

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ІВАНА ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

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

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.

_____ Г.М. Мазур

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

Львів – 2021

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 доцільності використання зазначених критеріїв для оцінки впливу регулюючих або токсичних агентів, таких як Ca^{2+} або алкоголь, на окислювальну функцію 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 мітохондрій гепатоцитів. Найнижчою адаптаційна здатність мітохондрій є за окиснення глюкози, а найвищою за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату. Метильовані естери сукцинату та α -кетоглутарату підтримують адаптаційну здатність на вищому рівні ніж їх неметильовані форми.

Встановлено, що адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить від способу виділення клітин, на що вказує різниця в максимальній швидкості роз'єданого дихання та оптимальній концентрації FCCP. У випадку перфузії печінки *in vitro* спектр адаптаційної відповіді мітохондрій гепатоцитів є значно вужчий порівняно із клітинами виділеними способом перфузії печінки *in situ*.

Показано, що максимальні швидкості роз'єданого дихання та оптимальні концентрації FCCP є вищими у випадку перфузії печінки *in situ*, ніж після перфузії *in vitro*. Незалежно від способу перфузії, максимальна швидкість

роз'єданого дихання є найвищою за використання монометил-сукцинату, а оптимальна концентрація FCCP – за окиснення пірувату. Отже, мітохондрії печінки дуже чутливі до адекватної перфузії під час процедури виділення гепатоцитів.

Збільшення концентрації Ca^{2+} до 10 мкмоль/л спричинило помітне зменшення адаптаційної здатності мітохондрій, про що свідчить зниження як АДФ-стимульованого, так і FCCP-стимульованого дихання пермеабілізованих гепатоцитів. Такі зміни спостерігаються, як за окиснення сукцинату, так і суміші малату, глютамату та пірувату.

Показано, що швидкість АДФ-стимульованого дихання знижувалась з часом, і це зниження прискорювалось із зростанням концентрацій Ca^{2+} . Додавання до полярографічної комірки CsA, де вже наявні катіони Ca^{2+} у певній концентрації, не змінювало швидкості дихання гепатоцитів як за окиснення суміші малату, глютамату та пірувату, так і сукцинату.

Внесення у комірку CsA перед катіонами Ca^{2+} запобігало Ca^{2+} -спричиненому зменшенню АДФ-стимульованого і FCCP-стимульованого дихання за окиснення сукцинату. CsA усував негативний ефект високих концентрацій Ca^{2+} на швидкість FCCP-стимульованого дихання, коли у середовищі була суміш малату, глютамату і пірувату.

Також оцінювали вплив алкоголю *in vitro* на адаптаційну здатність мітохондрій. Показано, що алкоголь *in vitro* не впливав на максимальне FCCP-стимульоване дихання, мембранний потенціал та НАД(Ф)Н-автофлуоресценцію мітохондрій гепатоцитів. CsA *in vitro* не змінював ефекту алкоголю на дихання гепатоцитів.

На відмінну від *in vitro*, алкоголь *in vivo* збільшував максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання за окиснення ендогенних субстратів, глюкози чи сукцинату, але не впливав на оптимальну концентрацію FCCP. Піруват *in vivo* не впливав на максимальну швидкість роз'єданого дихання чи

оптимальну концентрацію FCCP, та не змінював ефекту алкоголю на дихання гепатоцитів.

Отримані результати доводять, що нові критерії адаптаційної здатності мітохондрій є корисними для вивчення мітохондрій клітин печінки у фізіологічних та патологічних умовах.

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

Список опублікованих праць за темою дисертації:

1. **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).*
2. **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 статистичному опрацюванні даних, 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 монометилсукцинату. 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. 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 наукової 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; 20.
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.

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.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – Аденозиндифосфат

АТФ – Аденозинтрифосфат

НАД – Нікотинамідаденіндинуклеотид

ФАД – Флавінаденіндинуклеотид

ЦТК – Цикл трикарбонових кислот

CsA – Циклоспорин А

GLUT – Транспортер глюкози

МСТ – Монокарбоксилатний транспортер

mPTP – Мітохондріальна пори перехідної проникності

NaDC – Na⁺-дикарбоксилатний котранспортер

Omy – Олігоміцин

SNAT – Натрієві нейтральні транспортери амінокислот

VDAC - Аніонні канали, залежні від напруги

ЗМІСТ

ВСТУП.....	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	20
1.1. Адаптаційна здатність мітохондрій.....	20
1.2. Цикл трикарбонових кислот.....	21
1.2.1. Біологічна роль та ферментативні реакції циклу трикарбонових кислот.....	22
1.2.2. Транспортування субстратів циклу трикарбонових кислот.....	24
1.3. Процеси мітохондріального дихання у печінці.....	27
1.3.1. Дихальний ланцюг мітохондрій.....	27
1.3.2. НАД- та ФАД-залежні дегідрогенази дихального ланцюга.....	30
1.4. Роль Ca^{2+} у регуляції клітинного дихання	31
1.4.1. Характеристика Ca^{2+} -транспортувальних систем мітохондрій.....	32
1.4.2. Вплив Ca^{2+} на дихання мітохондрій гепатоцитів.....	33
1.4.3. Мітохондріальна пора перехідної проникності та її роль у регуляції Ca^{2+} -сигналізації та мітохондріального дихання.....	35
1.5. Метаболізм алкоголю в печінці.....	37
1.5.1. Шляхи метаболізму алкоголю в печінці.....	37
1.5.2. Механізми токсичного впливу алкоголю на гепатоцити.....	39
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ і МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	41
2.1. Умови утримання та основні засади поводження із тваринами при проведенні фізіологічних досліджень.....	41
2.1.1. Групи піддослідних тварин.....	41
2.2. Методика дослідження дихання цілісних та пермеабілізованих гепатоцитів.....	42
2.3. Методика ізолювання гепатоцитів способом перфузії печінки <i>in vitro</i> та <i>in situ</i>	44
2.4. Полярографічне вимірювання швидкості споживання кисню ізолюваними гепатоцитами.....	46

2.5. Спектрофотометричний метод визначення розвитку лактат-ацидозу.....	47
2.6. Метод визначення мембранного потенціалу та НАДН-автофлуоресценції мітохондрій гепатоцитів.....	47
2.7. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження.....	49
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	50
3.1. Адаптаційна здатність мітохондрій цілісних гепатоцитів за окиснення субстратів циклу трикарбонових кислот.....	50
3.1.1. Споживання кисню гепатоцитами за окиснення глюкози, пірувату та глутаміну.....	50
3.1.2. Споживання кисню гепатоцитами, інкубованими з сукцинатом, α -кетоглутаратом та їхніми метильованими формами.....	54
3.1.3. Максимальна адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів за окиснення різних субстратів.....	57
3.2. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів від способу виділення клітин.....	64
3.3. Процеси дихання та окисного фосфорилування пермеабілізованих гепатоцитів за спричиненої Ca^{2+} активації мітохондріальної пори перехідної проникності.....	72
3.3.1. Вплив циклоспорину А на дихання пермеабілізованих гепатоцитів на тлі олігоміцину за різних концентрацій Ca^{2+}	72
3.3.2. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за умови додавання циклоспорину А у полярографічну комірку перед збільшенням концентрації Ca^{2+}	77
3.3.3. Дихальний контроль пермеабілізованих гепатоцитів у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+}	80
3.4. Вплив етанолу <i>in vitro</i> на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату.....	84
3.4.1. Дослідження впливу етанолу <i>in vitro</i> на дихання ізольованих гепатоцитів.....	84

3.4.2. Дихання ізольованих гепатоцитів за впливу етанолу та циклоспорину <i>A in vitro</i>	88
3.4.3. Вплив етанолу <i>in vitro</i> на мембранний потенціал та НАДН- автофлуоресценцію мітохондрій гепатоцитів.....	93
3.4.4. Вплив етанолу <i>in vitro</i> на розвиток лактат-ацидозу у гепатоцитах щурів.....	97
3.5. Адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів щурів за тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти.....	99
3.5.1. Вплив короткотривалого хронічного споживання алкоголю на швидкість дихання гепатоцитів.....	99
3.5.2. Вплив пірувату <i>in vivo</i> на дихання гепатоцитів за короткотривалого хронічного споживання алкоголю.....	102
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	108
ВИСНОВКИ.....	114
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	115
Додаток А.....	129

ВСТУП

Актуальність теми. Печінка відіграє надзвичайно важливу роль у життєдіяльності організму виконуючи жовчосекреторну, депонуючу, дезінтоксикаційну, екскреторну і терморегуляційну функції. Також у печінці синтезуються компоненти системи зсідання крові і відбувається інактивація багатьох біологічно активних речовин. Беручи до уваги роль печінки у забезпеченні життєдіяльності цілого організму, її функціональний стан оцінюють у фармакологічних, токсикологічних та метаболічних дослідженнях.

Для функціонування органу та нормального протікання усіх процесів клітини потребують адекватного енергетичного забезпечення, яке здійснюють мітохондрії у процесі мітохондріального окиснення. Процеси мітохондріального дихання є важливим показником, за яким можна судити про функціонування молекулярних систем мітохондріального окиснення, а отже і про стан клітин загалом. Оцінити енергетичний потенціал мітохондрій можна за їхньою адаптаційною здатністю, яку можна охарактеризувати як максимальний приріст катаболічних процесів (максимальний катаболічний потенціал), спричинений деполяризацією внутрішньої мембрани мітохондрій. Зменшення потенціалу внутрішньої мембрани 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 [56, 107, 135].

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 [56, 89, 107] 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 з запису 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 [83]. 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 [40, 96, 141].

Ще одним чинником, який суттєво може впливати на гепатоцити, а відтак і на процеси енергетичного забезпечення, є етанол, основна частина якого метаболізується 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 [52, 138].

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 Ca^{2+} 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 адаптаційною здатністю мітохондрій за максимальною швидкістю роз'єданого дихання є за використання монометилсукцинату, 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 пошуку 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. 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 симпозіумі «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.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Адаптаційна здатність мітохондрій

Життєздатність клітин залежить від здатності мітохондрій задовольняти енергетичні потреби клітини. Адаптаційна здатність мітохондрій є важливим компонентом її біоенергетичного потенціалу, який може бути використаний під час збільшення потреб клітин в енергії. У стані спокою мітохондрії живих клітин здійснюють окисні процеси на невисокому базовому рівні, використовуючи лише частину своєї адаптаційної здатності. Проте у випадку навантаження або стресу клітинам необхідна додаткова кількість енергії, яку клітини можуть отримати, наприклад, використовуючи субстрати окиснення. Показано, що зниження резервної окисної здатності (або адаптаційної здатності) ізольованих мітохондрій корелює з патологіями та смертю клітин, включаючи серцеві захворювання [107], нейродегенеративні розлади [89, 135], а також загибель клітин у гладких м'язах [56].

