

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ ЛЬВІВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

МАЗУР ГАЛИНА МИХАЙЛІВНА

УДК 577.23 : 57.042 : 57.053.2 : 612.35 : 612.26

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
КРИТЕРІЇВ АДАПТАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ
МІТОХОНДРІЙ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних
наук

Львів – 2021

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано у Львівському національному університеті імені Івана Франка
Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник:

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

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор
Жолос Олександр Вікторович,
ННЦ «Інститут біології та медици-
ни», Київський національний уні-
верситет
імені Тараса Шевченка,
завідувач кафедри біофізики та ме-
дичної інформатики

кандидат біологічних наук
Данилович Ганна Вікторівна,
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна
НАН України,
старший науковий співробітник відділу
біохімії м'язів

Захист відбудеться «23» квітня 2021 р. о 13.30 год на засіданні спеціалі-
зованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені
Івана Франка на платформі Zoom (Meeting ID: 876 0098 6497, Passcode: 833954)

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

Автореферат розіслано «22» березня 2021 р.

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

М. В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Адаптаційну здатність мітохондрій можна охарактеризувати як максимальний приріст катаболічних процесів (максимальний катаболічний потенціал), спричинений деполяризацією їхньої внутрішньої мембрани. Зменшення мембранного потенціалу мітохондрій, енергія якого використана для синтезу АТФ під час функціонального навантаження клітин, необхідно компенсувати. Межі цієї здатності і визначають здатність клітин виконати те чи інше навантаження, а відтак – і їхню життєздатність. Показано, що зниження адаптаційної здатності ізольованих мітохондрій корелює з різними патологіями та загибеллю клітин [Yadava, Nicholls, 2007; Hill, Higdon, Dranka at al., 2010; Sansbury, Jones, Riggs at al., 2011].

Зручним інструментом для визначення адаптаційної здатності мітохондрій є протонофори (зокрема FCCP), які знижують мембранний потенціал мітохондрій шляхом полегшеної дифузії протонів крізь внутрішню мембрану мітохондрій і запускають, таким чином, компенсаторну реакцію дихального ланцюга. Використовуючи термін «адаптаційна здатність мітохондрій», ряд авторів [Nicholls, 2008; Hill, Higdon, Dranka at al., 2010; Sansbury, Jones, Riggs at al., 2011] часто ототожнюють її з максимальною швидкістю роз'єданого дихання, що звужує саме поняття адаптаційної здатності та обмежує можливості її дослідження. На нашу думку, врахування інших критеріїв оцінки адаптаційної здатності мітохондрій допомогло б більш ширше охарактеризувати це поняття та виявити чинники, що її визначають.

Ми припускаємо, що адаптаційну здатність мітохондрій можна охарактеризувати максимальною швидкістю роз'єданого дихання (найвищі значення швидкостей дихання за протестованих концентрацій FCCP), оптимальною концентрацією FCCP (концентрацією, за якої зареєстрована максимальна швидкість роз'єданого дихання), прискоренням дихання внаслідок додавання FCCP (визначається як друга похідна кривої реєстрації напруження кисню у полярографічній комірці) та, для уникнення залежності від базальної швидкості, площею приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP, яка дає змогу врахувати в інтегральній оцінці нахил кривої зміни швидкості споживання кисню, а не лише оптимальну концентрацію FCCP.

Процеси енергетичного забезпечення, а отже і адаптаційна здатність самих гепатоцитів, значною мірою регулюються катіонами Ca^{2+} , адже помірне збільшення концентрації Ca^{2+} у матриксі мітохондрій підвищує активність піруватдегідрогенази, ізоцитратдегідрогенази, α -кетоглутаратдегідрогенази та синтез АТФ [McComack, 1985]. Ми припускаємо також, що здатність мітохондрій компенсувати енергетичні витрати клітини у значній мірі залежить і від доступності субстратів окиснення. Транспортування одних і тих самих субстратів у клітини різних типів може відбуватись транспортерами з різною спорідненістю (K_m) до цих субстратів [Fafournoux, Demigne, Remesy at al., 1983; Zimmerli, O'Neill, Meier, 1992; Poole, Halestrap, 1993].

Ще одним чинником, який суттєво може впливати на гепатоцити, а відтак і на процеси енергетичного забезпечення, є етанол, основна частина якого ме-

таболізується в печінці. Мітохондріальне дихання відіграє важливу роль у метаболізмі етанолу шляхом регенерації НАД⁺, який регулює активність алкогольдегідрогенази та альдегіддегідрогенази і є необхідним для етанол-ацетальдегід метаболізму [Han, Ybanez, Johnson et al., 2012].

Оскільки на сьогодні немає чітко визначених критеріїв, щоб оцінити адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, важливо обґрунтувати їх у нормі та за дії різних чинників для кращого розуміння фізіологічних процесів, а також для розробки фармакологічних засобів корекції патофізіологічних станів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках держбюджетних тем «Ca²⁺-транспортувальні системи та регуляції клітинного дихання екзокринних залоз у нормі і за дії стресорних чинників» (2015–2017 рр., № держреєстрації 0115U003246) і «Адаптаційний потенціал мітохондрій секреторних клітин підшлункової залози і печінки у нормі та за розвитку патології» (2018–2020 рр., № держреєстрації 0118U003604).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було експериментально обґрунтувати критерії адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів за окиснення різних субстратів, впливу високих концентрацій Ca²⁺ та дії етанолу.

Для досягнення мети вирішували такі завдання:

1. Визначити критерії оцінки адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів та дослідити їхню залежність від доступності субстратів окиснення.
2. З'ясувати, чи залежить адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів від способу виділення клітин.
3. Перевірити критерії оцінки адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів за високих концентрацій Ca²⁺ у середовищі та можливої активації мітохондріальної пори перехідної проникності.
4. Встановити, які критерії дають змогу оцінити вплив етанолу та циклоспорину А *in vitro* на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.
5. Перевірити, як впливає короткотривале хронічне введення алкоголю (*in vivo*) на тлі високожирової дієти на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.

Об'єкт дослідження: процеси енергетичного забезпечення гепатоцитів.

Предмет дослідження: критерії адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів щурів за різної доступності субстратів окиснення, впливу катіонів Ca²⁺ та етанолу.

Методи дослідження: біофізичні (дослідження параметрів дихання ізольованих та пермеабілізованих гепатоцитів), фізіологічні (моделювання станів короткотривалим хронічним введенням етанолу та пірувату *in vivo*), фізико-хімічні (полярографічний і спектрофотометричний методи, флуоресцентна мікроскопія) та статистичні (порівняльний і дисперсійний аналіз).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше обґрунтовано критерії адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів. Досліджено адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів за окиснення різних субстратів. Встановлено, що

адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить від доступності субстратів окиснення та спорідненості транспортерів до цих субстратів, і є найвищою за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату. Також встановлено, що адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить від способу виділення і є суттєво вищою за перфузії печінки *in situ*. Незалежно від способу виділення клітин, найвищою адаптаційна здатність мітохондрій за максимальною швидкістю роз'єданого дихання є за використання монометил-сукцинату, а за оптимальною концентрацією FCCP – за окиснення пірувату. Показано, що збільшення концентрації Ca^{2+} у середовищі дихання зумовлює зниження швидкості АДФ- та FCCP-симульованого дихання за окиснення як сукцинату, так і суміші малату, глутамату та пірувату.

