіназа і білки родини *Bcl* [168]. У фізіологічних умовах в безпосередній регуляції можуть брати участь і деякі ізоформи протеїнкінази *C*. [34].

Ідентифіковано *mRyRs* у кардіоміоцитах [52], у нейронах [128]. З'ясувалося, що вони за своїми біохімічними, фармакологічними та функціональними властивостями подібні до типу 1 *RyRs* ендоплазматичного ретикулуму і відіграють важливу роль в акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях [52, 128]. Аналогічно *RyRs* ендоплазматичного ретикулуму, для активації *mRyRs* характерна куполоподібна залежність від концентрації катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі. Їхня максимальна активність спостерігається за концентрації 10 мкмоль/л, а повне інгібування – за 0,1–1 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  [33]. Ріанодин (10 мкмоль/л) індукує напівпровідний стан *mRyR* кардіоміоцитів, який триває лише кілька секунд [33].

Експресовані у внутрішній мембрані мітохондрій кардіоміоцитів і нейронів *mRyRs* забезпечують акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі у відповідь на зростання його цитозольної концентрації [52, 111]. У серці така акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями стимулює споживання кисню [51]. У цьому дослідженні

показано, що позамітохондріальні катіони  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації 10 мкмоль/л (але не у вищих) стимулювали споживання кисню і що цей ефект інгібувався ріанодином [51].

Акумулювання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями має важливе значення для підтримання  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостазу гепатоцитів. Усі процеси транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії або з них тісно пов'язані з їхнім енергетичним станом [43], який обумовлений такими процесами, як дихання мітохондрій, що забезпечується киснем і джерелами вуглецю, а також механізмами підтримання мембранного потенціалу та градієнта рН за рахунок активності електронно-транспортного ланцюга. На відміну від інших внутрішньоклітинних структур, що використовують АТФ для акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$ , мітохондрії транспортують цей катіон за рахунок трансмембранного електричного потенціалу (близько -180 мВ), який генерується системою переносу електронів і протонів в ході окислення субстратів дихання: глутамату, сукцинату, пірувату, жирних кислот і т. д. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$ , перенесеного в мітохондріальний матрикс, підтримується в ньому на низькому рівні за рахунок зв'язування цього катіона з білками і неорганічним фосфатом.

Мітохондрії починають акумулювати  $\text{Ca}^{2+}$  за його концентрації у цитозолі 100 нмоль/л [70], незважаючи на те, що афінність уніпортера становить 10 мкмоль/л. Підвищення рівня внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  активність уніпортеру експоненціально збільшується, і може становити 1,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  /мг білка за 1 хв із  $K_d < 10$  ммоль/л [43].

При зміні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  від 1 до 5 мкмоль/л швидкість акумулювання цього катіона зростає в десятки разів. Тому припускають, що система транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондрій «включається» тоді, коли відбувається перевантаження клітин кальцієм. У цьому випадку всередині мітохондрій збільшується концентрація іонів  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок чого інгібується АТФ/АДФ-обмін, зменшується концентрація аденілових нуклеотидів, виникає конкуренція  $\text{Ca}^{2+}$  з  $\text{Mg}^{2+}$  за АТФ. У матриксі мітохондрій відбувається випадання кристалів фосфату кальцію, і в подальшому ці органели руйнуються. Таким чином, замість виконання своєї

основної функції синтезу АТФ мітохондрії рятують клітину від загибелі.

Показано, що мітохондрії печінки в суспензії знижують концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,5 мкмоль/л, а внесення у середовище печінкових мікросом призводить до подальшого зменшення рівня  $\text{Ca}^{2+}$  до 0,2 мкмоль/л. Акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$ , препаратом ендоплазматичного ретикулуму супроводжувалась зниженням рівня мітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  на 7 нмоль/мг білка. Таким чином, в залежності від рівня внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  кожна з  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем (мітохондрій або ендоплазматичного ретикулуму) в тій чи іншій мірі бере участь у регуляції концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  [35, 86].

#### **1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізація гепатоцитів**

Гепатоцити виконують широкий спектр функцій, включаючи проміжний метаболізм, синтез і секрецію білків, транспорт і секрецію жовчних кислот [35, 86, 166, 234]. Зміна концентрації кальцію у цитозолі, ендоплазматичному ретикулумі, мітохондріях та інших внутрішньоклітинних органелах клітин здійснює необхідний вклад у регулювання цих функцій. Зокрема, кальцієві сигнали відіграють важливу роль у регуляції метаболізму гепатоцитів, включаючи мітохондріальний метаболізм і розпад глікогену [90].

##### **1.4.1. $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали у цитозолі**

Регуляція концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі здійснюється за участю  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму. Збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у гепатоцитах переважно відбувається внаслідок гормональної стимуляції вазопресином, ангіотензином II і агоністами  $\alpha$ -адренорецепторів, та передбачає активацію системи  $\text{I}\Phi_3$ , що призводить до вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулума, шляхом активації  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів.

Окрім  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів на характер  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів впливає і



активація RyRs, які не забезпечують значного вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕПР, можливо, через низьку експресію каналу, проте RyRs може привести до незначних  $\text{Ca}^{2+}$  осциляцій біля мембрани ЕПР, які можуть посилювати  $\text{I}\Phi_3$ -індуковані  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали [184]. На ізольованих гепатоцитах та культурі цих клітин показано, що RyRs та  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$  канали збільшують вірогідність відривання один одного. RyRs можуть створювати  $\text{Ca}^{2+}$ -мікродомени поблизу поверхні мембрани ЕПР біля  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів для подальшого і масованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  [184].

Локальні підвищення цитозольного вільного кальцію [ $\text{Ca}^{2+}$ ] ( $\text{Ca}^{2+}$ -спайки) чи  $\text{Ca}^{2+}$ -паффи це найпоширеніший механізм  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації у якому задіяні позаклітинні стимули, вони здійснюють фізіологічний контроль клітини як в збудливих так і в не збудливих тканинах [49, 50, 223].

#### **1.4.2. $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізація мітохондрій**

Відомо, що зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях гепатоцитів відіграє важливу роль у регулюванні метаболізму, синтезу глюкози, синтезу АТФ, жирних кислот [35, 46, 78, 110].

При диханні мітохондрій відбувається електрогенний викид в цитоплазму іонів водню, генерація градієнта рН і електричного потенціалу на внутрішній мітохондріальній мембрані. Утворюється так званий електрохімічний потенціал іонів водню, що є рушійною силою транспорту катіонів і слабких кислот всередину органел. На кожні два електрони перенесені по (через) дихальному ланцюгу всередину мітохондрій транспортується два іона кальцію.

Було встановлено тісну взаємодію між змінами внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та мітохондріальною функціональною активністю [225]. Зростання рівня внутрішньоклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  приводить до збільшення споживання кисню та підвищення концентрації НАДН [225]. Ключовою ланкою між  $\text{Ca}^{2+}$  та основним мітохондріальним метаболізмом (синтезом АТФ) є НАДН, який опосередковує забезпечення воднем ( $\text{H}^+$ ) дихальний ланцюг мітохондрій і,

таким чином, продукцію АТФ. Детальні дослідження цих процесів показали, що  $\text{Ca}^{2+}$  активує субодиниці  $F_1$ ,  $F_0$  АТФ-синтази [221]. На сьогоднішній день ще не існує доказів того, що  $\text{Ca}^{2+}$  безпосередньо впливає на  $F_1$ ,  $F_0$  АТФ-синтази, тому потрібні подальші дослідження щоб встановити механізм цього зв'язку. Синтез АТФ зростає вже при незначних підвищеннях мітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . АТФ-синтаза перетворює протонний потенціал на енергію хімічних зв'язків АТФ. Спряжена робота АТФ-синтази і електронтранспортного ланцюга, що забезпечує дихання клітини, називається окисним фосфорилуванням.

Ферменти дихального ланцюга, які окиснюють відновлені коферменти, локалізовані у внутрішній мембрані мітохондрій. Як донори електронів для відновлення кисню та води використовуються НАДН і ФАДН<sub>2</sub>. Ця реакція є багатоступінчаста і пов'язана з перенесенням протонів ( $\text{H}^+$ ) через мембрану з матриксу у між мембранний простір. Внаслідок цього на внутрішній мембрані мітохондрій створюється електрохімічний градієнт  $\text{H}^+$  який використовується для синтезу АТФ з АДФ і неорганічного фосфату в процесі каталізу АТФ-синтазою. Електрохімічний градієнт є також рушійною силою ряду транспортувальних систем мітохондрій в тому числі  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер. Існують складні взаємозв'язки між внутрішньоклітинною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  та енергетичними процесами мітохондрій.

Проте  $\text{Ca}^{2+}$  впливає на синтез НАДН не безпосередньо, а через  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні ферменти – дегідрогенази: піруватдегідрогеназний-  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекси та НАД-ізоцитратдегідрогеназу. Ці три ферменти каталізують відновлення НАД до його форми НАДН яка бере участь у окисному фосфорилуванні. На основі досліджень  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ферментів показано, що регулювання активності піруватдегідрогеназного комплексу реалізується на двох основних рівнях:

- шляхом інгібування активної (дефосфорильованої форми) піруватдегідрогенази продуктами її реакції - ацетил-СоА та НАДН;
- внаслідок взаємоперетворення активної (дефосфорильованої) і неактивної

(фосфорильованої) форми піруватдегідрогенази. Ці взаємоперетворення каталізуються алостеричними, регуляторними ферментами: протеїнкіназою піруватдегідрогенази (декарбоксилуючою) та протеїнофосфатазою. Фосфатаза відновлює активність піруватдегідрогеназного комплексу унаслідок його дефосфорильовання. Зв'язування фосфатази з дигідроліпоїлтрансацилазою відбувається за участю іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , коли комплекс фосфорильований, після чого переводить піруватдегідрогеназний комплекс з неактивного в активний стан, тобто  $\text{Ca}^{2+}$  активує фосфатазу, водночас інгібує кіназу яка інактивує комплекс [77, 232,].

Щодо регуляції НАД-залежної ізоцитратдегідрогенази цей ензим регулюється мітохондріальним  $\text{Ca}^{2+}$ , концентрація якого вища за фізіологічну. Порівняно з регуляцією  $\text{Ca}^{2+}$  піруватдегідрогеназного комплексу, на НАД-залежну ізоцитратдегідрогеназу іони  $\text{Ca}^{2+}$  мають більш прямий вплив, що приводить який до зниження трео-D<sub>5</sub>-ізоцитрату. Вплив  $\text{Ca}^{2+}$  на ізоцитратдегідрогеназу залежить від її ізоформи та концентрації субстратів. Деякі вчені вважають, що НАД-залежна ізоцитратдегідрогеназа є ключовим ферментом ( $\text{Ca}^{2+}$ -залежних) котрий сприяє найбільшим  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованим змінам концентрацій НАД(Ф)Н [38].

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  активують  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс шляхом модуляції афінності ферменту до  $\alpha$ -кетоглутарату [189].

### **1.4.3. Взаємозв'язок мітохондрій з ендоплазматичним ретикуломом**

Мітохондрії являють собою систему, яка відповідає за швидке захоплення кальцію та його виведення. Акумуляовані іони  $\text{Ca}^{2+}$  стимулюють метаболічні процеси. Інша важлива роль захоплення  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями можливо пов'язана з їхнім розташуванням поблизу джерел входу  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину (біля плазматичної мембрани, та ЕПР), де локальна концентрація може бути дуже високою. Завдяки такій локалізації вони регулюють внутрішньоклітинний рівень  $\text{Ca}^{2+}$ . Мітохондрії відіграють комплексну роль у кальцієвій сигналізації модулюючи процеси

захоплення та спустошення ЕПР і відповідно функціонування та загибелі клітини. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинних депо є важливим фактором у багатьох аспектах  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів, включаючи регуляцію мітохондріального дихання [42]. Мітохондрії,  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$  канали та RyRs беруть участь у механізмі поширення  $\text{Ca}^{2+}$  хвиль від апікального полюсу до базальної частини вони утворюють кільце, що обмежує апікальну ділянку клітини і перешкоджають подальшому поширенню  $\text{Ca}^{2+}$  у клітині [224]. Таким чином мітохондрії змінюють локальні  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали на глобальні та реагують на підвищення цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

Якщо з ЕПР  $\text{Ca}^{2+}$  активно вивільняється під впливом певного активатора ріанодинчутливих чи  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, то мітохондрії починають швидко його акумулювати. За високої концентрації кальцію у цитозолі він швидше транспортується в мітохондрії і менше в ЕПР. Зазвичай мітохондрії захоплюють до 50% кальцію вивільненого з ЕПР. Montero et al. (1995) показали, що мітохондріальні осциляції у цьому випадку зростають від 1 до 500 мкмоль/л [170]. Осциляції які виникають між мітохондріями та ЕПР локально, є значно вищі за ті, які виникають при поширенні цих осциляцій крізь цитозоль [215]. Можливо це пов'язано з близьким розташуванням мітохондрій та ЕПР.

Мітохондрії часто розташовані поруч (близько 20 нм один від одного), з  $\text{I}\Phi_3$ - рецепторами, будучи розташованими так близько до місць вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  депо, вони можуть конкурувати з  $\text{Ca}^{2+}$  помпам ЕПР у зменшенні цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , вивільненого з депо [198]. Проте, лише частина поверхні мітохондрій знаходиться у тісному контакті з ендоплазматичним ретикуломом [71]. У літературі є досить багато даних про взаємозв'язок між вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму та захопленням його поряд розташованими мітохондріями [104, 191, 198, 216]. Місця контакту між цими органелами називають асоційованими з мітохондріями мембранами ендоплазматичного ретикулуму (mitochondria associated membranes, MAM). Мембрана ендоплазматичного ретикулуму та зовнішня мембрана мітохондрій у ділянках

МАМ відокремлені одна від одної на ~10–50 нм (у гепатоцитах миші – ~12–20 нм) [104], що є вигідним для ефективного транспортування іонів між цими структурами. Також встановлено, що до 80 % мітохондрій перебувають у тісному контакті з ендоплазматичним ретикулулом [216].

### **1.5. Дихання мітохондрій у печінці**

Функціями мітохондрій гепатоцитів є окисне фосфорилування (синтез АТФ), розщеплення жирних кислот та створення коферменту А (цикл трикарбонових кислот (ЦТК)),  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз,  $\text{Ca}^{2+}$ -депо. Серед цих різноманітних функцій печінки багато з них регулюються  $\text{Ca}^{2+}$ . Ці та інші функції печінки, такі як синтез глюкози печінкою опосередковується зростанням цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , індукованої гормонами [40, 69, 90]. Процес секреції жовчі, також регулюються іонами  $\text{Ca}^{2+}$  [155, 157].  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє важливу роль у життєвому циклі клітин печінки, регулюючи ріст, поділ, апоптоз та некроз клітин печінки [89]. Проте основна функція мітохондрій – це синтез АТФ внаслідок окиснення основних продуктів гліколізу – пірувату та НАДН, які виробляються у цитозолі. Кожна молекула пірувату, синтезована в процесі гліколізу активно транспортується крізь внутрішню мітохондріальну мембрану в матрикс де вона окиснюється і з'єднається з коферментом А, утворюючи молекули  $\text{CO}_2$ , ацетил– $\text{CoA}$  і НАДН.

#### **1.5.1. Загальна характеристика енергетичних процесів гепатоцитів**

Енергетичне забезпечення клітин печінки відбувається шляхом окисного фосфорилування – окиснення відновлених еквівалентів (НАДН, НАДФН, убіхіолу) молекулярним киснем, спряженим з утворенням АТФ із АДФ і неорганічного фосфату – це є основний механізм біоенергетичного синтезу АТФ [80]. Цей процес забезпечується комплексом ферментів локалізованих у внутрішній мембрані мітохондрій та складається з п'яти ліпопротеїдних

комплексів: НАДН-дегідрогеназа (комплекс I), сукцинатдегідрогеназа (комплекс II), убіхінон-цитохром *c*-оксидоредуктаза; цитохром *c*-редуктаза (комплекс III), цитохром *c*, цитохром *c* оксидаза (комплекс IV) та  $F_1, F_0$  АТФ-синтаза.

Комплекс I (НАДН-дегідрогеназа) передає відновлювальні еквіваленти на убіхінон. НАДН-дегідрогеназа окислює НАДН· $H^+$ , та переносить від нього 2 електрони на убіхінон, а  $4H^+$  транспортує з матриксу у міжмембранний простір. [83, 141]. 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 [190]. Коензим Q (убіхінон) акцептує протони й електрони не тільки від НАДН-дегідрогенази, а й від ФАД-залежних дегідрогеназ мітохондрій [67, 148]. Комплекс III (убіхінон-цитохром *c*-оксидоредуктаза; цитохром *c*-редуктаза) транспортує 2 електрони з убіхінону на цитохром *c* та забезпечує викачування 4 протонів з матриксу в міжмембранний простір [127]. Цитохром *c* переносить електрони між комплексами III та IV дихального ланцюга. Комплекс IV (цитохром *c* оксидаза) складається з цитохромів *a* та *a<sub>3</sub>*, а також містить два іони міді змінної валентності ( $Cu^+ - Cu^{2+}$ ). Цей комплекс транспортує 2 електрони на кисень та одночасно переносить 2 протони в міжмембранний простір. За такою послідовністю цитохромів електрони з убіхінону передаються на кисень [146, 149]. Окисно-відновні реакції каталізовані комплексами I, III і IV, спряжені з генерацією  $\Delta\psi H^+$ , а комплекс V (АТФ-синтаза) використовує вільну енергію  $\Delta\psi H^+$  для АТФ [80].

Кількість молекул АТФ, які утворюються за умов фосфорильовального дихання, залежить від окиснювального субстрату. Окиснення будь якого із субстратів за участю НАД<sup>+</sup>, тобто з участю НАДН-залежної дегідрогенази супроводжується утворенням трьох молекул АТФ та кожний атом кисню, відновленого до води. Коли субстратом є сукцинат, то перенесення електронів обминає НАД<sup>+</sup>, і на кожний атом окисненого кисню утворюється дві молекули

АТФ. За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату за участю НАД<sup>+</sup> відбувається акт фосфорилування – синтез ГТФ (субстратне фосфорилування) [6]. За рахунок субстратного фосфорилування за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату на кожний атом відновленого кисню утворюється чотири молекули АТФ.

Окисне фосфорилування у мітохондріях регулюється кількома механізмами: регулювання на основі змін співвідношення концентрацій АТФ/АДФ, НАДН/НАД<sup>+</sup> [185, 135, 136], активності цитохромоксидази, активацією Ca<sup>2+</sup> Ca<sup>2+</sup>-залежних дегідрогеназ ЦТК [79, 78] та регулювання активності H<sup>+</sup>-АТФ-синтази мітохондрій регуляторними білками [73].

### 1.5.2. Роль кальцію у процесах мітохондріального дихання

Мітохондрії впливають на різноманітні нормальні та патологічні процеси в клітині [14]. На відміну від інших внутрішньоклітинних структур, які використовують АТФ для акумуляції Ca<sup>2+</sup>, мітохондрії транспортують цей катіон за рахунок трансмембранного електричного потенціалу (близько 180 мВ), який генерується системою переносу електронів і протонів в ході окислення субстратів дихання: глутамату, сукцинату, пірувату, жирних кислот і т.д. Концентрація кальцію, перенесеного в мітохондріальний матрикс, підтримується в ньому на низькому рівні за рахунок зв'язування цього катіона з білками і неорганічним фосфатом.

Два головних аспекти Ca<sup>2+</sup>-метаболізму мітохондрій вважаються найвагомішими: 1) роль мітохондрій як Ca<sup>2+</sup> депо за умов перевантаження цитозолу іонами Ca<sup>2+</sup>; 2) участь мітохондріального Ca<sup>2+</sup> у регуляції активності матриксних дегідрогеназ, які беруть участь у циклі Кребса, вказуючи таким чином на безпосередню участь Ca<sup>2+</sup> у клітинному диханні [14].

Мітохондрії починають акумулювати Ca<sup>2+</sup> за його концентрації у цитозолі 100 нмоль/л [70], незважаючи на те, що афінність уніпортера становить 10 мкмоль/л. Отже, мітохондрії акумулюють Ca<sup>2+</sup> не лише за умов підвищення цитозольної концентрації катіонів Ca<sup>2+</sup>, але й у стані фізіологічного спокою – чи

за рахунок формування  $\text{Ca}^{2+}$  мікродоменів, чи іншим чином. Споживання мітохондріями  $\text{Ca}^{2+}$  може впливати на динаміку цитозольних  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів [133, 124]. Це може бути або прямий вплив – через участь  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем мітохондрій у генеруванні  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів, або опосередкований – через зміну функціонування інших  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем клітини. З'ясовано, що дихання мітохондрій визначає активаційні/деактиваційні властивості депокерованого входу іонів кальцію, і це має важливе значення для повторного наповнення внутрішньоклітинних депо кальцієм, витраченим під час стимуляції клітин агоністами [105].

У стані спокою матрикс мітохондрій містить дуже мало  $\text{Ca}^{2+}$ . Швидке підвищення внутрішньомітохондріальної  $[\text{Ca}^{2+}]$  спостерігається під час підвищення цитозольної  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Це має важливе значення для стимуляції окисного фосфорилування у мітохондріях [186, 196]. Акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями відбувається за рахунок функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера та шляхом так званого «швидкого споживання» [44]. Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинних депо є важливим фактором у багатьох аспектах  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів, включаючи контроль мітохондріального дихання [42].

Процеси надходження та вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях тісно пов'язані з їх енергетичним станом [44], який обумовлений такими процесами, як дихання мітохондрій, що забезпечується киснем і джерелами вуглецю, а також механізмами підтримання мембранного потенціалу та градієнта рН за рахунок активності електронно-транспортного ланцюга.

При диханні мітохондрій відбувається електрогенний викид в цитоплазму іонів водню, генерація градієнта рН і електричного потенціалу на внутрішній мітохондріальній мембрані. Утворений так званий електрохімічний потенціал іонів водню ( $\Delta\mu\text{H}$ ) є рушійною силою транспорту катіонів і слабких кислот всередині органел [44]. На кожні два перенесені по дихальному ланцюгу електрони всередині мітохондрій транспортується два іони кальцію. Однак дані про кінетичні параметри системи транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  суперечливі. Але можна



зробити висновок, що величини  $K_d$  і  $V_{max}$  при транспорті становлять відповідно більше 10 мкМ і 500 нмоль/мг мітохондріального білка в 1 хв.

Отже, зміни цитозольної концентрації  $Ca^{2+}$  корелюють з регуляцією внутрішньомітохондріальних рівнів НАДФН, піруватдегідрогеназної активності і величини мітохондріальної протонної рушійної сили [201].

## **2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

### **2.1. Умови роботи з тваринами при проведенні фізіологічних досліджень**

У ході проведення досліджень ми гуманно поводитися з лабораторними тваринами, оскільки навіть звичайні маніпуляції, наприклад, перенесення тварини з віварію в лабораторію, можуть вплинути на різні функціональні показники клітинного дихання. Усі маніпуляції з тваринами проводились згідно з Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Досліди виконували, використовуючи нелінійних статевозрілих щурів та щурів лінії Wistar (самці масою 180–250 г), яких утримували у стаціонарних умовах віварію при постійній температурі, природному освітленні та стандартній дієті. Тварин наркотизували діетиловим ефіром, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко виділяли печінку. Декапітацію або цервікальну дислокацію в лабораторії проводили швидко, ізолювано від інших тварин.

### **2.2. Виділення ізолюваних мітохондрій печінки щурів**

Мітохондрії виділяли методом диференціального центрифугування [132]. Печінку швидко виділяли, зважували та перфузували розчином такого складу (у ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 1, MgCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 5, HEPES – 10; рН 7,4. Охолоджену і відперфузовану печінку подрібнювали через прес і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера–Евельгейма з швидкістю 800 об/хв і 3 вертикальні ходи товкачика. Середовище гомогенізації та виділення мітохондрій містило (у ммоль/л): сахарозу – 250, EGTA – 1, HEPES – 10; рН – 7,2.

Гомогенат центрифугували для осадження уламків клітин і ядер 3 хв за 150

g і 5 хв за 300 g без зупинки центрифуги. Осад мітохондрій отримували центрифугуванням впродовж 15 хв за 4500 g. Центрифугування проводили за температури 0–2 °С.

Отриманий осад мітохондрій ресуспензували середовищем виділення у співвідношенні на 1 г тканини 0,1 мл середовища і отримували суспензію мітохондрій, яку використовували для подальших досліджень. Концентрацію мітохондріального білка вимірювали за методом Лоурі [156].

### **2.3. Методика ізолювання та пермеабілізації гепатоцитів**

Гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена [209] з використанням п'яти різних розчинів (ммоль/л). Для цього швидко виділену печінку перфузували безкальцієвим позаклітинним розчином для відмивання від крові (у ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, HEPES – 10,0, глюкоза – 5,0, EGTA – 1; рН 7,4), після чого знову перфузували печінку для відмивання від EGTA (у ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, HEPES – 10,0, глюкоза – 5,0; рН 7,4). Наступним етапом була рециркуляторна перфузія печінки розчином колагенази впродовж 20–25 хв за температури 37 °С (у ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 3, HEPES – 10,0, глюкоза – 5,0; колагеназа (120 од./мл); рН 7,6). Швидкість потоку розчинів була постійною і становила приблизно 20 мл/хв. Зважаючи на здатність колагенази до автопротеолізу, її розчиняли безпосередньо перед дослідом.

Після завершення руйнування колагенового матриксу з метою вимивання колагенази печінку послідовно промивали базовим зовнішньоклітинним розчином, який містив (у ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, HEPES – 10,0, глюкоза – 5,0, EGTA – 1, MgCl<sub>2</sub> – 1,0; бичачий сироватковий альбумін – 2%; рН 7,4. Для відмивання середовища, у якому перебували гепатоцити, від EGTA і бичачого сироваткового альбуміну перфузію виконували базовим зовнішньоклітинним розчином (у ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 1,3, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, HEPES – 10,0, глюкоза – 5,0; рН 7,4. Також цей розчин

використовували як середовище дихання ізольованих інтактних клітин печінки.

Для створення середовищ інкубації мітохондрій, ізольованих та пермеабілізованих клітин печінки з різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (0,01, 0,1, 1 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  $\text{CaCl}_2$

З метою вилучення клітин, з'єднаних між собою, суспензію пропускали через нейлоновий фільтр. Для очищення суспензії від метаболітів, залишків позаклітинного матриксу та пошкоджених гепатоцитів її тричі центрифугували за 50 г. Для перевірки цілісності плазмалеми гепатоцити фарбували 0,1 % розчином трипанового синього застосовуючи світлову мікроскопію. Кількість клітин з цілісними плазматичними мембранами становила 80–90 %. Підрахунок гепатоцитів здійснювали за допомогою камери Горяєва.

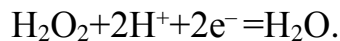
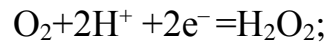
Пермеабілізовані гепатоцити отримували методом інкубації ізольованих клітин з дигітоніном (20 мкг/мл на 1 млн клітин) у внутрішньоклітинному розчині наступного складу (у ммоль/л):  $\text{KCl}$  – 90,0,  $\text{NaCl}$  – 15,0,  $\text{MgCl}_2$  – 1,0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2, EGTA – 0,5, NEPES–10,0; рН 7,2. Склад розчину в основному відповідає іонному складу внутрішньоклітинного середовища гепатоцитів [101]. Дигітонін утворює комплекси з холестеринем плазматичної мембрани, внаслідок чого у мембрані виникають пори через які надходять у клітину екзогенні субстрати окиснення. Пермеабілізацію здійснювали у внутрішньоклітинному розчині впродовж 10 хв за температури 37 °С.

#### **2.4. Полярографічна реєстрація швидкості споживання кисню мітохондріями**

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 температури 26 °С, ізольованими гепатоцитами – 37 °С.

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



Як субстрати окислення використовували сукцинат (5 ммоль/л), піруват (5 ммоль/л) та  $\alpha$ -кетоглутарат (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л). Внесенням у комірку інгібітора першого пункту спряження ротенону (10 мкмоль/л) за окиснення сукцинату усували надходження ендогенних НАД-залежних субстратів (піруват та  $\alpha$ -кетоглутарат), а внесенням інгібітора другого пункту спряження ТТФА (10 мкмоль/л) за окиснення пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату – використання ФАД-залежних субстратів (ендогенного сукцинату).

За полярограмами визначали швидкість споживання кисню гомогенатом, мітохондріями або суспензією пермеабілізованих гепатоцитів у станах  $S_4$ ,  $S_3$   $S_4^{ATP}$  за Чансом та Вільямсом (рис. 2.1) [68].

На основі полярографічних записів, окрім швидкості споживання кисню у станах  $S_4$ ,  $S_3$   $S_4^{ATP}$  за Чансом, розраховували час фосфорилування (Тф), швидкість фосфорилування (Vф), ефективність фосфорилування (АДФ/О), дихальні контролі за Чансом та Ларді. Усі показники перераховували на кількість білка (концентрація білка у комірці становила 5–7 мг/мл).

Розчини усіх речовин, які додавали у комірку, попередньо доводили до необхідного рН середовища інкубації мітохондрій – 7,2 чи ізольованих гепатоцитів – 7,4.

Швидкість споживання кисню суспензією ізольованих клітин (концентрація у комірці – 1 млн/мл) реєстрували на 3 та 5 хвилинах від моменту внесення клітин у комірку.

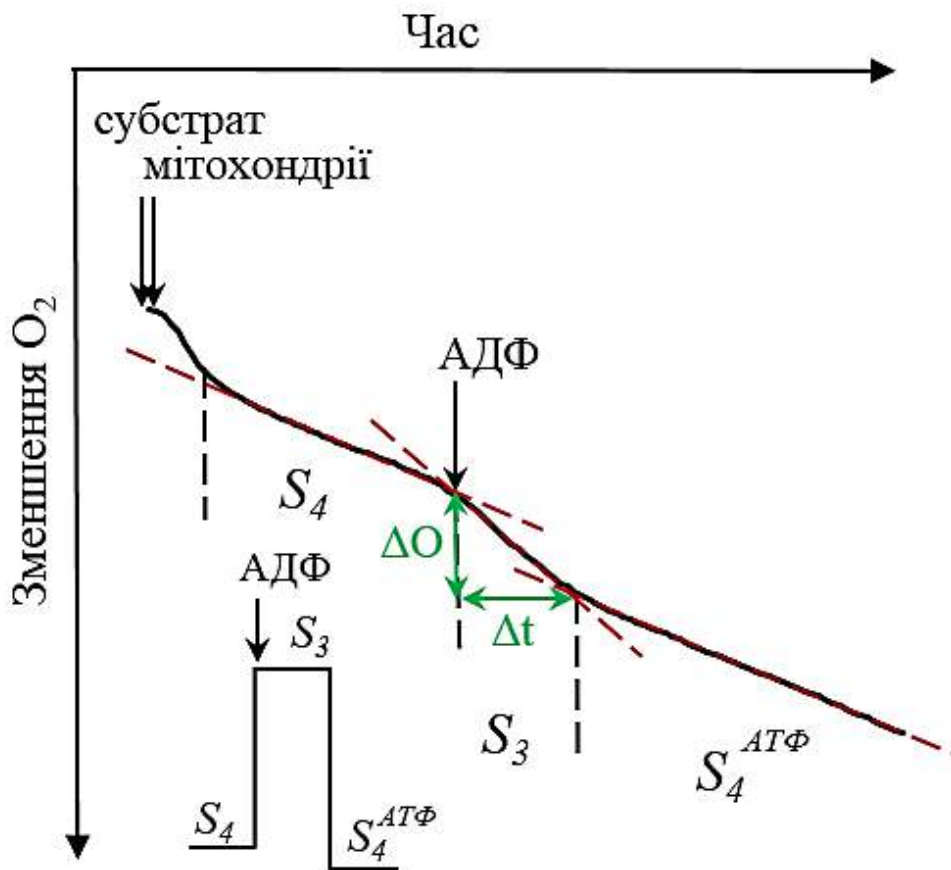


Рис. 2.1. Запис полярограми за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату у метаболічних станах за Чансом та Вільямсом: стан  $S_4$  – у комірку з екзогенним субстратам вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан  $S_3$  – для стимуляції окисного фосфорилування додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{АТФ}$ ;  $[\alpha\text{-кетоглутарату}] = 5$  ммоль/л,  $[\text{АДФ}] = 200$  мкмоль/л

## 2.5.. Метод проточної цитометрії

Мембранний потенціал мітохондрій  $\Delta\psi$  реєстрували проточним цитометром COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter) з аргонним лазером, який використовували для дослідження бокового та прямого світлорозсіювання мітохондрій, й аналізували за допомогою програми SYSTEM II™ Software (Beckman Coulter, США). В основі методу проточної цитометрії лежить

вимірювання параметрів кожної окремо взятої клітини або мітохондрії. Суспензію мітохондрій під тиском проганяли через капіляр, при цьому за рахунок наявності обволікаючої рідини по краях потоку створюється більш високий тиск, ніж у центрі. Внаслідок цього мітохондрії прямують в область найменшого тиску, утворюючи потік, що складається фактично з одного ряду мітохондрій. Коли такий струмінь перетинає сфокусований лазерний промінь (довжина хвилі лазерного випромінювання  $\lambda_{\text{буд.}} = 488$  нм), в точці перетину потоку і променя одночасно виявляється, як правило, тільки одна мітохондрія, що дозволяє уникнути артефактів, пов'язаних з різною віддаленістю клітин чи мітохондрій від точки перетину лазерного променя з потоком. Швидкодіючі датчики, розташовані поблизу вимірювальної комірки, фіксують розсіювання під кутом від 2 до 19°, яке називається прямим (малим кутовим) світлорозсіюванням (forward scatter – FS) і характеризує розміри клітин, і під кутом 90° (бічне світло розсіювання (side scatter – SS), що характеризує особливості внутрішньоклітинних структур – гранулярність.