Зміни дихальної здатності різних типів клітин за різних умов чи функціональних станів стали основним напрямом у дослідження адаптаційної здатності мітохондрій. Основною моделлю для дослідження адаптаційної здатності мітохондрій є збільшення енергетичних потреб клітин, яке запускає компенсаторну активацію дихальної здатності мітохондрій [89]. Зручним інструментом для визначення адаптаційної здатності мітохондрій є протонофори, які можуть спричинити, як стимуляцію дихання, так і гальмування [22]. Протонофори (FCCP, CCCP) знижують мембранний потенціал шляхом транспортування протонів крізь клітинні мембрани і запускають компенсаторну реакцію дихального ланцюга, таким чином створюючи експериментальну модель енергетичного навантаження мітохондрій.

На сьогодні мало дослідженими залишаються фактори, які визначають адаптаційну здатність мітохондрій. Потенційно, надходження субстратів у цикл трикарбонових кислот є основним джерелом для збільшення активності дихального ланцюга мітохондрій, а відтак і адаптаційної здатності мітохондрій. Показано, що активація піруватдегідрогенази, АМР-залежної кінази та другого комплексу дихального ланцюга збільшує адаптаційну здатність мітохондрій кардіоміоцитів в умовах гіпоксії [94]. Також більш різке виснаження адаптаційної здатності (резервної ємності) мітохондрій спостерігалось внаслідок впливу активних форм кисню [105].

Фактично, адаптаційну здатність мітохондрій можна описати як максимальний приріст катаболічних процесів, спричинений деполяризацією їхньої внутрішньої мембрани. Зменшення потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій, енергія якого використана для синтезу АТФ під час функціонального навантаження клітин, необхідно компенсувати. Межі цієї здатності і визначають здатність клітин адаптуватись до навантаження, а відтак – і їхню життєздатність. Тому дослідження адаптаційної здатності мітохондрій є вкрай важливим для визначення та моделювання енергетичного потенціалу мітохондрій клітин.

1.2. Цикл трикарбонових кислот

Цикл трикарбонових кислот (ЦТК, цикл Кребса, цитратний цикл) є важливою метаболічною мережею, загальним кінцевим шляхом окиснювального катаболізму клітини в аеробних умовах. До того ж ЦТК є джерелом сполук-попередників для анаболічних процесів та джерелом відновних еквівалентів (НАДН та ФАДН₂), які залучені у процес генерації енергії [77]. Основна частина відновного потенціалу, який необхідний для синтезу АТФ у процесі окисного фосфорилування забезпечується саме НАДН. Редукований нуклеотид нікотинаміду окиснюється комплексом I дихального ланцюга мітохондрій, а електрони, які утворюються, переносяться до

комплексу III та IV, де вони перетворюють O_2 у H_2O . Протонна рушійна сила, яка створюється рухом електронів, використовується для синтезу АТФ за участю АТФ-синтази.

Отже ЦТК є важливою ланкою у функціонуванні клітин, оскільки забезпечує протікання процесів окисного фосфорилування та анаболічних процесів.

1.2.1. Біологічна роль та ферментативні реакції циклу трикарбонових кислот

Цикл трикарбонових кислот являє собою циклічну послідовність з восьми ферментативних реакцій, в результаті яких відбувається окиснення ацетил-КоА до CO_2 з додатковим виділенням атомів водню. Сам ацетил-КоА є продуктом катаболізму вуглеводів, жирів, амінокислот, а атоми водню в свою чергу використовуються для відновлення нікотинамідних або флавінових коферментів [77]. Відкриття ЦТК відбулося у 1937 році англійським біохіміком Г. Кребсом, а у 1953 році, разом із Ф. Ліпманом, він отримав Нобелівську премію за це відкриття [8].

ЦТК відіграє важливу роль у життєдіяльності клітин. В першу чергу це стосується залучення відновних еквівалентів – НАДН та ФАДН₂ – у процес окисного фосфорилування. Окрім своєї ролі в енергетичному метаболізмі та окисненні 2-вуглецевих сполук, ЦТК є також основним шляхом взаємоперетворення 4- та 5-вуглецевих сполук у клітині, які утворюються, або є проміжними продуктами у синтезі амінокислот [90]. Також проміжні продукти ЦТК залучаються у анаплеротичні реакції, тобто вони використовуються для синтезу глюкози та жирних кислот під час голодування в печінці [100]. Оксалоацетат, ключовий проміжний продукт ЦТК, є головним попередником глюконеогенезу в стані голодування [80], а піруват карбоксилаза, яка виробляє оксалоацетат безпосередньо в мітохондріях, є головним анаплеротичним ферментом [90].

Анаплеротичними реакціями ЦТК є реакції клітинного метаболізму, які сприяють підвищенню концентрації субстратів ЦТК внаслідок утворення їх з проміжних продуктів інших метаболічних шляхів (наприклад, амінокислот, пірувату). Одними з анаплеротичних реакцій ЦТК є перетворення амінокислот на дикарбонові кислоти, в результаті яких відбувається утворення α -кетоглутарату в реакціях трансамінування та глутаматдегідрогеназній реакції, утворення оксалоацетату в реакціях трансамінування та утворення сукциніл-КоА з ізолейцину, валіну, метіоніну, треоніну. Утворення оксалоацетату також відбувається з пірувату в піруваткарбоксилазній реакції (є найважливішою анаплеротичною реакцією в клітинах печінки та нирок) та з фосфоенолпірувату (має місце в м'язових тканинах, а за умов перебігу цієї реакції у зворотному напрямку, використовується в процесі синтезу глюкози) [90].

Швидкість функціонування ЦТК регулюється потребою клітин в енергії та наявністю чи відсутністю сполук, які необхідні для продукування цієї енергії. В першу чергу робота ЦТК визначається першим етапом – цитрат-синтазною реакцією. Швидкість цієї реакції залежить від концентрації двох субстратів (оксалоацетату та ацетил-КоА) та активності самого ферменту цитрат-синтази. Концентрація оксалоацетату залежить від окиснювально-відновного потенціалу мітохондрій по відношенню до НАД⁺/НАДН-пари та концентрації малату. Активність цитрат-синтази може регулюватися АТФ, який інгібує фермент [71]. Кількість АТФ, аденозиндифосфату (АДФ) та аденозинофосфату (АМФ) у клітині є обмеженою. Коли рівень АДФ перевищує АТФ, клітинна потреба в енергії зростає, а отже НАДН швидко окиснюється і ЦТК прискорюється. Коли рівень АТФ перевищує АДФ, і у клітині немає потреби у додатковій кількості енергії; тоді робота ланцюга транспорту електронів сповільнюється, сповільнюється окиснення НАДН, а отже, сповільнюється і робота ЦТК [120].

Основними реакціями ЦТК є:

1. Синтез цитрату з ацетил-КоА та оксалоацетату за допомогою ферменту цитратсинтази.

2. Ізомеризація цитрату в ізоцитрат за допомогою ферменту аконітази

3. Декарбоксілювання ізоцитрату в α -кетоглутарат за участі ізоцитратдегідрогенази. В результаті цієї реакції відбувається відновлення НАД^+ до НАДН.

4. Окиснення α -кетоглутарату до сукцинату. Спочатку відбувається синтез сукциніл-КоА за участі α -кетоглутаратдегідрогеназного ферментативного комплексу Далі, відбувається трансформація сукциніл-КоА в сукцинат, яка каталізується ферментом сукцинілтіокіназою. У результаті реакції утворюється ГТФ.

5. Окиснення сукцинату до фумарату сукцинатдегідрогеназою з відновленням ФАД^+ до ФАДН_2 .

6. Перетворення фумарату до малату фумаразою.

7. Останньою реакцією циклу є перетворення малату в оксалоацетат за допомогою ферменту малатдегідрогенази з відновлення НАД^+ до НАДН.

Оксалоацетат, утворений в результаті малатдегідрогеназної реакції, далі здатний взаємодіяти з молекулами ацетил-КоА [90].

1.2.2. Транспортування субстратів циклу трикарбонових кислот

Здатність мітохондрій компенсувати енергетичні витрати клітини у значній мірі залежить від доступності субстратів окиснення, а транспортування одних і тих самих субстратів у клітини різних типів може відбуватись транспортерами з різною спорідненістю (K_m) до цих субстратів.

Першим субстратом, який вступає у цикл трикарбонових кислот, є глюкоза, яка після надходження в гепатоцити може фосфорилюватися до глюкозо-6-фосфат, а далі метаболізуватися до пірувату в процесі гліколізу.

Глюкоза транспортується у клітини крізь плазматичну мембрану за допомогою транспортерів родини GLUT. Shinoda та співавтори для дослідження локалізації мембранних білків у гепатоцитах *in situ* вводили cDNAs транспортерів у печінку щура. Було встановлено, що GLUT-1 був виявлений в синусоїдальній мембрані гепатоцитів щурів [113] і транспортує глюкозу з K_m 3,4 ммоль/л.

Не зважаючи на те, що у гепатоцитах щурів експресуються GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3 та GLUT-5 [113], глюкоза у ці клітини транспортується, очевидно, за допомогою лише GLUT-2 [9, 99, 113], який знаходиться на синусоїдальній мембрані гепатоцитів щурів [129].

Екзогенний піруват (як і лактат чи кетоніві тіла) транспортуються у клітину крізь плазматичну мембрану монокарбоксилатними транспортерами (MCT). Через зовнішню мембрану мітохондрій піруват транспортується відносно неспецифічним потенціалзалежним аніонним каналом (VDAC) [82]. Бонен ідентифікував 4 класи карбоксилатних транспортерів, ймовірно у внутрішній мембрані мітохондрій печінки щурів – MCT-1, -2, -6 і -7 [20]. Для гепатоцитів щурів значення K_m MCT для пірувату становить від 0,6 [37] до 1,3 ммоль/л [60]. На ооцитах *Xenopus laevis* було встановлено, що K_m MCT-1 та MCT-2 для пірувату становлять 1–2 та 0,025–0,08 ммоль/л відповідно [20]. Низькі значення K_m MCT для пірувату забезпечують транспорт цього субстрату у достатній кількості, щоб підтримувати високу швидкість дихання гепатоцитів.

Глутамін через плазматичну мембрану ізольованих гепатоцитів щурів може транспортуватися Na^+ -залежною (SNAT) та Na^+ -незалежною системами. Крім того, остання система може забезпечувати вихід глутаміну з клітин, коли підвищується його внутрішньоклітинна концентрація. Na^+ -залежна система транспортує глутамін з K_m 1,25 ммоль/л, а Na^+ -незалежна – 4 ммоль/л [39].

Vaird та співавт. [13] виявили 2 ізоформи SNAT у печінці щурів – SNAT3 та SNAT5. Дослідження (методом гібридизації печінки щурів *in situ*,

використовуючи DIG-мічений зонд РНК) показали, що мРНК SNAT5 експресується в основному в перипортальних гепатоцитах [13] та забезпечує надходження глутаміну з портальної крові, переносячи NH_3 у формі глутаміну для подальшого перетворення в сечовину у печінці [18]. А експресія мРНК SNAT3 в основному була зосереджена в межах перивенозної області, що межує з центральними венами [13]. Цей транспортер функціонує, щоб вивільнити глутамін з гепатоцитів у венозний кровотік.