Уперше встановлено, що внесення у середовище циклоспорину А (CsA) запобігає негативному ефекту високих концентрацій Ca^{2+} на АДФ- та FCCP-симульоване дихання гепатоцитів, але лише за умови, що його додавали перед збільшенням концентрації Ca^{2+} . Виявлено, що етанол *in vitro* не впливав на максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання, мембранний потенціал мітохондрій та НАДН-автофлуоресценцію гепатоцитів. Наявність у середовищі інкубації CsA жодним чином не змінювала ефектів етанолу на дихання гепатоцитів. Встановлено, що короткотривале хронічне введення алкоголю збільшує швидкість мітохондріального дихання гепатоцитів, але не впливає на оптимальну концентрацію FCCP. Введення пірувату *in vivo* не змінює ефектів алкоголю на дихання гепатоцитів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати дають можливість поглибити знання про адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів та критерії для її оцінювання, покращити розуміння механізмів її регуляції. Результати досліджень можуть бути використані для розробки засобів запобігання патологій печінки (зокрема при алкогольній інтоксикації) чи для модуляції функціональної активності клітин печінки (у різних функціональних станах). Дослідження адаптаційної здатності є важливим не лише у контексті моделювання функціональних станів клітин за фізіологічних чи патологічних умов, а й для передбачення адаптаційних можливостей клітин та відповідно організму загалом. Експериментальні дані та основні узагальнення дисертаційної роботи можуть бути впроваджені у навчальний процес у Львівському національному університеті імені Івана Франка під час викладання курсів «Біофізика», «Біоенергетика» та дисциплін вільного вибору студентів. Методичні та експериментальні розробки застосовуються студентами під час виконання курсових та дипломних робіт. Також вони можуть бути використані для підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у навчальних закладах вищої освіти України.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно здійснено пошук та аналіз наукової літератури за темою дисертаційної роботи. Здобувачем самостійно виконано експериментальну частину дисертації та статистичну обробку результатів. Обговорення, аналіз отриманих результатів та формулювання висновків здійснювалось за участю наукового керівника і співавторів публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були

представлені на XII–XVI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016–2020), VII з'їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 2018), XX з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019), VIII Міжнародній науковій конференції, присвяченій 175-річчю кафедри фізіології людини і тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 2017), III міжнародному симпозиумі «Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology» (Kyiv, 2017), а також на щорічних звітних наукових конференціях працівників біологічного факультету та наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації. Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 3 статтях у фахових наукових виданнях (два з яких належать до наукометричної бази Scopus) і в 9 тезах доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 131 сторінці комп'ютерного набору і складається зі вступу, 4-х розділів («Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження», «Результати досліджень та їхнє обговорення» та «Узагальнення»), а також висновків, списку використаних джерел. Робота містить 36 рисунків. Бібліографічний список налічує 139 джерел літератури.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Узагальнено дані про адаптаційну здатність мітохондрій. Проаналізовано біофізичні та біохімічні особливості циклу Кребса, дихального ланцюга мітохондрій, сучасні уявлення про транспортування субстратів циклу трикарбонових кислот у клітині та порівняно особливості функціонування НАД- та ФАД-залежних дегідрогеназ. Проаналізовано Ca^{2+} -транспортувальні системи мітохондрій та роль Ca^{2+} в регуляції клітинного дихання. Розглянуто особливості метаболізму алкоголю у печінці.

Матеріали і методи досліджень. Для виділення ізольованих гепатоцитів використовували два способи перфузії печінки: *in vitro* або *in situ* [Seglen, 1976; Cassim, Raymond, Lapierre et al., 2017]. Підрахунок гепатоцитів здійснювали з використанням камери Горяєва. Цілісність плазматичних мембран гепатоцитів оцінювали фарбуванням клітин 0,1 %-м розчином трипанового синього. За потреби пермеабілізацію гепатоцитів здійснювали дигітоніном (50 мкг/млн клітин) впродовж 10 хв у внутрішньоклітинному розчині за температури 37 °С.

Швидкість поглинання кисню мітохондріями реєстрували полярографічним методом (рис. 1) за допомогою електроду Кларка в закритій комірці об'ємом 1,6 мл за температури 37 °С.

Для дослідження адаптаційної здатності мітохондрій ізольовані гепатоцити попередньо інкубували впродовж 15 хв у базовому розчині, який не містив субстратів окиснення або містив глютамін, піруват, сукцинат, монометилсукцинат, α -кетоглутарат, диметил- α -кетоглутарат (по 2 ммоль/л) чи глюкозу (10 ммоль/л). Далі гепатоцити вносили у полярографічну комірку (приблизно

1 млн клітин/мл того самого розчину, в якому здійснювали інкубацію) та додавали FCCP у наростаючих концентраціях – до 0,25, 0,5 та до 1 мкмоль/л.

Описаний вище протокол був використаний і в серії досліджень залежності адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих гепатоцитів від способу виділення клітин (використання перфузії печінки *in vitro* та *in situ*). Але за перфузії печінки *in vitro* у полярографічну комірку ми додавали менші концентрації FCCP – до 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, та до 0,5 мкмоль/л.

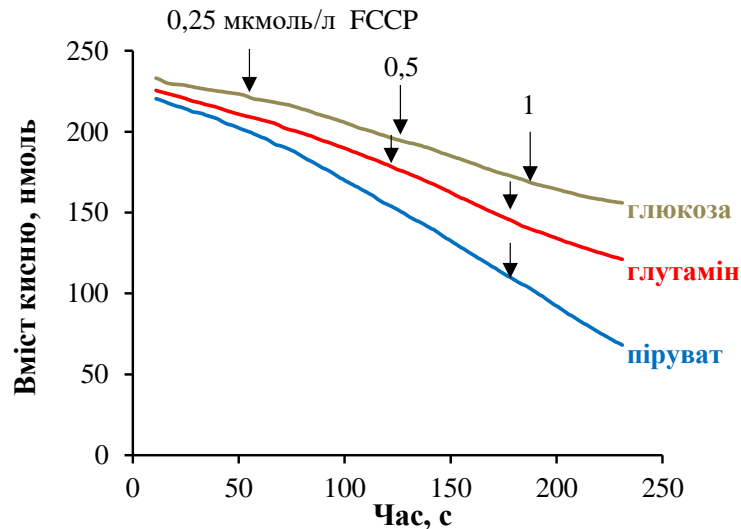


Рис. 1. Зменшення вмісту кисню у полярографічній комірці після внесення суспензії гепатоцитів за окиснення екзогенного пірувату, глутаміну та глюкози; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP до кінцевої концентрації 0,25, 0,5 і 1 мкмоль/л

Для дослідження впливу етанолу *in vitro* гепатоцити щурів інкубували протягом 60 хв з етанолом (50 ммоль/л) або CsA (0,5 мкмоль/л) у середовищі з глюкозою (10 ммоль/л) та з субстратами окиснення (піруват або монометилсукцинат, по 2 ммоль/л) чи без них. Після цього, для визначення швидкості дихання, у полярографічну комірку вносили гепатоцити та додавали протонатор у наростаючих концентраціях – до 0,25, 0,5 і 1 мкмоль/л.

У серії досліджень впливу короткотривалого хронічного споживання алкоголю на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи монометилсукцинату використовували перфузію печінки *in vitro*, гепатоцити у відповідних базових середовищах інкубували впродовж 15 хв, а кінцеві концентрації FCCP у комірці становили 0,25, 0,5, 1 та 1,5 мкмоль/л.

Для дослідження швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів, клітини додавали у полярографічну комірку, де вже були субстрати окиснення – сукцинат (5 ммоль/л) або суміш малату, глутамату і пірувату (по 5 ммоль/л). Після цього почергово додавали у комірку АДФ (750 мкмоль/л), олігоміцин (Ому) (3 мкмоль/л), CsA (0,5 мкмоль/л) та FCCP (дві добавки до кінцевої концентрації 0,05 і 0,1 мкмоль/л), реєструючи зміни напруження кисню у полярографічній комірці між цими добавками.

У контролі наступної серії досліджень до середовища у полярографічній комірці, що вже містило субстрат окиснення, додавали пермеабілізовані гепатоцити і через 120 с АДФ, а далі реєстрували швидкість дихання протягом чо-

тирьох часових інтервалів – 140–160 с, 325–355 с, 455–485 с та 500–540 с. У дослідній пробі почергово додавали АДФ, CsA, Оту та FCCP (0,05 мкмоль/л), реєструючи зміни напруження кисню у полярографічній комірці у ті самі проміжки часу, що і в контролі.

На наступному етапі ми додавали CsA у полярографічну комірку перед збільшенням концентрації катіонів Ca^{2+} від 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} до 1 або 10 мкмоль/л. Після цього у полярографічну комірку почергово додавали субстрат – сукцинат (5 ммоль/л) або суміш малату, глутамату і пірувату (по 5 ммоль/л), а також АДФ (750 мкмоль/л) та FCCP (0,25 мкмоль/л).