Прилад забезпечений фотодетектором, що дозволяє міряти флуоресценцію різних флуорофорів, якими можуть бути позначені мітохондрії для вимірювання мембранного потенціалу. Експерименти проводили з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM (tetramethylrhodaminemethyl ester;  $\lambda_{\text{буд.}} = 488$  нм,  $\lambda_{\text{фл.}} = 590$  нм) у концентрації 100 нмоль/л. TMRM – це позитивно заряджений флуоресцентний зонд, який проходить крізь мембрану і електрофоретично накопичується у полязованих мітохондріях, що мають негативний заряд на внутрішній мембрані. Чутливість зонду TMRM до змін мембранного потенціалу мітохондрій оцінювали за умов додавання протонофору, зокрема, CCCP (carbonilcyanide-m-chlorphenylhydrazone) у концентрації 10 мкмоль/л. Протонофор CCCP належить до групи сполук, що збільшують протонну провідність мембран мітохондрій, як наслідок-відбувається деполяризація мембран (рис. 2.2).

В ході отримання суспензії частина ізольованих мітохондрій (5–15%)

виявляються нежиттєздатними. За допомогою комп'ютерної аналітичної програми оцінювали розподіл інтенсивностей флуоресценцій функціонально активних і неживих мітохондрій. При поданні результатів вимірювання у вигляді гістограм за шкалою абсцис відкладали інтенсивність флуоресценції даного барвника в логарифмічних координатах, а за шкалою ординат – число подій (у даному випадку кількість мітохондрій). Таким чином, розподіл вимірюваних подій за даним параметром (інтенсивністю флуоресценції) матиме вигляд двох піків, площа яких характеризує кількість мітохондрій у кожній популяції.

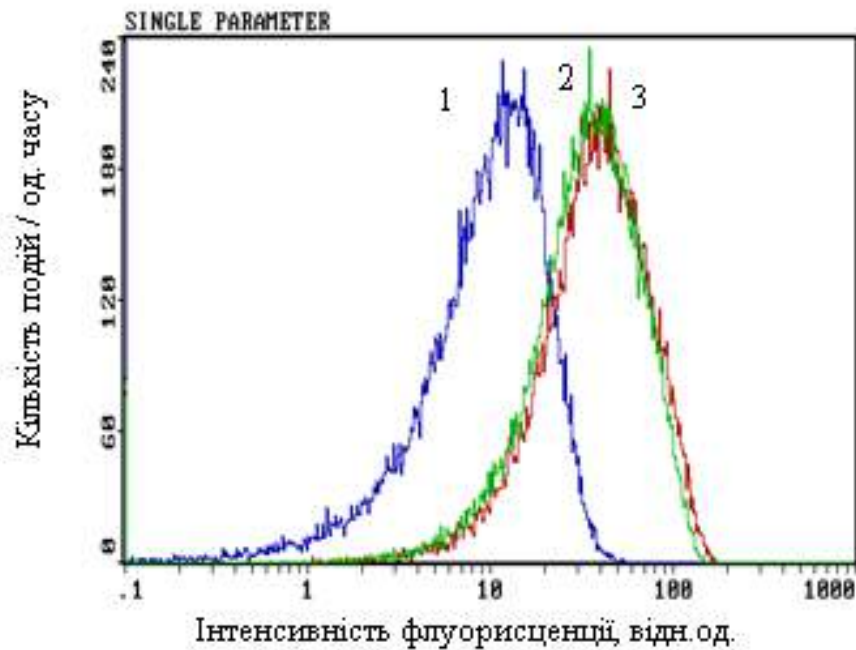


Рис. 2.2. Зміна інтенсивності флуоресценції у мітохондріях печінки: 1 – аутофлуоресценція, 2 – після додавання 100 нмоль/л TMRM, 5 хв інкубації, 3 – після додавання 100 нмоль/л TMRM і 1 мкмоль/л CCCP

До протоколу вводили логічне обмеження для реєстрації зразків за прямим та бічним світлорозсіюванням. Аналіз проб припинявся після реєстрації 50 000 подій в межах “логічного обмеження” (гейту). Вимірювання здійснювали на середній швидкості потоку.

Інтенсивність флуоресценції зонда TMRM у відносних одиницях



розраховували як різницю між геометричним положенням піків інтенсивності флуоресценції контрольної чи дослідних проб та автофлуоресценцією цих проб. Реєстрацію відносних значень мітохондріального потенціалу проводили у середовищі інкубації такого складу (у ммоль/л): HEPES – 20, сахароза – 250,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,  $\text{CaCl}_2$  – 0,0001, АДФ – 0,2, субстрат окиснення (піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат або сукцинат) – 5; рН 7,4. Інтенсивність флуоресценції реєстрували на 3 та 5 хв інкубації з зондом за температури 20 °С.

## 2.6. Метод потенціометрії

Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали методом потенціометрії, описаним Брендом і співроб. [56, 171], з використанням ліполітичного катіона – метилтрифенілфосфоніум броміду (triphenyl-methylphosphonium bromide,  $\text{TPMP}^+$ ) і чутливого до нього електрода. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містило (у ммоль/л): сахарозу – 250,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2, ЕГТА – 0,1,  $\text{CaCl}_2$  – 1, HEPES – 10; знежирений БСА – 5%; рН 7,2. У герметичну, термостатовану комірку (37 °С), обладнану  $\text{TPMP}^+$ -селективним електродом та розміщеною на магнітній мішалці для постійного перемішування, вносили мітохондрії з розрахунку 2 мг/мл білка. Для калібрування  $\text{TPMP}^+$ -селективного електрода (у кожному вимірюванні) чотириразово додавали  $\text{TPMP}^+$ , збільшуючи концентрацію від 10 до 40 мкмоль/л. Для ініціації дихання вносили субстрати окиснення – сукцинат, піруват та  $\alpha$ -кетоглутарат – у концентрації 5 ммоль/л. Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л) (рис 2.3). Споживання кисню суспензією мітохондрій контролювали за допомогою електрода Кларка. Сигнал з електродів передається через потенціометр «Sartorius» (Німеччина) і газоаналізатор BMS 3 Mk 2 Radiometer (Данія) на плату АЦП L-card і реєструється на персональному комп'ютері за допомогою програмного забезпечення.

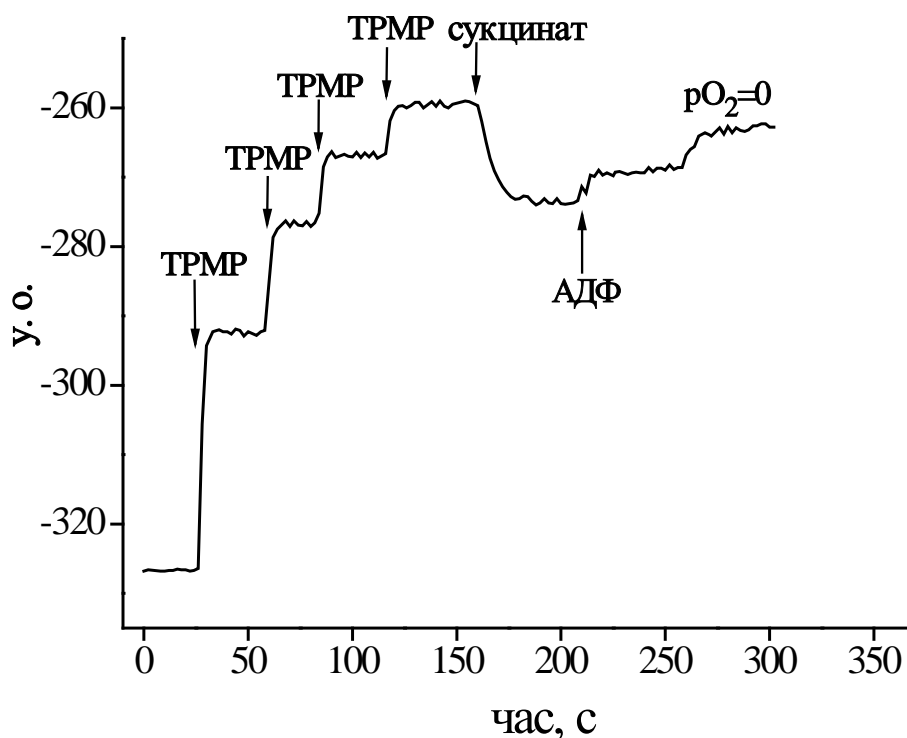


Рис. 2.3. Приклад реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій з TPMP<sup>+</sup>-селективним електродом за послідовного додавання TPMP<sup>+</sup>, сукцинату та АДФ: після субстрату до середовища інкубації вносили суспензію ізольованих мітохондрій, а потім чотири рази додавали TPMP<sup>+</sup> (для досягнення концентрації 10, 20, 30 і 40 мкмоль/л); [сукцинат] = 5 ммоль/л; дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л)

Мембранний потенціал мітохондрій ( $\Delta\psi_m$ ) розраховували у станах  $S_4$  і  $S_3$  (стан  $S_4$  – без АДФ, стан  $S_3$  – наявний екзогенний АДФ для стимуляції окисного фосфорилування) за Чансом та Вільямсом [68] за рівнянням Нернста:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[\text{TPMP}^+]_{in}}{[\text{TPMP}^+]_{out}} \right),$$

де R – універсальна газова стала, T – абсолютна температура, z – валентність, F

– число Фарадея,  $[TPMP^+]_{in}$  і  $[TPMP^+]_{out}$  – концентрація катіона  $TPMP^+$  всередині мітохондрій та у середовищі інкубації відповідно.

## 2.7. Оцінка вмісту $Ca^{2+}$ в мітохондріях методом флуоресцентної спектроскопії

Для оцінки вмісту іонізованого  $Ca^{2+}$  використовували метод флуоресцентної спектроскопії, який надає інформацію про широкий діапазон молекулярних процесів, в тому числі: взаємодії з молекулами розчинника флуорофорів, обергальна дифузія біомолекул, відстань між сайтами на біомолекулах, конформаційні зміни і взаємодії при зв'язуванні [194, 99].

Реєстрацію відносних значень рівня  $Ca^{2+}$  в матриці мітохондрій печінки здійснювали із використанням спектрофлуориметра Quanta Master 40 РТІ (Канада) із програмним забезпеченням FelixGX 4.1.0.3096 [5, 98, 103]. Мітохондрії навантажували зондом Fluo 4AM ( $\lambda_{збудл.} = 490$  нм,  $\lambda_{фл.} = 520$  нм) у концентрації 2 мкмоль/л впродовж 30 хв за температури 37 °С у розчині, який використовували для суспендування мітохондрій. Зонд Fluo 4AM є аналогом Fluo-3AM, два атоми хлору у циклічній структурі заміщені атомами фтору.  $K_d$  Fluo-4 для  $Ca^{2+}$  складає 0,35 мкмоль/л. Квантовий вихід флуоресценції  $Ca^{2+}$ -зв'язаних Fluo-3 і Fluo-4 практично ідентичний. Однак, максимум споживання Fluo-4 зміщується в сторону синього спектру приблизно на 12 нм, в порівнянні з Fluo-3. В результаті цього можна отримувати підсилене збудження зонду Fluo-4 за 488 нм, і отже, спостерігати вищий рівень сигналу для флуоресцентної спектроскопії, лазерної скануючої конфокальної мікроскопії, проточної цитометрії.

Після завершення часу навантаження зонда суспензію мітохондрій розводили розчином для суспендування (у співвідношенні 1:5) і центрифугували 15 хв за прискорення 4500 g. Отриманий осад мітохондрій суспендували за температури 0–4 °С розчином, який містив (у ммоль/л): HEPES – 10, сахароза – 250, EGTA – 1; рН 7,2. Акумуляція  $Ca^{2+}$  мітохондріями здійснювалася з

використанням середовища наступного складу (у ммоль/л): HEPES – 20, сахароза – 250,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2, АДФ – 0,2; рН 7,4. Як субстрати окиснення використовували піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат або сукцинат (по 5 ммоль/л). Активували акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  додаванням до середовища  $\text{CaCl}_2$  до кінцевої концентрації 100 мкмоль/л. Тестування кожної проби завершувалось додаванням 0,1 % тритону X-100 і 1 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$  та, через 1 хв, 5 ммоль/л EGTA (значення флуоресценції  $F_{max}$  та  $F_{min}$  відповідно) (рис. 2.4).

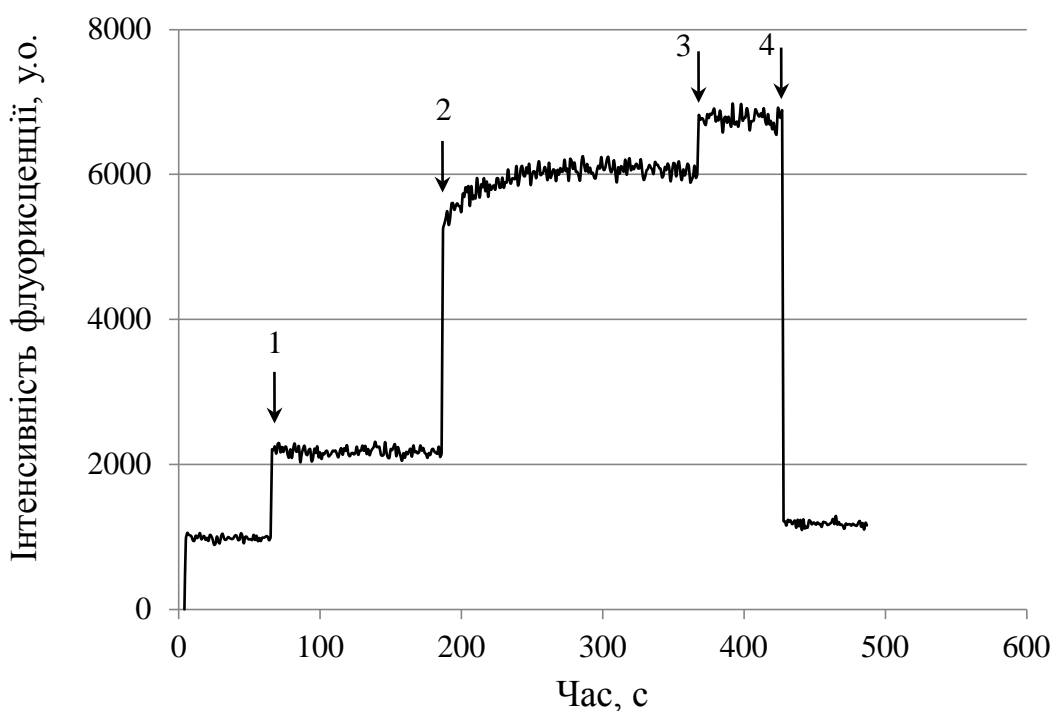


Рис. 2.4. Запис зміни інтенсивності флуоресцентного зонда Fluo-4 в мітохондріях у часі при внесенні в середовище інкубації мітохондрій (1), 100 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ (2), 0,1% тритону X-100 (3) та 5 ммоль/л EGTA (4), за наявності субстрату окиснення пірувату

Внесення тритону X-100 призводить до втрати бар'єрної функції мітохондрій та підвищення неспецифічної проникності мітохондрій до іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , що відповідає значенням насичуючої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ( $F_{max}$ ). Значення  $F_{min}$  отримували внесенням в середовище інкубації EGTA для хелатування іонів  $\text{Ca}^{2+}$

(рис. 2.4). Показники  $F_{max}$  та  $F_{min}$  реєстрували для кожної проби після проведення всіх експериментальних маніпуляцій.

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. Відтак, у контролі при внесенні в середовище інкубації, що містило суспензію мітохондрій, 100 мкмоль  $\text{Ca}^{2+}$ , спостерігалось часткове підвищення інтенсивності флуоресценції.

Для обчислення концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі мітохондрій використовували формулу Гринькевич:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} ,$$

де  $K_d$  – відносна  $\text{Ca}^{2+}$ -константа дисоціації зонда Fluo-4,  $F$  – середнє значення інтенсивності флуоресценції зонда у певний період часу,  $F_{max}$  – інтенсивність флуоресценції за насичуючих  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $F_{min}$  – інтенсивність флуоресценції за відсутності  $\text{Ca}^{2+}$  [108]. Оскільки в досліді використовувався  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливий зонд Fluo-4AM, то за відносну  $\text{Ca}^{2+}$ -константу дисоціації зонда  $K_d$  приймали значення 345 нМ.

## 2.8. Трансмійна 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) та фіксували 1,5%-м розчином глутарового альдегіду на какодилатному буфері (2 год) та 1%-м розчином  $\text{OsO}_4$  (2 год), який також виготовлений на какодилатному буфері. Після цього зразки переносили у 1,5%-й водний розчин ураніацетату на 12 год. Фіксовані зразки промивали і зневоднювали за кімнатної температури у зростаючих концентраціях етанолу (у діапазоні від 70 до 100°). Зневоднені зразки

переносили у чисту епоксидну смолу і поміщали у капсули для полімеризації й витримували 24 год за температури 40 °С у термостаті та 48 год за температури 60 °С. Зрізи виготовляли за допомогою ультрамікротома УМТП-6М. Контрастували їх на 1,5%-му розчині ураніацетату, виготовленому на 70°-му етанолі. Ще раз контрастували зрізи у свинець цитраті за Рейнольдсом [195], після чого переглядали і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЭМ-100.

На наведеній електронно-мікроскопічній фотографії (рис. 2.5) видно значну кількість функціонально повноцінних, неушкоджених мітохондрій, які перебувають на різних стадіях розвитку (молоді, зрілі та старі).

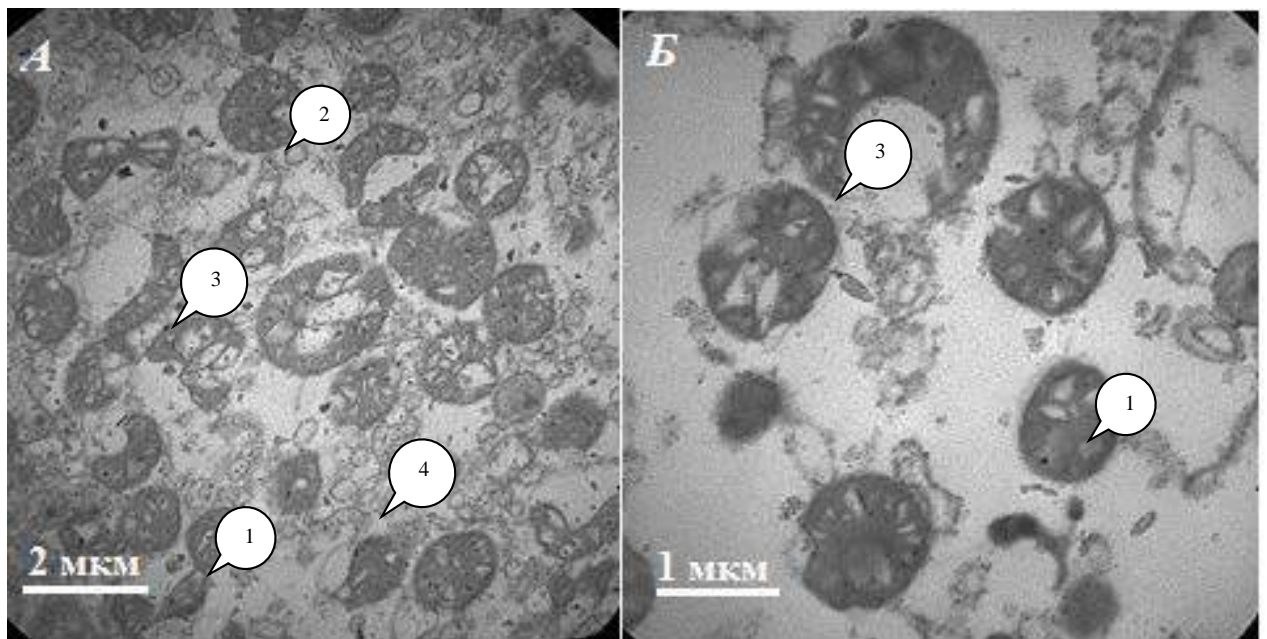


Рис. 2.5. Електронно-мікроскопічна фотографія суспензії мітохондрій гепатоцитів за збільшення  $\times 4000$  (А) і  $\times 10\ 000$  (Б): 1 – молоді мітохондрії, 2 – зрілі мітохондрії, 3 – старі мітохондрії, 4 – везикули з немітохондріальних мембран

Суспензія містить незначну кількість мембран, які асоційовані з мітохондріями або утворюють замкнені везикули. У такій суспензії краще зберігаються функціональні властивості мітохондрій і краще проявляються фізіологічні ефекти [11]. Ця гіпотеза була підтверджена роботами А.М.

Бабського на кафедрі фізіології людини і тварин ЛНУ ім. Івана Франка [2, 3, 4].

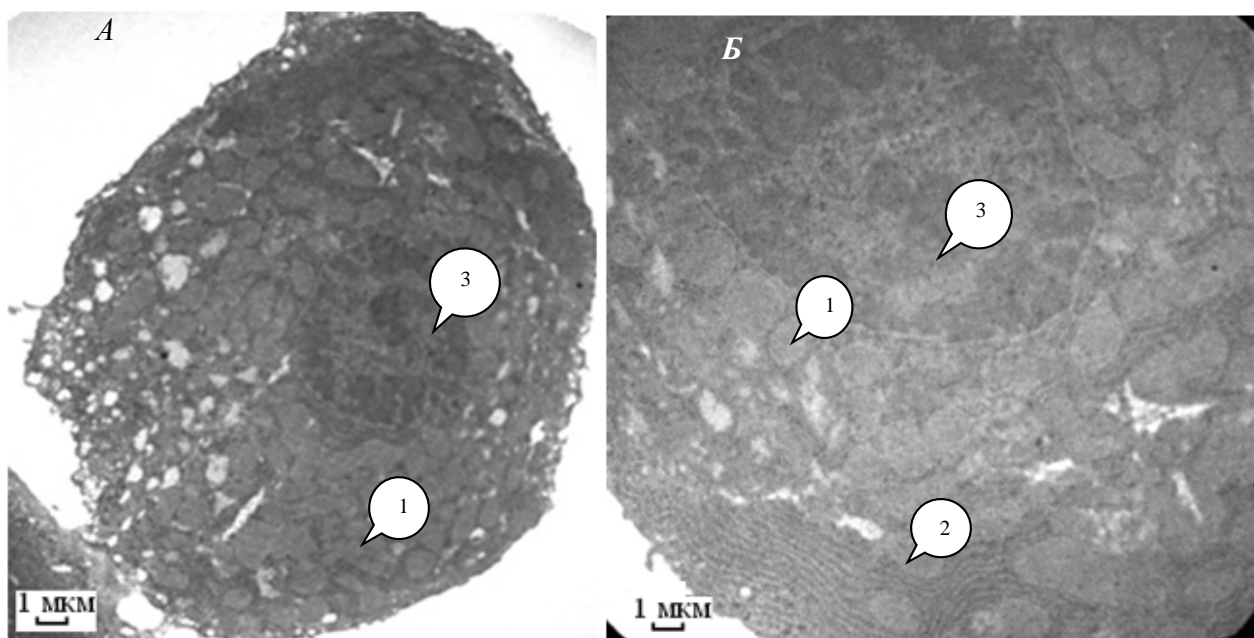


Рис. 2.6. Електронно-мікроскопічна фотографія гепатоцита щура за збільшення  $\times 4000$  (A) та за збільшення  $\times 10000$  (B) : 1 – мітохондрії, 2 – ЕПР, 3 – ядро

На електронних мікрофотографіях (рис. 2.6) добре видно ізольовані гепатоцити з неушкодженою плазматичною мембраною, мембрани ЕПР та значну кількість функціонально повноцінних мітохондрій, що дозволяє досліджувати енергетичні процеси клітин.

### 2.9. Метод визначення АТФ-азної активності суспензії мітохондрій

Для оцінки ролі немітохондріальних мембранних структур суспензії у депонуванні  $\text{Ca}^{2+}$  визначали АТФ-азну активність суспензії мітохондрій на основі змін вмісту неорганічного фосфату ( $\text{F}_n$ ) у середовищі інкубації мітохондрій методом УФ-детекції та методом Фіске-Суббароу [96]. Для цього суспензію мітохондрій розділяли на аліквоти й інкубували у відповідних середовищах впродовж 15 хв. З метою інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулу до середовища інкубації додавали

еозин Y (20 мкмоль/л), для інгібування  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -помпи – оубаїн (10 мкмоль/л), для інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму – тапсигаргін (1 мкмоль/л), для блокування дихального ланцюга – азид натрію (10 ммоль/л). АТФазну реакцію запускали додаванням до середовища АТФ (3 ммоль/л). Після інкубації суспензію мітохондрій центрифугували впродовж 5 с при 1600 g і швидко відбирали проби для визначення концентрації  $\Phi_n$  методом УФ-детекції та методом Фіске-Суббароу. Концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі моделювали шляхом застосування  $\text{Ca}^{2+}$ -ЕГТА-буферу (100 мкмоль/л ЕГТА). Різницю між вмістом  $P_n$  у середовищі з низькою концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  ( $10^{-7}$  моль/л) і середовищем, котре містило 2 ммоль/л ЕГТА (безкальцієве), вважали показником  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливої АТФ-азної активності.

Встановлено, що вміст  $\Phi_n$  у суспензії мітохондрій за дії інгібітора  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -помпи плазматичної мембрани оубаїну [36], інгібітора  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму еозину Y [13, 25], а також інгібітора  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму тапсигаргину [222] суттєво не змінювався і був у межах від 0,058 до 0,080 мкмоль  $\Phi_n$  / (мг білка  $\times$  15 хв) (рис.2.7).

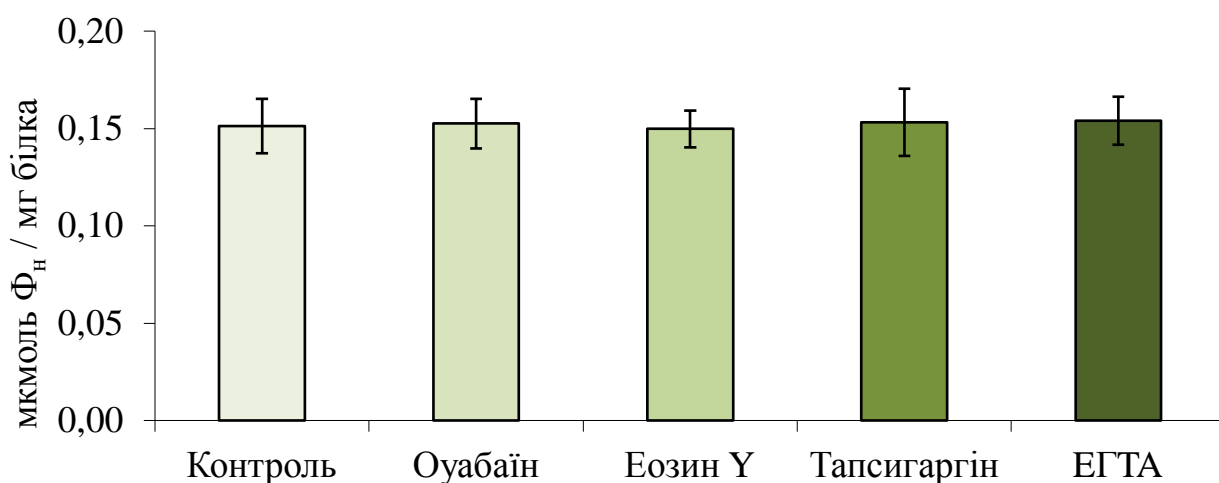


Рис. 2.7. Показники АТФ-азної активності суспензії мітохондрій обчислені на основі змін вмісту неорганічного фосфату ( $\Phi_n$ ) у середовищі інкубації мітохондрій: оубаїн (10 мкмоль/л), еозин Y (20 мкмоль/л), тапсигаргін (1 мкмоль/л), ЕГТА (100 мкмоль/л)



Це свідчить, що досліджувана суспензія містить незначну кількість немітохондріальних мембран, а їхній внесок у депонування  $\text{Ca}^{2+}$ , порівняно з мітохондріями, є несуттєвими.

### **2.10. Визначення концентрації білка за Лоурі**

Перерахунок швидкостей дихання, окисного фосфорилування, показників інтенсивності флуорисценції потенціалчутливих зондів та значення інтенсивності флуоресцентного зонда Fluo-4 здійснювали на одиницю кількості білка. В основу вираховування покладено здатність білкових молекул вираховувати реактив Фоліна з утворенням продукту реакції синього кольору. Для побудови калібрувальної кривої використовували бичачий сироватний альбумін фірми “Serva”. 12,5 мг альбуміну розчиняли у 25 мл NaOH. Далі готували різні концентрації вихідного розчину. У кожен пробірку до 0,4 мл робочого розчину додавали 2 мл розчину реактиву “С”, інкубували 10 хв, а потім 0,2 мл реактиву Фоліна [156]. Показники екстинкції реєстрували на ФЕКу при довжині хвилі 750 нм (червоний фільтр). Після побудови калібрувальної кривої проводили саме визначення. До 0,03 мл гомогенату печінки додавали 2 мл реактиву “С” (суміш інкубували 10 хв в темноті), а після того – 0,2 мл реактиву Фоліна (інкубували ще 30 хв в темному місці). Покази також знімали на ФЕКу за  $\lambda=750$  нм проти дистилляту.

### **2.11. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження**

Статистично-математичне опрацювання результатів проводили за Стюдентом. Необхідні статистичні підрахунки проводили за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*. При цьому визначали середнє арифметичне (M), середньоквадратичне відхилення ( $\sigma$ ), стандартну похибку (m), коефіцієнт варіації (CV), коефіцієнт достовірності

різниці між двома статистичними групами за Стьюдентом (P), % змін [7].  
Статистично достовірними вважали зміни при  $P < 0,05$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Роль $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму у регуляції енергетичного забезпечення гепатоцитів

У клітині існує взаємозалежність між  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляціями й енергетичними процесами [113, 113]. Однак на сьогодні не до кінця досліджений внесок різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем у регуляцію енергетичних процесів у клітині. Метою роботи було оцінити роль  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму, використовуючи їхній інгібітор еозин Y, у регуляції енергетичного забезпечення клітин. Відомо, що флуоресцентний індикатор еозин Y (2,4,5,7-тетра-бромфлуоресцеїн) інгібує  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму [25].

Еозин Y не конкурує з АТФ за місця зв'язування, хоча знижує спорідненість ферменту до нуклеозидтрифосфату. Основною складовою інгібувального ефекту еозину Y за високих концентрацій субстрату є зниження  $V_{max}$  АТФ-гідролазної реакції, тобто відбувається гальмування розпаду фермент-субстратного комплексу з утворенням продуктів реакції [13, 25].