Перенесення інтермедіатів циклу трикарбонових кислот, таких як сукцинат та α -кетоглутарат, здебільшого здійснюється Na^+ -дикарбоксилатними котранспортерами (NaDC) з K_m 5–30 мкмоль/л [87]. Використовуючи гістоавторадіографію та перфузію печінки щурів відповідним розчином, виявлено, що поглинання судинного α -кетоглутарату, можливо за участі Na^+ -дикарбоксилатних котранспортерів, здійснюється привенозними гепатоцитами, що містять глутамінсинтетазу [116, 117]. Методом гібридизації *in situ* підтверджено експресію мРНК NaDC-3 у гепатоцитах щурів, що оточують центральну вену [31].

Також у невеликій субпопуляції клітин печінки щурів методом нерадіоактивної гібридизації було виявлено експресію мРНК SDCT-1 транспортера [31]. Автори припускають, що цими клітинами можуть бути гепатоцити (SDCT1-позитивні клітини не утворювали певного шаблону і були розпорошені по всій печінці). Проте спорідненість цього транспортера до цитрату, сукцинату чи α -кетоглутарату у печінці щурів невідома.

Рогнштад показав, що проникнення сукцинату через плазматичну мембрану у клітину можна підвищити шляхом введення більш ліпофільної форми сукцинату – його метилового естеру [104]. Проте досі мало відомо про здатність метилових естерів субстратів циклу трикарбонових кислот підтримувати, після розщеплення клітинними естеразами, енергетичні процеси в ізольованих гепатоцитах.

1.3. Процеси мітохондріального дихання у печінці

Мітохондрії виконують функцію енергозабезпечення еукаріотичних клітин. Ці органели здатні перетворювати енергію, що зберігається в макроелементах в АТФ – універсальний донор енергії в клітині, синтез якого відбувається з АДФ та неорганічного фосфату. Таке перетворення енергії біологічних субстратів у доступну форму енергії відбувається в результаті мітохондріального дихання – сукупності метаболічних реакцій і процесів, які відбуваються в мітохондріях та потребують наявності O_2 [62].

Важливу роль у процесі мітохондріального дихання відіграє електронно-транспортний ланцюг (сукупність білкових комплексів у внутрішній мембрані мітохондрій), який здійснює перенесення електронів з НАДН, що утворюється в результаті ЦТК в матриці мітохондрій, до кисню [101]. Внаслідок перекачування протонів з матриксу мітохондрій у між мембранний простір створюється трансмембранний електрохімічний градієнт, який АТФ-синтаза використовує для синтезу АТФ.

1.3.1. Дихальний ланцюг мітохондрій

Дихальний ланцюг мітохондрій являє собою комплекс білків-переносників електронів і протонів, який розташований у внутрішній мембрані мітохондрій. Відносна кількість комплексів дихального ланцюга може відрізнятися в мітохондріях різних організмів і навіть між різними тканинами в одному організмі. Також комплекси можуть об'єднуватися комбінації, утворюючи чітко визначені «суперкомплекси» [134].

Дихальний ланцюг складається з комплексу I (НАДН дегідрогеназа), комплексу II (сукцинатдегідрогеназа), комплексу III (убіхінон цитохром с редуктази) та комплексу IV (цитохром с оксидаза). Електрони від відновних еквівалентів (NADH, що виробляється гліколізом і ЦТК, та сукцинату, інтермедіат ЦТК) передаються до комплексів I та II відповідно, далі

передаються на убіхінон для перенесення до комплексу III з подальшим транспортуванням до комплексу IV через цитохром c [62]. Введення відновних еквівалентів в дихальний ланцюг відбувається за участі дегідрогеназ (НАД- та ФАД-залежних), які здійснюють окиснення відповідних субстратів [44, 66].

Комплекс I (НАДН-убіхінон оксидоредуктаза) є один з найбільших і найскладніших ферментів, який відповідає за окиснення NADH в матриксі мітохондрій, регенерацію NAD^+ для подальшого залучення у ЦТК та за окиснення жирних кислот, а також сприяє генерації електрохімічного градієнта протонів на внутрішній мембрані мітохондрій [27]. У ссавців комплекс I складається з 45 субодиниць [130], включаючи 7 кодованих мтДНК і 37 – яДНК, одна з яких двічі присутня в комплексі [42].

Комплекс I окиснюючи НАДН транспортує 2 електрони на убіхінон, а 4 протони – з матриксу у міжмембранний простір. Внутрішні окиснювально-відновлювальні реакції включають перенесення електронів від НАДН, через ФМН та через лінійну серію Fe-S центрів, центр Fe-S з найвищим окиснювально-відновним потенціалом ймовірно є безпосереднім донором субстрату для убіхінону [101].

Оскільки комплекс I є основною точкою входу електронів у дихальний ланцюг, він може бути лімітуючою ланкою у регулюванні швидкості дихання, тому він відіграє центральну роль в енергетичному обміні [110].

Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа) – гетеротетрамерний комплекс, який каталізує окиснення сукцинату до фумарату в ЦТК [74]. Цей комплекс в якості кофактора містить флавін-адениндинуклеотид (ФАД) у SDHA субодиниці. Друга субодиниця – SDHB – містить ферум-сульфурні центри, функція яких полягає в передачі двох електронів на убіхінон, в результаті чого відбувається його відновлення [66]. Також до складу комплексу II входить гем b, проте, його участь у складі дихального ланцюга не була чітко встановлена, тому функціональне значення гему в межах сукцинатдегідрогенази є незрозумілим [65]. Комплекс II відрізняється від інших комплексів тим, що всі білки

комплексу II кодуються ядерно. Також комплекс II є прямим ферментативним компонентом ЦТК, і на відміну від інших комплексів дихального ланцюга не переносить протони у міжмембранний простір [101].

Комплекси I та II передають електрони на убихінон. Убіхінон – невелика, ліпіднорозчинна органічна молекула, яка може бути відновлена (убіхінол) та окиснена (убіхінон), і може вільно дифундувати всередині і через внутрішню мітохондріальну мембрану. Відновлений убихінон дифундує до комплексу III, де він повторно окиснюється [27]. Було показано, що добавка CoQ10 здійснює кардіопротекторні ефекти на функцію мітохондрій під час ішемії-реперфузії міокарда [32].

Комплекс III є центральним компонентом дихального ланцюга, який з'єднує перенесення електронів від убіхінолу до розчинного цитохрому c і здійснює генерацію протонного градієнта. З трьох комплексів комплекс III має найменшу кількість субодиниць – 1 кодована мтДНК і 10 кодовані яДНК [40]. Цей комплекс є гомодимером і містить чотири окиснювально-відновлювальні простетичні групи: FeS-центр, цитохром c₁ та два цитохроми b, які формують найбільшу субодиницю комплексу [101]. Він переносить 2 електрони на цитохром c, а 4 протони транспортує з матриксу у міжмембранний простір.

Цитохром c – гемвісний хромопротеїн, який розташований у міжмембранному просторі мітохондрій і функціонує як єдиний переносник електронів від комплексу III до комплексу IV. У дихальному ланцюзі цитохром c передає по одному електрону через свою групу гемів, тому для відновлення молекули кисню до води потрібні чотири такі передачі електронів [59].

Комплекс IV (цитохром c оксидаза) каталізує перенесення електронів із відновленого цитохрому c на молекулярний кисень. У савців комплекс IV є гомодимером, кожна половина якого складається з 14 субодиниць [14]. Функціональне ядро комплексу складається з трьох субодиниць, дві з яких каталізують реакції перенесення електронів і протонів. У ссавців усі три

основні субодиниці кодуються мтДНК, решта – яДНК, і їх функції залишаються в основному незрозумілими [101].

До складу комплексу входять цитохроми a та a_3 , а також 2 іони міді зі змінною валентністю ($Cu^+ - Cu^{2+}$). Поряд із перенесенням чотирьох електронів з цитохрому c відбувається транспортування чотирьох протонів з матриксу мітохондрій.

Також відомо, що комплекси дихального ланцюга можуть асоціююватися, утворюючи стійкі суперкомплекси або ресрасоми. Вважають, що суперкомплекси виконують такі функції, як посилення дифузії преносників електронів, забезпечення стабільності комплексів та захист від активних форм кисню. Проте питання про функціонування цих суперкомплексів вимагає подальших досліджень [27].

1.3.2. НАД- та ФАД-залежні дегідрогенази дихального ланцюга

Процес окиснення субстратів є важливою складовою мітохондріального дихання, в результаті якого відбувається синтез та акумуляція вільної хімічної енергії з подальшим її використанням клітинами. Окиснення субстратів відбувається за рахунок наявності ферментів – дегідрогеназ, які каталізують цей процес, а внаслідок зміни шляхів залучення субстратів у дихальний ланцюг мітохондрій можна підсилити надходження відновлених еквівалентів [4]. Під час окиснення субстратів коферменти дегідрогеназ виконують функцію акцепторів відновлювальних еквівалентів

Залежно від типу коферменту, дегідрогенази поділяють на НАД-залежні (роль коферментів виконують НАД (нікотинамідаденіндинуклеотид) та НАДФ (нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфат)) та ФАД-залежні (роль коферментів виконують ФАД (флавінаденіндинуклеотид) та ФМН (флавінмононуклеотид)) дегідрогенази [125]. НАДН-дегідрогеназа дихального ланцюга належить до нікотинамідних дегідрогеназ, а сукцинатдегідрогеназа – до флавінових дегідрогеназ. НАД є важливим коферментом в каталітичних реакціях різних

метаболічних шляхів. НАДН та ФАДН₂ є первинними носіями електронів у дихальному ланцюзі. Окиснення НАДН та ФАДН₂ призводить до транслокації протонів через комплекси I, III та IV внутрішньої мембрани мітохондрій у міжмембранний простір. Таким чином, зміни окиснювально-відновного стану НАДН та ФАДН₂ є показниками енергетично стану мітохондрій [114, 132].

НАД і НАДФ нікотинамідних дегідрогеназ є коферментними формами вітаміну РР – нікотинамідну [43]. Нікотинамідні нуклеотиди цих дегідрогеназ, через нестійкий зв'язок між коферментом та апоферментом (коферменти можуть знаходитися або у зв'язаному з апоферментом стані, або бути відділеними від нього), вважають більше субстратами, ніж простетичними групами [125]. Здебільшого, нікотинамідні дегідрогенази виконують функції анаеробних дегідрогеназ, вони відновлюють НАД чи НАДФ, відщеплюючи протони та електрони від субстратів. НАДФ-залежні дегідрогенази каталізують процеси відновлювального синтезу, тоді як НАД-залежні – беруть участь у окиснювально-відновних реакціях основних катаболічних шляхів [136].

ФМН і ФАД флавінових дегідрогеназ є коферментними формами вітаміну В₂ – рибофлавіну [36]. Коферменти флавінових дегідрогеназ зв'язані з білковою частиною ферменту значно міцніше, на відмінну від нікотинамідних дегідрогеназ, і не відщеплюються від апоферменту на жодній стадії каталітичного циклу [125].