Розвиток лактат-ацидозу вимірювали спектрофотометрично, використовуючи як індикатор зміни рН барвник феноловий червоний (4,5 ммоль/л). Для цього гепатоцити інкубували протягом 60 хв з етанолом (50 ммоль/л) у середовищі з глюкозою (10 ммоль/л) та з субстратами окиснення (піруватом або монометил-сукцинатом, по 2 ммоль/л) за температури 37 °С. Після інкубації суспензію гепатоцитів центрифугували за 50 г протягом 1 хв і відбирали надосадову рідину. Далі до надосадової рідини додавати феноловий червоний і реєстрували спектри світлопоглинання (в 1 мкл зразку).

Для реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій та спостереження НАДН-автофлуоресценції використовували флуоресцентний мікроскоп Olympus IX73 з цифровою камерою DP-74. Мембранний потенціал мітохондрій реєстрували за допомогою потенціал-чутливого барвника родаміну 123 (фільтр збудження 540–585 нм, розділювач променю 595 нм, бар'єрний фільтр 600 нм).

Флуоресцентний сигнал НАДН (фільтр збудження 470–490 нм, розділювач променю 505 нм, бар'єрний фільтр 515 нм) використовували для оцінки роботи дихального ланцюга мітохондрій за впливу етанолу. Для цього інкубували гепатоцити протягом 60 хв з етанолом (50 ммоль/л) у середовищі з відповідними субстратами окиснення. Далі суспензію гепатоцитів інкубували протягом 5 хв за температури 37 °С з FCCP (0,1 чи 2 мкмоль/л) або ротеноном (0,5 мкмоль/л), а далі протягом 10 хв – з родаміном 123.

Отримані результати досліджень опрацьовували статистично та здійснювали необхідні математичні розрахунки у програмі Microsoft Office Excel. Максимальну швидкість роз'єданого дихання визначали як найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій FCCP. Оптимальною вважали ту концентрацію FCCP, за якої зареєстрована максимальна швидкість роз'єданого дихання. Прискорення або сповільнення дихання визначали як другу похідну кривої реєстрації напруження кисню, використовуючи для цього рівняння поліному другого порядку: $N = N_0 - \left(v_0 t + \frac{1}{2} a t^2 \right)$, де $a = \frac{dv}{dt}$. Площу приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP розраховувати за формулою: $S = \int_0^1 \Delta v_i(C) \cdot dC$. Визначали також середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку (m) та середньоквадратичне відхилення (σ). Вірогідність змін визначали, використовуючи двофакторний аналіз ANOVA та *t*-тест Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

1. Адаптаційна здатність мітохондрій цілісних гепатоцитів за окиснення субстратів циклу трикарбонових кислот. Встановлено, що за окиснення ендогенних субстратів швидкість базального дихання гепатоцитів становила $0,12 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с \times млн клітин) (рис. 2). Внаслідок дії FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л швидкість споживання кисню гепатоцитами зростала. Подальше збільшення концентрації FCCP до 0,5 та 1 мкмоль/л не змінювало швидкості споживання кисню гепатоцитами за окиснення ендогенних субстратів. За додавання глюкози до базового середовища швидкість базального та FCCP-стимульованого дихання мітохондрій гепатоцитів вірогідно не відрізнялася від швидкості споживання кисню за окиснення ендогенних субстратів (рис. 2).

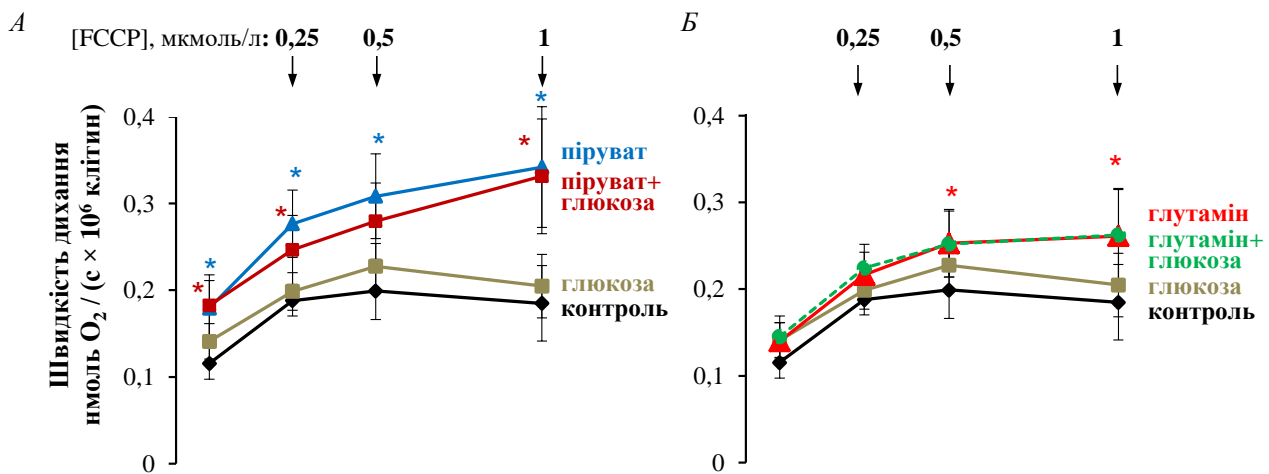


Рис. 2. Залежність дихання цілісних гепатоцитів від концентрації FCCP у середовищі за окиснення різних субстратів та їхнього поєднання: * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Піруват підвищував базальну та FCCP-стимульовану швидкості дихання за всіх досліджуваних концентрацій цього протонатора відносно відповідних швидкостей дихання, коли у середовище не додавали субстрату окиснення (рис. 2 А). Отже, піруват може забезпечити вищу адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, ніж глюкоза.

Глутамін (рис. 2 Б), у порівнянні з використанням безсубстратного середовища, не впливав на базальну швидкість споживання кисню, проте підвищував швидкість FCCP-стимульованого дихання за концентрації протонатора 0,5 та 1 мкмоль/л.

Як і у випадку з піруватом, вірогідної різниці між швидкістю дихання клітин за окиснення глюкози та швидкістю дихання за окиснення комбінації глутаміну та глюкози виявлено не було за жодної концентрації FCCP. Мабуть, утворення пірувату з глюкози було занадто повільним, щоб істотно впливати на ці параметри.

Додавання сукцинату або монометил-сукцинату підвищувало базальну швидкість споживання кисню гепатоцитами (рис. 3 Б), тоді як α -кетоглутарат та диметил- α -кетоглутарат не впливали на цей показник (рис. 3 А).

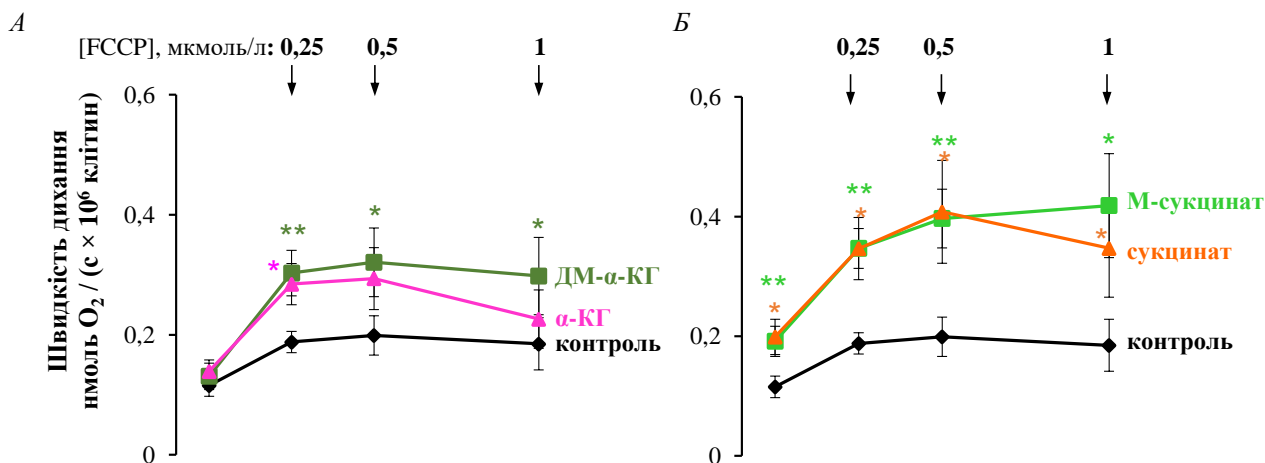


Рис. 3. Швидкості дихання гепатоцитів за використання α -кетоглутарату (А) чи сукцинату (Б) та їхніх метильованих похідних: * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Метиліві естери сукцинату та α -кетоглутарату підтримують дихання гепатоцитів на тому ж рівні, що і неметильовані субстрати. Проте за концентрацій FCCP 1 мкмоль/л швидкість дихання гепатоцитів була вищою, коли використовували метиліві естери субстратів.