З метою оцінки ролі  $\text{Ca}^{2+}$ -помп у регуляції процесів енергетичного забезпечення клітини на першому етапі дослідження ми здійснювали перфузію печінки позаклітинним розчином, який містив еозин Y (20 мкмоль/л).

З'ясувалося, що за таких умов дослідження еозин Y не впливав на процеси дихання та окисного фосфорилування мітохондрій за окиснення як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів. Зокрема, швидкість споживання кисню у стані  $S_3$  за окиснення сукцинату у контролі становила  $66,07 \pm 12,63$  нг-ат. О / (мг білка  $\times$  хв), а в досліді  $58,18 \pm 9,19$  нг-ат. О / (мг білка  $\times$  хв);  $P > 0,05$ ,  $n = 6$ . За окиснення НАД-залежних субстратів (пірувату й  $\alpha$ -кетоглутарату) статистично достовірних змін не зареєстровано (рис. 3.1.). Однак чітко простежується залежність швидкості споживання кисню від субстрату окиснення. Зокрема, найвищою швидкістю була

за окиснення сукцинату, що узгоджується з даними інших авторів [12].

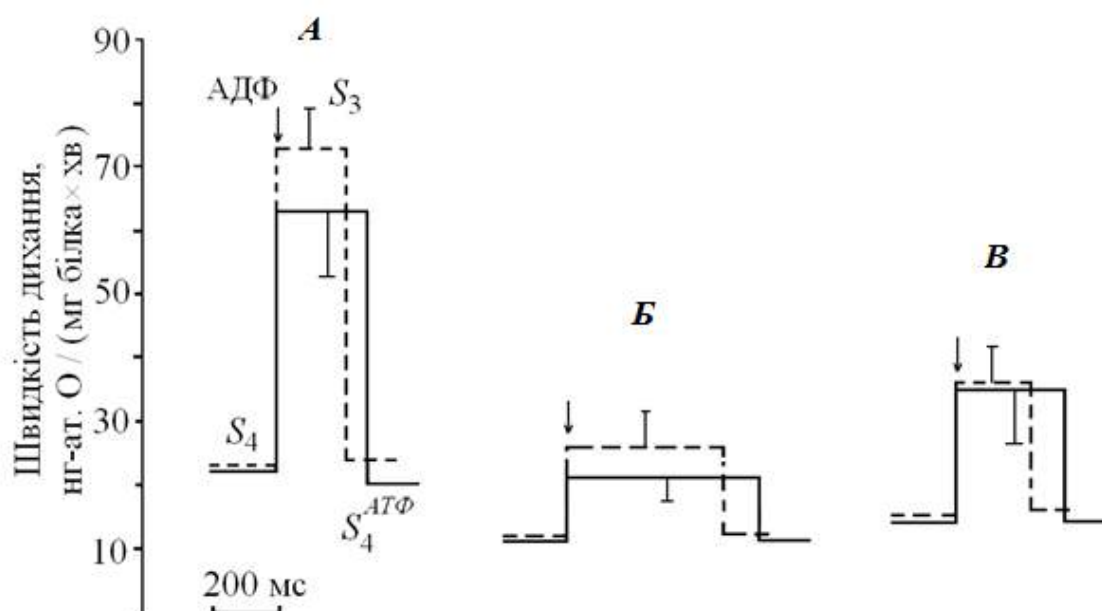


Рис. 3.1. Дихання мітохондрій після перфузії печінки еозин Y-вмісним розчином за окиснення сукцинату (А), пірувату (Б) й  $\alpha$ -кетоглутарату (В): штрихова лінія – контроль; суцільна лінія – дослід (печінку перфузували еозин Y-вмісним розчином у концентрації 20 мкмоль/л); стан  $S_4$  – у комірку з екзогенними субстратами вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан  $S_3$  – для стимуляції окисного фосфорилювання додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; блокатори I (ротенон, 10 мкмоль/л) та II [ТТФА] = 10 мкмоль/л пунктів спряження вносили в комірку одночасно зі субстратом окиснення, [субстратів] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, n=6

За перфузії печінки розчином еозину були відсутні й зміни у процесах окисного фосфорилювання (табл. 3.1). Проте значення показників окисного фосфорилювання, як і показників дихання, залежали від субстрату окиснення. Найменш інтенсивним для клітини виявилось використання пірувату, оскільки за цих умов швидкість і ефективність фосфорилювання були найнижчими і,

відповідно, тривалість цього процесу – найбільшою (табл. 3.1). Порівнюючи результати, отримані при окисненні сукцинату та  $\alpha$ -кетоглутарату, можна зробити висновок, що ефективність фосфорилування була вищою за використання  $\alpha$ -кетоглутарату, але решта показників дихання й окисного фосфорилування не відрізнялись. Це зумовлено різною кількістю пунктів спряження, задіяних у синтез АТФ при окисненні ФАД- та НАД-залежних субстратів, і узгоджується з теорією гормонально-субстратно-нуклеотидних систем регулювання енергетичних процесів [5].

Таблиця 3.1

Показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів після перфузії еозин  $Y$ -вмісним розчином ( $M \pm m$ ;  $n=6$ )

	АДФ/О, мкмоль/л АДФ/ нг-ат О		Vf, мкмоль/л АДФ/ мг білка		Tf, с	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
сукцинат	0,96 $\pm$ 0,18	0,95 $\pm$ 0,08	65,3 $\pm$ 16,3	56,76 $\pm$ 12,3	296 $\pm$ 112	277 $\pm$ 78,2
піруват	1,23 $\pm$ 0,12	0,95 $\pm$ 0,06	23,8 $\pm$ 3,34	21,07 $\pm$ 2,28	550 $\pm$ 84,3	606 $\pm$ 65,7
$\alpha$ -кето- глутарат	1,89 $\pm$ 0,19	1,50 $\pm$ 0,18	69,0 $\pm$ 15,8	56,0 $\pm$ 13,3	257 $\pm$ 75,6	343 $\pm$ 78,5

Отже, перфузія печінки щурів розчином еозину  $Y$  не впливає на процеси енергетичного забезпечення ізольованих мітохондрій печінки [16]. Ми припустили, що це може бути зумовлено наявністю гематогепатичного бар'єру – як чинника, що регулює надходження екзогенних речовин у печінку [140], або швидкоплинністю змін мітохондріального рівня  $Ca^{2+}$ .

Тому на наступному етапі досліджень, з метою перевірки цих версій, як модельний об'єкт ми використали гомогенат печінки, в якому крім мітохондрій наявні везикули ендоплазматичного ретикулуку.

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 не змінювалася статистично достовірно (рис. 3.2).

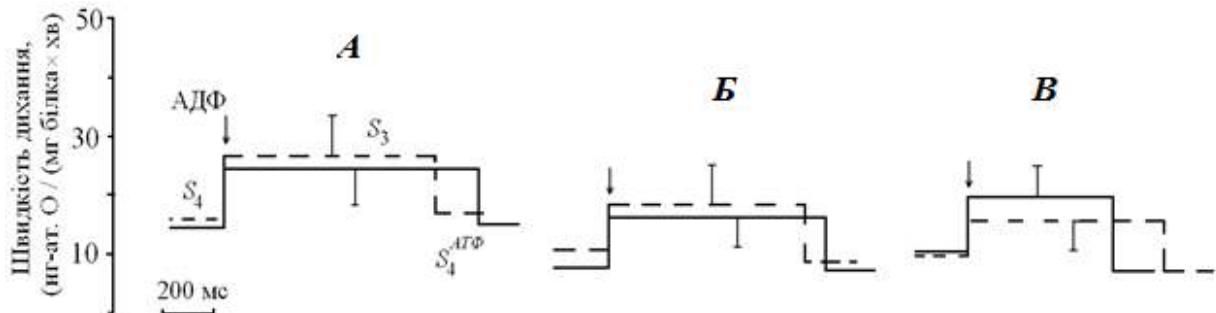


Рис. 3.2. Споживання кисню гомогенатом печінки щурів після попередньої інкубації з розчином еозину  $Y$  за окислення сукцинату (А), пірувату (Б) та  $\alpha$ -кетоглутарату (В): штрихова лінія – контроль, суцільна лінія – дослід (гомогенат, попередньо проінкубований 5 хв з еозином  $Y$  у концентрації 20 мкмоль/л); стан  $S_4$  – у комірку з екзогенними субстратами вносили 100 мкл гомогенату; після додавання екзогенного АДФ встановлюється стан  $S_3$ ; вичерпування екзогенного АДФ спричиняє перехід системи у рівноважний стан  $S_4^{АТФ}$ ; [ротенон]=10 мкмоль/л, [ТТФА]=10 мкмоль/л, [субстратів] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л,  $n=6$

Статистично достовірних змін показників окисного фосфорилування попередньої інкубації гомогенату з еозином  $Y$  не виявлено. Отже, відсутність змін у процесах мітохондріального дихання за перфузії печінки еозином  $Y$  не зумовлена непроникністю цього інгібітора через гематогепатичний бар'єр.

У наступній серії ми перевірили припущення, чи не спричинена відсутність змін у диханні мітохондрій за перфузії печінки (чи попередньої інкубації гомогенату) еозин  $Y$ -вмістним 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  $\alpha$ -кетоглутарату статистично достовірних змін дихання та окисного фосфорилування нами не встановлено (рис. 3.3, табл. 3.2).

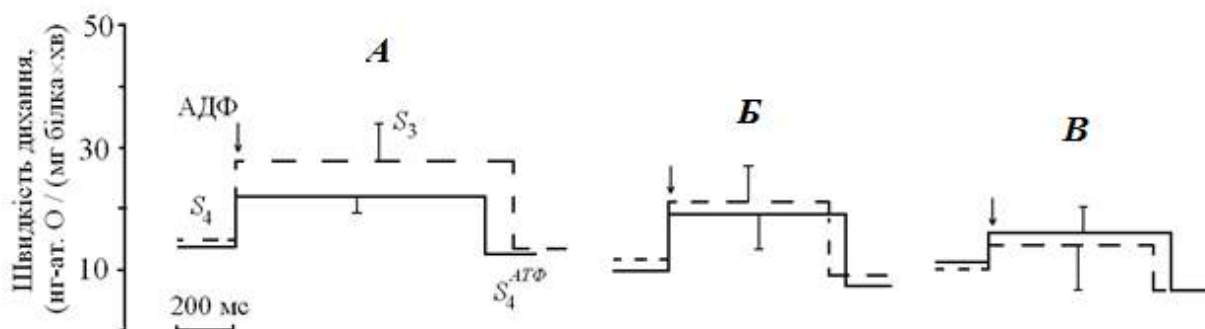


Рис. 3.3. Вплив додавання еозину Y до розчину в полярографічній комірці на споживання кисню гомогенатом печінки щурів за окислення сукцинату (A), пірувату (B) та  $\alpha$ -кетоглутарату (B): штрихова лінія – контроль, суцільна лінія – дослід (у комірку одночасно з гомогенатом вносили розчин еозину Y у концентрації 20 мкмоль/л); стан  $S_4$  – у комірку з екзогенними субстратами вносили 100 мкл гомогенату; стан  $S_3$  встановлюється після додавання екзогенного АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; [ротенон]=10 мкмоль/л, [ТТФА]=10 мкмоль/л, [субстратів] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, n=6

Аналізуючи отримані результати, ми зробили висновок, що інгібування  $Ca^{2+}$ -помп ендоплазматичного ретикулу та плазматичної мембрани еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л не впливає на енергетичні процеси у печінці щурів за активації ФАД- та НАД- залежних шляхів окиснення субстратів.

Механізми взаємозв'язку між ендоплазматичним ретикуломом і мітохондріями до сьогоднішнього дня залишаються дискусійними. Проте ні у кого не викликає сумнівів, що такий зв'язок наявний. Мітохондрії є близько розташованими до місць вивільнення  $Ca^{2+}$  із ендоплазматичного ретикулу,

тому можуть конкурувати з  $\text{Ca}^{2+}$ -помпами ендоплазматичного ретикулу у зменшенні цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [170]. Це, властиво, і лежить в основі функціонального (фізіологічного) зв'язку між цими двома органелами.

Таблиця 3.2

Показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів при додаванні еозину Y у полярографічну комірку ( $M \pm m$ ;  $n=3$ )

	АДФ/О, мкмоль/л АДФ/ нг-ат О		Vf, мкмоль/л АДФ/ мг білка		Tf, с	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
сукцинат	0,68±0,99	0,80±0,13	18,7±4,29	18,6±4,11	861±291	745±137
піруват	1,11±0,03	1,25±0,10	24,1±4,02	24,0±4,74	499±85,0	551±149
$\alpha$ -кето- глутарат	1,78±0,37	1,24±0,14	22,9±13,2	20,8±2,79	541±182	592±61,9

Наступним нашим завданням було з'ясувати роль різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем ендоплазматичного ретикулу в реалізації ендоплазматично-мітохондріального зв'язку. Слід взяти до уваги те, що лише частина мітохондріальної поверхні перебуває в тісному контакті (є колокалізованою) з ендоплазматичним ретикулом [231]. Не відомо також, які  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортні системи наявні у колокалізованих мембранах цих органел, зокрема у мембрані ендоплазматичного ретикулу –  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі чи ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали чи, можливо,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи. На жаль, прямих методів, які б дали змогу встановити це, поки що не існує.

Крім цього, зростання  $[\text{Ca}^{2+}]$  у місцях контакту мітохондрій з ендоплазматичним ретикулом має бути достатньою для активації уніпортера мітохондрій і мітохондріальних  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ, які активуються  $\text{Ca}^{2+}$  у мікромольних концентраціях [79]. Цілком можливо, що інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулу, навіть якщо вона наявна у



колокалізованих із мітохондріями мембранах, є недостатньою, щоб активувати ці процеси.

Для з'ясування цього припущення потрібно провести дослідження, використовуючи інші специфічні модулятори  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій. Оскільки існує припущення, що еозин Y може пригнічувати активність і  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій гладеньком'язових клітин матки [13].

Очевидно, інгібування не збільшує рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  до величин, необхідних для активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ у матриксі мітохондрій, або у місцях контакту зовнішньої мембрани мітохондрій з мембраною ендоплазматичного ретикулуму відсутня  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ендоплазматичного ретикулуму, як це було показано на фібробластах щурів [100].

**Підсумок.** Інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л не зумовлює змін енергетичних процесів у печінці щурів за активації як ФАД-, так і НАД-залежних шляхів окиснення субстратів.

1. Купиняк Н.І., Іккерт О.І., Манько В.В. Інгібітор транспортувальних  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз еозин Y не впливає на дихання і окисне фосфорилування у печінці щура // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2013. Вип. 61. С. 180–188.
21. Мацяк Н.І. (Купиняк Н.І.), Іккерт О.В., Манько В.В. Інгібітор  $\text{Ca}^{2+}$ -помп еозин Y не впливає на енергетичні процеси у печінці щурів // Матеріали II конференції молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму» (8–9 жовтня 2012 р., Київ). Фізіол. журн., 2012, Т. 58, № 6. С.109.
2. Мацяк (Купиняк) Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Дихання мітохондрій гепатоцитів за перфузії печінки блокатором  $\text{Ca}^{2+}$ -помп еозином Y // Матеріали V симпозіуму “Особливості формування та становлення психофізіологічних функцій людини у онтогенезі”, присвячені 75 річчю з дня народження проф. М.В. Макаренка (21–22 травня 2012, Черкаси). Черкаси, 2012. С. 61.

3. Matsyakh (Kupynyak) N.I., Ikkert O.V., Manko V.V. The inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-pump eosin Y doesn't influence on influence on energy processes in the rats liver // II Scientific conference of young physiologist "Physiology: from molecules to the body" (8–9 october 2012, Kyiv). Kyiv, 2012. P. 55.

### 3.2. Вплив ІФ<sub>3</sub> на енергетичні процеси у пермеабілізованих гепатоцитах

Відомо, що мітохондрії модулюють вивільнення Ca<sup>2+</sup> з ендоплазматичного ретикулуму, поглинаючи цитозольний Ca<sup>2+</sup> і, таким чином, пригнічують позитивний зворотний вплив його на ІФ<sub>3</sub>-чутливі Ca<sup>2+</sup>-канали у пермеабілізованих гепатоцитах. У свою чергу акумуляція у мітохондріях Ca<sup>2+</sup> може змінювати їхній функціональний стан [35]. Дані щодо ролі ІФ<sub>3</sub>-чутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів у підтриманні 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<sub>3</sub> у концентрації 2 мкмоль/л.

В результаті досліджень показано, що споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за активації ІФ<sub>3</sub>-чутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів ІФ<sub>3</sub> було вищим за окиснення НАД-залежних субстратів: пірувату – на 22,8 % (P≤0,05), а α-кетоглутарату – на 56,6 % (P≤0,01) (рис 3.4). Показники дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату під впливом ІФ<sub>3</sub> змін не зазнавали (рис 3.4).

Отже, така інтенсифікація дихання пермеабілізованих гепатоцитів, пов'язана з активацією ІФ<sub>3</sub>-чутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів, що супроводжується вивільненням Ca<sup>2+</sup> з ендоплазматичного ретикулуму та акумуляцією їх мітохондріями [17].

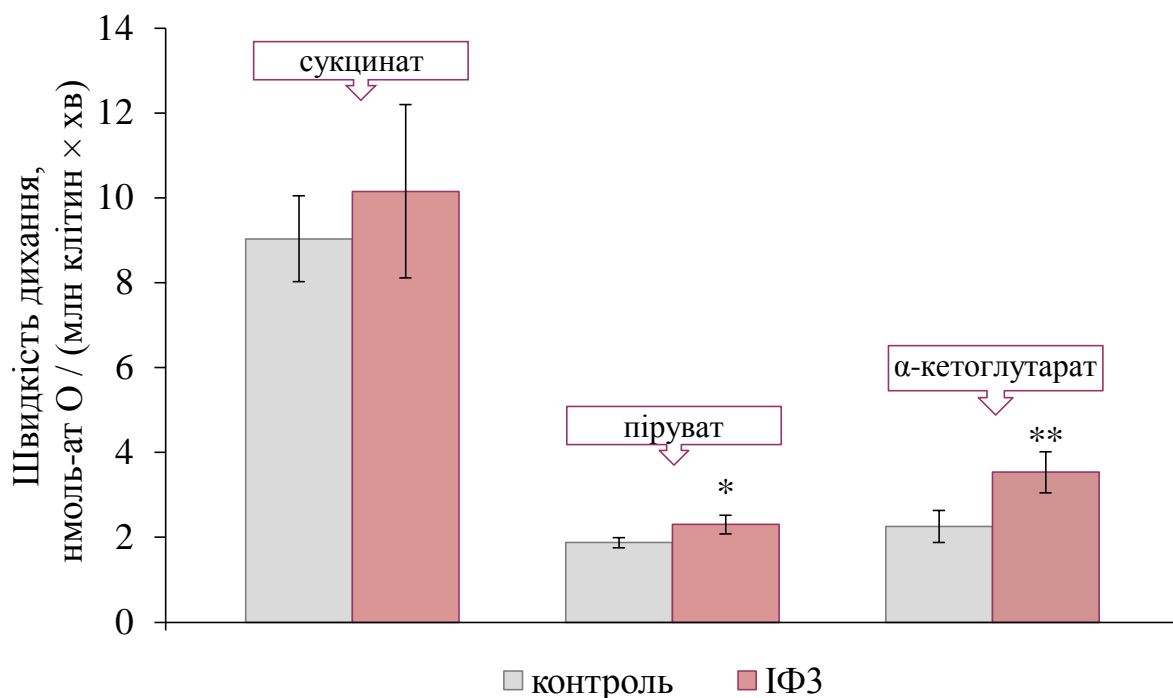


Рис. 3.4. Вплив ІФ<sub>3</sub> на споживання кисню пермеабілізованих гепатоцитів печінки щура: у досліді до полярографічної комірки з базовим позаклітинним розчином вносили суспензію клітин, а потім ІФ<sub>3</sub> у концентрації 2 мкмоль/л; за окиснення сукцинату, пірувату та α-кетоглутарату: [субстратів] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 0,75 ммоль/л; статистично вірогідна різниця відносно контролю \* – P ≤ 0,05, \*\* – P ≤ 0,01, n=5

Є два різні ефекти збільшення  $[Ca^{2+}]_m$  внаслідок акумуляції  $Ca^{2+}$  мітохондріями. Перший з це активація трьох  $Ca^{2+}$ -залежних ферментів циклу ЦТК – піруватдегідрогеназного комплексу, α-кетоглутаратдегідрогеназного комплексу та ізоцитратдегідрогенази [163]. Регуляція піруватдегідрогеназного комплексу  $Ca^{2+}$  здійснюється шляхом інгібування активної (дефосфорильованої форми) піруватдегідрогенази продуктами її реакції – ацетил-СоА та НАДН; внаслідок взаємоперетворення активної (дефосфорильованої) і неактивної (фосфорильованої) форми піруватдегідрогенази, які каталізуються регуляторними ферментами протеїнкіназою піруватдегідрогенази та протеїнфосфатазою. Фосфатаза відновлює активність піруватдегідрогеназного

комплексу унаслідок його дефосфорилування за участю іонів  $\text{Ca}^{2+}$  [86, 282]. Тоді як  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс та ізоцитратдегідрогеназу іони  $\text{Ca}^{2+}$  активують шляхом модуляції афінності ферменту до  $\alpha$ -кетоглутарату [221] та безпосереднього зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з ферментним комплексом [116, 163]. Цей перший шлях збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  внаслідок акумуляції мітохондріями  $\text{Ca}^{2+}$  вивільненого з ЕПР є найбільш ефективним, та приводить до посиленого синтезу АТФ [134]. Другий механізм впливу  $\text{Ca}^{2+}$  сигналізації на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями пов'язаний з змінами  $[\text{Ca}^{2+}]$  в ЕПР, які залежать від чутливості (афінності)  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів до  $\text{Ca}^{2+}$  (тобто, модуляція процесу вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕПР самим  $\text{Ca}^{2+}$ ) та  $\text{Ca}^{2+}$ -ємністю самих близько розташованих мітохондрій. Мітохондрії, які неподалік розташовані до ЕПР, акумулюють  $\text{Ca}^{2+}$  і таким чином модулюють амплітуду та кінетику  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів, які надходять з ЕПР через  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ( $\text{Ca}^{2+}$ -паффи) [198].

Цей механізм досліджено у пермеабілізованих гепатоцитах. Показано, що вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕПР, спричинене субмаксимальним  $\text{I}\Phi_3$ , посилюється при блокуванні акумулюванні  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії [112]. Окрім цього, цей ефект посилювався у місцях з меншою кількістю мітохондрій порівняно з ефектом, який отримували у пермеабілізованих гепатоцитах з високою щільністю мітохондрій [112]. Ці дані трактувалися як доказ того, що акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями пригнічує місцеві позитивні ефекти зворотного зв'язку впливу  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, але це також буде залежати від ефективності поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями [112, 198].

Очевидно, що інтенсифікація дихання пермеабілізованих гепатоцитів під впливом екзогенного  $\text{I}\Phi_3$  за окиснення пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату відбувається шляхом активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ферментів ЦТК – піруватдегідрогеназного комплексу,  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу і, як наслідок, посилення енергетичних процесів у пермеабілізованих гепатоцитах.

**Підсумок.**  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ендоплазматичного ретикулуму дійсно беруть участь у регуляції певного рівня клітинного дихання за окиснення

субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ.

1. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Вплив  $\text{I}\Phi_3$  на енергетичні процеси у пермеабілізованих гепатоцитах // Міжнародна наукова конференція «Механізми функціонування фізіологічних систем» (15–17 жовтня 2014 р., Львів): збірник тез. Львів, 2014. 54 с.
2. Купиняк Н., Мазур Г., Колтун О.І., Іккерт О., Манько В. Поглинання кисню мітохондріями гепатоцитів щурів за дії модуляторів  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (20 – 23 квітня 2015 р., Львів): збірник тез. Львів, 2015. С. 470–471.

### 3.3. Ідентифікація mRyRs

#### 3.3.1. Ефекти ріанодину на мембранний потенціал ізольованих мітохондрій печінки

Раніше вважали, що RyRs локалізовані лише в ендоплазматичному ретикулумі, однак пізніше була показана наявність mRyRs – у мітохондріях кардіоміоцитів та нейронів смугастого тіла [52, 128]. Цілком можливо, mRyRs дещо відрізняються від ендоплазматичних чутливістю до фармакологічних препаратів чи фізіологічно-активних речовин. Зокрема, максимальна активність mRyRs серця спостерігали за 10 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, а їхнє повне інгібування – за 0,1–1 ммоль/л [33].

Надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії може змінювати інтенсивність дихання мітохондрій з одного боку, а з іншого – впливати на мембранний потенціал мітохондрій. Нашим завданням було дослідити дію ріанодину на інтенсивність флуоресценції потенціалчутливого зонда TMRM.

Інтактність отриманих ізольованих мітохондрій можна оцінити, додаючи до середовища протоніофор, зокрема CCCP. З'ясувалося, що за присутності сукцинату CCCP спричинив швидке зменшення флуоресценції TMRM, що свідчить про поляризацію внутрішньої мембрани мітохондрій, а отже їхню функціональну активність (рис. 3.5).

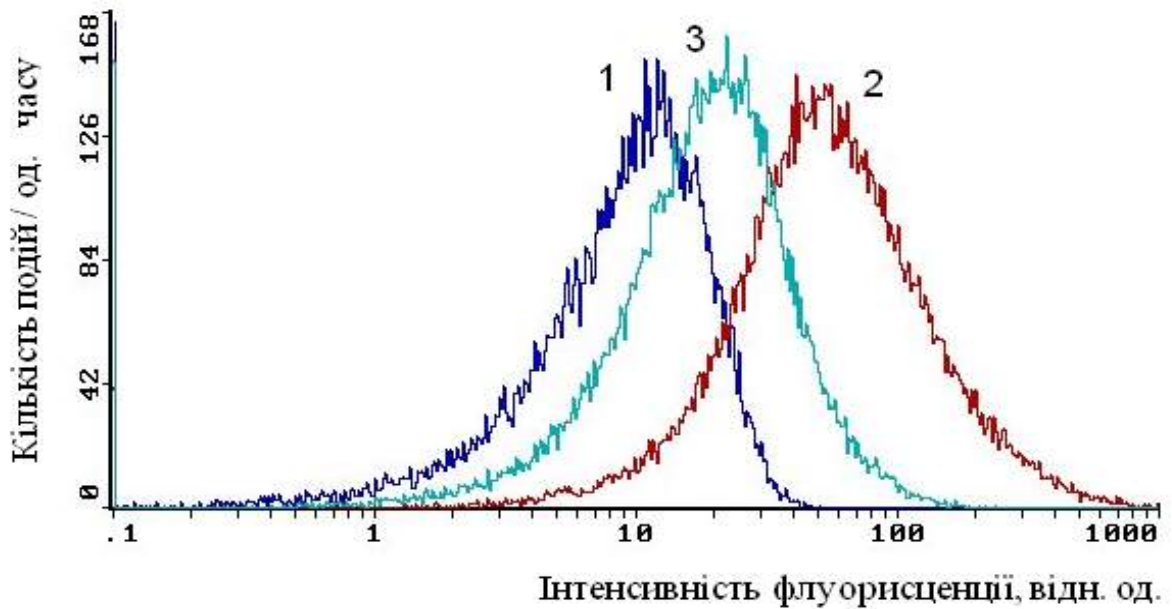
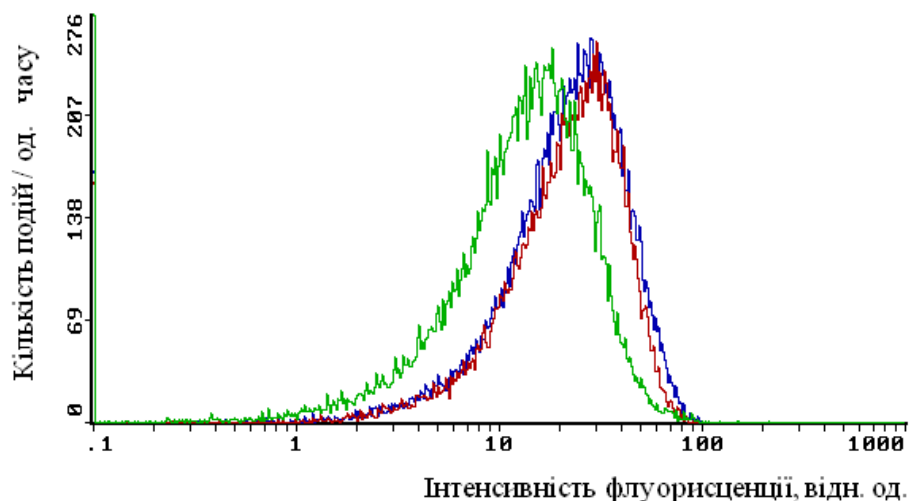


Рис. 3.5. Зміни інтенсивності флуоресценції мітохондрій: 1 – аутофлуоресценція, 2 – після навантаження 100 нмоль/л TMRM, 3 – після додавання 1 мкмоль/л CCCP; [АДФ] – 200 мкмоль/л,  $[Ca^{2+}]$  – 100 мкмоль/л; як субстрат окиснення використовували сукцинат (5 ммоль/л)

Величина мембранного потенціалу ізольованих мітохондрій залежить від екзогенного субстрату окиснення (рис. 3.6, 3.7). Зокрема, після 3 хв інкубації навантажених зондом мітохондрій у середовищі з сукцинатом відносні значення мембранного потенціалу мітохондрій були вищі, ніж за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, на 62,4 % (рис. 3.6, А і рис 3.7). Різниця між відносними значеннями мембранного потенціалу мітохондрій за окиснення пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату становила 57,9 %.



*A*



*B*

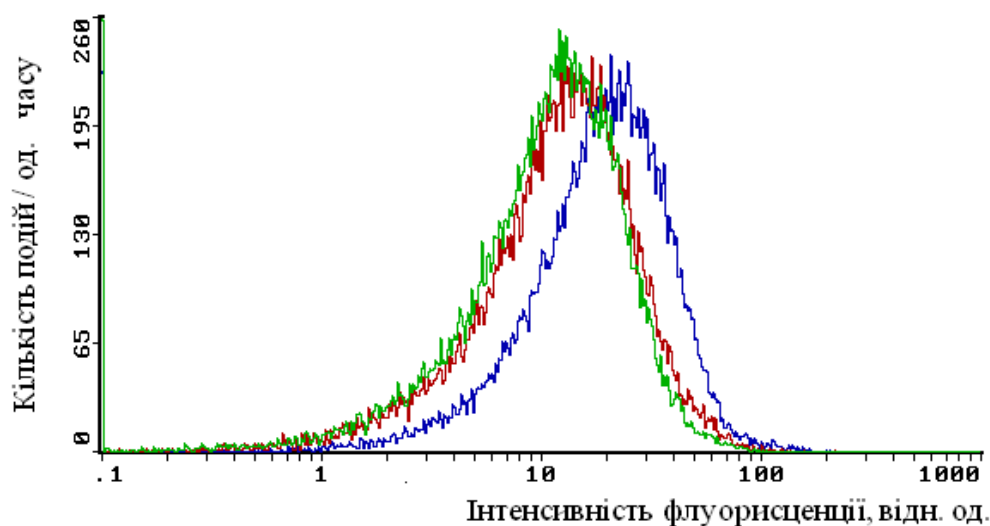


Рис. 3.6. Залежність мембранного потенціалу мітохондрій від наявності у середовищі субстрату окиснення – сукцинату, пірувату або  $\alpha$ -кетоглутарату: *A* і *B* – типові гістограми зміни інтенсивності флуоресценції TMRM на 3 і 5 хв інкубації відповідно (синя лінія – сукцинат, червона лінія – пірувату, зелена лінія –  $\alpha$ -кетоглутарат)

Після 5 хв інкубації мітохондрій з TMRM абсолютні значення флуоресценції дещо зменшувалися, але різниця між відносними значеннями мембранного потенціалу мітохондрій за окиснення різних субстратів навіть зростала. Так, відносні значення мембранного потенціалу мітохондрій за окиснення сукцинату були вище порівняно з таким за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату

на 79,0 %, а за окиснення пірувату – на 41,1 % (рис. 3.6, *Б* і рис. 3.7). Різниця між відносними значеннями мембранного потенціалу мітохондрій за окиснення пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату становила 65,4 % (рис. 3.7). Така залежність величини мембранного потенціалу від субстрату окиснення добре узгоджується із даними інших авторів. Відомо, що власне за окиснення сукцинату і значення мембранного потенціалу мітохондрій [26], і швидкість дихання [57] є найвищими.