1.4. Роль Са²⁺ у регуляції клітинного дихання

Кальцій є важливою сигнальною молекулою, що бере участь у регулюванні багатьох клітинних процесів. Са²⁺ стимуляція мітохондріального окисного метаболізму відіграє важливу роль у контролі клітинного гомеостазу АТФ. Крім того, Са²⁺ регулює багато реакцій, які пов'язані зі споживанням клітинами АТФ, такі як скорочення м'язів, екзоцитоз, біосинтез та сигналізація нейронів [46].

Помірне збільшення концентрації Ca^{2+} у матриксі мітохондрій підвищує активність піруват-, ізоцитрат-, α -кетоглутаратдегідрогеназ та синтез АТФ [48]. Аномально високе збільшення концентрації Ca^{2+} у матриксі мітохондрій передуює порушенню їхніх функцій, оскільки спричиняє відкривання мітохондріальної пори перехідної проникності (mPTP), що призводить до роз'єднання процесів дихання і окисного фосфорилування та в кінцевому результаті до загибелі клітин [75].

1.4.1. Характеристика Ca^{2+} -транспортувальних систем мітохондрій

Мітохондрії являють собою двомембранні органели, результатом функціонування яких є синтез АТФ шляхом окисного фосфорилування. Значну роль у виконанні мітохондріями своїх функцій відіграє Ca^{2+} , а мітохондрії в свою чергу беруть участь у Ca^{2+} -сигналізації та є внутрішньоклітинними депо Ca^{2+} [103]. Мітохондрії містять складну систему транспортування Ca^{2+} , а процес транспортування цього катіона у мітохондрії чи з них пов'язаний з їхнім енергетичним станом [78]. Зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та підтримання його фізіологічного рівня в цитозолі досягається шляхом його захоплення мітохондріями через уніпортер [102]. Мітохондріальна система транспортування кальцію, яка включає його обмін між цими органелами та цитозолем, включає Ca^{2+} -уніпортер, $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ - і $\text{H}^+ - \text{Ca}^{2+}$ -обмінники [47].

Ca^{2+} -уніпортер у внутрішній мембрані мітохондрій транспортує катіони Ca^{2+} у мітохондрії використовуючи електрохімічний градієнт H^+ . Ca^{2+} -уніпортер має низьку спорідненість до Ca^{2+} і транспортує його тоді, коли цитозольна концентрація Ca^{2+} зростає вище 500 нМ, тоді коли його концентрація у стані спокою становить 100–200 нМ [85].

Також уніпортер внаслідок реверсії, в умовах деполяризації мембрани під дією протонофорів та інгібіторів мітохондріального дихання, може здійснювати вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій [7, 26]. Проте такий механізм вивільнення

кальцію з мітохондрій в умовах колапсу мембранного потенціалу є дискусійним, і вважається, що вивільнення Ca^{2+} з мітохондрій здійснюють Na^+ - Ca^{2+} і H^+ - Ca^{2+} -обмінники та mPTP [102], [48].

Na^+ - Ca^{2+} -обмінник регулює вивільнення кальцію з мітохондрій, він переважає у збудливих клітинах, а H^+ - Ca^{2+} -обмінник поширений у незбудливих клітинах [81]. Активація mPTP у внутрішній мембрані мітохондрій відбувається внаслідок перевантаження матриксу катіонами Ca^{2+} [54].

В мітохондріях у вільному стані міститься менше 1% депонованого Ca^{2+} . Інший присутній в мітохондріях кальцій перебуває у зв'язаному (але здатному до обміну) стані [49]. Процес захоплення Ca^{2+} мітохондріями відбувається швидше за процес його вивільнення з цих органел [41].

У мітохондріях печінки виявлено і досить детально охарактеризовано Na^+ - Ca^{2+} -обмінник і H^+ - Ca^{2+} -обмінник. Наявність у мітохондріях цих обмінників має важливе значення, оскільки попереджує перевантаження органел іонами Ca^{2+} [6]. Певні зміни внутрішньоклітинної $[\text{Na}^+]$, а також стани ацидозу і алкалозу можуть призводити до суттєвих порушень кальцієвого гомеостазу і енергетики клітини, що в подальшому призводить до її загибелі.

Показано, що Na^+ - Ca^{2+} - і H^+ - Ca^{2+} -обмінники мітохондрій за фізіологічних $[\text{Na}^+]$ і $[\text{H}^+]$ у цитозолі забезпечують вихід Ca^{2+} з цих органел. Na^+ - Ca^{2+} -обмінник функціонує зі стехіометрією: $1\text{Ca}^{2+} : 2\text{Na}^+$, а H^+ - Ca^{2+} -обмінник – $1\text{Ca}^{2+} : 2\text{H}^+$ [3].

1.4.2. Вплив Ca^{2+} на дихання мітохондрій гепатоцитів

Мітохондрії є основним джерелом виробництва енергії в клітинах за рахунок утворення АТФ із вуглецевих субстратів. Потреба клітин в енергії зумовлює активацію циклу трикарбонових кислот (ЦТК), який внаслідок узгодженої дії з електрон-транспортним ланцюгом і АТФазою забезпечує виробництво АТФ у внутрішній мітохондріальній мембрані. Мітохондрії також

підтримують градієнт Ca^{2+} на своїй внутрішній мембрані, забезпечуючи його сигнальний потенціал [46]. Ca^{2+} в свою чергу активує кілька дегідрогеназ ЦТК разом із механізмами транспортування субстрату та стимулює вироблення відновних еквівалентів за допомогою цих механізмів [46]. Тому, стимуляція окисного метаболізму мітохондрій за допомогою Ca^{2+} є важливою для контролю клітинного гомеостазу АТФ.

Ca^{2+} -чутливими мітохондріальними ферментами є фосфатаза піруватдегідрогенази, ізоцитрат дегідрогеназа, 2-оксоглутаратдегідрогеназа та АТФ-синтаза.

Активність піруватдегідрогеназного комплексу є лімітуючою ланкою у процесі окиснення глюкози, і тому відображається на швидкості дихання та синтезі АТФ [97]. Активність фосфатази залежить від асоціації субодиниці PDHP1c та домену L2 субодиниці E2 піруватдегідрогеназного комплексу, які поокремо не мають сайтів зв'язування Ca^{2+} [128]. Сайт зв'язування катіону, ймовірно, утворюється спільно із залишків обох взаємодіючих білків [34]. Екстрамітохондріальний Ca^{2+} стимулює активність фосфатази у фізіологічному діапазоні 0,1–1,0 мкмоль/л [83].

Активація ізоцитрат-дегідрогенази відбувається алостерично, і кожен октамер зв'язує приблизно 2 катіони Ca^{2+} . Активність оксоглутаратдегідрогенази безпосередньо регулюється Ca^{2+} , швидше за все через субодиницю E1. Кожен ферментний комплекс здатен зв'язувати приблизно 3,5 катіонів Ca^{2+} .

Зв'язування Ca^{2+} АТФ-синтазою, ймовірно, регулюється за допомогою посттрансляційних модифікацій, а фосфорилування γ -субодиниці було чутливим до мітохондріального Ca^{2+} [58]. Також було описано білок із Ca^{2+} -залежним зв'язуванням з F1-F0-синтазою, внаслідок чого збільшується здатність до виробництва АТФ [19].

1.4.3. Мітохондріальна пора перехідної проникності та її роль у регуляції Ca^{2+} -сигналізації та мітохондріального дихання

mPTP відіграє критичну фізіологічну роль у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу мітохондрій. Перевантаження мітохондрій катіонами Ca^{2+} , а також надмірне підвищення концентрації фосфатів, рівня активних форм кисню і зниження рівня аденінових нуклеотидів спричиняє відкриття mPTP – неспецифічного каналу у внутрішній мітохондріальній мембрані, який є важливим регулятором нормального функціонування мітохондрій та відіграє важливу роль у підтриманні їхнього мембранного потенціалу [73, 75]. Тривале відкриття mPTP призводить до деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій, роз'єднання процесів дихання і окисного фосфорилування, вичерпування АТФ, набрякання мітохондріального матриксу, вивільнення цитохрому c та загибелі клітин [75].

Важливу роль mPTP відіграє у некротичній загибелі клітин [15]. Після відкриття пори, внаслідок підвищення проникності внутрішньої мітохондріальної мембрани, відбувається витік протонів, що призводить до розсіювання мембранного потенціалу та градієнта рН, які складають протонну рушійну силу. Внаслідок цього відбувається не лише зменшення синтезу АТФ шляхом окиснювального фосфорилування, але й реверсія АТФази, що спричиняє розпад цитозольного АТФ. Зниження рівня АТФ призводить до порушення метаболічного гомеостазу клітини, що в свою чергу є тригером некротичної загибелі клітин через активацію фосфоліпаз, нуклеаз та протеаз [75].

Відкриття mPTP відіграє роль у процесі загибелі клітин внаслідок реперфузії [67]. Рівень АТФ у клітинах після відкриття mPTP визначає, чи пошкодження клітин, в тому числі і гепатоцитів, після реперфузії прогресує до некрозу, чи АТФ-залежного апоптозу [67, 75].

Ряд досліджень показують, що хронічне споживання алкоголю призводить до відкриття mPTP, однак механізми, які зумовлюють цей ефект,

залишаються недостатньо визначеними [91, 92, 109]. Показано, що хронічне споживання етанолу зумовлює зростання експресії генів та збільшення рівня білка CypD в печінці, а також підвищує чутливість до Ca^{2+} -залежного відкривання mPTP в ізольованих мітохондріях печінки щурів [68]. Тобто, зростання рівня CypD підвищує ймовірність відкривання mPTP у відповідь на хронічне споживання етанолу.

Основними білками, які беруть участь у формуванні mPTP є потенціал-залежний іонний канал (VDAC) у зовнішній плазматичній мембрані, транслокатор аденінових нуклеотидів у внутрішній мембрані мітохондрій та циклофілін D (CypD) у матриксу [12]. Також до складу mPTP входять периферичний рецептор бензодіазепіну, гексокіназа та креатинкіназа [96]. Хоча роль VDAC у функціонуванні mPTP ставиться під сумнів [12, 45], той факт, що CypD дефіцитні клітини були захищені від некрозу, говорить про те, що цей білок має важливе значення для mPTP [11].

Незважаючи на чисельні дослідження, молекулярна природа mPTP досі достеменно не відома. Автори висувають припущення, що F_0F_1 -субодиниці АТФ-синтази беруть участь у формуванні mPTP [45]. mPTP інгібується антибіотиком та імунодепресантом CsA у наномолярних концентраціях, який зв'язується з CypD, а також інгібується іонами Mg^{2+} , Mn^{2+} , відновленими пуриновими нуклеотидами (НАДН, НАД(Ф)Н) та тіолами [50]. Передінкубація мітохондрій з 5 мкмоль/л CsA та 40 мкмоль/л ADP, перешкоджає Ca^{2+} -індукованому набуханню органел [5]. Внаслідок інгібування mPTP (в результаті дії на CypD) спостерігається захист від загибелі клітин за різних захворювань. Видалення гена, що кодує циклофілін D (Prif) зменшує чутливість мітохондрій до набряку викликаного перевантаженням кальцієм, що асоційований з дефектною сарколемою, тим самим зменшуючи некроз міофібри в двох різних моделях м'язової дистрофії [84].