Максимальна швидкість роз'єданого дихання (рис. 4 А) найвищою є за використання монометил-сукцинату і дещо зменшується у послідовності: монометил-сукцинат > сукцинат > піруват > диметил- α -кетоглутарат > α -кетоглутарат > глутамін > глюкоза.

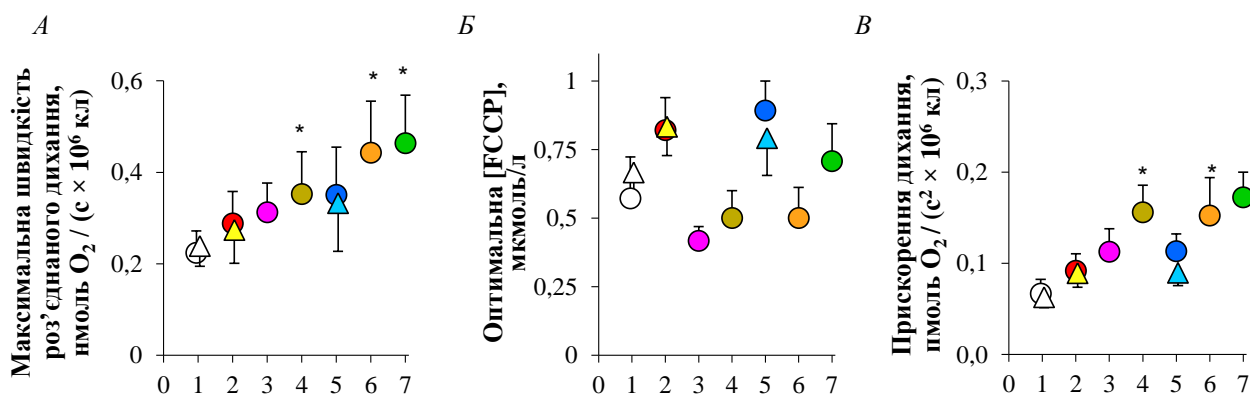


Рис. 4. Максимальна швидкість роз'єданого дихання (А), оптимальна концентрація FCCP (Б) та прискорення дихання (В) гепатоцитів: 1 – ендогенні субстрати, 2 – глутамін, 3 – α -кетоглутарат, 4 – диметил- α -кетоглутарат, 5 – піруват, 6 – сукцинат, 7 – монометил-сукцинат; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Для оптимальної концентрації FCCP послідовність субстратів є дещо іншою (рис. 4 Б). Суттєво гіршою, ніж того можна було очікувати з послідовності для максимальної швидкості роз'єданого дихання, є оптимальна концентрація FCCP за окиснення α -кетоглутарату та сукцинату. Очевидно, цей параметр характеризує стійкість процесів дихання чи час, протягом якого певні субстрати здатні підтримувати дихання на високому рівні.

Послідовність субстратів, яка характеризує прискорення дихання внаслідок додавання FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л, є подібною до послідовності для максимальної швидкості роз'єданого дихання (рис. 4 В). Проте незважаючи на достатньо високу максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію FCCP, піруват забезпечує незначне прискорення дихання мітохондрій.

2. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів від способу виділення клітин. Щоб охарактеризувати адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, отриманих різними способами, визначали максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію FCCP.

Максимальна швидкість роз'єданого дихання за перфузії печінки *in situ* виявилась вищою, ніж за перфузії печінки *in vitro*. Швидкість споживання кисню гепатоцитами внаслідок додавання FCCP у низьких концентраціях збільшувалася, а у високих концентраціях – дещо зменшувалася в обох випадках перфузії печінки. Тим не менше, чутливість до FCCP у випадку перфузії печінки *in vitro* є дещо вищою. Спектр адаптаційної відповіді дихання мітохондрій суттєво залежить від способу перфузії печінки під час виділення гепатоцитів. У випадку перфузії печінки *in vitro* спостерігається значно щільніше скупчення множини точок у лівій частині графіка (рис. 5), що ми розцінюємо як свідчення про суттєво вузький спектр адаптаційної відповіді мітохондрій.

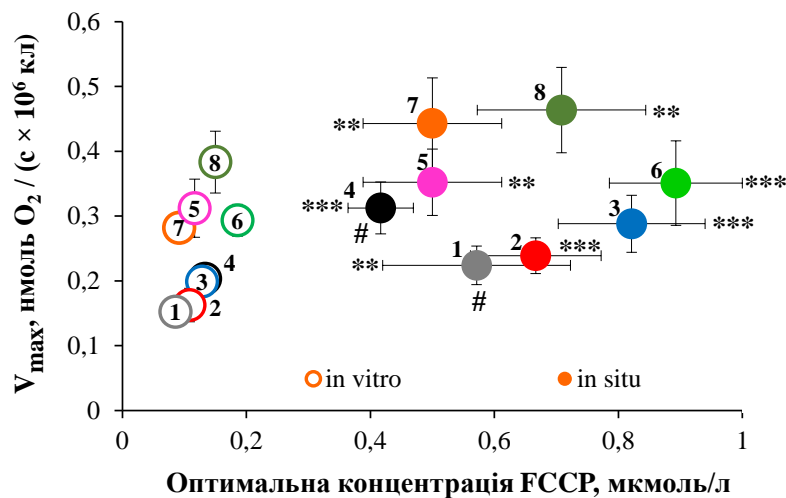


Рис. 5. Залежність максимальної швидкості роз'єданого дихання від оптимальної концентрації FCCP: 1 – ендогенні субстрати, 2 – глюкоза, 3 – глутамін, 4 – α -кетоглутарат, 5 – диметил- α -кетоглутарат, 6 – піруват, 7 – сукцинат, 8 – монометил-сукцинат; * – статистично вірогідна різниця оптимальної концентрації FCCP за використання перфузії *in situ* відносно перфузії *in vitro* з $P < 0,05$; # – статистично вірогідна різниця максимальної швидкості роз'єданого дихання за використання перфузії *in situ* відносно перфузії *in vitro* з $P < 0,05$, $n = 6$

Окрім того, після перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання є дещо вищими, а оптимальні концентрації FCCP – суттєво вищими, ніж після перфузії *in vitro*. Отже, функціональний стан ізольованих гепатоцитів, а відтак і результати експериментів проведені на цих клітинах залежать від використаних методів перфузії печінки під час ізолювання гепатоцитів. Очевидно, що за використання перфузії *in vitro*, саме під час перенесення

частки печінки на скельце, гепатоцити піддаються впливу гіпоксії, що в подальшому і впливає на їхню метаболічну активність. Використання перфузії печінки *in situ* дає змогу отримати кращі клітини для проведення експериментів.

3. Процеси дихання та окисного фосфорилування пермеабілізованих гепатоцитів за спричиненої Ca^{2+} активації мітохондріальної пори перехідної проникності (mPTP). mPTP активується катіонами Ca^{2+} у високій концентрації у матриксі мітохондрій [Rasola, Bernardi, 2011]. CsA здатний блокувати mPTP і запобігати порушенню функцій мітохондрій [Crompton, Ellinger, Costi, 1988]. Тому з'ясування можливої ролі mPTP у реалізації впливу катіонів Ca^{2+} на дихання (а, відтак, і на адаптаційну здатність) пермеабілізованих гепатоцитів є актуальним питанням.