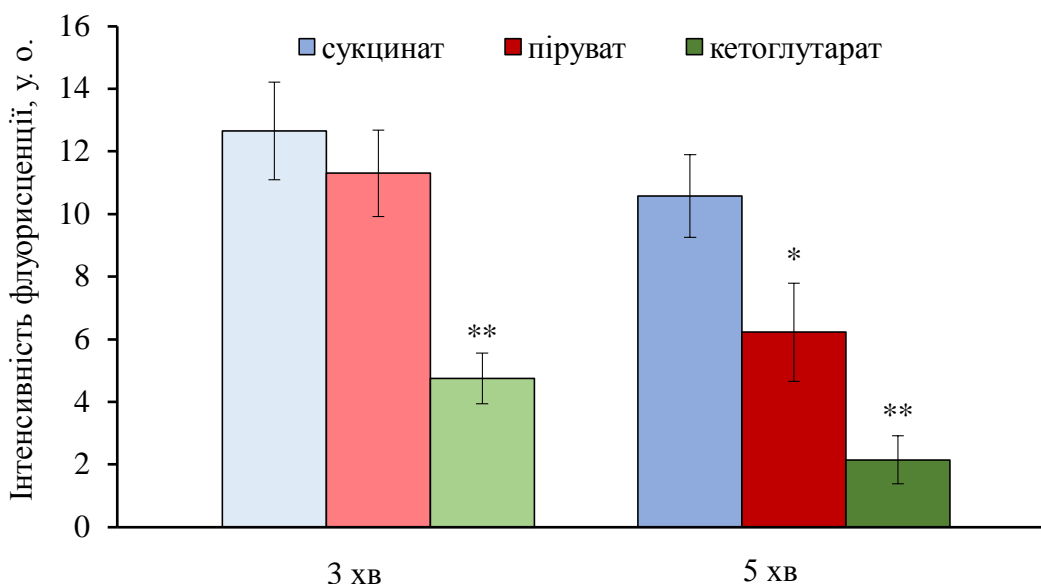


Рис. 3.7. Величина трансмембранного потенціалу мітохондрій без впливу ріанодину на 3 і 5 хв інкубації за окиснення сукцинату, пірувату або  $\alpha$ -кетоглутарату; [АДФ] – 200 мкмоль/л,  $[Ca^{2+}]$  – 100 мкмоль/л; \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ ,  $n = 4$

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  $\alpha$ -кетоглутарату (рис. 3.8, *А* і *В*). За окиснення пірувату ріанодин у концентрації 0,1 спричинив зниження відносних значень мембранного потенціалу мітохондрій після 3 хв інкубації на 51,7 % (рис. 3.8, *Б*).

Деяко 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  $\alpha$ -кетоглутарату ріанодин у концентрації 0,05 мкмоль/л спричиняв збільшення відносних значень мембранного потенціалу мітохондрій на 116,2 % ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 4$ ).

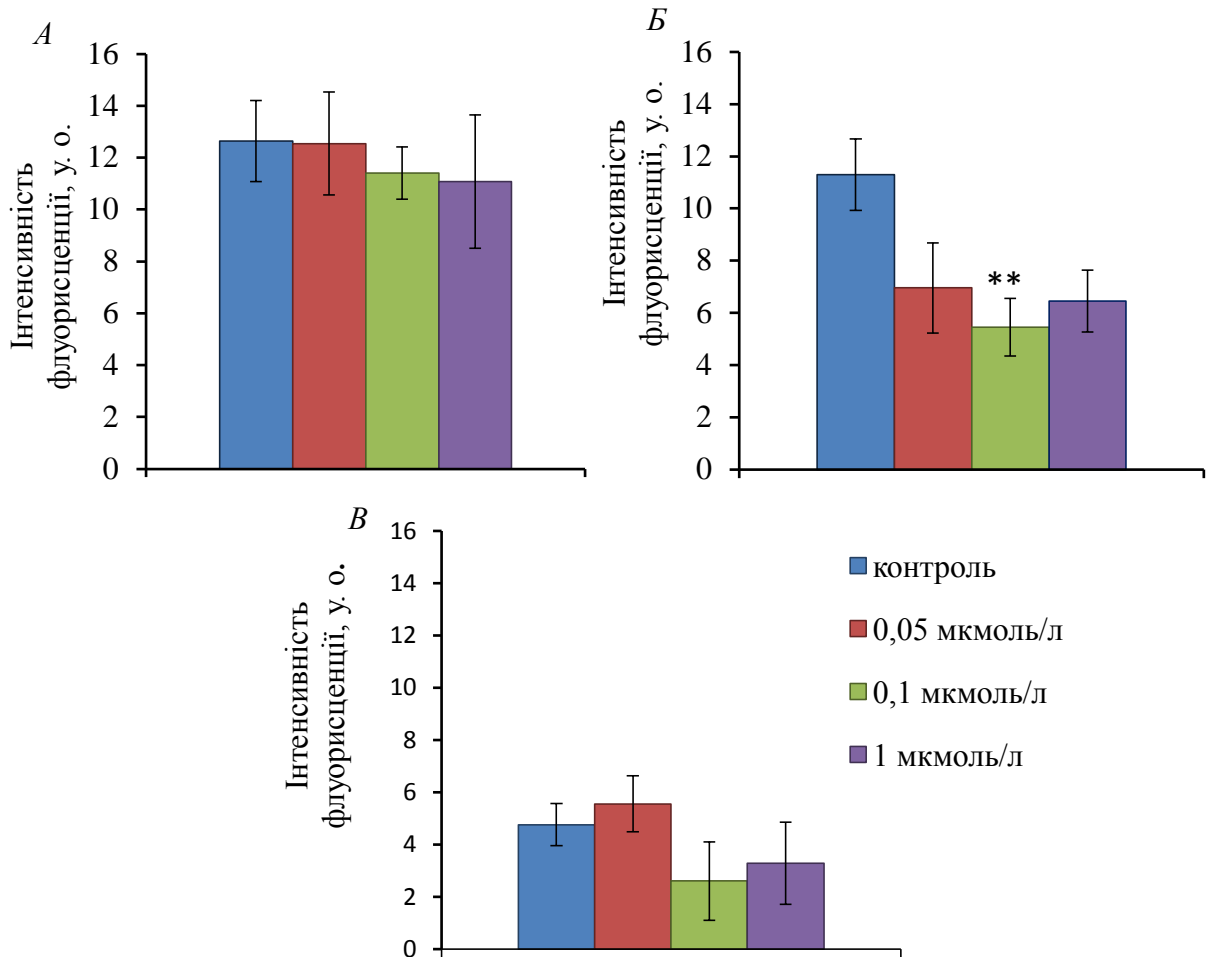


Рис. 3.8. Мембранний потенціал мітохондрій під впливом ріанодину (0,05, 0,1, 1 мкмоль/л), за окиснення сукцинату (A), пірувату (B),  $\alpha$ -кетоглутарату (B) після 3 хв інкубації: концентрація кожного з субстратів окиснення становила 5 ммоль/л, [АДФ] – 200 мкмоль/л,  $[Ca^{2+}]$  – 100 мкмоль/л; контролем вважали інтенсивність флуоресценції TMRM в ізольованих мітохондріях за відсутності ріанодину; \*\* –  $P \leq 0,01$ ,  $n = 4$

Отже, чутливість мембранного потенціалу мітохондрій гепатоцитів щурів до ріанодину після 3 (за окиснення пірувату) і 5 (за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату)

хв інкубації свідчать про наявність mRyRs у їхній мембрані [142, 143].

### 3.3.2. Вплив ріанодину на рівень $\text{Ca}^{2+}$ в ізольованих мітохондріях

На електрофоретичне транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій використовується енергія протонного градієнта, 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  $\text{Ca}^{2+}$ , тому активація mRyRs може спричинити і зростання мембранного потенціалу. Який варіант реалізується за дії ріанодину у досліджуваних концентраціях? Відповісти на ці питання неможливо, якщо не з'ясувати, як впливає ріанодин на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій.

У подальших дослідженнях реєстрували концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях печінки за умови інкубації з різними субстратами окиснення та вплив на цей показник ріанодину. Виявилось, що концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій печінки залежить від субстрату окиснення (рис. 3.9). Найвища концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  спостерігалась за наявності сукцинату –  $764 \pm 61,6$  нмоль/л ( $n = 3$ ). За наявності пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила  $68,8 \pm 3,31$  і  $162 \pm 12,4$  нмоль/л ( $n = 3$ ) відповідно. Це повністю узгоджується як з даними літератури [26], так і результатами наших попередніх досліджень стосовно значення мембранного потенціалу мітохондрій за окиснення різних субстратів (див. рис. 3.6, 3.7): чим вище значення мембранного потенціалу мітохондрій, тим вищою є їхня здатність акумулювати  $\text{Ca}^{2+}$ .

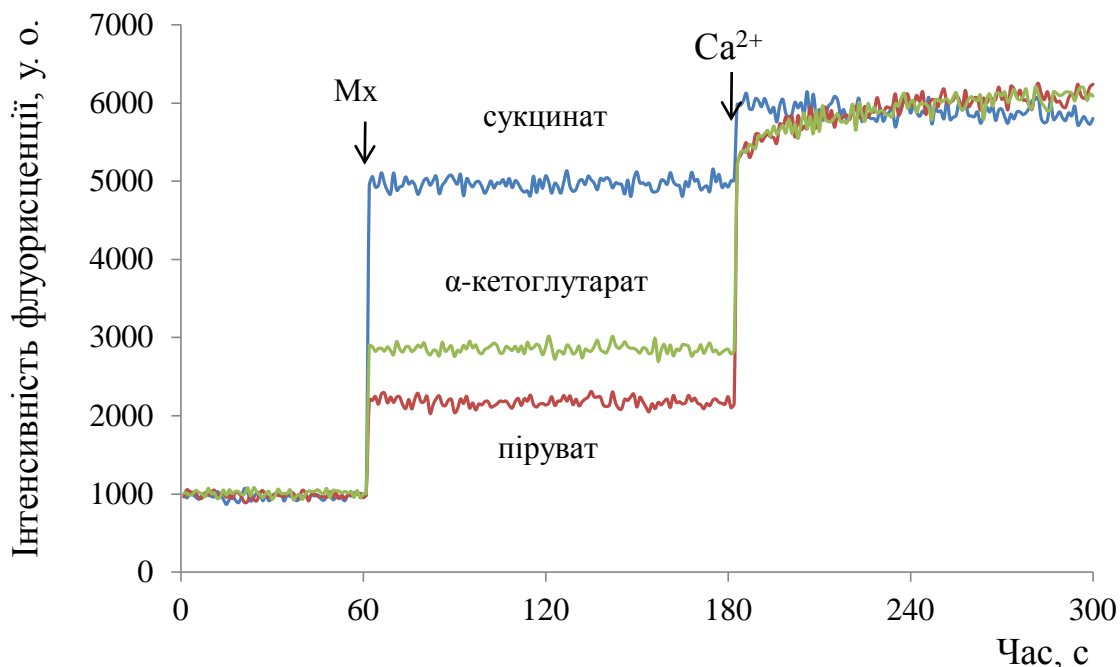


Рис. 3.9. Типовий запис змін інтенсивності флуоресценції зонда Fluo-4 в мітохондріях у часі при внесенні в середовище інкубації мітохондрій та 100 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  за наявності різних субстратів окиснення

Після додавання екзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  (100 мкмоль/л) у всіх випадках концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях збільшилася практично до того і самого рівня – за окиснення сукцинату до  $2725 \pm 129$  нмоль/л ( $n = 3$ ), за окиснення пірувату – до  $2812 \pm 210$  нмоль/л, ( $n = 3$ ), а за окислення  $\alpha$ -кетоглутарату – до  $3304 \pm 752$  ( $n = 3$ ).

Ріанодин у концентрації 0,05 мкмоль/л за окиснення сукцинату призвів до зменшення  $\text{Ca}^{2+}$ -активованої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях печінки на 12,7 % (рис. 3.10, А). За інших концентрацій ріанодину статистично достовірних змін концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  не зареєстровано. За окиснення пірувату ріанодин в концентраціях 0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л знижував  $\text{Ca}^{2+}$ -активовану концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій на 21,8, 21,9 та 31,2 % відповідно (рис. 3.10, В). За наявності у середовищі  $\alpha$ -кетоглутарату статистично достовірних змін не зареєстровано внаслідок значної дисперсії отриманих результатів (рис. 3.10, В);

такий розкид даних, на нашу думку, пов'язаний з інваріантністю мітохондрій і є неметодичного походження.

Відмінність в акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями за окиснення різних субстратів полягає у тому, що піруват та  $\alpha$ -кетоглутарат є субстратами  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ циклу трикарбонових кислот (піруватдегідрогеназного та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів); сукцинатдегідрогеназа, на відміну від цього, не є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним ферментом.

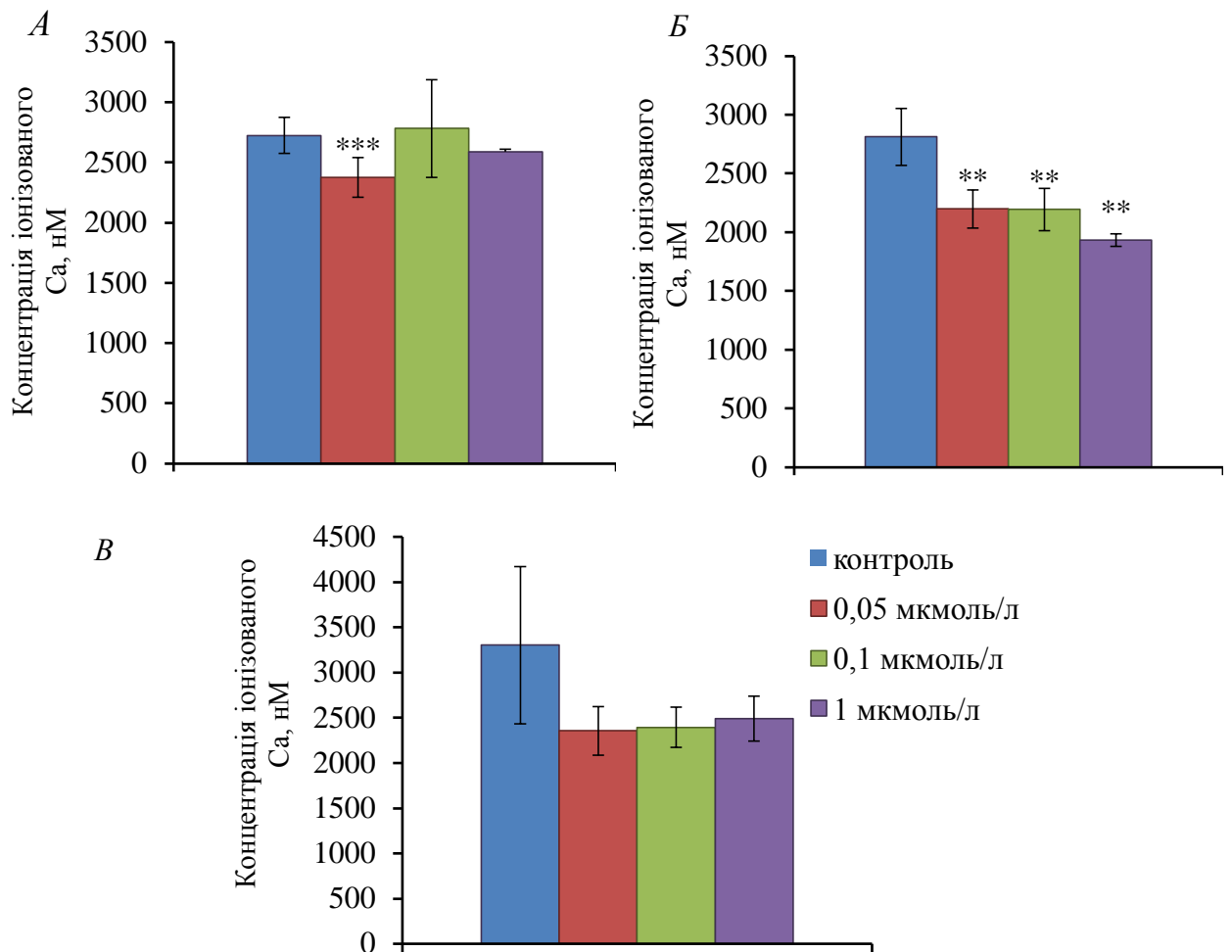


Рис. 3.10. Зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях під впливом ріанодину (0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л) за окиснення сукцинату (A), пірувату (B) та  $\alpha$ -кетоглутарату (B): контролем вважали  $[\text{Ca}^{2+}]$  в матриці мітохондрій за відсутності ріанодину; концентрація кожного з субстратів становила 5 ммоль/л; кінцева  $[\text{Ca}^{2+}]$  у середовищі 100 мкмоль/л; \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ,  $n=3$

Отже, проведені нами дослідження переконливо свідчать, що у мембрані мітохондрій наявні mRuRs (рис. 3.11). За їхньої активації (цілком можливо, цитозольним  $\text{Ca}^{2+}$ ) величина протонного градієнта зменшується, оскільки його енергія використовується на електрофоретичне транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій. Фактично, це первинне зменшення протонного градієнта є миттєвим (первинним) і не визначається фізико-хімічними властивостями  $\text{Ca}^{2+}$ . У другу фазу зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій опосередковано через підвищення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ (піруватдегідрогеназного і  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів чи НАД-ізоцитратдегідрогенази) інтенсифікує процеси мітохондріального дихання та збільшення протонного градієнта. У свою чергу, за рахунок зворотного позитивного зв'язку збільшення протонного градієнта посилює процеси акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій. Обмежується цей процес наявністю негативного зворотного зв'язку між величиною протонного градієнта і процесами мітохондріального дихання [142, 143].

Друга фаза є виключно  $\text{Ca}^{2+}$ -залежною і виявляється у досліді лише за окиснення субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ. Причому є відмінність як між величинами протонного градієнта, так і кількостями акумульованого  $\text{Ca}^{2+}$  за присутності у середовищі пірувату чи  $\alpha$ -кетоглутарату. Це зумовлено різними механізмами регуляції іонами  $\text{Ca}^{2+}$  цих ензимів [57, 79].

Регулювання активності піруватдегідрогеназного комплексу, який складається з трьох ензимів є складним процесом. Катіони  $\text{Ca}^{2+}$  активують фосфатазу та інгібують кіназу цього комплексу. Коли комплекс фосфорильований, тоді відбувається перетворення піруватдегідрогеназного комплексу з неактивного в активний стан [77]. Щодо  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу, то іони  $\text{Ca}^{2+}$  мають безпосередній вплив на нього за рахунок зниження значення  $K_m$  для субстрату [79].

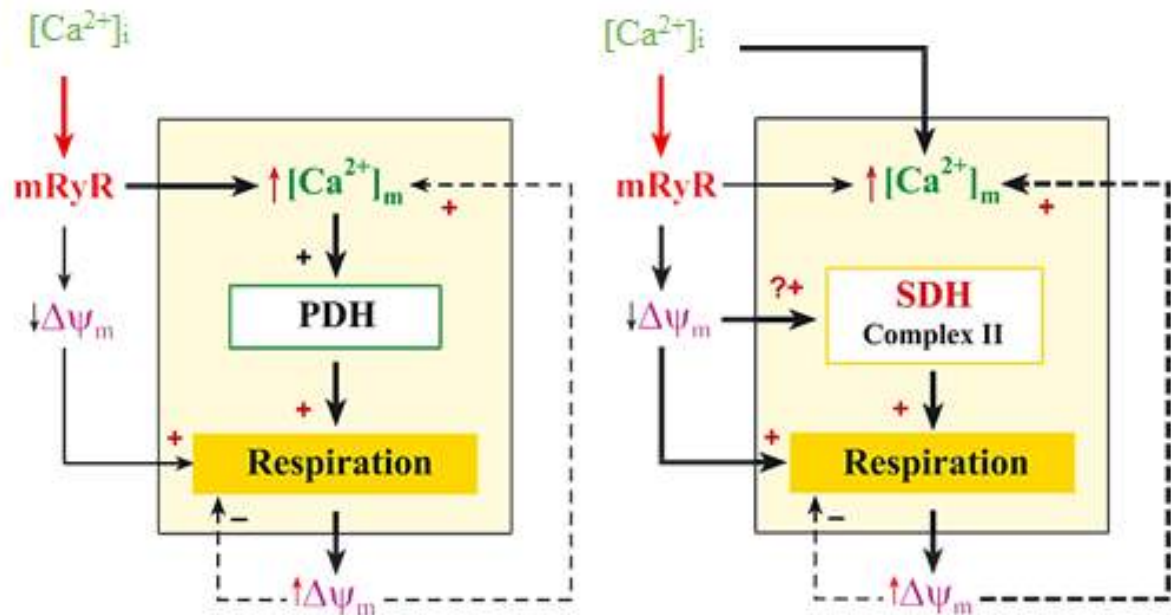


Рис. 3.11. Інгибування mRyRs в гепатоцитах щурів з піруватом (ліва сторона) та з сукцинатом як субстрати окиснення (праворуч сторона): у цій схемі представлено  $[Ca^{2+}]_i$  – внутрішньоклітинна концентрація  $Ca^{2+}$ ,  $[Ca^{2+}]_m$  – концентрація  $Ca^{2+}$  у мітохондріальному матриксі,  $\Delta\psi_m$  – мембранний потенціал мітохондрій. PDH – піруватдегідрогеназний комплекс; SDH – сукцинатдегідрогеназа (комплекс II дихального ланцюга); Respiration – дихання мітохондрій; безперервна лінія означає прямий вплив і пунктирна лінія – вплив за принципом зворотнього зв'язку

**Підсумок.** У гепатоцитах печінки щура наявні mRyRs, які на відміну RyRs ендоплазматичного ретикулулу інгібуються ріанодинол у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л. Інгибування mRyRs супроводжується зменшення внутрішньомітохондріальної концентрації іонізованого  $Ca^{2+}$ , що у свою чергу негативно відображається на енергетичних процесах гепатоцитів.

1. Kupynyak N.I., Ikkert O.V., Shlykov S.G., Babich L.G., Manko V.V. Mitochondrial ryanodine-sensitive  $Ca^{2+}$  channels of rat liver // Cell Biochemistry and Function. 2017. Vol. 35(1). P. 42–49.



22. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В.. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій печінки щура за дії ріанодину // Матеріали ХІХ-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.
2. Курунуак N.I., Ikkert O.V., Shlykov S.G., Babich L.G., Manko V.V. Effect of ryanodine on membrane potential of rat liver mitochondria // Conference for Young Scientists “Today’s challenges in molecular and cell biology” (21–25 september 2015). Abstract book. Kyiv, 2015. P. 140.

### 3.4. Роль mRyRs у регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за різних субстратів та позамітохондріальної концентрації $\text{Ca}^{2+}$

#### 3.4.1. Дихання ізольованих мітохондрій за дії ріанодину з різною тривалістю преінкубації

Для визначення ролі mRyRs у процесах мітохондріального дихання отриману суспензію мітохондрій преінкубували з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л за 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 за окиснення сукцинату відбувається зниження споживання кисню тільки у стані  $S_4^{ATP}$  – на 22,8 % (рис. 3.12, А). На відміну від цього, після преінкубації 10 хв спостерігали зниження дихання за окиснення сукцинату у станах  $S_4$  (на 41,2 %) та  $S_3$  (на 38,8 %).  $S_4^{ATP}$  – (на 44,3 %,).

За окиснення пірувату 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. 3.12, Б). Після преінкубації упродовж 10 хв спостерігали зменшення споживання кисню мітохондріями у трьох станах –  $S_4$  (на 40,8 %),  $S_3$  (на 44,9 %) та  $S_4^{ATP}$  (на 41,4 %).

Показано, що чутливість  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до  $\text{Ca}^{2+}$  є трохи вищою, ніж чутливість піруватдегідрогеназного комплексу. Так, у своїй роботі Дентон [76] наводить дані, що активність  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу зростає зі збільшенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  вже від 0,001 мкмоль/л (хоча до тих самих 0,1 мкмоль/л, що й активність піруватдегідрогеназного комплексу). За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату статистично достовірних змін швидкості дихання після преінкубації з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л нами не зареєстровано (рис. 3.12, В).

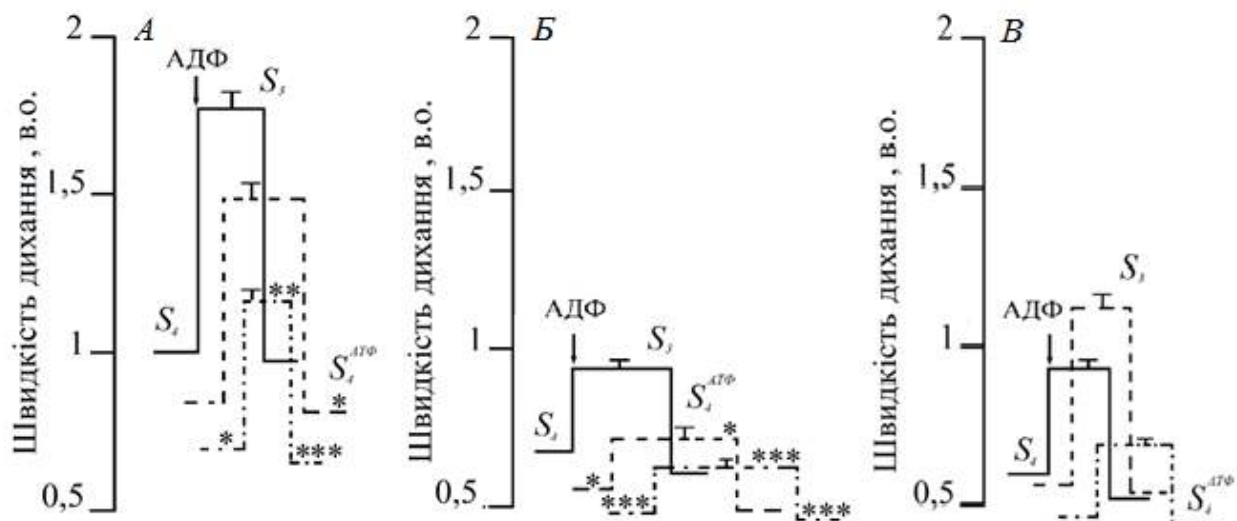


Рис. 3.12. Дихання суспензії мітохондрій преінкубованих з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л за окиснення сукцинату (А), пірувату (Б) та  $\alpha$ -кетоглутарату (В): — контроль, - - - 5 хв, - · - 10 хв;  $[Ca^{2+}] = 0,1$  мкмоль/л; стан  $S_4$  – у комірку з екзогенним субстратам вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан  $S_3$  – для стимуляції окисного фосфорилування додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; [сукцинат], [піруват], [ $\alpha$ -кетоглутарату] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; за одиницю взято швидкість дихання у контролі в стані  $S_4$  за окиснення сукцинату; \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ,  $n=4$

Отже, встановлено, що ріанодин у концентрації 0,05 мкмоль/л знижує споживання кисню преінкубованими мітохондріями за окиснення сукцинату за преінкубації тривалістю впродовж 10 хвилин, а за окиснення пірувату після преінкубації впродовж 5 та 10 хвилин, причому з збільшенням часу преінкубації до 10 хв зменшення споживання кисню було вираженішим [18].

### 3.4.2. Дослідження процесів мітохондріального дихання ізольованих гепатоцитів за дії ріанодину за умов різної концентрації $\text{Ca}^{2+}$ у середовищі

У цій серії дослідження ріанодин у концентрації 0,1 мкмоль/л вносили безпосередньо у полярографічну комірку до мітохондрій.

Унаслідок безпосереднього внесення ріанодину до мітохондрій у полярографічну комірку з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі 0,1 і 1 мкмоль/л за окиснення сукцинату швидкість дихання теж зменшилася у трьох станах (рис. 3.13). За концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 мкмоль/л це ріанодиніндуковане зменшення становило у стані  $S_4$  13,4 %, у стані  $S_3$  – 13,7 %, а за концентрації 1 мкмоль/л – 9,59 і 15,3 % відповідно. А ось коли концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у полярографічній комірці не задавали (умовно 0 ммоль/л), суттєвих змін у диханні мітохондрій за окиснення сукцинату під впливом ріанодину не було.

Слід зазначити, що саме по собі споживання кисню мітохондріями у станах  $S_4$  і  $S_3$  за окиснення сукцинату зростає внаслідок підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л ( $P = 0,009$  і  $0,003$  відповідно). Крім того, в середовищі з 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  дихальний контроль за Ларді (відношення швидкостей у станах  $S_3$  і  $S_4$ ) становив 1,15, а в середовищі з 1 мкмоль/л – зменшився до 1,08 (на 5,93 %,  $P = 0,048$ ; див. таблицю). Дихальний контроль за Чансом ( $S_3/S_4^{\text{ATФ}}$ ) становив 1,38, коли концентрація була 0,1 мкмоль/л, і 1,40 за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі 1 мкмоль/л. Назагал, такі низькі дихальні контролю, які спостерігаються, є свідченням роз'єднання дихання й окисного фосфорилування – у першу чергу внаслідок високої швидкості дихання у стані  $S_4$  чи  $S_4^{\text{ATФ}}$ . Збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі 1 мкмоль/л супроводжується підвищення ступеня роз'єднання дихання й окисного фосфорилування у стані  $S_4$ , але не  $S_4^{\text{ATФ}}$ . Подібну закономірність – збільшення швидкості дихання у стані  $S_4$  і відсутність змін у стані  $S_3$  внаслідок збільшення позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  від 0,1 до 1 мкмоль/л – зареєстровано за

окиснення сукцинату і на пермеабілізованих гепатоцитах щурів [23].

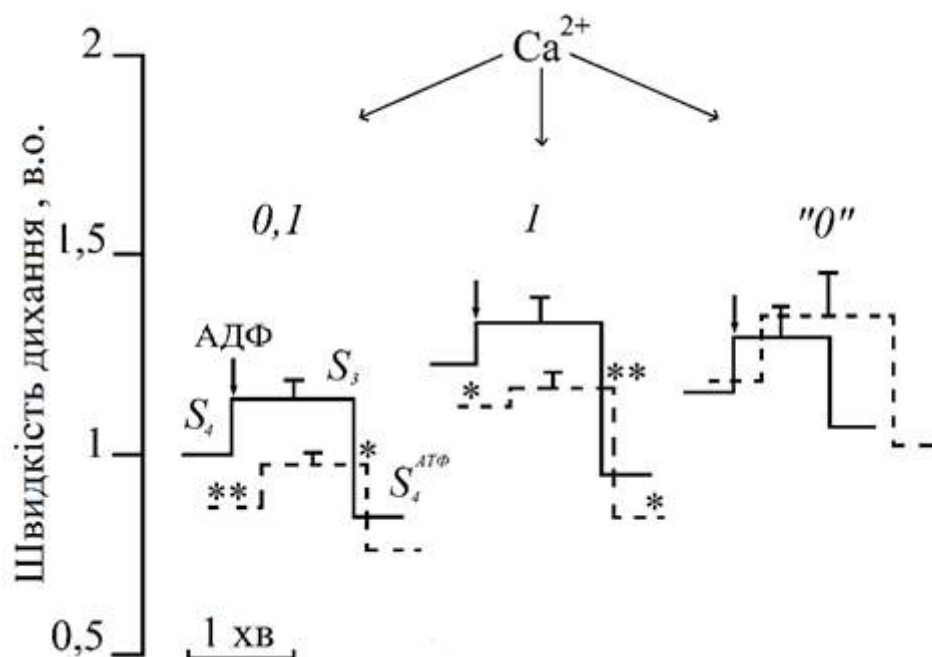


Рис. 3.13. Дихання суспензії мітохондрій за окиснення сукцинату за дії ріанодину (0,1 мкмоль/л), який додавали до полярографічної комірки у середовища з різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$ : — контроль, - - - дослід; стан  $S_4$  – у комірку з екзогенним субстратам вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан  $S_3$  – для стимуляції окисного фосфорилювання додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; [сукцинат] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; за одиницю взято швидкість дихання у контролі в стані  $S_4$ ; \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ ,  $n=4$

Внаслідок додавання ріанодину в комірку за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  дихальний контроль за Ларді не змінився, а дихальний контроль за Чансом – незначно зменшився (лише на 5,85 %,  $P = 0,015$ ; див. табл. 3.3). Коли концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі була 1 мкмоль/л, дихальний контроль ні за Ларді, ні за Чансом статистично достовірно не змінився під впливом ріанодину. З цього можна зробити висновок, що за високої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  ступінь спряженості дихання

й окисного фосфорилування внаслідок додавання ріанодину в комірку не змінюється.