1.5. Метаболізм алкоголю в печінці

Печінка є основним органом, який здійснює метаболізм алкоголю. Молекула етанолу через свій малий розмір та гідроксильну групу добре розчинна у водному та ліпідному середовищі, відповідно, добре проникає у цитоплазму клітин [112]. Основна частина алкоголю, що потрапляє в організм метаболізується в печінці трьома основними шляхами: алкогольдегідрогеназою, через мікросомальну P450-етанолоксидантну і каталазну системи [52]. Процес окиснення етанолу є незворотним і нерегульованим, тому швидкість залежить лише від концентрації та активності ферментів. В результаті окиснення етанолу відбувається нерегульоване введення відновлювальних еквівалентів, що зумовлює зменшення як цитоплазматичної, так і внутрішньомітохондріальної НАД⁺ і зростання співвідношення АТФ / АДФ [133].

У випадку, коли швидкість метаболізму алкоголю є меншою за швидкість його надходження, накопичення алкоголю призводить до ураження клітин печінки, а згодом – до розвитку алкогольної хвороби печінки.

1.5.1. Шляхи метаболізму алкоголю в печінці

Окиснення етанолу в печінці відбувається за допомогою трьох ферментів, алкогольдегідрогенази (АДГ), каталази та P450, і центральну роль у цьому процесі відіграють мітохондрії. Найбільшу участь в окисненні етанолу бере АДГ, меншою мірою здійснюється метаболізм алкоголю в гепатоцитах через каталазну та P450 системи [52]. Для АДГ $K_m = 1,4$ ммоль/л, для каталази $K_m = 12$ ммоль/л і для P450 $K_m = 18-10$ ммоль/л [133]. АДГ та цитохром P450 метаболізують етанол в ацетальдегід, але P450 також призводить до виробництва активних форм кисню, які сприяють окиснювальному стресу.

АДГ у цитоплазмі каталізує перший етап окиснення етанолу. Кофактор НАД⁺ є необхідним для прийняття відновлення еквівалентів з алкоголю. В

результаті цієї реакції етанол окиснюється до ацетальдегіду, а вітамінний кофактор відновлюється до НАДН [57]. Реакція АДГ є оборотною.

Далі, у мітохондріях, ацетальдегід за участю альдегіддегідрогенази (АлДГ) окиснюється до ацетату. У цій необоротній реакції також відбувається відновлення НАД⁺. Частина ацетату, що утворюється в результаті окиснення ацетальдегіду циркулює до периферичних тканин, де активується до ключового продукту – ацетилу КоА [57].

АДГ – цинк-вмісний фермент, що складається з двох субодиниць. Він здійснює окиснення ендogenous спирту, що утворюється мікроорганізмами в кишечнику, окиснення екзогенного етанолу та інших спиртів, що вживаються в раціон. Фермент має широку субстратну специфічність окиснюючи багато первинних або вторинних спиртів. АДГ локалізується в цитозолі клітин і в найбільшій кількості міститься в печінці [29].

Каталаза є гем-вмісним ферментом, який знаходиться в пероксисомальній фракції клітини. Цей антиоксидантний фермент каталізує розщеплення H₂O₂, а також відіграє незначну роль в окисненні алкоголю печінкою [122].

Цитохром P450 належить до гем-вмісних ферментів і бере участь у окисненні стероїдів, жирних кислот та ксенобіотиків. Найвищий рівень цитохрому P450 знаходиться в печінці, переважно в ендоплазматичному ретикулумі [23]. Його ізоформа CYP2E1 має найвищу активність в окисненні спирту до ацетальдегіду. Цитохром P450 відіграє незначну роль у метаболізмі алкоголю (приблизно 10%), але індукується у міру збільшення концентрації алкоголю в крові [29].

Оскільки у процесі окиснення етанолу утворюються відновлені форми НАДН, то мітохондріальне дихання відіграє важливу роль в метаболізмі алкоголю шляхом регенерації НАД⁺, які регулюють рівень обох ферментів і є необхідними для етанол-ацетальдегід метаболізму [52, 138].

Процес окиснення етанолу та ацетальдегіду слабо піддається регуляції, і визначається наявністю та активністю відповідного ферменту тому швидкості

окиснення етанолу є специфічними для різних клітин [133]. Печінка здатна адаптуватися до впливу алкоголю і розвивати підвищену здатність до його метаболізму внаслідок тривалого споживання. Оскільки рівні ферментів при споживанні алкоголю не змінюються, то, ймовірно, адаптація до алкоголю відбувається через мітохондріальні зміни чи інші шляхи [53, 124].

1.5.2. Механізми токсичного впливу алкоголю на гепатоцити

Основний продукт окиснення етанолу – ацетальдегід – є хімічно реакційноздатною сполукою і може неензиматично реагувати з іншими клітинними компонентами, утворюючи метаболічно активні або цитотоксичні продукти – аддукти. Оскільки ацетальдегід володіє значною токсичністю, тому для осіб з неактивною чи малоактивною АлДГ, споживання алкоголю може мати побічні ефекти, починаючи від неприємних відчуттів до серйозних захворювань [76].

Метаболізм алкоголю опосередкований через CYP2E1 зумовлює утворення не тільки ацетальдегіду, але і активних форм кисню [126]. Як і ацетальдегід, всі ці метаболіти можуть утворювати стабільні, ковалентні модифікації білків, ліпідів, ДНК та інших макромолекул [25, 64, 126].

Одним із механізмів, за допомогою яких різні аддукти можуть сприяти ураженню печінки, є формування ацетальдегід-тубулін аддуктів. Було показано, що модифікація ацетальдегідом лише 5% окремих молекул певного типу тубуліну призводить до повного гальмування збірки тубуліну в мікротрубочки [126]. Дефекти секреції білка та шляхів його транспортування до печінки, ймовірно, є наслідком порушення функції мікротрубочок внаслідок хронічного споживання алкоголю [127].

Ще одним процесом, на який негативно впливають аддукти метаболізму алкоголю, є формування позаклітинного матриксу. Порушення у формуванні позаклітинного матриксу може призвести до утворення рубцевої тканини в печінці (фіброзу печінки) – аномального накопичення компонентів

позаклітинного матриксу, яке може виникати внаслідок того, що ацетальдегід збільшує вироблення колагену в різних типах клітин печінки [126].

Вплив аддуктів на імунну систему є ще одним механізмом токсичної дії етанолу на печінку. У дослідженнях було показано, що аддукти здатні викликають імунну відповідь, а після хронічного впливу алкоголю у тварин було виявлено антитіла проти таких аддуктів [137]. Відповідно було зроблено висновки, що аддукти, утворені внаслідок вживання алкоголю, можуть бути розпізнані імунною системою і можуть викликати шкідливі імунні реакції, які можуть призвести до ураження печінки.

Також, у відповідь на вплив алкоголю у печінці відбувається зростання синтезу АТФ, посилення утворення активних форм кисню, перекисне окиснення ліпідів та пригнічення окиснення жирних кислот [10]. Пригнічення окиснення жирних кислот призводить до швидкого накопичення нейтральних ліпідів в гепатоцитах, що зумовлює розвиток стеатозу [111]. Етанол також спричиняє гіперметаболічний стан, який характеризується швидким збільшенням метаболізму алкоголю, зростанням мітохондріального дихання та роз'єднанням окисного фосфорилування мітохондрій [21].

Отже, основним шляхом токсичного впливу алкоголю є накопичення під час його хронічного споживання ковалентних модифікації, які порушують нормальну функцію печінкових білків, ліпідів та ДНК [35], що далі призводить до порушення функції печінки.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Умови утримання та основні засади поводження із тваринами при проведенні фізіологічних досліджень

Для досліджень ми використовували білих нелінійних щурів-самці масою 250–300 г (у серії досліджень адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів за окиснення різних субстратів) та щурів-самців лінії Wistar масою 180–230 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні (перед експериментом тварини голодували 18 годин з вільним доступом до води).

Усі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, Франція, 1985) та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 26 лютого 2006 року).

2.1.1. Групи піддослідних тварин

Для дослідження впливу тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти на процеси дихання гепатоцитів ми використали 4 групи тварин: контроль, алкоголь, піруват та піруват+алкоголь (рис. 2.1). Тварини усіх груп утримували на спеціальній дієті з високим вмістом жиру тваринного походження (до 35 % за калорійністю). Якісний склад корму: лізин – 0,86 %, Метіонін+Цестин – 0,59 %, Треонін – 0,58 %, Кальцій – 0,80 %, Фосфор – 0,55 %, Натрій – 0,25 %, вітамін А – 10000 МО/кг, вітамін Д3 – 2000 МО/кг, Вітамін Е – 70 Мг/кг.

Тваринам контрольної і піруватної групи кожного вечора впродовж 14 днів перорально через зонд вводили у шлунок воду, а тваринам групи алкоголь та піруват+алкоголь – водний розчин етанолу (6 г/кг маси тіла).

На 7–14 день експерименту тваринам груп піруват та піруват+алкоголь двічі на добу (зранку і ввечері) робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію 1 мл

водного розчину пірувату натрію (по 0,5 г на кг маси тіла), а тваринам контрольної і алкогольної групи – таку ж кількість фізіологічного розчину.

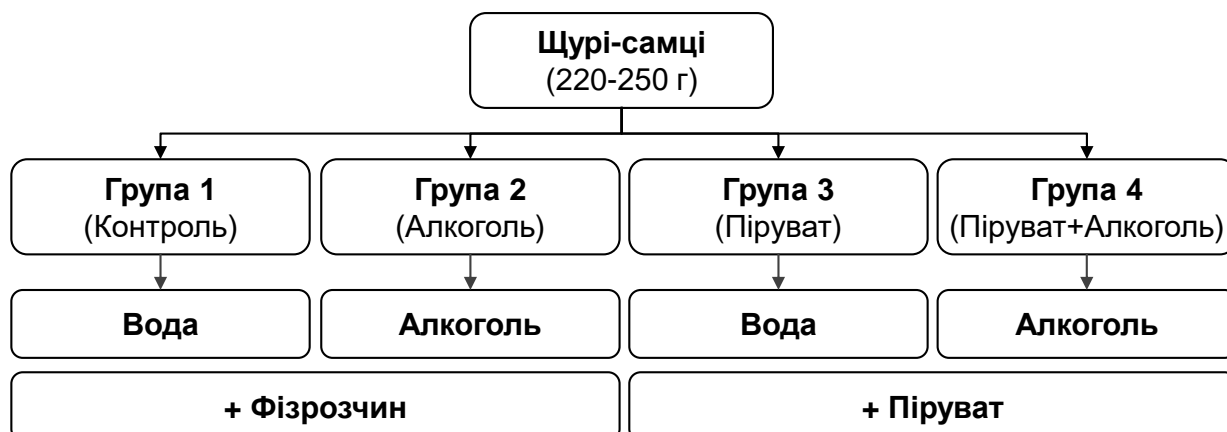


Рис. 2.1. Схема дослідження впливу хронічного введення алкоголю

Перед дослідом тварину тримали протягом ночі ізольовано, без їжі з вільним доступом до води. На 15 добу експерименту тварин декапітували та виділяли гепатоцити для дослідження швидкості дихання.