Зареєстроване нами пригнічення ефектів АДФ та Omy у випадку, коли концентрація Ca^{2+} у середовищі пермеабілізованих гепатоцитів становила 10 мкмоль/л, є свідченням пригнічення процесів окисного фосфорилування. За цієї ж концентрації Ca^{2+} стимульоване 0,05 мкмоль/л FCCP дихання виявилось найменшим, а пригнічення дихання за 0,1 мкмоль/л FCCP – найбільшим внаслідок, очевидно, деполаризації внутрішньої мембрани мітохондрій і/або порушенням негативного зворотного зв'язку між мембранним потенціалом мітохондрій і диханням. Якщо змінити послідовність і спочатку до середовища додати CsA (на тлі АДФ), а потім Omy, то за окиснення сукцинату суттєвих змін швидкості дихання після додавання FCCP у концентрації 0,05 і 0,1 мкмоль/л не зареєстровано.

Найсуттєвіше відрізняються ефекти CsA за різних концентрацій Ca^{2+} , коли у середовищі наявні субстрати Ca^{2+} -залежних дегідрогеназ. Але така відмінність у ефектах CsA може бути зумовлена впливом часу (а не послідовності) додавання у комірку. Щоб відкинути це припущення, ми проаналізували, чи залежить швидкість дихання гепатоцитів у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+} від часу реєстрації.

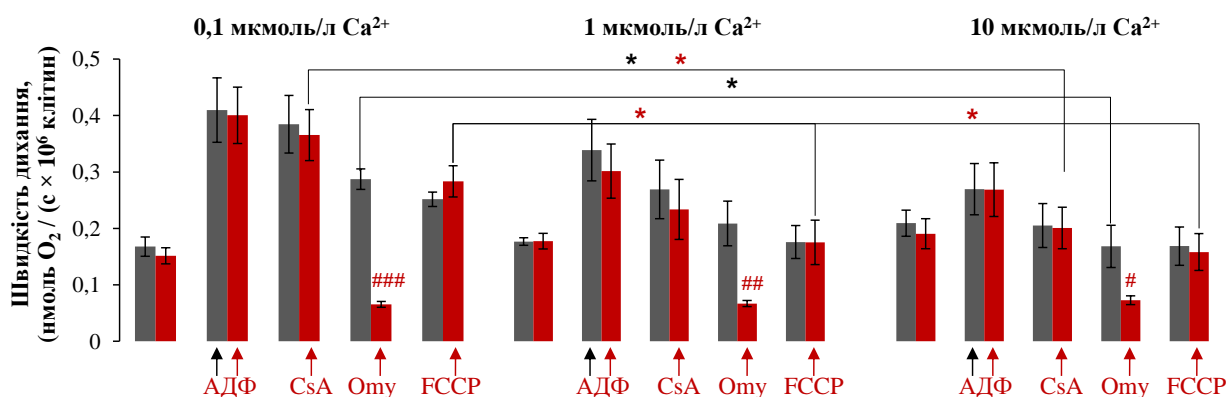


Рис. 6. Швидкість дихання гепатоцитів внаслідок дії CsA за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату: * – статистично вірогідна різниця порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} ; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; n = 6

З'ясувалося, що у контролі швидкість АДФ-стимульованого дихання дещо зменшується із часом за всіх концентрацій Ca^{2+} . На тлі такого зменшення не виявлено статистично достовірних змін швидкостей дихання гепатоцитів вна-

слідок додавання CsA як за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату (рис. 6), так і сукцинату. Тобто, додавання до полярографічної комірки CsA (на відміну від Ому та FCCP), де вже наявні катіони Ca^{2+} у певній концентрації, не змінює швидкості дихання гепатоцитів.

На наступному етапі ми додавали CsA у полярографічну комірку перед збільшенням концентрації катіонів Ca^{2+} від 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} до 1 або 10 мкмоль/л. Внесення у комірку CsA перед катіонами Ca^{2+} нівелювало, назагал, негативний ефект їхній високих концентрацій, як за окиснення сукцинату, так і за окиснення суміші субстратів. Якщо ж у середовищі була суміш малату, глутамату і пірувату та підвищена концентрація Ca^{2+} , то CsA усував негативний ефект високих концентрацій Ca^{2+} лише на швидкість FCCP-стимульованого дихання і, навіть, пришвидшував його.

Отже, під час дослідження адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів потрібно задавати певну концентрацію Ca^{2+} у середовищі та враховувати ймовірність активації mPTP. Збільшення концентрації Ca^{2+} у середовищі зумовлює зниження адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів, а внесення у середовище CsA запобігає негативному ефекту високих концентрацій Ca^{2+} , але лише за умови, що його додавали перед збільшенням концентрації Ca^{2+} .

4. Вплив етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату. Мітохондріальне дихання відіграє важливу роль в метаболізмі етанолу шляхом регенерації НАД⁺, які регулюють рівень ферментів алкогольдегідрогенази та альдегіддегідрогенази і є необхідними для етанол-ацетальдегід метаболізму [Han, Ybanez, Johnson et al., 2012; Zhong, Ramshesh, Rehman et al., 2014]. Тому ми вирішили використати розроблені нами критерії для оцінки впливу етанолу *in vitro* на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.

З'ясувалося, що етанол не впливав на базальне дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, монометил-сукцинату чи пірувату на тлі глюкози. Але інкубація гепатоцитів протягом 60 хв з етанолом зумовлювала підвищення FCCP-стимульованого дихання на 11 % ($P = 0,01$) за концентрації FCCP 0,25 мкмоль/л та окиснення глюкози та на 19 % ($P = 0,03$) за концентрації FCCP 0,5 мкмоль/л та окиснення монометил-сукцинату, що свідчить про залучення етанолу як субстрату окиснення за таких умов. Етанол жодним чином не впливав на дихання гепатоцитів за наявності пірувату. Максимальна швидкість FCCP-роз'єданого дихання за впливу етанолу змінювалась лише за окиснення глюкози – етанол на 12 % підвищував максимальне FCCP-стимульоване дихання. Сам CsA не впливав на базальне та FCCP-стимульоване дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи сукцинату. Максимальна швидкість FCCP-роз'єданого дихання за окиснення глюкози, пірувату чи сукцинату не змінювалась ні за наявності у середовищі CsA, ні за наявності CsA з етанолом (рис. 7)

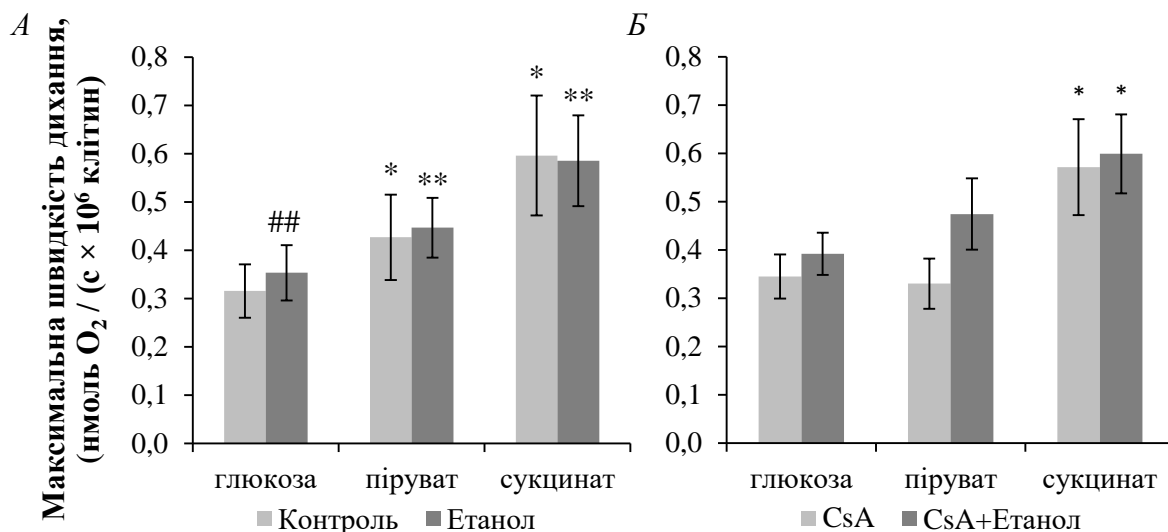


Рис. 7. Вплив етанолу *in vitro* та CsA на максимальну швидкість роз'єданого дихання: * – статистично вірогідна різниця порівняно з глюкозою; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без етанолу); P < 0,05; n = 5

Провівши аналіз ANOVA для чотирьох дослідних груп ми не отримали підтвердження впливу етанолу чи CsA на максимальну швидкість роз'єданого дихання. Дисперсійний аналіз підтвердив лише значний вплив субстрату окиснення на швидкість дихання гепатоцитів з P = 0,01.