Таблиця 3.3

Зміни дихальних контролів за Ларді та за Чансом унаслідок додавання ріанодину в полярографічну комірку у концентрації 0,1 мкмоль/л ( $M \pm m$ )

Субстрат окиснення	Контроль		Дослід	
	дихальний контроль за Ларді	дихальний контроль за Чансом	дихальний контроль за Ларді	дихальний контроль за Чансом
$[Ca^{2+}] = 0,1$ мкмоль/л				
Сукцинат	1,15±0,02	1,38±0,07	1,15±0,03	1,30±0,06*
Піруват	1,30±0,03	1,58±0,02	1,14±0,07	1,17±0,06*
$\alpha$ -Кетоглутарат	1,42±0,06	1,51±0,03	1,30±0,08	2,04±0,14*
$[Ca^{2+}] = 1$ мкмоль/л				
Сукцинат	1,08±0,02 <sup>#</sup>	1,40±0,06	1,01±0,02	1,34±0,07
Піруват	1,26±0,04	1,57±0,08	1,33±0,13	1,67±0,14 <sup>#</sup>
$\alpha$ -Кетоглутарат	1,24±0,05 <sup>#</sup>	1,78±0,09 <sup>#</sup>	0,92±0,03* <sup>##</sup>	1,84±0,05

**Примітка:** \* – зміни щодо контролю є статистично достовірними з  $P < 0,05$ ; # – статистично достовірна різниця між відповідними показниками за концентрації  $Ca^{2+}$  0,1 і 1 мкмол/л з  $P < 0,05$ , ## – з  $P < 0,01$ ; n = 4

Сукцинатдегідрогеназа не є  $Ca^{2+}$ -залежним ферментом [181]. Але у цих дослідженнях ми не використовували інгібітори комплексу I дихального ланцюга. Тому залежність інтенсивності сукцинатстимульованого дихання ізольованих мітохондрій від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі спричинена, мабуть, підтоком ендогенних субстратів  $Ca^{2+}$ -залежних дегідрогеназ. Цікаво, що за цих умов ріанодин знижує швидкість дихання мітохондрій як у серії з преінкубацією,

так і за безпосереднього внесення у полярографічну комірку. Мембранний потенціал мітохондрій внаслідок дії ріанодину у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л за окиснення сукцинату практично не змінювався (див. пункт 3.3.1) [142]. Трохи складнішою є залежність вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій від концентрації ріанодину: коли його концентрація становить 0,05 мкмоль/л і як субстрат окиснення використовується сукцинат, вміст акумульованого  $\text{Ca}^{2+}$  зменшується, а за вищих концентрацій – змін немає (див. пункт 3.3.2) [142]. Такий ефект ріанодину може бути спричинений лише інгібуванням mRyRs – зменшенням надходжень  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій і, відтак, пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ. Але спричинене ріанодином зниження швидкості дихання за окиснення сукцинату є незначним, тому суттєво не змінюється ні акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій, ні їхній мембранний потенціал.

За окиснення пірувату внаслідок безпосереднього внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) в полярографічну комірку з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі 0,1 мкмоль/л швидкість споживання кисню мітохондріями знижувалась у станах  $S_4$ ,  $S_3$  та  $S_4^{ATP}$  на 22,2, 32,1 та 8,2 % відповідно (рис. 3.14). Але за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  1 мкмоль/л у середовищі під впливом ріанодину спостерігали не зниження, а підвищення швидкості дихання у станах  $S_4$  та  $S_3$  – на 12,2 і 17,2 % відповідно. Коли концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі не задавали, споживання кисню мітохондріями під впливом ріанодину у стані  $S_3$  зросло на 20,0 %, а у стані  $S_4^{ATP}$  – знизилось на 24,8 %.

На відміну від дихального контролю за Ларді, дихальний контроль за Чансом зменшився внаслідок додавання ріанодину в комірку на 25,6 % ( $P = 0,014$ ; див. табл. 3.3), коли концентрація у середовищі становила 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Таке виражене зниження дихального контролю за Чансом свідчить, що mRyRs є одним з механізмів, які забезпечують спряженість процесів дихання й окисного фосфорилування за фізіологічної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

За концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  1 ммоль/л дихальні контролю під впливом ріанодину достовірно не змінювалися (див. табл. 3.3), тобто за цих умов ріанодин не змінює

ступінь спряженості дихання й окисного фосфорилування.

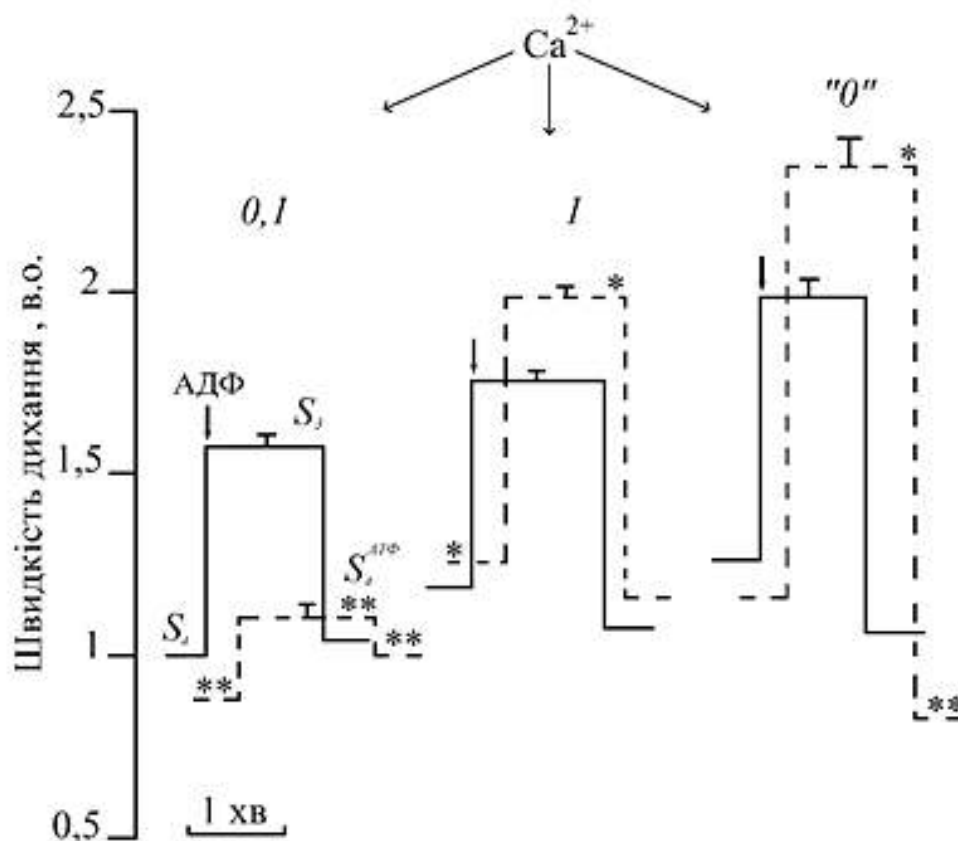


Рис. 3.14. Вплив внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) у полярографічну комірку на дихання суспензії мітохондрій у середовищі з різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  за окиснення пірувату: — контроль, - - - дослід; за одиницю взято швидкість у стані  $S_4$  за окиснення пірувату; стан  $S_4$ – у комірку з екзогенним субстратам вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан  $S_3$ – для стимуляції окисного фосфорилування додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; [піруват] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ,  $n=4$

Раніше нами встановлено, що за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі 0,1 мкмоль/л мембранний потенціал мітохондрій зменшився внаслідок дії ріанодину



(0,01 мкмоль/л; у інших концентраціях ріанодину зменшення не досягнуло першого ступеня достовірності) (див. підрозділ 3.3). Ще суттєвіше знизився вміст акумульованого в матриксі мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$  за дії ріанодину у всіх концентраціях (див. підрозділ 3.3). Тому з досить високою ймовірністю можемо стверджувати, що за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  ріанодин у концентрації 0,05 і 0,01 мкмоль/л інгібує mRyRs, що спричиняє зменшення надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, пригнічення піруватдегідрогеназного комплексу, зниження швидкості дихання і мембранного потенціалу мітохондрій. Причому зниження мембранного потенціалу не спричиняє за цих умов компенсаторного підвищення швидкості дихання. Лише за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  і 0,1 мкмоль/л ріанодину швидкість дихання зростає. Нам важко пояснити цей феномен. Цілком можливо, що ріанодин має різний ефект на mRyRs за різних концентрацій цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Або зниження мембранного потенціалу мітохондрій є настільки виражене, що включаються інші, не  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні, адаптаційні механізми, спрямовані на інтенсифікацію мітохондріального дихання.

Дентон дослідив залежність активності піруватдегідрогеназного та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів мітохондрій серця від позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [76]. Він встановив, що активність піруватдегідрогеназного комплексу зростала за збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  від 0,01 до 0,1 мкмоль/л, а за вищої концентрації – навіть трохи зменшилася [76]. Ці дані корелюють із результатами дослідження дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату [23]. Авторами встановлено, що АДФ-стимульоване дихання пермеабілізованих гепатоцитів інтенсифікувалося за збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі до 0,1 мкмоль/л. Коли ж концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 1 мкмоль/л, АДФ-стимульоване дихання, навпаки, трохи сповільнилося [23].

У зв'язку з цим ми припускаємо, що стимулюючий ефект ріанодину за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  1 мкмоль/л зумовлений обмеженням надходження цих катіонів у матрикс мітохондрій і усуненням їхнього негативного ефекту [18].

Але внаслідок додавання ріанодину (0,1 мкмоль/л) до полярографічної комірки швидкість дихання мітохондрій у різних станах змінювалася, а напрям цих змін залежав від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Якщо у середовищі концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 0,1 мкмоль/л, то ріанодин спричиняв збільшення швидкості дихання мітохондрій у стані  $S_4$  на 25,7 %, а у стані  $S_3$  – на 16,3 % (рис. 3.15). Дихальний контроль за Чансом у контролі становив 1,51, а за дії ріанодину збільшився (!) на 34,8 % ( $P = 0,030$ ; див. табл. 3.3.).

Такі зміни швидкостей дихання і дихального контролю за Чансом дають змогу припустити, що коли субстратом окиснення є  $\alpha$ -кетоглутарат, то ріанодин, обмежуючи акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі, усуває його негативний ефект на процеси дихання. Очевидно, за окиснення лише  $\alpha$ -кетоглутарату процеси дихання є менш стійкими, ніж за окиснення, наприклад, пірувату, і негативний ефект  $\text{Ca}^{2+}$  проявляється вже за концентрації 0,1 мкмоль/л. Тому, мабуть, достовірних змін мембранного потенціалу мітохондрій і вмісту в матриксі  $\text{Ca}^{2+}$  за цієї концентрації позамітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  не зареєстровано (див. пункт 3.3.1).

Коли у контролі збільшили концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  до 1 мкмоль/л, швидкість дихання мітохондрій зросла у стані  $S_4$  на 30,6 % ( $P = 0,002$ ), а у стані  $S_3$  – на 16,3 % ( $P = 0,044$ ). Тому дихальний контроль за Ларді зменшився, а за Чансом – збільшився.

За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату під впливом ріанодину швидкість дихання мітохондрій за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  зросла у стані  $S_4$  – на 19,2 %, а у стані  $S_4^{ATP}$  – знизилася на 14,6 %. Але найсуттєвішим є те, що за цих умов немає стимулюючого ефекту АДФ на швидкість дихання. У безкальцієвому середовищі споживання кисню мітохондріями внаслідок дії ріанодину зменшувалося у стані  $S_3$  на 12,9 %, а у стані  $S_4^{ATP}$  – на 14,2 % (рис. 3.15).

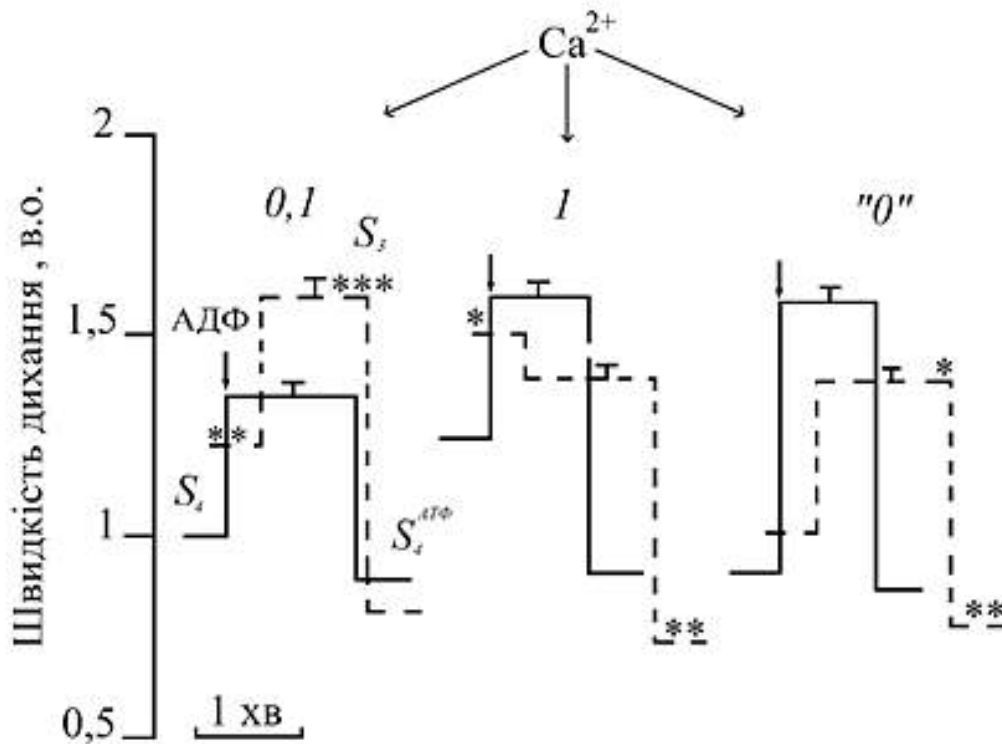


Рис. 3.15. Споживання кисню суспензії мітохондрій за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату під впливом ріанодину (0,1 мкмоль/л) доданого у полярографічну комірку до середовища з різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (— контроль, - - - дослід; за одиницю взято швидкість у стані  $S_4$  за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату); стан  $S_4-$  у комірку з екзогенним субстратам вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан  $S_3-$  для стимуляції окисного фосфорилування додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ;  $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 5$  ммоль/л,  $[\text{АДФ}] = 200$  мкмоль/л; \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ,  $n=4$

Інгібування ріанодином mRyRs може модулювати процеси дихання мітохондрій опосередковано через (1) зміну їхнього мембранного потенціалу і (2) зміну активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ та, відтак, активності дихального ланцюга. У свою чергу, між мембранним потенціалом і диханням мітохондрій наявні двосторонні зв'язки – зменшення мембранного потенціалу

інтенсифікує процеси дихання, що, у свою чергу веде до підвищення мембранного потенціалу і сповільнення дихання. Система через наявність великої кількості прямих і зворотних зв'язків є складною, тому за різних умов (різної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , використання різних субстратів окиснення, вихідного значення мембранного потенціалу мітохондрій тощо) ефекти ріанодину є різними.

Дихання ізольованих мітохондрій печінки у контролі інтенсифікується внаслідок підвищення концентрації у середовищі  $\text{Ca}^{2+}$  від 0,1 до 1 мкмоль/л за використання усіх трьох субстратів окиснення. У разі окиснення пірувату й  $\alpha$ -кетоглутарату механізм цього підвищення є зрозумілий, оскільки підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій активує піруват- і  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназні комплекси [76]. За використання сукцинату як субстрату окиснення інтенсифікація дихання внаслідок збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  від 0,1 до 1 мкмоль/л (див. рис. 3.13) спричинена, мабуть, залученням до окиснення ендогенних субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ.

Тут варто згадати, що рівень мембранного потенціалу мітохондрій печінки найвищий, коли субстратом окиснення є сукцинат (див. пункт 3.3.1). Оскільки рушійна сила транспорту катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  залежить як від їхньої концентрації у середовищі, так і від мембранного потенціалу мітохондрій, то швидкість акумуляції (як і концентрація (див. пункт 3.3.1)  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій за окиснення сукцинату є найвищою. За таких умов система стає дуже чутливою до ріанодину. Тому інтенсивність дихання знижується за дії ріанодину навіть за переважаючого окиснення сукцинату, але не настільки, щоб змінився мембранний потенціал мітохондрій.

Зниження мембранного потенціалу мітохондрій печінки та вмісту в них  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок дії ріанодину у широкому діапазоні концентрацій (від 0,05 до 1 мкмоль/л) зареєстровано лише за окиснення пірувату (див. підрозділ 3.3). І оскільки ріанодин (0,05–0,1 мкмоль/л) спричиняє значне пригнічення процесів дихання за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 мкмоль/л (див. рис. 3.14), ми можемо

стверджувати, що mRyRs є важливою ланкою зв'язку між мембранним потенціалом мітохондрій і їхнім диханням. Вилучення цієї ланки спричиняє зниження ступеня цього зв'язку та переведення енергетичного рівня мітохондрій на нижчий рівень.

На жаль, немає даних про те, як змінюються під впливом ріанодину мембранний потенціал мітохондрій печінки та вміст  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі. Тому ми не знаємо, що спричиняє ріанодиніндуковану інтенсифікацію дихання за цих умов. Ми можемо лише припустити, що ріанодиніндуковане зниження мембранного потенціалу мітохондрій за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі й окиснення пірувату настільки виражене, що запускаються інші, не спряженні з  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізацією, регуляторні зв'язки, спрямовані на інтенсифікацію дихання і відновлення мембранного потенціалу. Цілком можливо, що це відбувається на тлі обмеження надходження  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс мітохондрій і усунення їхнього негативного ефекту.

Вихідне значення мембранного потенціалу мітохондрій печінки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату є нижчим, ніж за окиснення сукцинату і пірувату (див. пункт 3.3.1). Але концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату є трохи вищою, ніж за окиснення пірувату (див. пункт 3.3.2). Тому рушійна сила транспорту катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  теж є, очевидно, найнижчою. Достовірних змін мембранного потенціалу мітохондрій унаслідок дії ріанодину за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату не зареєстровано, хоча спостерігається виражена тенденція до зниження (див. пункт 3.3.1). Дихання ж мітохондрій унаслідок додавання ріанодину в полярографічну комірку, коли концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становить 0,1 мкмоль/л, інтенсифікується (див. рис. 3.15). І ця інтенсифікація, зважаючи на трохи вищу чутливість  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до  $\text{Ca}^{2+}$  [76], нагадує таку ж інтенсифікацію за окиснення пірувату і концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  1 мкмоль/л (див. рис. 3.14). В її основі справді може лежати усунення негативного впливу катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  у надмірній кількості на процеси дихання внаслідок інгібування mRyRs.

**Підсумок.** У мітохондріях гепатоцитів mRyRs є важливою ланкою регуляторного зв'язку між значенням мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання за низьких (фізіологічних) значень позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Коли піруват є основним субстратом окиснення, mRyRs забезпечують надходження у матрикс мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$ , активацію піруватдегідрогеназного комплексу й інтенсифікацію дихання, що запобігає зменшенню мембранного потенціалу мітохондрій. Якщо ж переважає окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, надходження  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою mRyRs, навіть за фізіологічної їхньої концентрації, то призводить до пригнічення процесів дихання. За вищих концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  їхня акумуляція системою mRyRs негативно впливає на дихання за окиснення як пірувату, так і  $\alpha$ -кетоглутарату.

1. Babich L. G., Shlykov S. G., Kushnarova-Vakal A. M., Kupynyak N. I., Manko V. V., Fomin V. P., Kosterin S. O. The relationship between the ionized Ca concentration and mitochondrial functions // Ukr. Biochem. J. 2018. Vol. 90(3). P. 32–40.
2. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Роль ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у регуляції дихання мітохондрій печінки щурів // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. 2017. Вип. 76. С. 193–205.
3. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Вплив ріанодину на енергетичні процеси у печінці щурів // Матеріали XI міжнародної наукової конференції «Шевченківська весна». Секція «Біологічні науки» (18–22 березня 2013 р., Київ). Київ, 2013. 64 с.
4. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Вплив ріанодину на споживання кисню ізольованими мітохондріями печінки щурів // III Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму» (24–25 жовтня 2013 р., Київ): збірник тез. Київ, 2013. 17 с.
5. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Вплив різних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  на ефекти ріанодину у мітохондріях печінки щурів // Міжнародна наукова

конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (7–9 жовтня 2014 р., Київ): збірник тез. Київ, 2014. 92 с.

### 3.5. Енергетичні процеси у печінці щура за дії ріанодину

#### 3.5.1. Споживання кисню гомогенатом печінки після преінкубації з ріанодином у різних концентраціях

Для дослідження змін енергетичних процесів у печінці щура ми модулювали функціональну активність mRyRs та RyRs дією ріанодину у різних концентраціях.

Рослинний алкалоїд ріанодин специфічно впливає на RyRs – залежно від концентрації він або стимулює, або блокує вивільнення кальцію з ЕПР [58]. Дослідження впливу ріанодину на гомогенат серця новонароджених мишей були проведені Veutner і співавт. [51]. Ними ідентифіковано RyRs у мітохондріях кардіоміоцитів, які проявляють біохімічні, фармакологічні та функціональні властивості схожі з RyR1 у ЕПР скелетних м'язів і тому їх називають mRyR1 [51, 52]. Також встановлено зниження  $\text{Ca}^{2+}$ -стимульованого споживання кисню гомогенатом серця мишей після преінкубації (15 хв) з ріанодином у концентрації 20 мкмоль/л за окиснення сукцинату, малату та пірувату [51]. Зважаючи на те, що згідно даних літератури ріанодин у концентрації 20 мкмоль/л інгібує споживання кисню [51], а ріанодин у наномолярних концентраціях (5–50 нмоль/л) збільшує вірогідність відкритого стану ріанодинчутливого  $\text{Ca}^{2+}$  каналу, а у мікромолярних концентраціях інгібує цей канал [58, 59], ми у своїх дослідженнях використовували ширший діапазон концентрацій ріанодину – 0,01, 0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л.

З'ясувалося, що за окиснення екзогенного  $\alpha$ -кетоглутарату після преінкубації гомогенату печінки з ріанодином на холоді спостерігається тенденція до зниження швидкості дихання у стані  $S_3$ . Але лише за його концентрації 0,05 мкмоль/л це зниження на 13,3 % було статистично достовірним ( $P < 0,05$ ,  $n = 6$ ) відносно контролю (рис. 3.16).

За окиснення екзогенного пірувату зареєстровано зниження споживання кисню гомогенатом печінки щурів у стані  $S_3$  (на 10,2 %;  $P < 0,05$ ,  $n = 5$ ) лише



після преінкубації з ріанодином у концентрації 0,01 мкмоль/л. А за окиснення екзогенного сукцинату після преінкубації гомогенату тканини печінки з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л відбувається зниження споживання кисню на 14,4 та 15,6 % відповідно у станах  $S_3$  і  $S_4^{ATP}$  ( $P < 0,05$ ,  $n = 6$ ). За інших концентрацій ріанодину та в інших станах зміни дихання не досягали достатнього ступеня достовірності внаслідок значного розкиду даних.

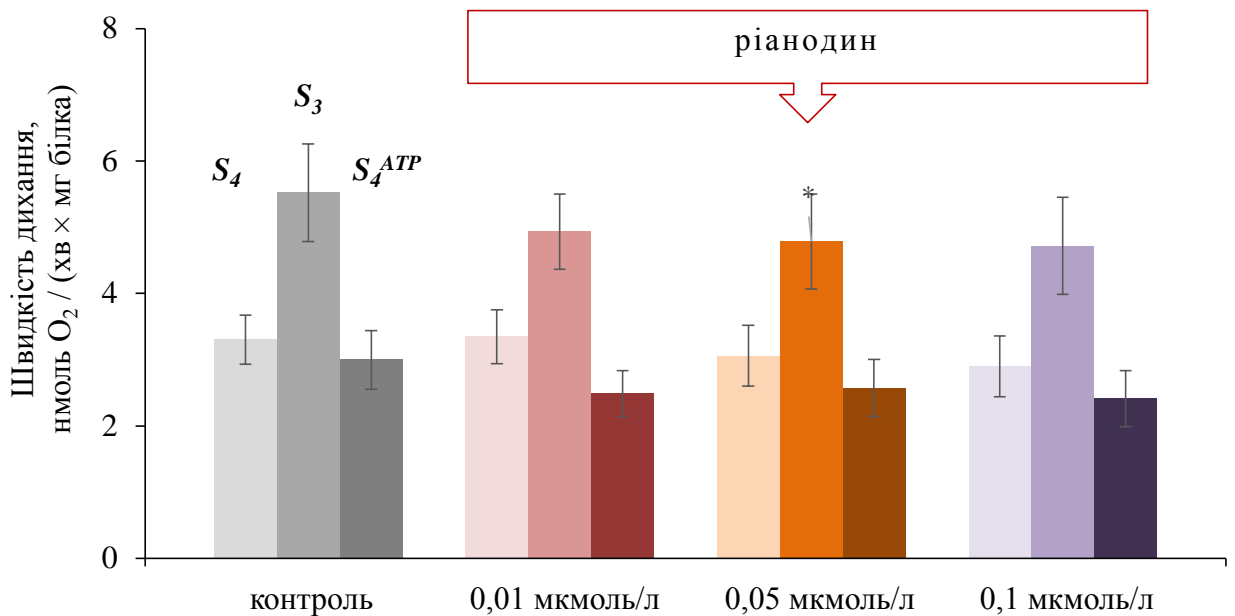


Рис. 3.16. Споживання кисню гомогенатом печінки після преінкубації (5 хв) з ріанодином у концентраціях 0,01, 0,05 та 0,1 мкмоль/л за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату: стан  $S_4$  – у комірку з екзогенним субстратом вносили 100 мкл гомогенату; стан  $S_3$  – для стимуляції окисного фосфорилування додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; [ $\alpha$ -кетоглутарату] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; \* – статистично вірогідна різниця відносно контролю з  $P \leq 0,05$ ,  $n = 6$

Отже, після преінкубації з ріанодином (0,01 та 0,05 мкмоль/л)

спостерігається тенденція до зниження споживання кисню гомогенатом печінки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, пірувату та сукцинату [19].

Зниження споживання кисню гомогенатом печінки може бути зумовлене або опосередкованим впливом ріанодину через RyRs ендоплазматичного ретикулуму, які локалізовані біля мітохондрій, або прямою дією на mRyRs у внутрішній мембрані мітохондрій. У гладеньком'язових клітинах аорти [227], вентрикулярних міоцитах [210], хромафінних клітинах [169] тісний зв'язок між RyRs і  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером мітохондрій уже досліджено. Проте не відомо, на яку відстань поширюються  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали після активації RyRs у різних клітинах, впродовж якого часу триває ефект ріанодину і чи зберігаються у гомогенаті тканини структури, що забезпечують зв'язки між ендоплазматичним ретикулумом і мітохондріями.

Слід брати до уваги і те, що лише частина поверхні мітохондрій знаходиться у тісному контакті з ендоплазматичним ретикулумом [71]. У літературі є досить багато даних про взаємозв'язок між вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму та захопленням його поряд розташованими мітохондріями [104, 192, 198, 216]. Місця контакту між цими органелами називають асоційованими з мітохондріями мембранами ендоплазматичного ретикулуму (mitochondria associated membranes, MAM). Мембрана ендоплазматичного ретикулуму та зовнішня мембрана мітохондрій у ділянках MAM відокремлені одна від одної на  $\sim 10\text{--}50$  нм (у гепатоцитах миші –  $\sim 12\text{--}20$  нм [104], що є вигідним для ефективного транспортування іонів між цими структурами. Також встановлено, що до 80 % мітохондрій перебувають у тісному контакті з ендоплазматичним ретикулумом [216].

Отже, встановлена виражена тенденція до зниження споживання кисню гомогенатом печінки за окиснення сукцинату, пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату за умов преінкубації з ріанодином у концентраціях 0,05 та 0,01 мкмоль/л. Показано, що ріанодин у концентрації 0,05 мкмоль/л за окиснення сукцинату та пірувату більш виражено знижує споживання кисню ізольованими мітохондріями печінки

щура після їхньої преінкубації з ріанодином (див. пункт 3.4.1). Причому, це зниження швидкості дихання корелює із пригніченням акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій за дії ріанодину (див. пункт 3.3.2). З цього факту можна зробити висновок, що наявність у гомогенаті печінки везикул ЕПР нівелює ефект ріанодину, який він чинить на ізольовані мітохондрії. А це можливо лише за умови, що ріанодин у заданій концентрації активує вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму та одночасно пригнічує його акумуляцію у матриксі мітохондрій.

### **3.5.2. Вплив ріанодину на споживання кисню ізольованими гепатоцитами**

Оскільки у гомогенаті взаємозв'язки між мітохондріями та ендоплазматичним ретикулумом є лише частково збережені, ця серія досліджень була проведена на ізольованих інтактних гепатоцитах.

У цьому дослідженні ми використовували ріанодин у концентраціях 0,05, 0,1, та 1 мкмоль/л та проводили дослідження у трьох варіантах: 1) клітини преінкубували з ріанодином впродовж 5 хв і після цього вносили до полярографічної комірки, де вже був розчин для дихання; 2) у комірку вносили ріанодин з розчином для дихання, а після цього суспензію гепатоцитів або 3) у комірку спершу вносили суспензію клітин, а потім додавали ріанодин.

Після преінкубації суспензії ізольованих гепатоцитів з ріанодином споживання кисню клітинами печінки щура знижується (рис. 3.17). У цій серії дослідів ізольовані клітини печінки преінкубували на холоді, а потім перенесли у полярографічну комірку із базовим позаклітинним розчином. Після такої преінкубації з ріанодином у концентрації 0,1 мкмоль на 3 хв реєстрації дихання швидкість споживання кисню ізольованими гепатоцитами знизилася на 20,9 % відносно контролю, а у концентрації 1 мкмоль/л – на 36,6 %. На 5 хв реєстрації швидкості дихання гепатоцитів були нижчими у всіх випадках, але зменшення швидкостей під впливом преінкубації з ріанодином відносно контролю

виявилось приблизно таким же, як і на 3 хв.