2.2. Методика дослідження дихання цілісних та пермеабілізованих гепатоцитів

Для дослідження адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів ми використовували цілісні гепатоцити, а для дослідження процесів окисного фосфорилування – пермеабілізовані гепатоцити.

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, монометил-сукцинат, 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.

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 монометил-сукцинат, по 2 ммоль/л) чи без них. Після цього, для визначення швидкості дихання, у полярографічну комірку вносили гепатоцити та додавали протонофор 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 монометил-сукцинату 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.

Оскільки внутрішня мітохондріальна мембрана непроникна для екзогенних субстратів, а процеси окисного фосфорилування мітохондрій неможливо детально вивчити за умов цілісності плазматичної мембрани, тому для досліджень ми використовували пермеабілізовані гепатоцити. Пермеабілізацію гепатоцитів здійснювали дигітоніном (50 мкг/млн клітин) впродовж 10 хв у внутрішньоклітинному розчині за температури 37 °С. Дигітонін володіє властивістю утворювати комплекси з холестерином клітинної мембрани, внаслідок чого у ній виникають своєрідні «пори».

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 по чергово додавали у комірку АДФ (750 мкмоль/л), олігоміцин (Omy) (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 чотирьох часових інтервалів – 140–160 с, 325–355 с, 455–485 с та 500–540 с. У дослідній пробі по чергово 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 по чергово 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).

2.3. Методика ізольовання гепатоцитів способом перфузії печінки *in vitro* та *in situ*

Для виділення ізольованих гепатоцитів використовували два способи перфузії печінки: *in vitro* або *in situ* [28, 108].

У випадку використання перфузії печінки *in vitro* тварин наркотизували використовуючи хлороформ, а коли застосовували перфузію *in situ* – тіопентал натрію (40 мг/кг маси тіла внутрішньоочеревинно).

Коли перфузували печінку *in vitro*, відразу після наркозу тварину декапітували, розтинали черевну порожнину, вирізали ліву присередню частку печінки, переносили її на предметне скельце (за кімнатної температури) і вводили перфузійну голку в кровоносні судини (судини другого порядку, на які розгалужуються печінкова артерія чи вена). У цьому випадку потреби використовувати гепарин не було.

За перфузії печінки *in situ*, натискаючи пінцетом на хвіст, перевіряли чи подіяв наркоз. Після дії наркозу тварину фіксували в положенні на спині та робили розтин черевної порожнини. Гепарин 5000 МО/мл (0,3 мл) вводили в

черевну нижню порожнисту вену, щоб запобігти зсіданню крові. У ворітну вену вводили катетер (18 G, 1.3 x 45 mm) і робили надріз нижньої порожнистої вени для відтоку розчину.

Далі, за перфузії печінки *in vitro* та *in situ*, гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена [108]. Спочатку, щоб відмити від крові, печінку перфузували безкальцієвим ЕГТА-вмісним розчином (37 °С) (в ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, глюкоза – 5,0, NERES – 10,0, ЕГТА – 1; рН 7,4. Швидкість потоку розчинів, яку регулювали за допомогою перистальтичної помпи, була однаковою і становила приблизно 20 мл/хв.

Наступним етапом була рециркуляторна перфузія печінки Ca²⁺-вмісним розчином з колагеназою (108 од./мл) протягом 10–12 хв (37 °С). Після перфузії печінку поміщали у базовий розчин, що містив (в ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, глюкоза – 5,0, NERES – 10,0; рН 7,4. Далі, для вилучення клітин з'єднаних між собою, гепатоцити диспергували легким піпетуванням та пропускали суспензію через нейлоновий фільтр (розмір пор 0,1 мм × 0,1 мм). Щоб вилучити метаболіти, залишки позаклітинного матриксу та пошкоджені гепатоцити суспензію тричі центрифугували (50 g).

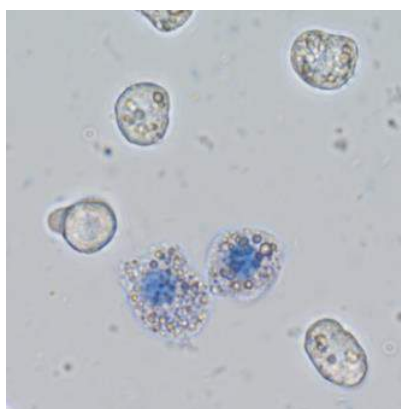


Рис. 2.2. Гепатоцити зафарбовані 0,1 %-м розчином т рипанового синього:
А – непошкоджені гепатоцити; Б – гепатоцити з порушенням цілісності плазматичної мембрани

Підрахунок гепатоцитів здійснювали з використанням камери Горяєва. Цілісність плазматичних мембран гепатоцитів оцінювали фарбуванням клітин 0,1 %-м розчином трипанового синього (рис. 2.2). Відсоток незафарбованих клітин за перфузії печінки *in vitro* та *in situ* становив $83,40 \pm 0,78$ та $82,29 \pm 1,79$ % відповідно.

2.4. Полярграфічне вимірювання швидкості споживання кисню ізольованими гепатоцитами

Принцип полярграфії полягає у дослідженні розчинів або електродних процесів за допомогою електролізу з двома електродами, один з яких є поляризованим, а інший неполяризованим.

Полярграфічне вимірювання засноване на виробленні струму, коли напруга подається між двома електродами. Електрод використовує здатність молекул O_2 хімічно реагувати з H_2O у присутності електронів для вироблення гідроксильних (OH^-) іонів. Ця електрохімічна реакція, яка називається реакцією окиснення / відновлення, або відновлення, генерує малий струм і потребує зовнішнього джерела постійної поляризованої напруги, що становить приблизно 0,6 В.

Величина струму, що генерується, є прямо пропорційною до кількості молекул кисню, які переміщуються до контактної поверхні катода. За зменшенням кількості кисню в комірці (коли клітини, які присутні у комірці споживають кисень) можна обчислити швидкість дихання.

Величину дифузного струму реєстрували за допомогою полярграфічної установки, яка включала: скляну термостатовану закриту комірку (об'ємом 1,6 мл), закритий електрод Кларка, магнітну мішалку (для розмішування суспензії), кисневий монітор (YSI5300) та мультиметр (UT-60E).

З кисневого монітора дані змін напруження кисню знімалися щосекунди (мультиметр UT-60E) та через RS232 роз'єм передавалися на носії оперативної пам'яті комп'ютера. Показники напруження кисню (у мВ) зберігались у вигляді файлу програми Microsoft Office Excel. Подальше опрацювання результатів досліджень також виконували у цій програмі.

2.5. Спектрофотометричний метод визначення розвитку лактат-ацидозу

Внаслідок окиснення етанолу у гепатоцитах відбувається накопичення ацетальдегіду, що в свою чергу призводить до ряду метаболічних порушень, одним із яких є зростання співвідношення НАДН / НАД⁺. Накопичення у клітинах НАДН може призводити до підвищення синтезу лактату з пірувату, що спричиняє розвиток лактат-ацидозу і, відповідно, зміну рН.

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 g протягом 1 хв і відбирали надосадову рідину. Далі до надосадової рідини додавати феноловий червоний і реєстрували спектри світлопоглинання (в 1 мкл зразку) за допомогою спектрофотометра Denovix DS-11+.

2.6. Метод визначення мембранного потенціалу та НАДН-автофлуоресценції мітохондрій гепатоцитів

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 барвника родамін 123 (фільтр збудження 540–585 нм, розділювач променю 595 нм, бар'єрний фільтр 600 нм).

Флуоресцентний сигнал НАДН (фільтр збудження 470–490 нм, розділювач променя 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.

Після цього довільно вибирали 5 варіантів зображень клітин у видимому та флуоресцентному світловому спектрі (рис. 2.3) та фотографували клітини на флуоресцентному мікроскопі. Інтенсивність флуоресценції аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ, використовуючи зелений канал для вимірювання флуоресценції родаміну 123 та синій канал для автофлуоресценції НАДН.

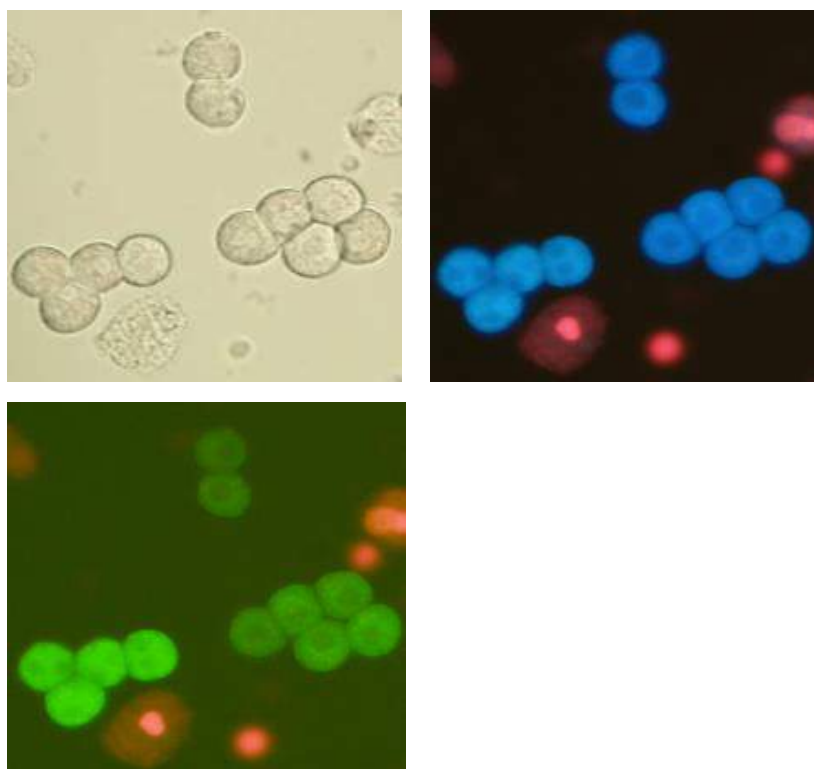


Рис. 2.3. Флуоресцентна мікроскопія гепатоцитів: *A* – гепатоцити у видимому світлі; *Б* – НАДН-автофлуоресценція гепатоцитів; *В* – флуоресценція клітин з Rhodamin 123

2.7. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження

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.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Адаптаційна здатність мітохондрій цілісних гепатоцитів за окиснення субстратів циклу трикарбонових кислот

Здатність мітохондрій компенсувати енергетичні витрати клітини, їхня адаптаційна здатність, у значній мірі залежить від властивостей дихального ланцюга мітохондрій та активності ферментів циклу трикарбонових кислот. Оцінити адаптаційну здатність мітохондрій можна, зменшуючи їхній мембранний потенціал та індукуючи максимальну швидкість споживання кисню (V_{\max}) додаванням протоніофорів (СССР або FCCP). Показано, що зниження адаптаційної здатності ізольованих мітохондрій (або запасної окисної здатності – різниці між максимальною та базальною швидкостями дихання) корелює з різними патологіями та загибеллю клітин, включаючи серцеві захворювання [107], нейродегенеративні розлади [89, 135], а також загибель клітин у гладких м'язах [56].