Методом флуоресцентної мікроскопії з використанням барвника родаміну 123 ми досліджували вплив етанолу на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів за дії FCCP та ротенону. З'ясувалося, що під впливом етанолу мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів не змінювався як за окиснення глюкози, так і за окиснення пірувату та монометил-сукцинату. Аналіз ANOVA підтвердив відсутність прямого впливу етанолу чи субстрату окиснення на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів. Етанол жодним чином не впливав і на НАДН-автофлуоресценцію за окиснення глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату, що підтверджено і результатами аналізу ANOVA. Водночас, згідно аналізу, наявна залежність НАДН-автофлуоресценції мітохондрій гепатоцитів від субстрату окиснення.

Отже, етанол не впливав на максимальне роз'єдане дихання за наявності пірувату та монометил-сукцинату, які самі по собі значно підвищували це дихання. Наявність у середовищі інкубації CsA жодним чином не змінювала впливу етанолу на дихання гепатоцитів. Споживання алкоголю призводить до адаптивного збільшення метаболізму етанолу, що характеризується зростанням мітохондріального дихання та розпрямленням окисного фосфорилування, але цей стан настає лише через 2–3 години після введення етанолу [Thurman, Paschal, Abu-Murad et al., 1982], що є ймовірною причиною відсутності впливу етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів.

5. Адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів щурів за короткотривалого хронічного введення алкоголю на тлі високожирової дієти. Незважаючи на значну кількість експериментів, результати стосовно метаболізму алкоголю печінкою та його впливу на функції мітохондрій є неоднозначними

[Thurman, Paschal, Abu-Murad et al, 1982; Holmuhamedov, Lemasters, 2009; Han, Ybanez, Johnson et al., 2012]. Також зважаючи на відсутність ефекту етанолу при його впливі *in vitro*, ми вважали за доцільне оцінити адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів за впливу короткотривалого введення алкоголю.

З'ясувалося, що алкоголь, за короткотривалого хронічного вживання, збільшував максимальну швидкість FCCP-роз'єданого дихання у безсубстратному середовищі та у середовищі з глюкозою та сукцинатом на 68 ($P = 0,03$, $n=6$), 34 ($P = 0,04$, $n=6$) та 90 % ($P = 0,01$, $n=6$) відповідно, і не впливав на цей показник за окиснення пірувату (рис. 8 А).

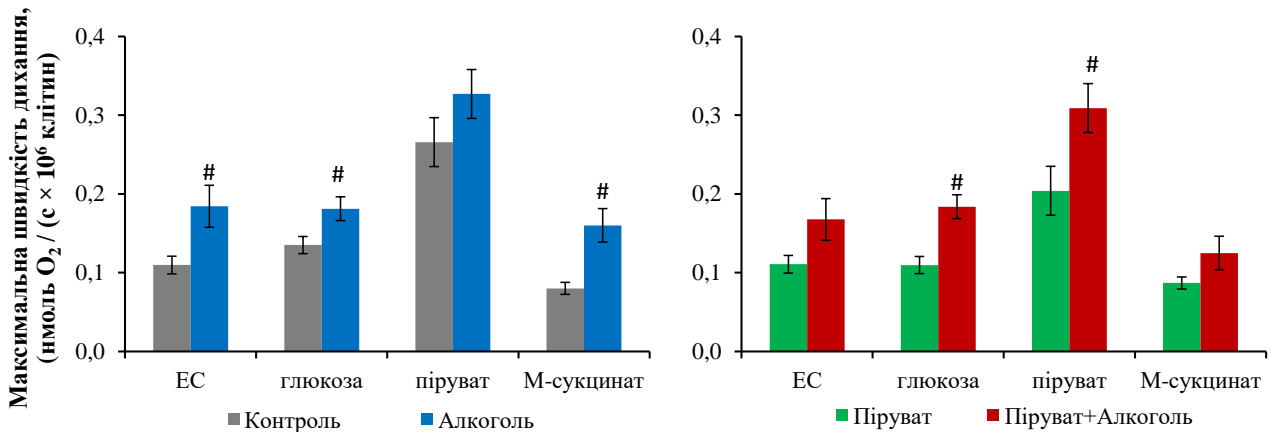


Рис. 8. Вплив алкоголю та пірувату на максимальну швидкість роз'єданого дихання за окиснення ендогенних субстратів (ЕС), глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату: # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; $P < 0,05$; $n = 6$

Алкоголь не впливав на оптимальну концентрацію FCCP, яка у безсубстратному середовищі, за окиснення глюкози чи сукцинату становила 0,25 мкмоль/л, а за окиснення пірувату – 0,35 мкмоль/л.

Отже, збільшення швидкості мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за дії алкоголю може свідчити про активацію компенсаторних механізмів, спрямованих на збереження енергетичного гомеостазу гепатоцитів.

Окиснення етанолу в печінці обмежено потужністю дихального ланцюга мітохондрій, внаслідок чого відбувається накопичення відновних еквівалентів [Han, Ybanez, Johnson et al., 2012; Zhong, Ramshesh, Rehman et al., 2014]. Існує припущення, що введення пірувату може прискорити окиснення етанолу шляхом вловлювання відновлювальних еквівалентів під час перетворення пірувату в лактат [Tanaka, Nishigaki, Fuku et al., 2007]. Тому ми вирішили перевірити вплив пірувату *in vivo* на енергетичні процеси печінки щурів за короткотривалого хронічного введення алкоголю.

Алкоголь, за короткотривалого хронічного його введення та ін'єкцій пірувату, збільшував максимальну швидкість FCCP-роз'єданого дихання у середовищі з глюкозою та піруватом на 68 ($P = 0,03$, $n=6$) та 51 % ($P = 0,03$, $n=6$) відповідно, і не впливав на цей показник за окиснення ендогенних субстратів та монометил-сукцинату (рис. 8 Б). Алкоголь також не впливав на оптимальну концентрацію FCCP. Піруват *in vivo* не впливав на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів. Дисперсійний аналіз підтвердив вплив алкоголю та відсутність впливу

ін'єкцій пірувату на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.

Отже, зростання швидкості споживання кисню мітохондріями гепатоцитів в результаті дії алкоголю може бути пов'язаним і зростанням кількості НАДН, яке утворюється в процесі метаболізму етанолу. Внаслідок хронічного споживання алкоголю мітохондрії печінки можуть реагувати на підвищені потреби в метаболізмі алкоголю шляхом адаптаційних пластичних змін, широкі межі яких, ймовірно, могли бути причиною відсутності ефекту пірувату *in vivo*.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Отримані нами результати свідчать, що адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить не тільки від властивостей дихального ланцюга мітохондрій та активності піруватдегідрогенази та ферментів циклу трикарбонних кислот, а й від доступності субстратів окиснення як за фізіологічних, так і патологічних умов. На основі отриманих результатів (червоним кольором на рис. 9) та даних літератури пропонуємо схему взаємозв'язків між адаптаційною здатністю мітохондрій гепатоцитів та факторами, які на неї впливають (рис. 9).