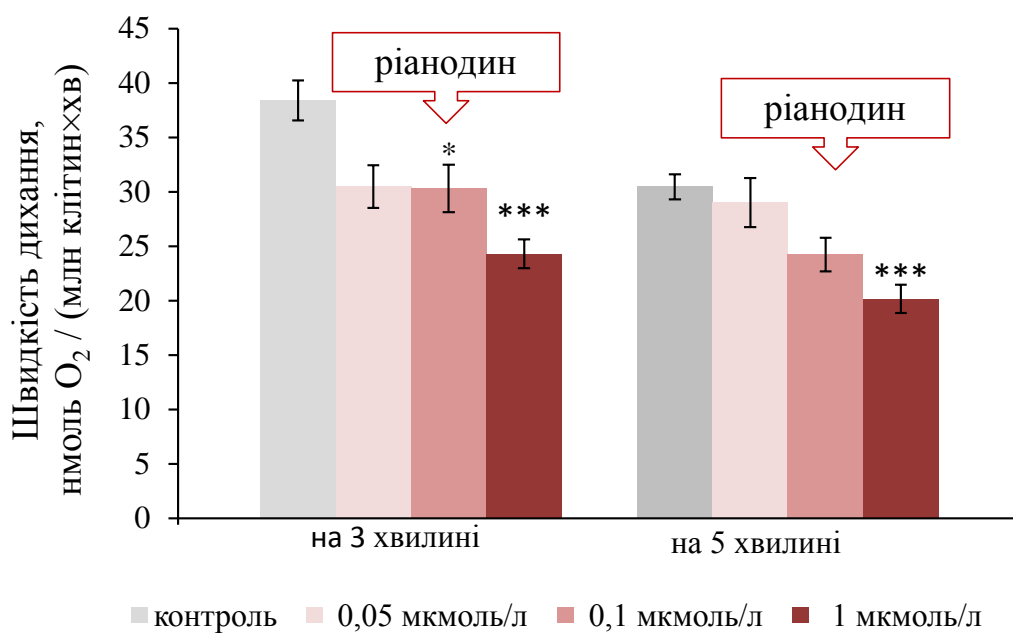


Рис. 3.17. Споживання кисню ізольованими гепатоцитами печінки щура після їхньої преінкубації з ріанодином (5 хв): у досліді клітини преінкубували з ріанодином (0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л) після чого їх вносили до полярографічної комірки з базовим позаклітинним розчином, у контролі до полярографічної комірки з базовим позаклітинним розчином вносили суспензію ізольованих гепатоцитів; концентрація клітин у комірці – 1 млн/мл; показники швидкості споживання кисню обчислювали на 3 та 5 хвилинах запису від моменту внесення клітин у комірку; \* – статистично вірогідна різниця відносно контролю з  $P \leq 0,05$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ,  $n=5$

У наступній серії дослідів гепатоцити одразу після ізолювання вносили у комірку, де до базового позаклітинного розчину вже був доданий ріанодин (рис. 3.18). На 3 хв реєстрації 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 %. Як і у попередній серії, на 5 хв реєстрації

зменшення швидкостей дихання за дії ріанодину виявилось практично таким самим, що і на 3 хв

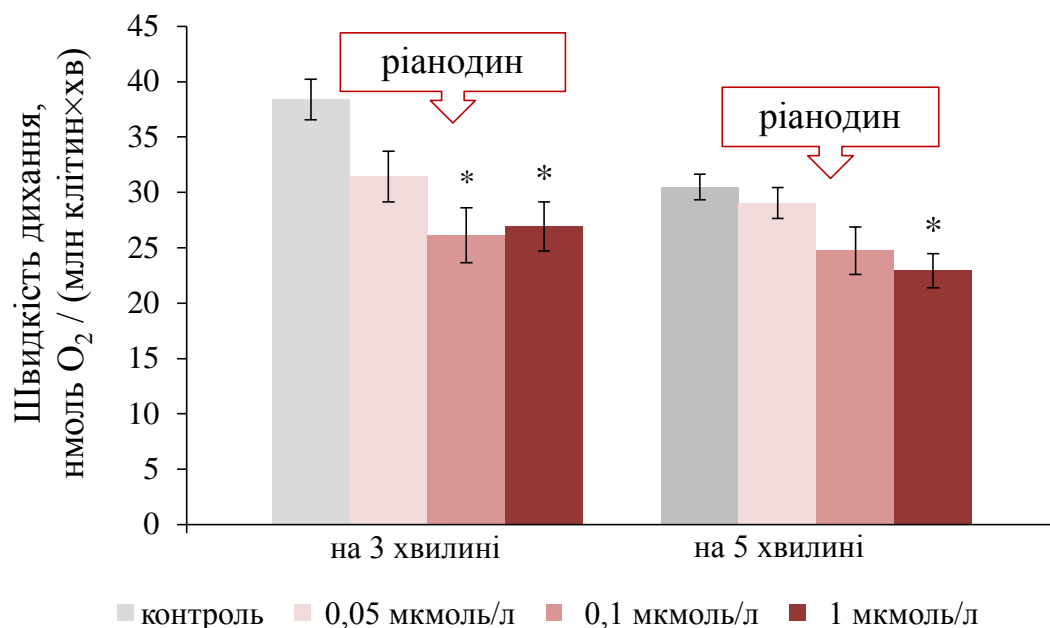


Рис. 3.18. Дихання ізольованих гепатоцитів печінки щура за наявності у полярографічній комірці ріанодину: у досліді ріанодин (0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л) разом з базовим позаклітинним розчином вносили у комірку, а потім – суспензію клітин, у контролі до полярографічної комірочки з базовим позаклітинним розчином вносили суспензію ізольованих гепатоцитів; концентрація клітин у комірці – 1 млн/мл; показники швидкості споживання кисню обчислювали на 3 та 5 хвилинах запису від моменту внесення клітин у комірку; \* – статистично вірогідна різниця відносно контролю з  $P \leq 0,05$ ,  $n=5$

У серії дослідів, коли ріанодин у відповідних концентраціях додавали у полярографічну комірку після суспензії ізольованих гепатоцитів, були зареєстровані дещо інші результати (рис. 3.19). Статистично достовірне зменшення швидкості дихання зареєстровано вже за найнижчої концентрації ріанодину – 0,05 мкмоль/л. Причому, на 3 хв це зменшення було найбільш

вираженим – на 38,5 % відносно контролю, тоді як за концентрації ріанодину 0,1 мкмоль/л воно становило 33,8 %. А от додавання у полярографічну комірку до ізольованих гепатоцитів ріанодину у концентрації 1 мкмоль/л не спричиняло статистично достовірних змін швидкості їхнього дихання. Такі зміни швидкості дихання внаслідок додавання ріанодину до полярографічної комірки практично відтворилися на 5 хв реєстрації, хоча відносне зменшення за його концентрацій 0,05 і 0,1 мкмоль/л було дещо меншим і становило 25,8 і 27,2 % відповідно (рис. 3.17).

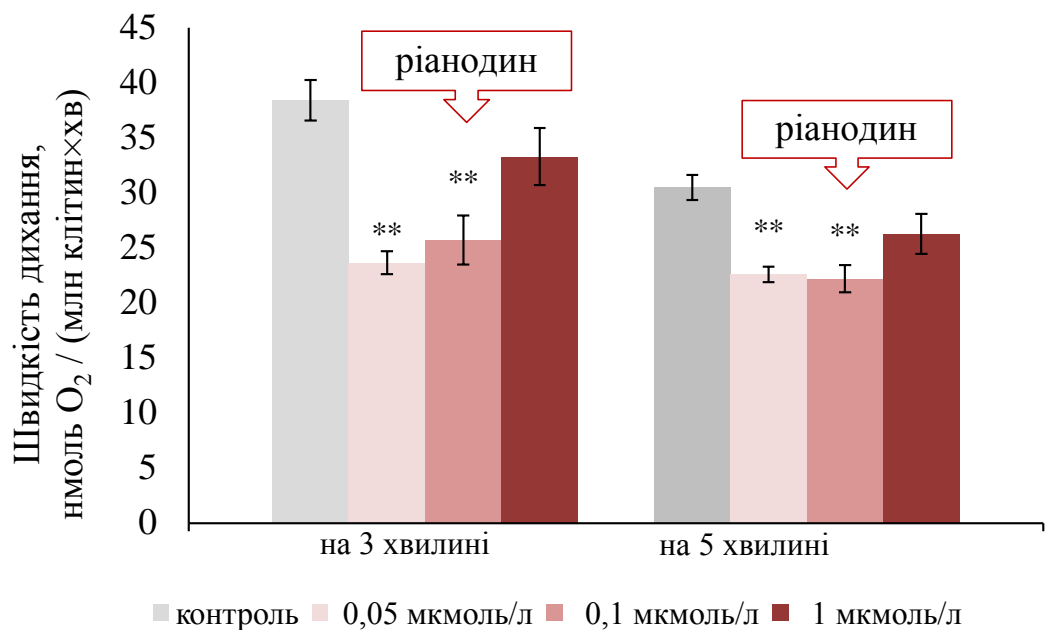


Рис. 3.19. Вплив ріанодину на дихання ізольованих гепатоцитів печінки щура: у досліді до полярографічної комірки з базовим позаклітинним розчином вносили суспензію клітин, а потім ріанодин у концентраціях 0,05, 0,1 та 1 мкмоль/л; концентрація у комірці – 1 млн/мл; показники швидкості споживання кисню обчислювали на 3 та 5 хвилинах запису від моменту внесення клітин у комірку; \*\* – статистично вірогідна різниця відносно контролю з  $P \leq 0,01$ ,  $n=5$

Зареєстрована залежність зменшення швидкості дихання ізольованих гепатоцитів внаслідок додавання до полярографічної комірки ріанодину від концентрації дає змогу зробити припущення про наявність двох його внутрішньоклітинних мішеней. У низькій концентрації домінує інгібувальний ефект ріанодину на mRyRs, тому швидкість дихання ізольованих гепатоцитів зменшується. У вищій концентрації (1 мкмоль/л) ріанодин активує вивільнення депонованого в ЕПР  $\text{Ca}^{2+}$  системою RyRs, це спричиняє суттєве збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі та, мабуть, подальше його транспортування у матрикс мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортером. За цих умов одночасне інгібування ріанодинем mRyRs (на тлі активації RyRs ендоплазматичного ретикулу) суттєво не пригнічує процеси дихання (рис. 3.19).

Лише у цілісних клітинах можна спостерігати взаємозв'язки між органелами, що модулюють просторово-часові параметри  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації. Методами флуоресцентної та конфокальної мікроскопії на культурі серцевих клітин (H9c2) показано, що  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$  sparks), спричинені активацією RyRs, поширюються лише на одну мітохондрію, де викликають незначні зростання мітохондріальної  $[\text{Ca}^{2+}]$  [180]. Дослідження Csordas et al. (1999) показали, що активація RyRs супроводжується короткорисчасним збільшенням цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  від 100 нмоль/л до 10 мкмоль/л, яке поширюється на відстань від 10–20 до 100 нмоль/л залежно від концентрації ріанодину. Слід брати до уваги і те, що лише частина поверхні мітохондрій знаходиться у тісному контакті з ендоплазматичним ретикуломом [71].

Преінкубація ізольованих гепатоцитів з ріанодинем спричиняє, назагал, зменшення швидкості дихання, що є подібно до його дії на ізольовані мітохондрії і більш виражено, ніж його дія на гомогенат печінки. Зокрема, у серії дослідів, проведених на ізольованих гепатоцитах, які були преінкубовані з ріанодинем (див. рис. 3.17), спостерігали зниження споживання кисню як на 3 хв реєстрації за концентрацій 0,1 та 1 мкмоль/л, так і на 5 хв (за концентрації 1 мкмоль/л). У досліді, коли гепатоцити після ізолювання вносили у комірку, де до базового

позаклітинного розчину вже був доданий ріанодин (фактично, тривалість дії ріанодину суттєво зменшилася; див. рис. 3.18), споживання кисню на 3 хв реєстрації знижувалося за дії ріанодину у концентраціях 0,1 та 1 мкмоль/л, а на 5 хв – у концентрації 1 мкмоль/л. Як і у попередній серії, на ефекти ріанодину на 5 хв реєстрації виявилися практично такими ж, що і на 3 хв [19].

Наступне зменшення тривалості дії ріанодину – додавання безпосередньо до клітин у полярографічній комірці – дало змогу виявити нівелювання його ефект за концентрації 1 мкмоль/л. Такі зміни споживання кисню гепатоцитами, як і гомогенатом печінки щура, пов'язані із різноспрямованою дією ріанодину на RyRs ЕПР та mRyRs гепатоцитів (див. рис. 3.19), які мають, мабуть, різну спорідненість до нього.

Показано на різних тканинах, що ріанодин у низьких концентраціях (~10 нмоль/л) збільшує частоту відкривання одного каналу RyR до нормального рівня провідності, у проміжних концентраціях (~1 мкмоль/л) – стабілізує канал у відкритому стані, а у високих концентраціях (~100 мкмоль/л) – блокує канал [95]. На ізольованих мікросомах печінки показано, що ріанодин у концентраціях від 1 до 10 мкмоль/л стимулював вивільнення  $Ca^{2+}$ , а за вищих концентрацій ріанодину (100 і 300 мкмоль/л) вивільнення  $Ca^{2+}$  було заблоковано [211]. Pierobon et al (2006) у своїх дослідженнях впливу ріанодину на ІФ<sub>3</sub>-спричинені осциляції цитозольного  $Ca^{2+}$  використовував ізольовані інтактні і пермеабілізовані гепатоцити, а також культуру цих клітин. Було показано, що ріанодин у концентраціях 1–100 мкмоль/л не спричиняв достовірних змін базального рівня  $Ca^{2+}$  у цитоплазмі ізольованих гепатоцитів і не індукував жодних осциляцій цитозольної концентрації  $Ca^{2+}$  у культурі клітин. Автори зазначають, що ріанодин сам по собі ніколи не індукував швидкого вивільнення  $Ca^{2+}$  з ЕПР. Лише за дії ріанодину у концентраціях 1–5 мкмоль/л відбувалося повільне вивільнення  $Ca^{2+}$  з депо [184]. Тому, очевидно, що RyRs у різних тканинах відрізняються між собою.

Але не лише від діючої концентрації ріанодину залежить його ефект, а й



від часу його впливу. Різні дослідники використовують різний час інкубації препаратів із ріанодином. Beutner і співавт. гомогенат тканини серця мишей та ізольовані мітохондрії з серця щура преінкубували 15 хв (щоб оцінити вплив акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями системою mRyRs на модуляцію окисного фосфорилування [51]). Bull і співавт. для активації  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів везикул саркоплазматичного ретикулуму скелетних м'язів жаби впливали ріанодином впродовж 5–10 хв [59]. Хоча вивільнення депонованого в ізольованих мікосоммах печінки  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  досягає плато на 6–8 с [211]. Важко сказати, чим зумовлена така пролонгація дії ріанодину у кожному випадку, але найсуттєвіший ефект ріанодину, спричинений активацією RyRs ЕПР, що нівелює ефект інгібування mRyRs, зареєстровано нами лише на 3 хв після його внесення у полярографічну комірку (див. рис. 3.19). За більш тривалої дії ріанодину цей ефект є відсутній (див. рис. 3.17 і 3.18).

**Підсумок.** RyRs ЕПР та mRyRs відіграють важливе значення у внутрішньоклітинній регуляції дихання мітохондрій гепатоцитів. Ріанодин у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л інгібує mRyRs, що призводить до зменшення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій, зниження активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ферментів циклу трикарбонових кислот і роботи дихального ланцюга (рис. 3.20). Водночас ріанодин (0,05–1 мкмоль/л) активує RyRs ЕПР, що спричиняє інтенсифікацію процесів дихання мітохондрій у гепатоцитах. Але цей ефект є обмежений у часі, тому реєструється лише за безпосереднього внесення ріанодину у концентрації 1 мкмоль/л до клітин у полярографічну комірку.

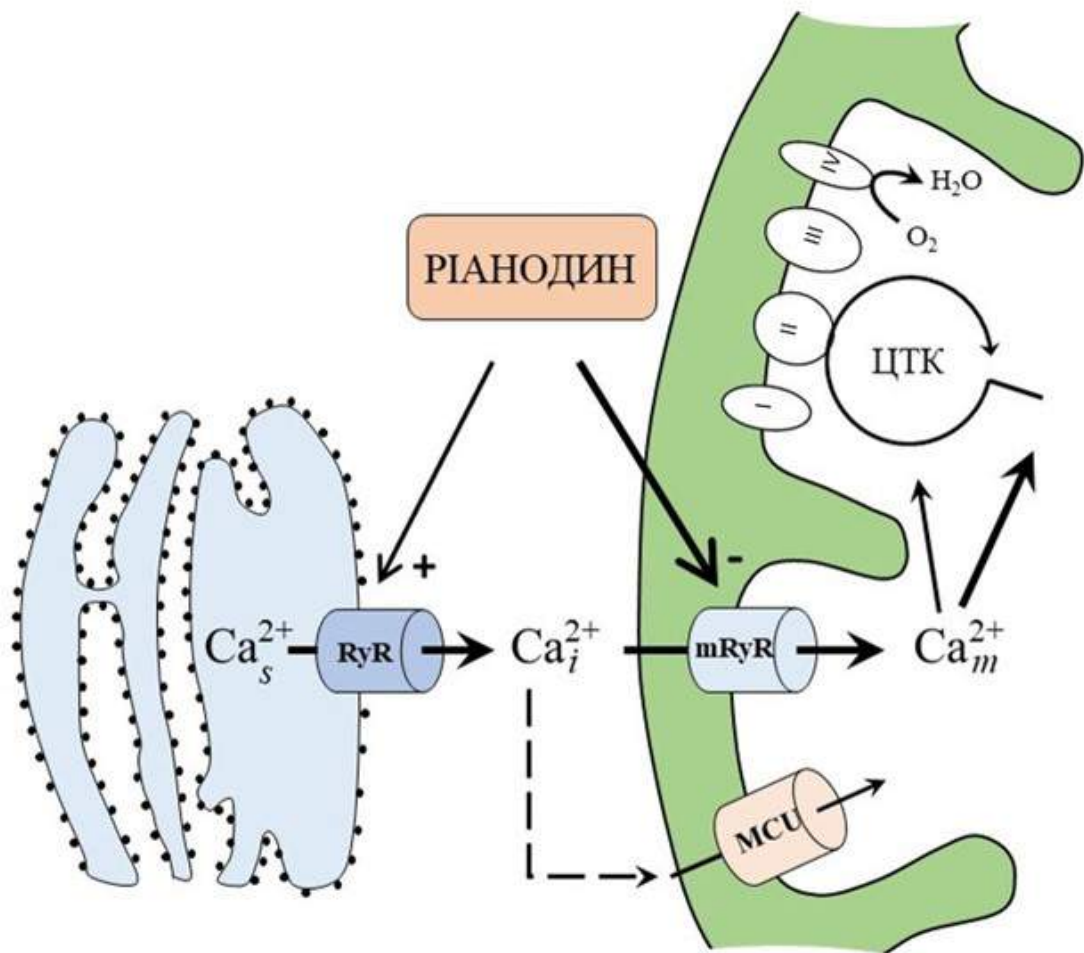


Рис. 3.20. Схема впливу ріанодину на механізми  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляції мітохондріального дихання у гепатоцитах: RyR – ріанодинчутливий  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ЕПР, mRyR – ріанодинчутливий  $\text{Ca}^{2+}$ -канал мітохондрій, MCU – мітохондріальний  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, ЦТК – цикл трикарбонних кислот,  $\text{Ca}^{2+}_s$  –депонований  $\text{Ca}^{2+}$  в ЕПР,  $\text{Ca}^{2+}_i$  – цитозольний  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}_m$  – акумульований у матриксі мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$

1. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Енергетичні процеси у печінці щура за дії ріанодину // Експеримет. та клін. фізіол. і біохім. 2018. Вип. 1 (81). С. 51–61.
2. Купиняк Н.І., Іккерт О.В., Манько В.В. Залежність мітохондріального дихання гепатоцитів від функціональної активності  $\text{Ca}^{2+}$ -помп та

ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів // 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 МолекМоулярна і клітинна фізіологія. Фізіол. журн. 2014. Т. 60(3), (Додаток). 12 с.

3. Купиняк Н., Мазур Г., Колтун О.І., Іккерт О., Манько В. Поглинання кисню мітохондріями гепатоцитів щурів за дії модуляторів  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (20–23 квітня 2015 р., Львів): збірник тез. Львів, 2015. С. 470–471.

### 3.6. Зміни мембранного потенціалу ізольованих мітохондрій за дії сураміну

Для дослідження змін мембранного потенціалу мітохондрій за дії сураміну використали як потенційний агоніст mRyRs сурамін (1 мкмоль/л), який додавали до середовища інкубації, після чого вносили суспензію ізольованих мітохондрій та реєстрували їхній мембранний потенціал.

Сурамін розроблений у 1916 р. для лікування трипаносомозу [82], а пізніше почав використовуватися як протипухлинний препарат [214]. Окрім використання сураміну як лікарського засобу, його застосовують у дослідженнях для інгібування або активації G-білків [41], пуринових рецепторів [65, 85] чи RyRs [121]. На різних клітинах показано, що сурамін є антагоністом P2 пуринергічних рецепторів [65].

Відомо, що сурамін є агоністом RyRs типу 1 і 2 [121, 208]. Hohenegger et al. показали, що сурамін сприяє зв'язуванню [<sup>3</sup>H]-ріанодину як з білками RyRs у мембранах саркоплазматичного ретикулулу скелетних та серцевих м'язів кролика, так і з окремими очищеними білками [121]. Дослідження ефекту сураміну на очищеному RyRs з скелетних м'язів кролика, реконструйованому у ліпідний бішар, показало, що сурамін безпосередньо взаємодіє з цим рецептором та дозозалежно його активує (50–500 мкмоль/л), не змінюючи провідності каналу [121].

Як субстрат Ca<sup>2+</sup>-незалежної дегідрогенази використали сукцинат [181], а як субстрати Ca<sup>2+</sup>-залежних ферментів – піруват- та α-кетоглутарат [76]. Встановлено, що значення мембранного потенціалу мітохондрій, які реєстрували за окиснення сукцинату, були вищими порівняно із його значеннями за 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 [54]. На мітохондріях печінки щурів різними іншими дослідниками теж показано, що

значення мембранного потенціалу мітохондрій є вищі за окиснення сукцинату порівняно з значеннями отриманими за окиснення інших субстратів. Зокрема, методом проточної цитометрії з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда TMRM<sup>+</sup> встановлено, що мембранний потенціал мітохондрій за окиснення сукцинату був вищий порівняно з таким за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату на 79,0 %, а за окиснення пірувату – на 41,1 % (див. пункт 3.3.1), [144] показали, що ротенон спричиняв дисипацію мембранного потенціалу мітохондрій внаслідок інгібування комплексу I дихального ланцюга, але після додавання сукцинату (субстрат комплексу II) мембранний потенціал збільшувався до попередніх значень або навіть вищих за ті, які були отримані за окиснення пірувату та малату [144].

Ефект сураміну на мембранний потенціал мітохондрій залежить від наявності у середовищі інкубації субстратів окиснення та фосфорилування. За окиснення екзогенного сукцинату сурамін знижує мембранний потенціал мітохондрій у стані  $S_4$  за Чансом і Вільямсом [68] на 5,88 % відносно контролю (рис. 3.21). Це зниження, на нашу думку, спричинене використанням енергії мембранного потенціалу мітохондрій на транспортування іонів  $Ca^{2+}$  у матрикс мітохондрій проти їхнього концентраційного градієнта.

Саме по собі додавання екзогенного АДФ до середовища у контролі також призводить до зменшення мембранного потенціалу мітохондрій (приблизно на 6,51 %) – внаслідок, очевидно, активації АТФ-синтази, яка використовує протонний градієнт для синтезу АТФ (рис. 3.21, стан  $S_3$ ). За наявності АДФ у середовищі зниження мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну не досягає першого ступеня достовірності.

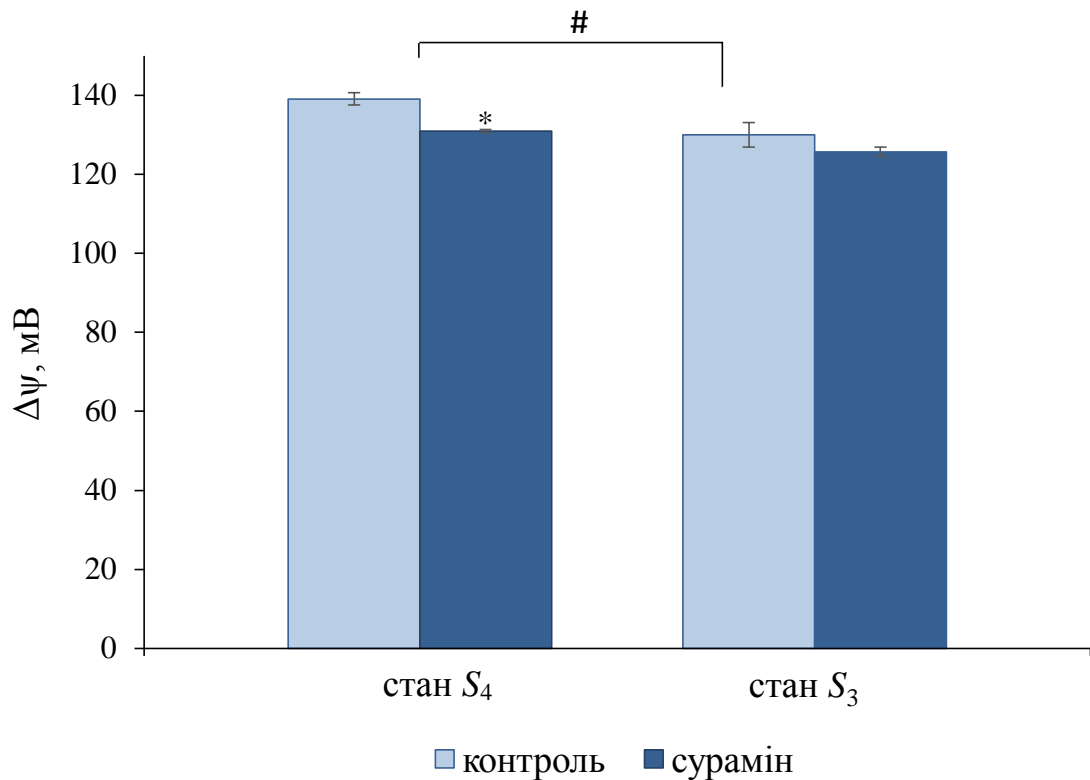


Рис. 3.21. Зменшення мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну за окиснення сукцинату: стан S<sub>4</sub> – без АДФ, стан S<sub>3</sub> – додавали екзогенний АДФ для стимуляції окисного фосфорилування; [сурамін] = 1 мкмоль/л, [сукцинат] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, [Ca<sup>2+</sup>] = 0,1 мкмоль/л; \* – статистично вірогідна різниця відносно контролю з P ≤ 0,05, # – відносно стану S<sub>4</sub> з P ≤ 0,05, n = 3

За окиснення екзогенних пірувату та α-кетоглутарату сурамін спричиняв зростання мембранного потенціалу мітохондрій у стані S<sub>4</sub>. За окиснення α-кетоглутарату це збільшення становило 15,2 % відносно контролю (рис. 3.22), а за окиснення пірувату – 39,1 % (рис. 3.23). Таке збільшення мембранного потенціалу мітохондрій у стані S<sub>4</sub> під впливом сураміну за окиснення α-кетоглутарату і пірувату пов'язане, мабуть, з активацією α-кетоглутаратдегідрогеназного чи піруватдегідрогеназного комплексів, які є Ca<sup>2+</sup>-залежними ферментами [77, 78]. Сурамін активує, очевидно, mRyRs, збільшується надходження Ca<sup>2+</sup> у матрикс мітохондрій, активуються Ca<sup>2+</sup>-

залежні дегідрогенази, що і спричиняє збільшення мембранного потенціалу мітохондрій.

Зміни мембранного потенціалу мітохондрій у стані  $S_4$  під впливом сураміну за наявності у середовищі інкубації екзогенного пірувату є більш вираженими. Обидва ферменти (піруватдегідрогеназний та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекси) активуються катіонами  $Ca^{2+}$ , але їхня чутливість до катіонів  $Ca^{2+}$  та шляхи активації є різними. Дентон встановив [78], що активність піруватдегідрогеназного комплексу збільшується у діапазоні концентрацій  $Ca^{2+}$  від 0,01 до 0,1 мкмоль/л; за вищих концентрацій  $Ca^{2+}$  його активність навіть трохи зменшується. Встановлено, що  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс зв'язує від 2,5 до 5 іонів  $Ca^{2+}$ /моль комплексу [205], а його активність збільшується, починаючи вже від концентрації  $Ca^{2+}$  0,001 мкмоль/л [76]. Іони  $Ca^{2+}$  активують  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс шляхом модуляції афінності ферменту до  $\alpha$ -кетоглутарату [189]. На відміну від  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу регулювання активності піруватдегідрогеназного комплексу реалізується на двох основних рівнях: шляхом інгібування активної (дефосфорильованої форми) піруватдегідрогенази продуктами її реакції – ацетил-СоА та НАДН; унаслідок взаємоперетворення активної (дефосфорильованої) і неактивної (фосфорильованої) форми піруватдегідрогенази. Ці взаємоперетворення каталізуються алостеричними, регуляторними ферментами: протеїнкіназою піруватдегідрогенази (декарбоксилюючої) та протеїнфосфатазою. Фосфатаза відновлює активність піруватдегідрогеназного комплексу унаслідок його дефосфорильовання. Зв'язування фосфатази з дигідроліполтрансацилазою відбувається за участю іонів  $Ca^{2+}$ , коли комплекс фосфорильований, після чого переводить піруватдегідрогеназний комплекс з неактивного в активний стан, тобто  $Ca^{2+}$  активує фосфатазу, водночас інгібує кіназу, яка інактивує комплекс. Важливо відзначити те, що чутливість  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до іонів  $Ca^{2+}$  збільшується за рахунок зниження співвідношення АТФ/АДФ, тоді як на

чутливість фосфатази піруватдегідрогенази це може не впливати, тому у деяких умовах активація  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу може спостерігатися за нижчих концентрацій іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж у піруватдегідрогеназного [77, 232].

На тлі  $\alpha$ -кетоглутарату і АДФ сурамін не змінював мембранний потенціал мітохондрій у стані  $S_3$  (рис. 3.22).

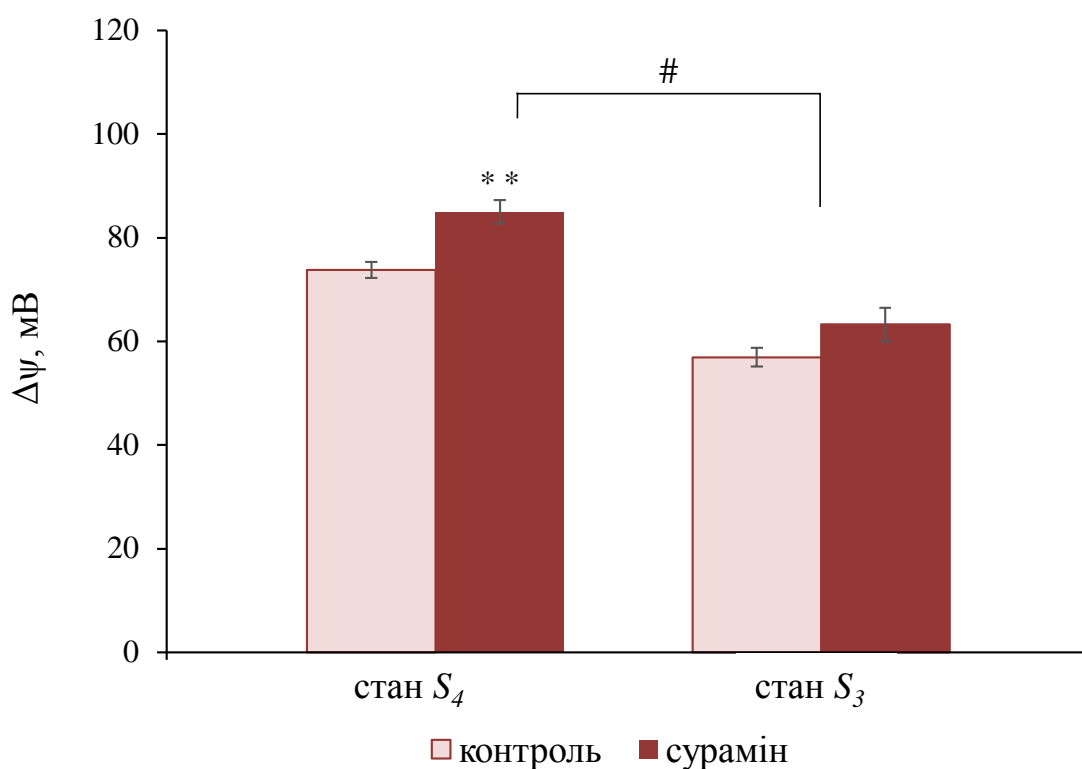


Рис. 3.22. Збільшення мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату: стан  $S_4$  – без АДФ, стан  $S_3$  – додавали екзогенний АДФ для стимуляції окисного фосфорилування; [сурамін] = 1 мкмоль/л, [ $\alpha$ -кетоглутарат] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, [ $\text{Ca}^{2+}$ ] = 0,1 мкмоль/л; \*\* - статистично вірогідна різниця відносно контролю – ,  $P \leq 0,01$ ; відносно стану  $S_4$  – #,  $P \leq 0,05$ ;  $n = 3$

За окиснення пірувату додавання АДФ у контролі спричиняє статистично вірогідне збільшення мембранного потенціалу мітохондрій на 78,5 %, а на тлі



сураміну – лише на 24,7 % (рис. 3.23). Сам по собі сурамін не спричиняв змін мембранного потенціалу у стані  $S_3$ . Очевидно, стимуляція піруватдегідрогеназного комплексу внаслідок додавання АДФ маскує потенційну його активацію катіонами  $Ca^{2+}$ . Відомо, що АДФ інгібує кіназу піруватдегідрогенази, конкуруючи з АТФ [212]. Якщо у внутрішньомітохондріальному просторі концентрація АТФ та АДФ становить від 0,5 до 6 мкмоль/л, а  $K_m$  для кінази піруватдегідрогенази для АТФ – лише 0,02 ммоль/л, то ця кіназа була би завжди насиченою АТФ і не відбувалося б конкурентного гальмування АДФ [220].  $K_i$  кінази піруватдегідрогенази для АДФ становить від 0,03 до 0,1 моль/л і залежить від концентрації калію [220]. Оскільки гальмування АДФ є конкурентно спроможним, а рівні АДФ і АТФ, як правило, змінюються в протилежних напрямках, досить складно сказати, чи зміни у співвідношенні АДФ до АТФ спричинене підвищеним рівнем АДФ чи зниженням АТФ. В обох випадках конкуренція між нуклеотидами є важливим чинником, що визначає активність кінази піруватдегідрогенази в ізольованих мітохондріях печінки, а внутрішньомітохондріальне співвідношення АТФ/АДФ є важливим регулятором кінази піруватдегідрогенази [220]. Окрім співвідношення АТФ/АДФ на активність кінази піруватдегідрогенази впливають і інші чинники. Зокрема, збільшення мітохондріального рівня  $НАД^+$  та  $CoA$  стимулює інактивацію цього фермента [202].