Ми припускаємо, що максимальна окисна здатність мітохондрій цілісних клітин (а відтак і їхня адаптаційна здатність) залежить не лише від властивостей дихального ланцюга мітохондрій та активності ферментів циклу трикарбонових кислот, а й від доступності субстратів окиснення, перенесення яких за умов цілісності плазматичної мембрани здійснюється транспортерами з різною спорідненістю до них.

3.1.1. Споживання кисню гепатоцитами за окиснення глюкози, пірувату та глютаміну

Адаптаційна здатність мітохондрій визначається спряженістю циклу трикарбонових кислот та дихального ланцюга. У свою чергу, ефективність роботи циклу трикарбонових кислот залежить від доступності субстратів окиснення, експресії їхніх транспортерів, локалізації у клітинних мембранах та спорідненості до цих субстратів. Піруват, який утворюється у процесі гліколізу з глюкози, та глютамін є найважливішими молекулами, які забезпечують

включення енергетичних субстратів у цикл трикарбонових кислот. Тому для оцінки окисної здатності мітохондрій у першу чергу необхідно дослідити їхній вклад.

Для дослідження окисної здатності ізольовані гепатоцити інкубували протягом 15 хв за 37° С без екзогенних субстратів окиснення (контроль) та з ними. Далі клітини вносили у полярографічну комірку і реєстрували базальну швидкість дихання. Потім у полярографічну комірку вносили FCCP у наростаючих концентраціях – до 0,25, 0,5 або 1 мкмоль/л (рис. 3.1 А).

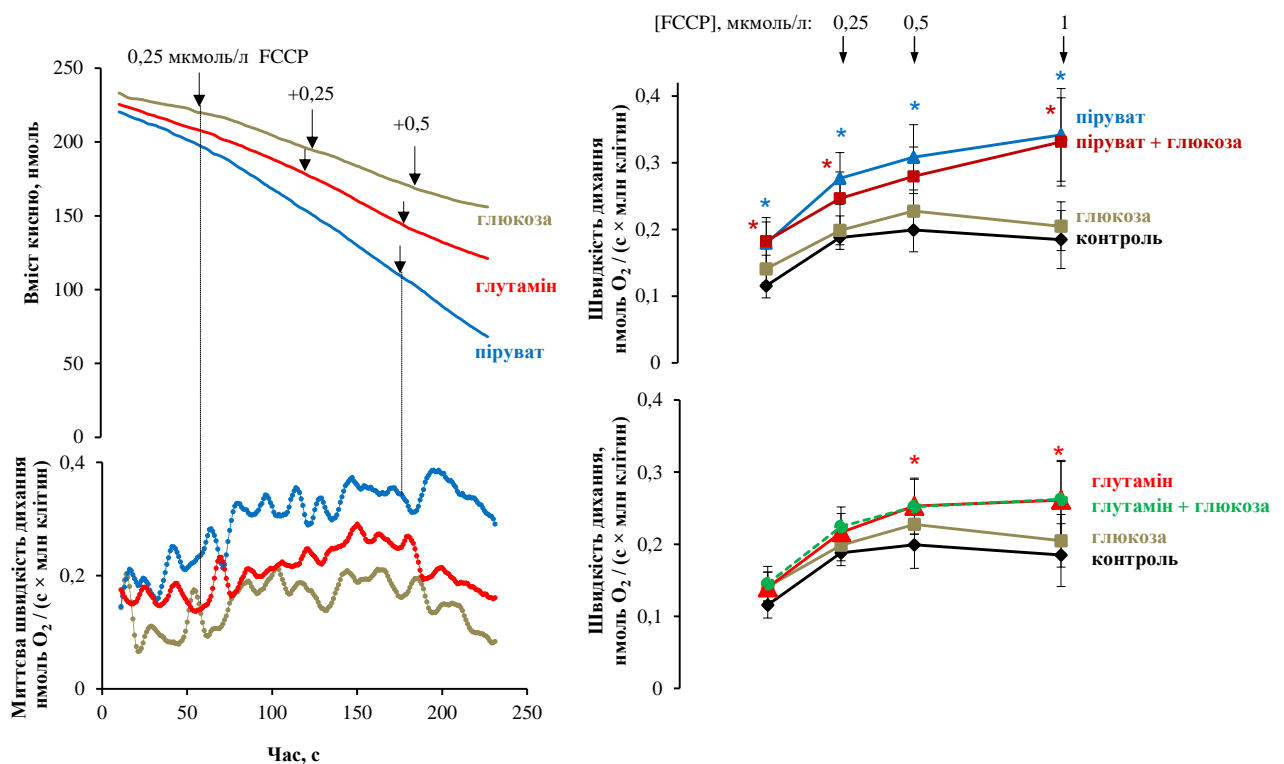


Рис. 3.1. Швидкість дихання цілісних гепатоцитів залежить від субстрату окиснення: А – зменшення вмісту кисню у полярографічній комірці після внесення суспензії гепатоцитів (зверху) і розрахована миттєва швидкість дихання (знизу) за окиснення екзогенного пірувату, глутаміну та глюкози; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP до кінцевої концентрації 0,25, 0,5 і 1 мкмоль/л; Б, В – залежність дихання цілісних гепатоцитів від концентрації FCCP у середовищі за окиснення різних субстратів та їхнього поєднання; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін] = 2 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів (Б, В) з $P < 0,05$, $n = 6$

За окиснення ендогенних субстратів швидкість базального дихання гепатоцитів становила $0,12 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с × млн клітин) (рис. 3.1 Б). 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. 3.1 Б).

Глюкоза транспортується у клітини крізь плазматичну мембрану за допомогою транспортерів родини GLUT. Не зважаючи на те, що у гепатоцитах щурів експресуються GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3 та GLUT-5 [113], глюкоза у ці клітини транспортується, очевидно, за допомогою лише GLUT-2 [9, 99, 113], який знаходиться на синусоїдальній мембрані гепатоцитів щурів [129]. Після надходження в гепатоцити, вона може фосфорилюватися до глюкозо-6-фосфат, а далі метаболізуватися до пірувату в процесі гліколізу. Піруват вступає у такі анаболічні і катаболічні шляхи, як глюконеогенез, синтез ліпідів та холестерину, окиснювальний метаболізм, цикл трикарбонових кислот. Альтернативно, глюкоза фосфорилюється до глюкозо-1-фосфату і депонується у печінці у вигляді глікогену [106]. Швидкість дихання за наявності глюкози характеризує тільки потік повного окиснення глюкози, що є лише частиною здатності гепатоцитів до утилізації глюкози.

Нами встановлено також, що піруват підвищував базальну та FCCP-стимульовану швидкості дихання за всіх досліджуваних концентрацій цього протонофора відносно відповідних швидкостей дихання, коли у середовище не додавали субстрату окиснення (рис. 3.1 Б). Отже, піруват може забезпечити вищу адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, ніж глюкоза. Тому можна припустити, що гліколіз є лімітуючою ланкою катаболізму глюкози у

гепатоцитах. Більше того, ефекти глюкози (10 ммоль/л) і пірувату (2 ммоль/л) виявилися неадитивними, оскільки за одночасної наявності цих субстратів у середовищі базальна та FCCP-стимульована швидкості дихання не змінювались у порівнянні до глюкози.

Екзогенний піруват (як і лактат чи кетонів тіла) транспортуються у клітину крізь плазматичну мембрану монокарбоксилатними транспортерами (MCT). На ооцитах *Xenopus laevis* було встановлено, що K_m MCT-1 та MCT-2 для пірувату становлять 1–2 та 0,025–0,08 ммоль/л відповідно [20]. Низькі значення K_m MCT для пірувату забезпечують транспорт цього субстрату у достатній кількості, щоб підтримувати високу швидкість дихання в наших експериментах.

Глутамін через плазматичну мембрану ізольованих гепатоцитів щурів може транспортуватися Na^+ -залежною (SNAT) та Na^+ -незалежною системами. Крім того, остання система може забезпечувати вихід глутаміну з клітин, коли підвищується його внутрішньоклітинна концентрація [39].

Baird та співавт. [13] виявили 2 ізоформи SNAT у печінці щурів – SNAT3 та SNAT5. Дослідження (методом гібридизації печінки щурів *in situ*, використовуючи DIG-мічений зонд РНК) показали, що мРНК SNAT5 експресується в основному в перипортальних гепатоцитах [13] та забезпечує надходження глутаміну з портальної крові, переносячи NH_3 у формі глутаміну для подальшого перетворення в сечовину у печінці [18]. А експресія мРНК SNAT3 в основному була зосереджена в межах перивенозної області, що межує з центральними венами [13]. Цей транспортер функціонує, щоб вивільнити глутамін з гепатоцитів у венозний кровотік.

Нами досліджено (рис. 3.1 B), що глутамін, у порівнянні з використанням безсубстратного середовища, не впливав на базальну швидкість споживання кисню, проте підвищував швидкість FCCP-стимульованого дихання за концентрації протонофора 0,5 та 1 мкмоль/л. Очевидно, наявність транспортерів глутаміну з відносно високою афінністю [39] забезпечують

гепатоцити щурів достатньою кількістю субстрату, який вступає у цикл трикарбонових кислот через перетворення в глутамат та підтримує дихання мітохондрій на високому рівні.

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.

3.1.2. Споживання кисню гепатоцитами, інкубованими з сукцинатом, α -кетоглутаратом та їхніми метильованими формами

Перенесення інтермедіатів циклу трикарбонових кислот, таких як сукцинат та α -кетоглутарат, здебільшого здійснюється Na^+ -дикарбоксилатними котранспортерами (NaDC) з K_m 5–30 мкмоль/л [87]. Використовуючи гістоавторадіографію та перфузію печінки щурів відповідним розчином, виявлено, що поглинання судинного α -кетоглутарату, можливо за участі Na^+ -дикарбоксилатних котранспортерів, здійснюється привенозними гепатоцитами, що містять глютамінсинтетазу [116, 117]. Методом гібридизації *in situ* підтверджено експресію мРНК NaDC-3 у гепатоцитах щурів, що оточують центральну вену [31].