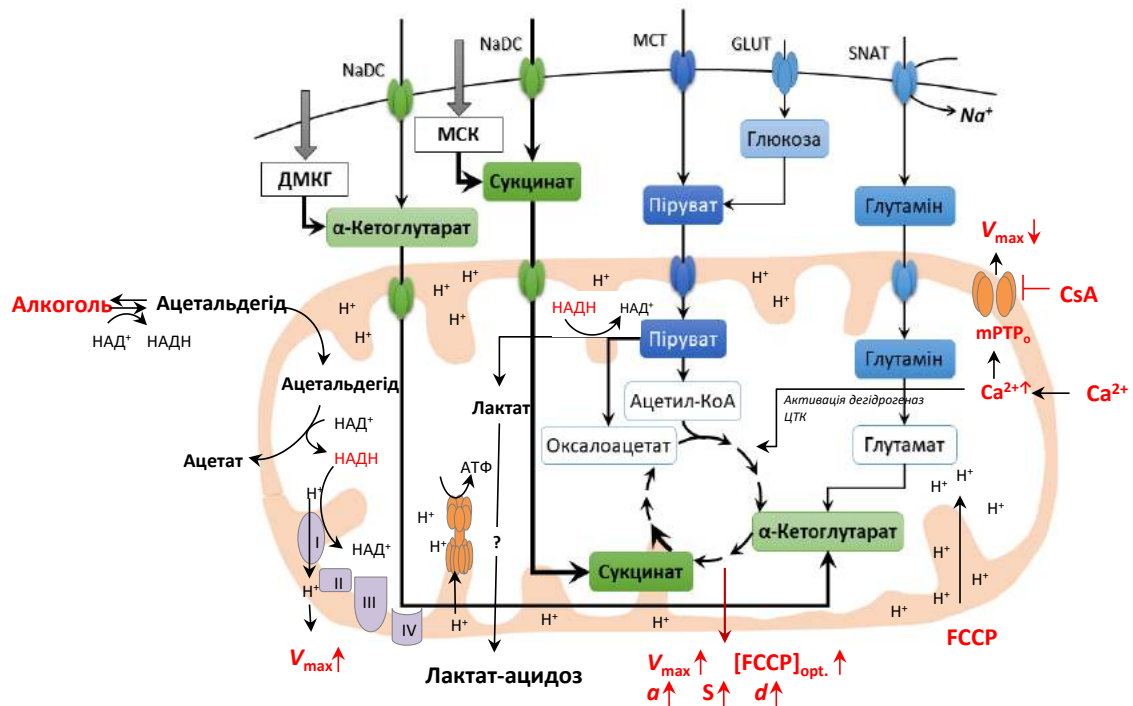


Рис. 9. Схема взаємозв'язків між адаптаційною здатністю мітохондрій гепатоцитів та факторами, які на неї впливають: ДМКГ – диметил- α -кетоглутарат, МСК – диметил-сукцинат, NaDC – Na^+ -дикарбоксилатний котранспортер, MCT – монокарбоксилатний транспортер, GLUT – транспортер глюкози, SNAT – Na^+ -транспортери амінокислот системи N; V_{\max} – максимальна швидкість роз'єданого дихання; $[\text{FCCP}]_{\text{opt.}}$ – оптимальна концентрація FCCP; a – прискорення швидкості дихання; d – сповільнення швидкості дихання S – площа приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP; \rightarrow – товщина стрілок пропорційна до здатності субстрату окиснення підтримувати адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.

На основі результатів дослідження ми визначили 5 основних критеріїв, за якими можна оцінити адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів: максима-

льну швидкість роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій FCCP), оптимальну концентрація FCCP (концентрація, за якої ця швидкість зареєстрована), прискорення дихання внаслідок додавання FCCP, сповільнення дихання, та площа приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP (рис. 9).

Ми встановили, що здатність мітохондрій компенсувати енергетичні витрати клітини у значній мірі залежить від типу та проникнення субстратів окиснення. Нами встановлено, що за використання перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання та оптимальні концентрації FCCP є вищими, ніж за перфузії печінки *in vitro*. Тобто, перфузія печінки *in situ* дає змогу отримати метаболічно повноцінні клітини для проведення експериментів.

Внесення у комірку CsA перед катіонами Ca^{2+} нівелювало Ca^{2+} -спричинене пригнічення АДФ і FCCP-стимульованого дихання як за окиснення сукцинату, так і за окиснення суміші субстратів. Встановлено, що етанол *in vitro* чи CsA не впливали на максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання, оптимальну концентрація FCCP, мембранний потенціал та НАДН-автофлуоресценцію мітохондрій гепатоцитів. Алкоголь *in vivo* збільшував максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання за окиснення ендогенних субстратів, використання глюкозовмісного середовища та сукцинатвмісного середовища. Аналіз ANOVA підтвердив вплив алкоголю, але не підтвердив впливу пірувату *in vivo* на максимальну швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів.

Отже, адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів як за фізіологічних, так і патологічних умов залежить від доступності субстратів окиснення, а ряд критеріїв, які її характеризують, дають змогу оцінити адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів за цих умов.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі експериментально обґрунтовано критерії оцінки адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів за окиснення різних субстратів, впливу високих концентрацій катіонів Ca^{2+} та дії етанолу.

На основі аналізу отриманих результатів зроблено такі висновки:

1. Для оцінки адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів доцільно використовувати такі критерії, як максимальна швидкість роз'єданого дихання, оптимальна концентрація FCCP, прискорення дихання внаслідок додавання FCCP, площа приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP. Адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить від доступності субстратів окиснення.
2. Під час дослідження адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів потрібно враховувати методи ізолювання гепатоцитів; вона є вищою, коли використовувати перфузію печінки *in situ*.
3. Під час дослідження адаптаційної здатності гепатоцитів потрібно задавати певну концентрацію Ca^{2+} у середовищі та враховувати ймовірність активації mPTP. Збільшення концентрації Ca^{2+} у середовищі спричиняє зниження адап-

таційної здатності мітохондрій гепатоцитів, а внесення у середовище CsA запобігає негативному ефекту високих концентрацій Ca^{2+} .

4. Етанол та CsA *in vitro* не впливають на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.
5. Дія етанолу *in vivo* підвищує адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, оскільки збільшується максимальна швидкість роз'єданого дихання (але не оптимальна концентрація FCCP). Введення пірувату *in vivo* не впливає на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Mazur H.M.**, Merlavsky V.M., Manko B.O., Manko V.V. Dependence of the mitochondrial adaptive capacity of hepatocytes on the oxidative substrates availability. Ukr. Biochem. J. 2019; 91(6): 5–14. *(Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, брала участь у статистично-му опрацюванні даних, в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
2. **Mazur H.M.**, Merlavsky V.M., Manko B.O., Manko V.V. mPTP opening differently affects electron transport chain and oxidative phosphorylation at succinate and NAD-dependent substrates oxidation in permeabilized rat hepatocytes. Ukr. Biochem. J. 2020; 92(4): 14–23. *(Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
3. **Мазур Г.М.**, Мерлавський В.М., Манько Б.О., Манько В.В. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій печінки від способу виділення клітин. Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. 2020; 82: 177–185. *(Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
4. Галан С., **Мазур Г.**, Мерлавський В., Манько Б.О., Манько В.В. Вплив етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату або нометилсукцинату. Молодь і поступ біології : збірник тез XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 75 річниці створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача. Львів, 2020; 172–173.
5. **Мазур Г.М.**, Мерлавський В.М., Манько Б.О., Манько В.В. Адаптаційна здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів щурів. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка. Фізіологічний журнал. Київ, 2019; 65(3): 32–33.
6. Галан С., **Мазур Г.**, Мерлавський В., Манько Б.О., Манько В.В. Адаптаційна здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів залежить від способу виділення клітин. Молодь і поступ біології : збірник тез XV Міжнародної нау-

- кової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 135 річниці від дня народження Я. Парнаса. Львів, 2019; 148–149.
7. **Мазур Г.М.,** Манько Б.О., Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій залежить від рівня експресії у клітинах транспортерів та їхньої спорідненості до субстратів окиснення. Матеріали Тематичного VII з'їзду УБФТ. Київ, 2018; 16.
 8. **Мазур Г.,** Дроздик Н., Мерлавський В., Манько В.В. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів щурів за дії циклоспорину А та олігоміцину. Молодь і поступ біології : збірник тез XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів. Львів, 2018; 286–287.
 9. **Mazur H.,** Merlavsky V., Manko V. Effect of CsA on the respiration of rats permeabilized hepatocytes in media with different concentrations of Ca^{2+} . Third Kyiv International Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities. Kyiv, 2017; 65.
 10. Манько В.В., Манько Б.О., Сідорова О.О., **Мазур Г.М.,** Манько Б. В. Алкоголь за хронічного введення на тлі високо жирної дієти порушує мітохондріальні дихання панкреатитів, але не гепатоцитів. VIII Міжнародна наукова конференція, присвячена 175-річчю кафедри фізіології людини і тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, 2017; 69.
 11. **Мазур Г.,** Манько Б.О., Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій інтактних гепатоцитів щурів за тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти. Молодь і поступ біології : збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів. Львів, 2017; 261–262.
 12. **Мазур Г.,** Манько Б.О., Манько В.В. Вплив субстратів окиснення на максимальну окисну здатність мітохондрій інтактних гепатоцитів. Молодь і поступ біології : збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів. Львів, 2016; 300–301.