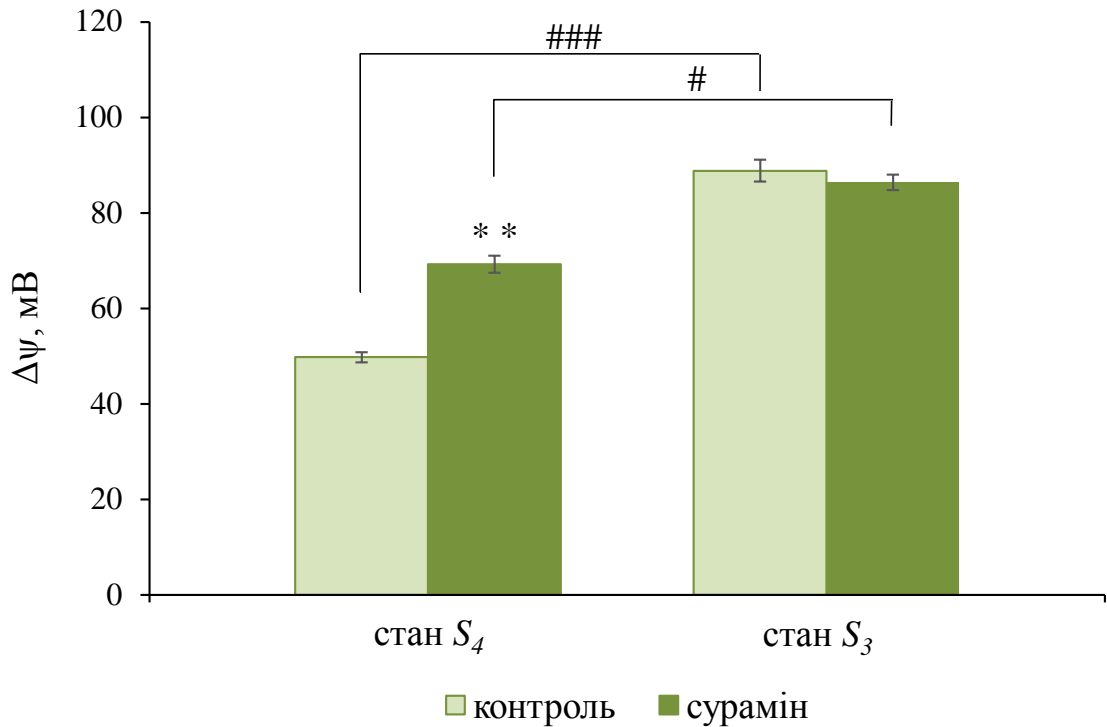


Рис. 3.23. Вплив сураміну на мембранний потенціал мітохондрій за окиснення пірувату: стан  $S_4$  – без АДФ, стан  $S_3$  – додавали екзогенний АДФ для стимуляції окисного фосфорилування; [сурамін] = 1 мкмоль/л, [піруват] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л,  $[Ca^{2+}] = 0,1$  мкмоль/л; статистично вірогідна різниця відносно контролю – \*\*,  $P \leq 0,01$ ; відносно стану  $S_4$  – # з  $P \leq 0,05$ ; i ### з  $P \leq 0,001$ ;  $n = 3$

У мітохондріях печінки щура нами ідентифіковано mRyRs (див. пункт 3.2.) [142]. Показано, що mRyRs інгібуються ріанодином у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л і це супроводжується зменшення внутрішньомітохондріальної концентрації іонізованого  $Ca^{2+}$  (див. пункт 3.3.2.). Відтак mRyRs у гепатоцитах є важливою ланкою регуляторного зв'язку між значенням мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання за низьких (фізіологічних) значень позамітохондріальної концентрації  $Ca^{2+}$ . Коли піруват є основним субстратом окиснення, mRyRs забезпечують надходження у матрикс мітохондрій  $Ca^{2+}$ , активацію піруватдегідрогеназного комплексу й

інтенсифікацію дихання, що запобігає зменшенню мембранного потенціалу мітохондрій. Якщо ж переважає окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, надходження  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою mRyRs, навіть за фізіологічної їхньої концентрації, то призводить до пригнічення процесів дихання. За вищих концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  їхня акумуляція системою mRyRs негативно впливає на дихання за окиснення як пірувату, так і  $\alpha$ -кетоглутарату (див. пункт 3.4.2.).

**Підсумок.** Сурамін є агоністом RyRs і mRyRs гепатоцитів. Ефект сураміну на мембранний потенціал мітохондрій залежить від субстратів окиснення та фосфорилування наявних у середовищі інкубації [20]. За окиснення екзогенного сукцинату сурамін знижує мембранний потенціал мітохондрій у стані  $S_4$ , а за окиснення екзогенних пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату – навпаки, збільшення. За окиснення сукцинату, активація mRyRs призводить до транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, але оскільки сукцинатдегідрогеназа не регулюється самими катіонами  $\text{Ca}^{2+}$  [181], компенсаторної інтенсифікації дихання у цьому випадку не відбувається. За використання  $\alpha$ -кетоглутарату чи пірувату надходження  $\text{Ca}^{2+}$  інтенсифікує активність ферментів, що веде до збільшення мембранного потенціалу мітохондрій, але лише у стані  $S_4$ .

1. Купиняк Н.І. Охай І.Ю., Манько В.В. Мембранний потенціал мітохондрій за дії сураміну // Науковий вісник східноєвропейського ун-ту. Сер. біол. наук. 2018. Вип. 4 (377). С. 100–108.

#### 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

На основі отриманих результатів та даних літератури пропонуємо схему  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів за окиснення сукцинату, пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату (рис. 4.1).

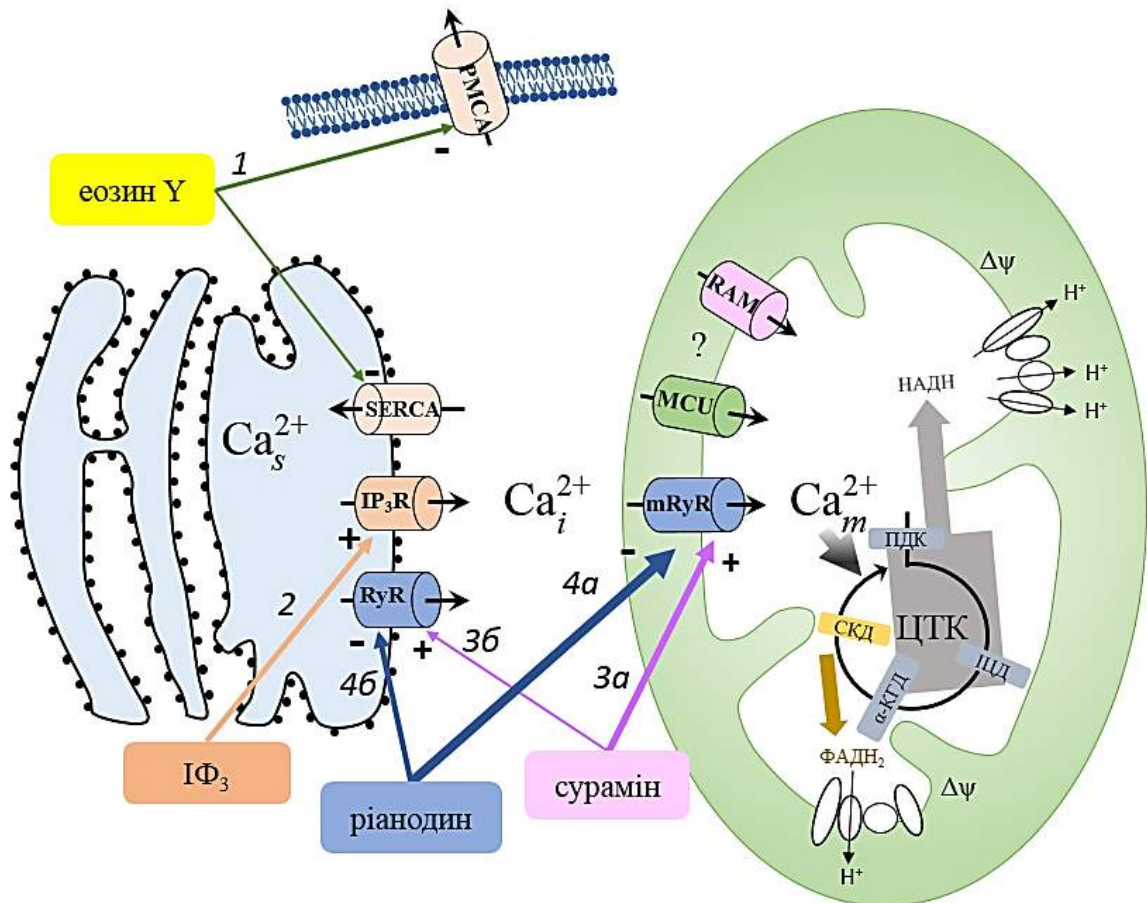


Рис. 4.1. Узагальнююча схема  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів; PMCA –  $\text{Ca}^{2+}$  помпа плазматичної мембрани, SERCA –  $\text{Ca}^{2+}$  помпа ЕПР, IP<sub>3</sub>R – IΦ<sub>3</sub>-чутливий  $\text{Ca}^{2+}$ -канал, RyR – ріанодинчутливий  $\text{Ca}^{2+}$ -канал, mRyR – ріанодинчутливий  $\text{Ca}^{2+}$ -канал мітохондрій, MCU – мітохондріальний  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер, RAM – система швидкої акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях, ЦТК – цикл трикарбонових кислот, ПДК піруватдегідрогеназний комплекс,  $\alpha$ -КГК –  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс, ІЩД – ізоцитратдегідрогеназа, СКД – сукцинатдегідрогеназа,  $\Delta\psi$  – мембранний потенціал мітохондрій, IΦ<sub>3</sub> – езогенний інозитол-1,4,5-трифосфат,  $\text{Ca}^{2+}_s$  –

депонований  $\text{Ca}^{2+}$  в ЕПР,  $\text{Ca}^{2+}_i$  – цитозольний  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}_m$  – акумульований у матриксі мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$ , «+» – активуючий вплив, «-» – інгібуючий вплив. Інші пояснення у тексті

Для дослідження впливу  $\text{Ca}^{2+}$  на різні шляхи процесів дихання мітохондрій гепатоцитів ми використовували субстрати окиснення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ (піруват та  $\alpha$ -кетоглутарат) [76] і сукцинат [2] як субстрат сукцинатдегідрогенази нечутливої до впливу  $\text{Ca}^{2+}$  [181].

З метою модуляції функціональної активності  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем гепатоцитів використовували еозин Y – інгібітора  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани та ЕПР, екзогенний  $\text{I}\Phi_3$  – агоніст  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів, ріанодин, як модулятор та сурамін, як агоніст ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ЕПР та мітохондрій відповідно.

Першим етапом вивчення  $\text{Ca}^{2+}$ -регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів було дослідження змін інтенсивності споживання кисню мітохондріями за умов зменшення  $[\text{Ca}^{2+}]_v$  шляхом інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани і ЕПР. Встановлено, що інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани і ЕПР еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л не збільшує рівень цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  до величин, необхідних для активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ у матриксі мітохондрій як за ФАД-, так і НАД-залежних шляхів окиснення субстратів (рис. 4.1).

З'ясувавши те, що інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани і ЕПР не спричиняло змін споживання кисню мітохондріями, ми вважали за доцільне дослідити роль  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у енергетичних процесах пермеабілізованих гепатоцитів. Після додавання екзогенного  $\text{I}\Phi_3$  – агоніста  $\text{I}\Phi_3$ -чутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ми спостерігали інтенсифікацію дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату, яке відбувалося шляхом активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ферментів ЦТК – піруватдегідрогеназного та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу і, як

наслідок, посилення енергетичних процесів у пермеабілізованих гепатоцитів. Це свідчить про те, що ІФ<sub>3</sub>-чутливі Ca<sup>2+</sup>-канали дійсно беруть участь у регуляції клітинного дихання за окиснення субстратів Ca<sup>2+</sup>-залежних дегідрогеназ (рис. 4.1, 2).

З метою більш детального вивчення Ca<sup>2+</sup>-залежної регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів, ми продовжили досліджувати внесок різних Ca<sup>2+</sup>-транспортувальних систем ЕПР у регуляцію енергетичних процесів мітохондрій. Наступним нашим завданням було виявити ефекти ріанодину на мембранний потенціал мітохондрій печінки. Оскільки надходження Ca<sup>2+</sup> у мітохондрії може змінювати інтенсивність дихання мітохондрій з одного боку, а з іншого впливати на мембранний потенціал мітохондрій, нашим завданням було дослідити дію ріанодину (модулятора функціональної активності ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів) на інтенсивність флуоресценції потенціалчутливого зонда TMRM. По-перше, ми встановили, що різниця між відносними значеннями мембранного потенціалу мітохондрій за окиснення ФАД- та НАД- залежних субстратів була різною. Так, відносне значення мембранного потенціалу за окиснення сукцинату були вище порівняно з таким за окиснення α-кетоглутарату на 79,0 %, а за окиснення пірувату – на 41,1 %. Різниця між відносними значеннями мембранного потенціалу мітохондрій за окиснення пірувату та α-кетоглутарату становила 65,4 %. По-друге, 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, а за окиснення пірувату ріанодин у концентрації 0,1 мкмоль/л спричинив зниження відносних значень мембранного потенціалу мітохондрій після 3 хв інкубації на 51,7 %. Після 5 хв інкубації мітохондрій з ріанодином (0,05 мкмоль/л) за окиснення α-кетоглутарату відносні значення мембранного потенціалу мітохондрій збільшилися.

Ми припустили, що зменшення мембранного потенціалу мітохондрій може бути пов'язано з наявністю ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів у мембрані

мітохондрій. Оскільки енергія протонного градієнта використовується на електрофоретичне транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, тому зменшення мембранного потенціалу можна очікувати за активації mRyRs. Але таке зменшення може привести до інтенсифікації процесів дихання – за рахунок зворотних гомеостатичних зв'язків, спрямованих на відновлення мембранного потенціалу мітохондрій. Відомо, що частина мітохондріальних дегідрогеназ активуються  $\text{Ca}^{2+}$ , тому активація mRyRs може спричинити і зростання мембранного потенціалу. Виявилося, що ріанодин впливає на акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями та концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій печінки залежить від субстрату окиснення (рис. 4.1).

Отже, проведені нами дослідження переконливо свідчать, що у мембрані мітохондрій наявні mRyRs. За їхньої активації (цілком можливо, цитозольним  $\text{Ca}^{2+}$ ) величина протонного градієнта зменшується, оскільки його енергія використовується на електрофоретичне транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс. Це спричиняє зростання концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій опосередковано через необхідність підвищення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ (піруватдегідрогеназного і  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів чи НАД-ізоцитратдегідрогенази) і в результаті інтенсифікує процеси мітохондріального дихання та збільшення протонного градієнта.

Після ідентифікації mRyRs у гепатоцитах ми досліджували їхню роль у регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за різних субстратів та позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Показано, що mRyRs інгібуються ріанодином у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л і це супроводжується зменшення внутрішньомітохондріальної концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$ . Відтак mRyRs у гепатоцитах є важливою ланкою регуляторного зв'язку між значенням мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання за низьких (фізіологічних) значень позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Коли піруват є основним субстратом окиснення, mRyRs забезпечують надходження у матрикс мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$ , активацію піруватдегідрогеназного комплексу й

інтенсифікацію дихання, що запобігає зменшенню мембранного потенціалу мітохондрій. Якщо ж переважає окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, надходження  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою mRyRs, навіть за фізіологічної їхньої концентрації, то призводить до пригнічення процесів дихання. За вищих концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  їхня акумуляція системою mRyRs негативно впливає на дихання за окиснення як пірувату, так і  $\alpha$ -кетоглутарату (рис. 4.1).

З метою більш детального вивчення ролі mRyRs у енергетичних процесах гепатоцитів ми досліджували зміни мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну у концентрації 1 мкмоль/л. Це зумовлено тим фактом, що сурамін є агоністом RyRs [208]. Виявилось, що сурамін є не лише агоністом RyRs, а й mRyRs гепатоцитів. Ефект сураміну на мембранний потенціал мітохондрій залежить від субстратів окиснення та фосфорилування наявних у середовищі інкубації. За окиснення екзогенного сукцинату сурамін знижує мембранний потенціал мітохондрій у стані  $S_4$ , а за окиснення екзогенних пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату – навпаки, збільшення. За окиснення сукцинату, активація mRyRs призводить до транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, водночас сукцинатдегідрогеназа не регулюється самими катіонами  $\text{Ca}^{2+}$  [181], тому компенсаторної інтенсифікації дихання не відбувається. За використання  $\alpha$ -кетоглутарату чи пірувату надходження  $\text{Ca}^{2+}$  інтенсифікує активність ферментів, що веде до збільшення мембранного потенціалу мітохондрій, але лише у стані  $S_4$  (рис. 4.1.).

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



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджено  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну регуляцію енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки за участі  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л за активації окиснення як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів.
2.  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ендоплазматичного ретикулуму беруть участь у регуляції клітинного дихання за окиснення субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій, яке виявилось найсуттєвішим за окиснення пірувату.
4. Мембранний потенціал мітохондрій внаслідок інгібування mRyRs виражено зменшується за  $[\text{Ca}^{2+}]$  0,1 мкмоль/л і окиснення пірувату (після 3 хв інкубації) чи  $\alpha$ -кетоглутарату (після 5 хв), але не сукцинату. Таке зменшення мембранного потенціалу мітохондрій зумовлене пригніченням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ, активність яких регулюється катіонами  $\text{Ca}^{2+}$ .
5. Ефект інгібування mRyRs на дихання ізольованих мітохондрій залежить від  $[\text{Ca}^{2+}]$  у середовищі та субстрату окиснення. За 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі та окиснення пірувату 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  $\text{Ca}^{2+}$  та окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Коли ж окиснювався сукцинат, швидкість

мітохондріального дихання під впливом ріанодину незначно зменшилася за обох концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ .

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  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ (пірувату і  $\alpha$ -кетоглутарату) і 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі він збільшує мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів, а за окиснення сукцинату – зменшує.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Костерін С. О. Транспортування іонів Са в мітохондріях гладеньких м'язів // Укр. біохім. журн. – 2014. – Т. 86. Вип. 6. – С. 18–30.
2. Бабский А. М. Влияние адреналина на окислительное фосфорилирование и обмен ионов кальция в митохондриях печени и слизистой оболочки тонкого кишечника крысы: автореф. дис. ... канд. биол. наук.: 03.00.13. Львів, 1985. 20 с.
3. Бабский А. М., Кондрашова М. Н., Шостаковская И. В. Действие и последствие адреналина на дыхание митохондрий // Физиол. журн. – 1985. – Вып. 31. – С. 301–306.
4. Бабский А. М., Стефанкив Ю. С., Кондрашова М. Н. Субстратно-гормональная система янтарная кислота - катехоламины. Новые данные // Митохондрии в патологии. Пущино: ОНТИ. – 2001. – С. 14–21.
5. Бережнов А. В., Зинченко В. П., Федотова Е. И., Яшин В. А. Применение флуоресцентной микроскопии в исследованиях динамики Са<sup>2+</sup> в клетках. Пущино, Учебно-методический центр Пущинского научного центра, Учебный центр Института биофизики клетки РАН, 2007. – 65 с.
6. Гордій С., Шостаковська І., Доліба М. та ін. Адренергічні та холінергічні механізми регуляції ефективності дихання секреторних клітин // Фізіол. журн. 1994. Т. 40. № 2. С. 46–56.
7. Гордій С.К., Іккерт О.В., Кургалюк Н.М. [та ін.]. Нейротрансмітери та ефективність дихання секреторних тканин : монографія – Львів : Львівський національний університет імені Івана Франка, 2006. – 233 с.
8. Деркач М., Гумецький Р., Чабан М. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 206 с.
9. Доліба М. Холінергічна регуляція транспорту кальцію, окисного фосфорилування в мітохондріях печінки і підшлункової залози: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.13. Л., 1988. 19 с.

10. Дубицький Л., Наливайко Н., Кравенська Є. Залежність  $\text{Ca}^{2+}$ -акумулювальної функції мітохондрій печінки від віку тварин. // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 46. С. 153–158.
11. Захарченко М. В., Кондрашова М. Н., Хундерякова Н. В. Важность сохранения биофизической организации изолированных митохондрий для выявления физиологической регуляции их функций // Биофизика. 2011. Вип. 56. С. 840–847.
12. Кондрашова М. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. 1991. Т. 56. №3. С. 388–405.
13. Костерин С. А, Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. біохім. журн. 1996. Т. 68. Вип. 6. С. 50–61.
14. Костюк О.П., О.О. Лук'янець «Внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація: структури та функції» Київ: Наукова думка, 2010. – 174 с.
15. Кравенська Є. В. Неспецифічна проникність внутрішньої мембрани мітохондрій та її модифікація катіонами металів: автореф. дис. ... канд. біол. наук.: 03.00.13. Львів, 2010. 20 с.
16. **Купиняк Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. Енергетичні процеси у печінці щура за дії інгібітора транспортувальних  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз еозину Y // Вісник Львівського університету. Серія біологічна 2013. Вип. 61. С.180–188.
17. **Купиняк Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. Вплив  $\text{I}_3\text{F}$  на енергетичні процеси у пермеабілізованих гепатоцитах // 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.
18. **Купиняк Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. Роль р'янодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів у регуляції дихання мітохондрій печінки щурів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2017. Вип. 76. С. 193–205.

19. **Купиняк Н.І.,** Іккерт О.В., Манько В.В. Енергетичні процеси у печінці щура за дії ріанодину // Експеримент. та клін. фізіол. і біохім. 2018. Вип. 1 (81). С. 51–61.
20. **Купиняк Н.І.,** Охай І.Ю., Манько В.В. Мембранний потенціал мітохондрій за дії сураміну // Науковий вісник східноєвропейського ун-ту. Сер. біол. наук. 2018. Вип. 4 (377). С. 100–108.
21. Манько Б.О., Манько В.В.  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи секреторних клітин екзокринних залоз // Вісник Львів. ун-ту. Сер.біол. 2008. Вип. 48. С. 1–32.
22. Манько В. В. Системи транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах екзокринних залоз: монографія. Львів: ЛНУ Івана Франка, 2011. 271 с.
23. Мерлавський В. М., Іккерт О. В., Манько В. В. Вплив  $\text{Ca}^{2+}$  на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Серія біол. 2015. Вип. 70. С. 294–304.
24. Наливайко Н. В., Вовканич Л. С., Дубицький Л. О. Порівняльний аналіз механізмів взаємодії катіонів двовалентних металів з  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Ca}^{2+} / \text{H}^+$ -обмінниками мітохондрій печінки // Вісн. Харк. нац. ун-ту. Біофіз. вісн. 2006. Вип. 17. С. 48–53.
25. Слинченко Н. Н., Браткова Н. Ф., Костерин С. А. и др. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 6. С. 812–819.
26. Шликов С. Г., Бабіч Л. Г., Євтушенко М. Є., Карахім С. О., Костерін С. О. Модуляція мембранного потенціалу мітохондрій міометрія антагоністами кальмодуліну // Укр. біохім. журн. 2014. Vol. 86, № 1. С. 29–41.
27. Gunter T. E., Pfeiffer D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1990. Vol. 258. N 5. P. 755–786.

28. Jouaville L.S., Ichas F., Holmuhamedov E.L., Camacho P., Lechleiter J.D. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes // *Nature* 1995. Vol. 377. P. 438–441.
29. MacLennan D.H, Asahi M., Tupling A.R. The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin // *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Vol. 986. P. 472–480.
30. Shamoo A.E., Ambudkar I.S. Regulation of calcium transport in cardiac cells // *Can J Physiol Pharmacol.* 1984. Vol. 62(1). P. 9–22.
31. Sottocasa G., Sandri G., Panfili E., De Bernard B., Gazzotti P., Vasington F.D., Carafoli E. Isolation of a soluble  $\text{Ca}^{2+}$  binding glycoprotein from ox liver mitochondria // *Biochem Biophys Res Commun.* 1972. Vol. 47(4). P. 808–813.
32. Adams J. M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival // *Science.* 1998. Vol. 281(5381). P. 1322–1326.
33. Altschafll B. A, Beutner G., Sharma V. K. Sheu S. S., Valdivia H. H. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: A pharmaco-kinetic profile // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1768(7). P. 1784–1795.
34. Amaral A.U., Cecatto C., da Silva J.C., Wajner A., Godoy K.DS., Ribeiro R.T., Wajner M. cis-4-Decenoic and decanoic acids impair mitochondrial energy, redox and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and induce mitochondrial permeability transition pore opening in rat brain and liver: Possible implications for the pathogenesis of MCAD deficiency // *Biochim Biophys A*
35. Amaya J. M., Nathanson M. H. Calcium Signaling in the Liver // *Compr Physiol.* 2013. Vol. 3(1): P 515–539.
36. Aperia A., Akkuratov E. E., Fontana J. M., Brismar H.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , a new class of plasma membrane receptors // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2016. Vol. 310(7). P. 491–495.
37. Assimacopoulos-Jeannet F., Chan T.M., Exton J.H. Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output. Insulin inhibition of alpha-adrenergic and glucagon actions in normal and calcium-depleted hepatocytes // *J Biol Chem.*

1979. Vol. 254(8). P. 2828–2834.
38. Baniene R., Nauciene Z., Maslauskaite S., Baliutyte G., Mildaziene V. Contribution of ATP synthase to stimulation of respiration by  $\text{Ca}^{2+}$  in heart mitochondria // *Syst Biol* (Stevenage). 2006. Vol. 153(5). P. 350–353.
  39. Barritt G.J., Litjens T.L., Castro J., Aromataris E., Rychkov G.Y. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels and microdomains of  $\text{Ca}^{2+}$  in liver cells // *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009. Vol. 36(1). P. 77–83.
  40. Bassik M.C., Scorrano L., Oakes S.A., Pozzan T., Korsmeyer S.J. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and apoptosis // *EMBO J*. 2004. Vol. 23(5). P. 1207–1216.
  41. Beindl W., Mitterauer T., Hohenegger M., Ijzerman A.P., Nanoff, C, Freissmuth, M Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues // *Molecular Pharmacology*. 1996. Vol. 50(2). P. 415–423.
  42. Bergling S., Dolmetsch R., Lewis R.S., Keizer J. A fluorometric method for estimating the calcium content of internal stores // *Cell Calcium*. 1998. Vol. 23. P. 251–259.
  43. Bernardi P. Mitochondria in muscle cell death // *Ital J Neurol Sci*. 1999. Vol. 20 (6). P. 395–400.
  44. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol. Rev*. 1999. Vol. 79(4). P. 1127–1155.
  45. Bernstein J., Santacana G. The  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange system of the liver cell // *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1985. Vol. 47(1). P. 33–34.
  46. Berridge M. J., Irvine R. F. Inositol phosphates and cell signalling // *Nature*. 1989. Vol. 341, (6239). P. 197–205.
  47. Berridge M. J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000. Vol. 1(1). P. 11–21.
  48. Berridge M.J. Elementary and global aspects of calcium signalling // *J. Physiol*. 1997 Vol. 499. P. 291–306.
  49. Berridge M.J. Inositol trisphosphate and calcium signaling // *Nature*. 1993. Vol.

361. P. 315–325.
50. Berridge M.J., Bootman M.D., Lipp P. Calcium—a life and death signal // *Nature*. 1998. Vol. 395(6703). P.645–648.
  51. Beutner G., Sharma V., Lin L., Ryu Sh-Y., Dirksen R.T., Sheu S-S. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling // *Biochim Biophys Acta*. 2005. Vol. 1717(1). P. 1–10.
  52. Beutner G., Sharma V.K., Giovannucci D.R., Yule D.I., Sheu S-S. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria // *J. Biol. Chem*. 2001. Vol. 276. P. 21482–21488.
  53. Boerries M., Most P., Gledhill J. Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes // *Mol. Cell. Biol*. 2007. Vol. 27. P. 4365–4373.
  54. Bookelman H. J., Trijbels M. F., Sengers R. A., Janssen A. M., Veerkamp J. H., Stadholjders T. M. Pyruvate Oxidation in Rat and Human Skeletal Muscle // *Mitochondria Biochemical Medicine*. 1978. Vol. 20. P 395–403.
  55. Borutaite V., Mildaziene V., Brown G.C., Brand M. D. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. Vol. 1272. P. 154–158.
  56. Brand M.D., Brown G.C., Cooper C.E. *Bioenergetics: a practical approach*. Oxford. IRL Press. 1995. P. 39–62.
  57. Brown J. C., Chung D. J., Cooper A. N., Staples J.F. Regulation of succinate-fuelled mitochondrial respiration in liver and skeletal muscle of hibernating thirteen-lined ground squirrels // *J Exp Biol*. 2013. Vol. 216(Pt 9). P. 1736–43.
  58. Buck E., Zimanyi I., Abramson J., Pessah I. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel // *J Biol Chem*. 1992. Vol. 267(33). P. 23560–23567.
  59. Bull R., Marengo J., Suarez-Isla B., Donoso P., Sutko J.L., Hidalgo C. Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar



- concentrations of ryanodine // *Biophys. J.* 1989. Vol. 56. P. 749–756.
60. Bull R., Marengo J.J. Sarcoplasmic reticulum release channels from frog skeletal muscle display two types of calcium dependence // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 331(3). P. 223–237.
  61. Burk S., Lytton J., MacLennan D.H., Shull G., cDNA cloning, functional expression, and mRNA distribution of a third organellar Ca-pump // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 18561–18568.
  62. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub R.W., Bolis L., editors. *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach.* New York: Raven Press. 1978. P. 107–118.
  63. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // *Cell Mol Life Sci.* 2007. Vol. 64(12). P. 1471–83.
  64. Burnstock G., Knight G E. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes in Different Systems // *International Review of Cytology.* 2004. Vol. 240. P. 31–304.
  65. Burnstock G., Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease // *Purinergic Signal.* 2014. Vol. 10(1). P.103–155.
  66. Caroni P., Reinlib L., Carafoli E. Charge movements during the Na<sup>+</sup>–Ca<sup>2+</sup> exchange in heart sarcolemmal vesicles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. Vol. 77(11). P. 6354–6358.
  67. Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain // *Ann. Rev. of Biochem.* 2003. Vol. 72. P. 77–109.
  68. Chance B., Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state // *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 217. P. 409–427.
  69. Charest R., Blackmore P.F., Berthon B., Exton J.H. Changes in free cytosolic Ca<sup>2+</sup> in hepatocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. Studies on Quin-2-loaded hepatocytes // *J Biol Chem.* 1983. Vol. 258(14). P. 8769–73.
  70. Collins T. J., Lipp P., Berridge M. J. et al. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals // *J. Biol. Chem.* 2001.

Vol. 276(28). P. 26411–26420.

71. Csordás G., Thomas A., Hajnóczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria // *EMBO J.* 1999. Vol. 18(1). P. 96–108.
72. Csordás G., Várnai P., Golenár T. et al. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology // *Mol. Cell Endocrinol.* 2012. Vol. 353 (1–2). P. 109–113.
73. Das A.M. Harris D.A. Control of mitochondrial ATP synthase in rat cardiomyocytes: effect of thyroid hormone // *Biochim. et Biophys. Acta.* 1991. Vol. 1096. P. 284–290.
74. Dehaye J.P., Hughes B.P., Blackmore P.F., Exton J.H. Insulin inhibition of alpha-adrenergic actions in liver // *Biochem J.* 1981. Vol. 194(3). P. 949–56.
75. Delgado-Coello B., Mas-Oliva J. Relevance of the plasma membrane calcium-ATPase in the homeostasis of calcium in the fetal liver // *Organogenesis.* 2014. Vol. 10(4). P.333–339.
76. Denton R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions // *Biochim Biophys Acta.* 2009. Vol. 1787(11). P. 1309–1316.
77. Denton R. M., McCormack J. G., Rut-I-Er G. A., Burnett P., Edgell N. J., Moule S. K. Diggle T. A. The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex *Advan // Enzyme Regul.* 1996. Vol. 36. P. 183–198.
78. Denton R. M., Randle P. J., Martin B. R. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase // *Biochemical Journal.* 1972. Vol. 128(1). P. 161–179.
79. Denton R., Richards D., Chin J. Calcium ions and the regulation of NAD<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues // *Biochem. J.* 1978. Vol. 176. P. 899–906.
80. Dimroth P., Kaim G., Matthey U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases // *J. Exp. Biol.* 2000. Vol. 203(Pt 1). P. 51–59.

81. Dixon C.J., Woods N.M., Cuthbertson K.S., Cobbold P.H. Evidence for two Ca<sup>2+</sup>-mobilizing purinoceptors on rat hepatocytes // *Biochem J.* 1990. Vol. 269. P. 499–502.
82. Dressel J. The discovery of germanin by Oskar Dressel and Richard Kothe // *J. Chem. Ed.* 1961. Vol. 38. P. 620–621.
83. Dudkina N. V. Eubel H., Keegstra W., Boekema E., Braun H-P. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III // *PNAS.* 2005. Vol. 102(9). P. 3225–3229.
84. Dudkina N. V., Kouřil R., Peters K., Braun H.P., Boekema E.J. Structure and function of mitochondrial supercomplexes // *Bioenergetics.* 2010. Vol. 1797(6–7). P. 664–670.
85. Dunn P. M., Blakeley A. G. H. Suramin: A reversible P<sub>2</sub>-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens // *Br. J. Pharmacol.* 1988. Vol. 93. P. 243–245.
86. Dupont G., Swillens S., Clair C., Tordjmann T., Combettes L. Hierarchical organization of calcium signals in hepatocytes: from experiments to models // *Biochimica et Biophysica Acta.* 2000. Vol. 1498. P. 134–152.
87. Endo M., Tanaka M., Ogawa Y. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibers // *Nature.* 1970. Vol. 228. P. 34–36.
88. Eu J.P., Xu L., Stamler J.S., Meissner G. Regulation of ryanodine receptors by reactive nitrogen species // *Biochem Pharmacol.* 1999. Vol. 57(10). P. 1079–1084.
89. Evan G. I., Vousden K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer // *Nature.* 2001. Vol. 411(6835). P. 342–348.
90. Exton J.H. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism // *Diabetes Metab Rev.* 1987. 3(1). P. 163–83.
91. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum // *Am. J. Physiol.* 1983. Vol. 245. P. 1–14
92. Ferrari D., La Sala A., Chiozzi P., Morelli A., Falzoni S., Girolomoni G., Idzko

- M., Dichmann S., Norgauer J, Di Virgilio F. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release // *FASEB J.* 2000. Vol. 14(15). P. 2466–2476.
93. Feske S Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep; 7(9) P. 690–702.
94. Feske S., Gwack Y., Prakriya M., Srikanth S. et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function // *Nature.* 2006 Vol. 441(7090). P. 179–185.
95. Fill M., Copello J. A. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels // *Physiol Rev.* 2002 Vol. 82. P. 893–922.
96. Fiske C. H., SubbaRow Y. The colometric determination of phosphorus // *J Biol Chem.* 1925. N 66. P. 375–400.
97. Flood P., Role L. W. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulation by general anesthetics // *Toxicol. Lett.* 1998. Vol. 100–101. P. 149–153.
98. Fluo calcium indicators. Molecular probes. Invitrogen detection technologies. Product information. – Revised: 02-Feb-2011.
99. Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology.* Engelborghs Y., Visser A. J. (Eds.). New York: Springer. 2014. 812 p.
100. García-Pérez C., Schneider T., Hajnóczky G. et al. Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2011. Vol. 301 (5). P. 1907–1915.
101. Gasbarrini A., Borle A.B., Farghali H., Bender C., Francavilla A., Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and cytotoxicity in rat hepatocytes // *J Biol Chem.* 1992a. Vol. 267. P. 6654–6663.
102. Gaspers L. D., Thomas A. P. Calcium signaling in liver // *Cell Calcium* 2005. Vol. 38. P. 329–342.
103. Gee K. R., Brown K. A., Chen W-N. H. // *Cell Calcium.* 2005. 27, N 2. P. 97–106.

104. Giacomello M, Pellegrini L The coming of age of the mitochondria–ER contact: A matter of thickness // *Cell Death Differ.* 2016. Vol. 23. P. 1417–1427.
105. Gilabert J.A., Parekh A.B. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current  $\text{I}(\text{CRAC})$  // *EMBO J.* 2000. Vol. 19(23). P. 6401–6407.
106. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis // *Genes Dev.* 1999. Vol. 13(15). P.1899–1911.
107. Grover A. K., Khan I. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. Review article // *Cell Calcium.* 1992. Vol. (1). P. 9–17.
108. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. P. 3440–3450.
109. Gunter T. E., Pfeiffer D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 1990 Vol. 258(5 Pt 1). P. 755–786.
110. Gunter T. E., Sheu S. S. Characteristics and possible functions of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1787(11). P. 1291–1308.
111. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. Calcium and mitochondria // *FEBS Letters.* 2004. Vol. 567(1). P. 96–102.
112. Hajnóczky G., Hager R., Thomas A.P., Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by  $\text{Ca}^{2+}$  // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 14157–14162.
113. Hajnoczky G., Robb-Gaspers L.D., Seitz M.B., Thomas A.P. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria // *Cell.* 1995. Vol. 82. P. 415–424.
114. Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H., Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain // *FEBS Lett.* 1992. Vol. 312. P. 229–235.
115. Halestrap A.P., Davidson A.M. Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced large-amplitude

- swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J.* 1990;268:153–160.
116. Hansford R.G. Physiological role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport // *J.Bioenerg. Biomembr.* 1994. Vol. 26. P. 495–508.
117. Hardingham G.E, Chawla S., Johnson C.M., Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression // *Nature.* 1997. Vol. 385(6613). P. 260–265.
118. Hill A. P., Kingston O., Sitsapesan R. Functional Regulation of the Cardiac Ryanodine Receptor by Suramin and Calmodulin Involves Multiple Binding Sites // *Molecular Pharmacology.* 2004. Vol. 65(5). P. 1258–1268.
119. Hirata K., Pusch T., O'Neill A.F., Dranoff J.A., Nathanson M.H. The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger  $\text{Ca}^{2+}$  waves in rat hepatocytes // *Gastroenterology.* 2002 Vol. 122(4). P. 1088–1100.
120. Hohenegger M., Berg I., Weigl L., Mayr G.W., Potter, B.V.L., Guse A.H. Pharmacological activation of the ryanodine receptor in Jurkat T-lymphocytes // *Br J Pharmacol.* 1999. Vol. 128(6). P. 1235–1240.
121. Hohenegger M., Mathyash M., Poussu K., Herrmann-Frank A., Sarközi S., Lehmann-Horn F., Freissmuth M. Activation of the skeletal muscle ryanodine receptor by suramin and suramin analogs // *Mol. Pharmacol.* 1996. Vol. 50. P.1443–1453.
122. Hoppe U.C. Mitochondrial calcium channels // *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584. N 10. P. 1975–1981.
123. Horsefield R., Iwata S., Byrne B. Complex II from a structural perspective // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2004. Vol. 5(2). P. 107–118.
124. Hoth M./1., Fanger C.M., Lewis R.S.. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes // *J Cell Biol.* 1997. Vol. 137(3). P. 633–648.
125. Howard A., Barley N.F., Legon S., Walters J.R. Plasma-membrane calcium-pump

- isoforms in human and rat liver // *Biochem J.* 1994. Vol. 303(Pt 1). P. 275–279.
126. Hucho F., Randall D.D., Roche T.E., Burgett M.W., Pelley J.W, Reed L.J. Keto acid dehydrogenase complexes. XVII. Kinetic and regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine kidney and heart // *Arch Biochem Biophys.* 1972. Vol. 151(1). P 328–340.
127. Hüttemann M. Pecina P., Rainbolt M., Sanderson T.H. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis // *Mitochondrion.* 2011. Vol. 11(3). P. 369–381.
128. Jakob R., Beutner G., Sharma V. et al. Molecular and functional identification of a mitochondrial ryanodine receptor in neurons // *Neuroscience Lett.* 2014. Vol. 575. P. 7–12.
129. James P. Inui M. Tada M. Chiesi M. Carafoli B. Nature and site of phospholamban regulation of the Ca-pump of SR. *Nature.* 1989. Vol. 342. P. 90–92.
130. Johanna T. Lanner, Dimitra K. Georgiou, Aditya D. Joshi, Susan L. Hamilton Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010.
131. Jones B.F., Boyles R.R., Hwang S.Y., Bird G.S., Putney J.W. Calcium influx mechanisms underlying calcium oscillations in rat hepatocytes // *Hepatology.* 2008 Vol. 48(4) P. 1273–1281.
132. Jonson D., Lardy H. In *Methods in enzymology* // New York. 1967. Vol. 10. P. 94–102.
133. Jouaville L. S., Ichas F., Holmuhamedov E.L., Camacho P., Lechleiter J.D. Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes // *Nature.* 1995. Vol. 377(6548). P. 438–441.
134. Jouaville L., Pinton P., Bastianutto C. et al. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96(24). P. 13807–13812.

135. Kadenbach B., Ramzan R., Wen L., Vogt S. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Vol. 1800(3). P. 205–212.
136. Kalckar H.M. 50 years of biological research—from oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation // *Annual Review of Biochemistry*. 1991. Vol. 60. P. 1–37.
137. Kappl M., Hartung K. Rapid charge translocation by the cardiac  $\text{Na}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger after a  $\text{Ca}^{2+}$  concentration jump // *Biophys. J*. 1996. Vol. 71. P. 2473–2485.
138. Kass G.E., Llopis J., Chow S.C., Duddy S.K., Orrenius S. Receptor-operated calcium influx in rat hepatocytes. Identification and characterization using manganese // *J Biol Chem*. 1990. Vol. 265(29). P. 17486–17492.
139. Khananshveli D. Distinction between the two basic mechanisms of cation transport in the cardiac  $\text{Na}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange system // *Biochemistry*. 1990. Vol. 29 (10). P. 2437–2442.
140. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease // *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol*. 2001. Vol. 161 (III–XIII). P. 1–151.
141. Koopman W.H., Nijtmans L.J., Dieteren C.J., Roestenberg P. et al. Mammalian mitochondrial complex I: Biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 12(12). P. 1431–1470.
- 142. Kupynyak N.I., Ikkert O.V., Shlykov S.G., Babich L.G., Manko V.V.** Mitochondrial ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels of rat liver // *Cell Biochem Funct*. 2017. Vol. 1. P. 42–49.
143. **Kupynyak N.I., Babich L.G., Shlykov S.G., Kushnarova-Vakal A.M., Kupynyak N.I., Manko V.V., Fomin V.P., Kosterin S.O.** The relationship between the ionized Ca concentration and mitochondrial functions // *Ukr. Biochem. J.*, 2018, Vol. 90, N 3. P. 32–40
144. Labajova A., Vojtiskova A., Krivakova P., Kofranek J., Drahotka Z., Houstek J. Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device



- with a tetraphenylphosphonium-selective electrode // *Anal Biochem.* 2006. Vol. 353(1). P. 37–42.
145. Lanner J.T., Georgiou D.K., Joshi A.D., Hamilton S.L. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. 2010. a003996.
146. Lapuente-Brun E., Moreno-Loshuertos R., Acín-Pérez R., Latorre-Pellicer A. Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain // *Science.* 2013. Vol. 340(6140). P. 1567–1570.
147. Lechleiter J., Girard S., Clapham D., Peralta E. Subcellular patterns of calcium release determined by G protein-specific residues of muscarinic receptors // *Nature.* 1991. Vol. 350. P. 505–508.
148. Lenaz G., Baracca A., Barbero G., Bergamini C. Mitochondrial respiratory chain super-complex I–III in physiology and pathology // *Biochim. et Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1797(6–7). P. 633–640.
149. Lenaz G., Fato R., Genova M.L., Bergamini C., Bianchi C., Biondi A. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol. 1757(9–10). P. 1406–1420.
150. LeSage G.D., Glaser S.S., Marucci L., Benedetti A. et al. Acute carbon tetrachloride feeding induces damage of large but not small cholangiocytes from BDL rat liver // *Am J Physiol.* 1999. Vol. 276(5 Pt 1). P. 1289–1301.
151. Li C., Fox C.J., Master S.R., Bindokas V.P., Chodosh L.A., Thompson C.B. Bcl-X(L) affects  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis by altering expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. Vol. 99. P. 9830–9835.
152. Lin S.H. Novel ATP-dependent calcium transport component from rat liver plasma membranes. The transporter and the previously reported  $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$  are different proteins // *J Biol Chem.* 1985. Vol. 260. P. 7850–7856.
153. Linden, J. M. Purinergic Receptors Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. Philadelphia, Lippincott-Raven. 1999.

154. Liou J., Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrell J.E. Jr, Meyer T. STIM is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor essential for  $\text{Ca}^{2+}$ -store-depletion-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  influx // *Curr Biol*. 2005 Vol. 15(13). P. 1235–1241.
155. Lowe P.J., Miyai K., Steinbach J.H., Hardison W.G. Hormonal regulation of hepatocyte tight junctional permeability // *Am J Physiol*. 1988 Vol. 255 (4 Pt 1). P. 454–461.
156. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
157. Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors // *Cell*. 1998. Vol. 94(4). P. 481–490.
158. Mallilankaraman K., Cárdenas C., Doonan P. et al. MCUR1 is an essential component of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake that regulates cellular metabolism // *Nat. Cell Biol*. 2012 Vol. 14 (12). P. 1336–1343.
159. Marchant J., Callamaras N., Parker I. Initiation of  $\text{IP}_3$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  waves in *Xenopus* oocytes // *EMBO J*. 1999. Vol. 18. P. 5285–5299.
160. Marshall I.C., Taylor C.W. Biphasic effects of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  stimulated Ca mobilization in hepatocytes // *J. Bio. Chem*. 1993b. Vol. 268, Issue 18. P. 13214–13220.
161. Martinou J.C., Youle R.J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics // *Dev Cell*. 2011. Vol. 21(1). P. 92–101.
162. McCormack J., Denton R. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat // *Biochem. J*. 1980. Vol. 190. P. 95–105.
163. McCormack J.G., Halestrap A.P, Denton R.M. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* // 1990. Vol. 70(2). P. 391–425.
164. Meissner G. Ryanodine receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channels and their regulation by

- endogenous effectors // *Annu Rev Physiol.* 1994. Vol. 56. P. 485–508.
165. Meldolesi J., Pozzan T. Pathways of  $\text{Ca}^{2+}$  influx at the plasma membrane: voltage-, receptor-, and second messenger-operated channels // *Exp Cell Res.* 1987. Vol. 171(2). P. 271–83.
166. Meldolesi J., Pozzan T. The endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  store: A view from the lumen // *Trends Biochem. Sci.* 1998. P. 10–14.
167. Minagawa N., Kruglov E.A., Dranoff J.A., Robert M.E., Gores G.J., Nathanson M.H. The antiapoptotic protein Mcl-1 inhibits mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  signals // *J Biol Chem.* 2005. Vol. 280. P. 33637–33644.
168. Mnatsakanyan N., Beutner G., Porter G.A., Alavian K.N., Jonas E.A. Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore // *J Bioenerg Biomembr.* 2017. Vol. 49(1). P. 13–25.
169. Montero M., Alonso M., Carnicero E., Cuchillo-Ibáñez I. et al. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transients that modulate secretion // *Nat Cell Biol.* 2000. Vol. 2(2). P. 57–61.
170. Montero M., Brini M., Marsault R., Alvarez J., Sitia R., Pozzan T., Rizzuto R. Monitoring dynamic changes in free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells // *EMBO J.* 1995. Vol. 14(22). P. 5467–75.
171. Nadtochiy S.M., Tompkins A., Brookes P.S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology and cardioprotection // *Biochem. J.* 2006. Vol. 395. P. 611–618.
172. Nakai J., Imagawa T., Hakamat, Y., Shigekawa M., Takeshima H., Numa S. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 271. P. 169–177
173. Nakamura T., Arii Sh., Monden K., Furutani M. et al. Expression of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. Vol. 95(9). P. 5389–5394.
174. Neer E.J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals // *Cell.*

1995. Vol. 80(2). P. 249–257.
175. Niggli V., Adunyah E.S., Penniston J.T., Carafoli E. Purified (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids // *J Biol Chem.* 1981. Vol. 256(1). P 395–401.
176. North R. A. Molecular physiology of P2X receptors // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82(4). P. 1013–1067.
177. Oliveira A. G., Marques P. E., Amaral S. S., Quintao J L. D et al. Purinergic signalling during sterile liver injury liver // *International Liver Int.* 2013. Vol. 33. P. 353–361.
178. Otsu K., Willard H.F., Khanna V.K., Zorzato F., Green N.M., MacLennan D.H. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 13472–13483.
179. O-Uchi J., Pan S., Sheu S-S. Molecular identities of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> influx mechanism: Updated passwords for accessing mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-linked health and disease // *JGP.* 2012. Vol. 139(6). P. 435–443.
180. Pacher P., Thomas A., Hajnóczky G. Ca<sup>2+</sup> marks: miniature calcium signals in single mitochondria driven by ryanodine receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Vol. 99. P. 2380–2385.
181. Panov A.V., Scaduto R.C. Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1995. Vol. 316 N 2. P. 815–820.
182. Parekh A. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane // *J. Physiol.* 2003. Vol. 547. P. 333–348.
183. Parekh A.B., Putney J.W. Store-operated calcium channels // *Physiol. Rev.* 2005. Vol. 85. P. 757–810.
184. Pierebon N., Renard-Rooney D., Gaspers L. Ryanodine receptors in liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 45. P. 34086–34095.

185. Porter R.K., Brand M.D. Mitochondrial proton conductance and H<sup>+</sup>/O ratio are independent of electron transport rate in isolated hepatocytes // *Biochem. J.* 1995. Vol. 310(Pt 2). P. 379–382.
186. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores // *Physiol Rev.* 1994. Vol. 74(3). P. 595–636.
187. Pusl T., Wu J.J., Zimmerman T.L., Zhang L. et al. Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium // *J Biol Chem.* 2002. Vol. 277. P. 27517–27527.
188. Putney J.W. A model for receptor-regulated calcium entry // *Cell Calcium.* 1986. Vol. 7. P. 1–12.
189. Qi F., Pradhan R.K., Dash R.K., Beard D.A. Detailed kinetics and regulation of mammalian 2-oxoglutarate dehydrogenase // *BMC Biochem.* 2011. Vol. 26. P. 12–53.
190. Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V., Treberg J.R., Ackrell B.A., Brand M.D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions // *The J. of Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. P. 27255–27264.
191. Raturi A., Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM) // *Biochim Biophys Acta.* 2013. Vol. 1833(1). P 213–224.
192. Raturi A., Simmen T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM) // *Biochim Biophys Acta.* 2013 Vol. 1833(1). P. 213–224.
193. Reed JC Bcl-2 family proteins // *Oncogene.* 1998. Vol. 17(25). P. 3225–3236.
194. Reviews in Fluorescence 2006. Geddes C. D. Lakowicz J. R. (Eds.). New York: Springer, 2006. Vol. 3. 621 p.
195. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J Cell Biol.* 1963. Vol. 17. P. 208–212.
196. Rizzuto R., Bastianutto C., Brini M., Murgia M., Pozzan T. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>

- homeostasis in intact cells // *J Cell Biol.* 1994. Vol. 126(5). P. 1183-1194.
197. Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria // *Science.* 1993. Vol. 262(5134). P. 744–747.
198. Rizzuto R., Duchen M.R., Pozzan T. Flirting in little space: The ER/mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  liaison // *Sci. STKE.* 2004. Vol. 215.T re 1.
199. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M. et al.  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from the ER to mitochondria: when, how and why? // *Biochim Biophys Acta.* 2009. Vol. 1787(11). P. 1342–1351.
200. Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ : molecular determinants and functional consequences // *Physiol Rev.* 2006. Vol. 86(1).P. 369–408.
201. Robb-Gaspers L.D., Burnett P., Rutter G.A., Denton R.M., Rizzuto R., Thomas A.P. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses // *EMBO J.* 1998. Vol. 17. P. 4987–5000.
202. Roche T. E., Baker J. C., Yan X., Hiromasa Y. et. al. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001. Vol. 70. P 33–75.
203. Rodrigues M.A., Gomes D.A., Leite M.F., Grant W., Zhang L., Lam W., Cheng Y.C., Bennett A.M., Nathanson M.H. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation // *J Biol Chem.* 2007. Vol. 282. P. 17061–17068.
204. Rooney T.A., Sass E.J., Thomas A.P. Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes // *J Biol Chem.* 1989. Vol. 264. P. 17131–17141.
205. Rutter G.A., Denton R.M., The binding of  $\text{Ca}^{2+}$  ions to pig-heart  $\text{Nad}^+$ -isocitrate dehydrogenase and the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex // *Biochem. J.*, 1989. Vol. 263. P. 453–462.
206. Rutter J., Winge D. R., Schiffman J. D. Succinate Dehydrogenase – Assembly, Regulation and Role in Human Disease // *Mitochondrion.* 2010. Vol. 10(4). P

393–401.

207. Satrústegui J., Pardo B., Del Arco A. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signalling // *Physiol Rev.* 2007. Vol. 87(1). P. 29–67.
208. Seewald M.J., Olsen R.A., Powis G. Suramin blocks intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release and growth factor-induced increases in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration // *Cancer Lett.* 1989. Vol. 49. P. 107–113.
209. Seglen P.O. Preparation of isolated rat liver cells // *Methods Cell Biol.* 1976. Vol. 13 P. 29–83.
210. Sharma V., Ramesh V., Franzini-Armstrong C., Sheu S-S. Transport of  $\text{Ca}^{2+}$  from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in rat ventricular myocytes // *J Bioenerg Biomembr.* 2000. Vol. 32(1). P. 97–104.
211. Shoshan-Barmatz V. High affinity ryanodine binding sites in rat liver endoplasmic reticulum // *FEBS.* 1990 Vol. 263(2). P. 317–320.
212. Siess E.A, Wieland O. H. Regulation of pyruvate dehydrogenase interconversion in isolated hepatocytes by the mitochondrial ATP/ADP ratio // *FEBS Lett.* 1975. Vol. 52(2). P. 226–230.
213. Sparagna G.C., Gunter K.K., Sheu S.S., Gunter T.E. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270(46). P. 27510–27515.
214. Stein C.A., Larocca It.V., Thomas R., Mcame N. Myzas C.E. Suramin: An anticancer drug with a unique mechanism of action // *J. Clin. Oncol.*, 1989. Vol. 7. P. 499–508.
215. Szalai G., Csordás G., Hantash B.M., Thomas A.P., Hajnóczky G. Calcium Signal Transmission between Ryanodine Receptors and Mitochondria // *The Journ of Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P.15305–15313.
216. Szymański J., Janikiewicz J., Michalska B., Patalas-Krawczyk P. et al. Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure // *Int J Mol Sci.* 2017. Vol. 18(7). 1576.

217. Tada M., Kirchberger M.A., Katz A.M. Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase // *J Biol Chem.* 1975. Vol. 250(7). P. 2640–2647.
218. Takeshima H., Nishimura S., Matsumoto T., Ishida H. et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor // *Nature.* 1989. Vol. 339. P. 439–445.
219. Taylor C.W. Inositol trisphosphate receptors:  $\text{Ca}^{2+}$  modulated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1436. P. 19–33
220. Taylor S.I., Mukherjee C., Jungas R.L. Regulation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat liver mitochondria. Effects of octanoate, oxidation-reduction state, and adenosine triphosphate to adenosine diphosphate ratio // *J Biol Chem.* 1975. Vol. 250(6). P. 2028–2035.
221. Territo P., French S., Balaban R. Simulation of cardiac work transitions, in vitro: effects of simultaneous  $\text{Ca}^{2+}$  and ATPase additions on isolated porcine heart mitochondria // *Cell Calcium.* 2001. Vol. 30 (1) P. 19–27.
222. Thastrup O., Cullen P.J., Drøbak B.K., Hanley M.R., Dawson A.P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990. Vol. 87(7). P. 2466–2470.
223. Thomas A.P., Bird G.S., Hajnoczky G., Robb-Gaspers L.D., Putney J.W., Jr Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling // *FASEB J.* 1996. Vol. 10. P. 1505–1517.
224. Tinel H.I., Cancela J.M., Mogami H., Gerasimenko J.V. et al. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  signals // *EMBO J.* 1999. Vol. 18(18). P. 4999–5008.
225. Toescu E.C. Mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling // *J.Cell.Mol.Med.* 2000. Vol. 4(3). P. 164–175.



226. Tovey S.C., de Smet P., Lipp P., Thomas D., et al. Calcium puffs are generic InsP(3)-activated elementary calcium signals and are downregulated by prolonged hormonal stimulation to inhibit cellular calcium responses // *J Cell Sci.* 2001. Vol. 114(Pt 22). P. 3979–3989.
227. Vallot O., Combettes L., Lompré A-M. Functional coupling between the caffeine/ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> store and mitochondria in rat aortic smooth muscle cells // *Biochem J.* 2001. Vol. 357(2). P. 363–371.
228. Van Petegem F. Ryanodine Receptors: Structure and Function // *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287(38). P. 31624–31632.
229. Vig M., Peinelt C., Beck A., Koomoa D.L. et al. Kinet CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry // *JP Science.* 2006. Vol. 312(5777). P. 1220-1223.
230. Voronina S., Sukhomlin T., Johnson P.R., Erdemli G., Petersen O.H., Tepikin A. Correlation of NADH and Ca<sup>2+</sup> signals in mouse pancreatic acinar cells // *J Physiol.* 2002. Vol. 539(Pt 1). P. 41–52.
231. Walter L., Hajnóczky G. Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2005. Vol. 37 (3). P. 191–206.
232. Wan B., Lanoue, K.F., Cheung J.Y., Scaduto R.C. Regulation of citric-acid cycle by calcium // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 13430–13439.
233. Wang Y., Li G., Goode J., Paz J.C. et al. Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes // *Nature.* 2012. Vol. 485(7396). P. 128–132.
234. Watanabe N., Tsukada N., Smith C.R., Edwards V., Phillips M.J. Permeabilized hepatocyte couplets. Adenosine triphosphate-dependent bile canalicular contractions and a circumferential pericanalicular microfilament belt demonstrated // *Lab Invest.* 1991. Vol. 65(2). P. 203–213.
235. Watanabe S., Smith C.R., Phillips M.J. Coordination of the contractile activity of bile canaliculi. Evidence from calcium microinjection of triplet hepatocytes // *Lab Invest.* 1985. Vol. 53. P. 275–279.

236. Watras J.1., Bezprozvanny I., Ehrlich B.E. Inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channels in cerebellum: presence of multiple conductance states // *J Neurosci*. 1991. Vol. 11(10). P. 3239–3245.
237. Wieland O.H, Portenhauser R. Regulation of pyruvate-dehydrogenase interconversion in rat-liver mitochondria as related to the phosphorylation state of intramitochondrial adenine nucleotides // *Eur J Biochem*. 1974. Vol. 45(2). P. 577–588.
238. Wojcikiewicz R.H. Type I, II, and III inositol 1,4,5-trisphosphate receptors are unequally susceptible to down-regulation and are expressed in markedly different proportions in different cell types // *J. Biol. Chem*. 1995. Vol. 270. P. 11678–11683.
239. Xu Z., Zhang D., He X., Huang Y., Shao H. Transport of Calcium Ions into Mitochondria // *Curr Genomics*. 2016. Vol. 17(3). P. 215–219.
240. Zhang S.L., Yu Y., Roos J., Kozak J.A., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Stauderman KA, Cahalan MD STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane // *Nature*. 2005. Vol. 437(7060). P. 902–905.
241. Zorzato F., Fujii J., Otsu K., Phillips M. et al. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // *J. Biol. Chem*. 1990. Vol. 265. P. 2244–2256.

## Додаток А

### Список публікацій здобувача

23. Куруньяк N.I. Mitochondrial ryanodine-sensitive  $Ca^{2+}$  channels of rat liver / **Куруньяк N.I.**, Ikkert O.V., Shlykov S.G., Babich L.G., Manko V.V. // Cell Biochem Funct. 2017. Vol. 1. P. 42–49.
24. Куруньяк N.I. The relationship between the ionized Ca concentration and mitochondrial functions / Babich L.G., Shlykov S.G., Kushnarova-Vakal A.M., **Куруньяк N.I.**, Manko V.V., Fomin V.P., Kosterin S.O. // Ukr. Biochem. J., 2018, Vol. 90, N 3. P. 32–40
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.

30. Matsyah N.I. (Kupynyak N.I.) The inhibitor of Ca<sup>2+</sup>-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.
31. Мацях Н.І. (**Купиняк Н.І.**) Інгібітор Ca<sup>2+</sup>-помп еозин Y не впливає на енергетичні процеси у печінці щурів. / **Мацях Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали II конференції молодих учених «Фізіологія: від молекул до організму» (8–9 жовтня 2012 р., Київ). Фізіол. журн., 2012, Т. 58, № 6. С.109.
32. 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.
33. Купиняк Н.І. Вплив ріанодину на споживання кисню ізольованими мітохондріями печінки щурів / **Купиняк Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. // III Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених «Фізіологія: від молекул до організму» (24–25 жовтня 2013 р., Київ): збірник тез. Київ, 2013. С. 17.
34. Купиняк Н.І. Активація ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-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.
35. Купиняк Н.І. Роль окремих Ca<sup>2+</sup>-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.
36. Купиняк Н.І. Вплив різних концентрації Ca<sup>2+</sup> 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.

37. Купиняк Н.І. Вплив ІФ<sub>3</sub> 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.
38. Купиняк Н.І. Залежність мітохондріального дихання гепатоцитів від функціональної активності Ca<sup>2+</sup>-помп та ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів / **Купиняк Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали ХІХ-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.
39. Купиняк Н. Поглинання кисню мітохондріями гепатоцитів щурів за дії модуляторів Ca<sup>2+</sup>-каналів / **Купиняк Н.**, Мазур Г., Колтун О.І., Іккерт О., Манько В // ХІ Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (20–23 квітня 2015 р., Львів): збірник тез. Львів, 2015. С. 470–471.
40. Купиняк Н.І. Зміни мембранного потенціалу мітохондрій печінки щура за дії ріанодину / **Купиняк Н.І.**, Іккерт О.В., Манько В.В. // Матеріали ХІХ-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.
41. Купиняк Н.І. Активація мітохондріальних ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-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.
42. 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.