АНОТАЦІЯ

Мазур Г.М. Експериментальне обґрунтування критеріїв адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів щурів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2021.

Дисертація присвячена експериментальному обґрунтуванню критеріїв адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів щурів та перевірці гіпотези про можливість використання цих критеріїв для оцінювання впливу високих концентрацій Ca^{2+} чи етанолу на адаптаційну здатність мітохондрій.

Досліджено, що адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів можна оцінити такими критеріями, як максимальна швидкість роз'єданого дихання, оптимальна концентрація FCCP, прискорення дихання внаслідок додавання FCCP та площа приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP. Субстрати окиснення впливають на адаптаційну здатність мі-

тохондрій гепатоцитів. Найнижчою адаптаційна здатність мітохондрій є за окиснення глюкози, а найвищою – за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату.

Встановлено, що адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить від способу виділення клітин. У випадку перфузії печінки *in vitro* спектр адаптаційної відповіді мітохондрій гепатоцитів є значно вужчий порівняно із клітинами виділеними способом перфузії печінки *in situ*.

Під час дослідження адаптаційної здатності гепатоцитів потрібно задавати певну концентрацію Ca^{2+} у середовищі, а додавання CsA нівелює Ca^{2+} -спричинене пригнічення адаптаційної здатності мітохондрій, але лише за умови, що його додавати перед збільшенням концентрації Ca^{2+} . Показано, що етанол *in vitro* не впливав на адаптаційну здатність мітохондрій, а алкоголь *in vivo* збільшував максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання, але не впливав на оптимальну концентрацію FCCP. Введення пірувату *in vivo* не змінювало ефекту алкоголю на дихання гепатоцитів.

Отримані результати дають змогу оцінити адаптаційні можливості чи функціональну активність мітохондрій клітин печінки за фізіологічних і патологічних умов.

Ключові слова: адаптаційна здатність мітохондрій, субстрати окиснення, гепатоцити, протонофори, мітохондріальна пора транз'єнтної проникності, циклоспорин А, етанол.

АННОТАЦИЯ

Мазур Г.М. Экспериментальное обоснование критериев адаптационной способности митохондрий гепатоцитов крыс. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.02 – биофизика. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2021.

Диссертация посвящена экспериментальному обоснованию критериев адаптационной способности митохондрий гепатоцитов крыс и проверке гипотезы о возможности использования этих критериев для оценки влияния высоких концентраций Ca^{2+} или этанола на адаптационную способность митохондрий.

Доказано, что адаптационную способность митохондрий гепатоцитов можно оценить таким критериям, как максимальная скорость разобщенного дыхания, оптимальная концентрация FCCP, ускорение дыхания вследствие добавления FCCP и площадь прироста под кривыми зависимости скорости дыхания от концентрации FCCP. Субстраты окисления влияют на адаптационную способность митохондрий гепатоцитов.

Установлено, что адаптационная способность митохондрий гепатоцитов зависит от способа выделения клеток. В случае перфузии печени *in vitro* спектр адаптационного ответа митохондрий гепатоцитов значительно более узкий по сравнению с клетками выделенными способом перфузии печени *in situ*.

Во время исследования адаптационной способности гепатоцитов нужно задавать определенную концентрацию Ca^{2+} в среде, а добавление CsA нивелирует Ca^{2+} -вызванное подавления адаптационной способности митохондрий, но

только при условии, что его добавлять перед увеличением концентрации Ca^{2+} . Показано, что этанол *in vitro* не влиял на адаптационную способность митохондрий, а алкоголь *in vivo* увеличивал максимальную скорость FCCP-стимулированного дыхания.

Полученные результаты позволяют оценить адаптационные возможности или функциональную активность митохондрий клеток печени при физиологических и патологических условиях.

Ключевые слова: адаптационная способность митохондрий, субстраты окисления, гепатоциты, протонофоры, митохондриальная пора транзистентной проницаемости, циклоспорин А, алкоголь.

ANNOTATION

Mazur H.M. Experimental substantiation of criteria of mitochondrial adaptive capacity of rat hepatocytes. – Manuscript.

Dissertation for PhD degree in Biology in specialty 03.00.02 – biophysics. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2021.

The thesis is aimed at experimental substantiation of mitochondrial adaptive capacity criteria in rat hepatocytes and testing the feasibility of said criteria utilization in assessing the effects of regulatory or toxic agents such as Ca^{2+} or alcohol on mitochondrial oxidative function.

It is suggested that mitochondrial adaptive capacity can be assessed by the following criteria: maximal uncoupled respiration rate, optimal protonophore (FCCP) concentration, acceleration of respiration upon stimulation with FCCP and the area under the curve of dependence of the uncoupled respiration rate on FCCP concentration. Oxidative substrates affect mitochondrial adaptive capacity of hepatocytes. The lowest maximal uncoupled respiration rate was upon glucose oxidation, and the highest upon α -ketoglutarate and succinate oxidation. Methyl esters of succinate and α -ketoglutarate maintain mitochondrial adaptive capacity at a higher level than free substrates.

It was found that mitochondrial adaptive capacity of hepatocyte depends on the method of cell isolation, as indicated by a difference in maximal uncoupled respiration rate and optimal FCCP concentration. Upon *in vitro* liver perfusion the range of adaptive respiratory responses of mitochondria of hepatocytes is significantly narrower compared to cells isolated using *in situ* liver perfusion. It was shown that maximal rates of uncoupled respiration and the optimal concentrations of FCCP were higher upon *in situ* liver perfusion than upon *in vitro* liver perfusion. Irrespectively of the perfusion methods, the maximal rate of uncoupled respiration is highest with the use of monomethyl succinate and the optimal FCCP concentration is highest upon pyruvate oxidation. Thus, liver mitochondria are very sensitive to adequate perfusion during hepatocyte isolation procedure.

The increase of Ca^{2+} concentration to 10 μM caused a marked diminishing of the adaptive capacity of mitochondria, as evidenced by a decrease of both ADP-stimulated and FCCP-stimulated respiration of permeabilized hepatocytes. Such

changes are observed upon oxidation of either succinate or the mixture of malate, glutamate and pyruvate.

It was established that ADP-stimulated respiration time-dependent decrease accelerated with increase of Ca^{2+} concentration. The addition of CsA after Ca^{2+} into the polarographic chamber did not change the respiration rate of hepatocytes both upon succinate or mixture of malate, glutamate and pyruvate oxidation.

The addition of CsA into the chamber before Ca^{2+} prevented the Ca^{2+} -induced decrease of ADP-stimulated and FCCP-stimulated respiration upon succinate oxidation. CsA also abolished the negative effect of high Ca^{2+} concentrations on the FCCP-stimulated respiration when mixture of malate, glutamate and pyruvate was present in the medium. However, CsA did not affect the negative effect of high Ca^{2+} concentrations on the ADP-stimulated respiration under these conditions.

The effects of alcohol *in vitro* on the adaptive capacity of mitochondria were assessed. Alcohol *in vitro* did not affect the maximal FCCP-stimulated respiration, mitochondrial membrane potential and NAD(P)H autofluorescence of hepatocytes. CsA *in vitro* did not change the effect of alcohol on the respiration of hepatocytes. Unlike *in vitro*, alcohol *in vivo* increased maximal FCCP-stimulated respiration upon endogenous substrates, glucose or succinate oxidation, but did not affect the optimal FCCP concentration. Pyruvate *in vivo* did not affect maximal uncoupled respiration rate or optimal FCCP concentration and did not change the effect of alcohol on the respiration of hepatocytes.

The obtained results prove that new criteria of adaptive capacity mitochondria are useful to study mitochondria of liver cells under physiological and pathological conditions.

Key words: adaptive capacity of mitochondria, oxidative substrates, hepatocytes, protonophores, mitochondrial permeability transition pore, cyclosporin A, alcohol.

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