Рогнштад показав, що проникнення сукцинату через плазматичну мембрану у клітину можна підвищити шляхом введення більш ліпофільної форми сукцинату – його метилового естеру [104]. На клітинах лімфоми NK/Ly було показано, що використання диметил- α -кетоглутарату зумовлює зростання швидкості FCCP-стимульованого дихання [1].

Проте досі мало відомо про здатність метилових естерів субстратів циклу трикарбонових кислот підтримувати, після розщеплення клітинними естеразами, енергетичні процеси в ізольованих гепатоцитах.

Нами встановлено, що додавання сукцинату або монометил-сукцинату підвищувало базальну швидкість споживання кисню гепатоцитами (рис. 3.2), тоді як α -кетоглутарат та диметил- α -кетоглутарат не впливали на цей показник (рис. 3.3).

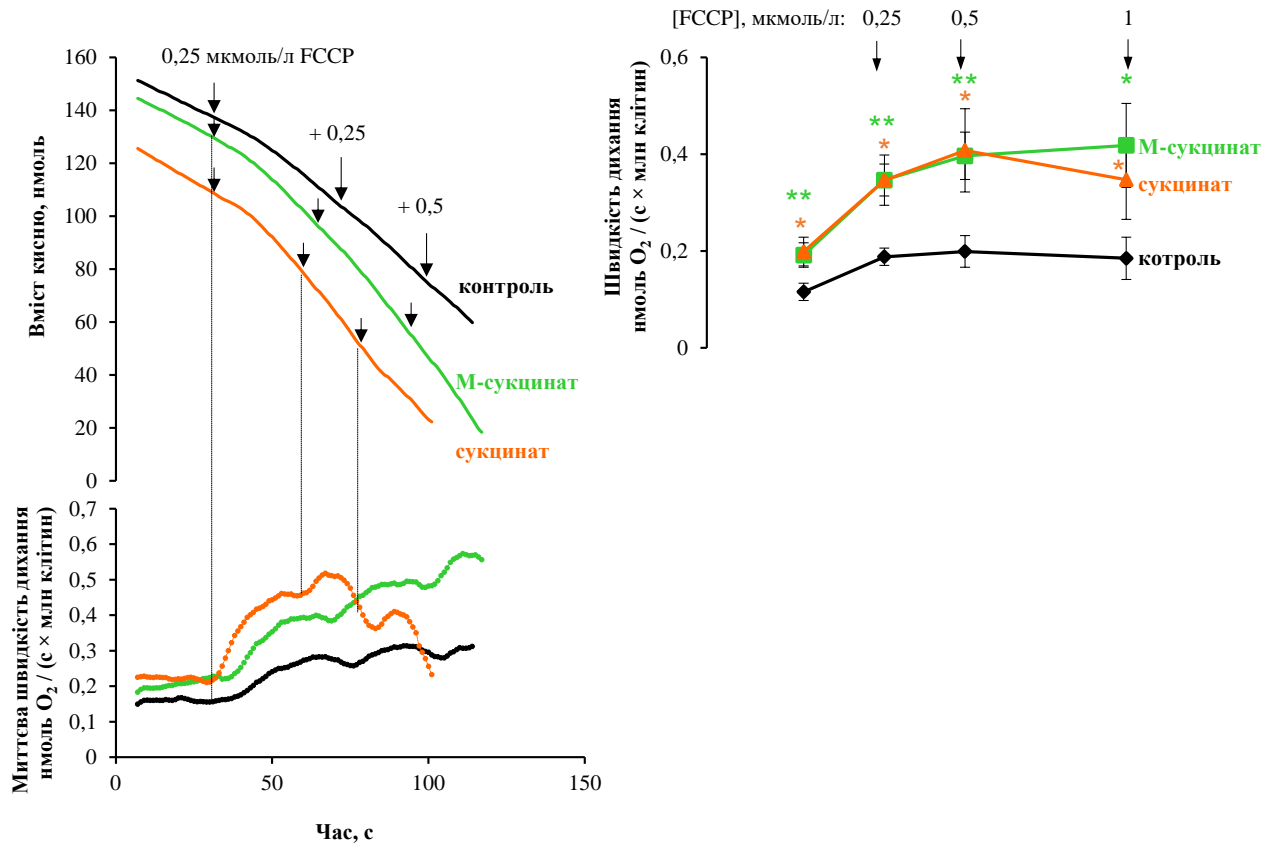


Рис. 3.2. Швидкості дихання гепатоцитів за використання сукцинату та його метильованого похідного: А – зменшення вмісту кисню у полярографічній комірці після внесення суспензії гепатоцитів (зверху) та швидкість дихання (знизу) за окиснення сукцинату; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP до кінцевої концентрації 0,25, 0,5 і 1 мкмоль/л; Б – залежність швидкості дихання цілісних гепатоцитів від концентрації FCCP у середовищі; [сукцинат], [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів за дії FCCP у концентраціях 0,25, 0,5 та 1 мкмоль/л була більшою, у порівнянні з використанням безсубстратного середовища, за наявності сукцинату, монометил-сукцинату та

диметил- α -кетоглутарату (рис. 3.2 Б, 3.3 Б). Коли окиснювався екзогенний α -кетоглутарат, швидкість роз'єданого дихання була більшою лише за 0,25 мкмоль/л FCCP.

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.

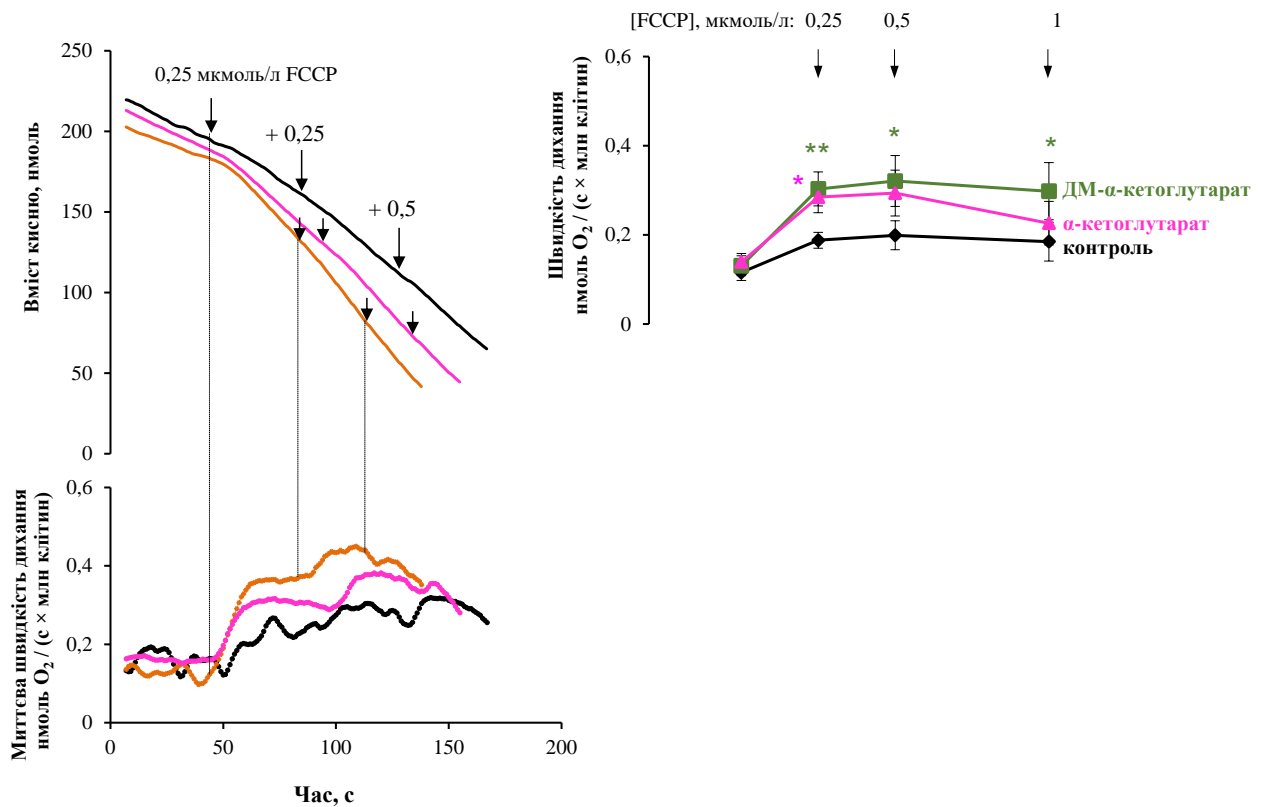


Рис. 3.3. Швидкості дихання гепатоцитів за використання α -кетоглутарату чи диметил- α -кетоглутарату: А – зменшення вмісту кисню у полярографічній комірці (зверху) та швидкості дихання (знизу) за окиснення α -кетоглутарату та диметил- α -кетоглутарату; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP до кінцевої концентрації 0,25, 0,5 і 1 мкмоль/л; Б – залежність швидкості дихання цілісних гепатоцитів від концентрації FCCP у середовищі; [α -кетоглутарат], [диметил- α -кетоглутарат] = 2 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Сукцинат та α -кетоглутарат транспортуються одним типом транспортерів, а значно вища швидкість дихання, що спостерігалась за окиснення сукцинату у порівнянні з α -кетоглутаратом, може бути пов'язана з різною селективністю транспортерів до цих субстратів, швидкістю включення субстрату в цикл трикарбонових кислот, активністю його дегідрогеназ, що здійснюють окиснення субстратів, ефективністю транспорту протонів через дихальний ланцюг чи з іншими чинниками.

3.1.3. Максимальна адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів за окиснення різних субстратів

Адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів можна охарактеризувати максимальною швидкістю роз'єданого дихання та оптимальною концентрацією FCCP.

Ще одним параметром, який дає змогу охарактеризувати адаптаційну здатність мітохондрій, є прискорення дихання гепатоцитів внаслідок додавання FCCP у певній концентрації. Її визначали як другу похідну з запису споживання кисню. Для цього використовували рівняння поліному другого порядку:

$$N = N_0 - \left(v_0 t + \frac{1}{2} a t^2 \right),$$

де N – вміст O_2 у розчині в момент часу t (нмоль), N_0 – початковий вміст O_2 у розчині (нмоль), t – час (с), v_0 – швидкість споживання кисню (нмоль O_2 / (с \times млн клітин)), a – прискорення споживання кисню (нмоль O_2 / (с² \times млн клітин)) або, для зручності представлення, пмоль O_2 / (с² \times млн клітин)).

Отже, максимальна швидкість роз'єданого дихання (рис. 3.4 А) за використання безсубстратного середовища становила $0,22 \pm 0,05$ нмоль O_2 / (с \times млн клітин), а оптимальна концентрація FCCP (рис. 3.4 Б) – $0,57 \pm 0,15$ мкмоль/л. Прискорення дихання внаслідок додавання FCCP у концентрації $0,25$ мкмоль/л (рис. 3.4 В) і окиснення ендогенних субстратів становило $6,79 \pm 1,72$ пмоль O_2 / (с² \times млн клітин).

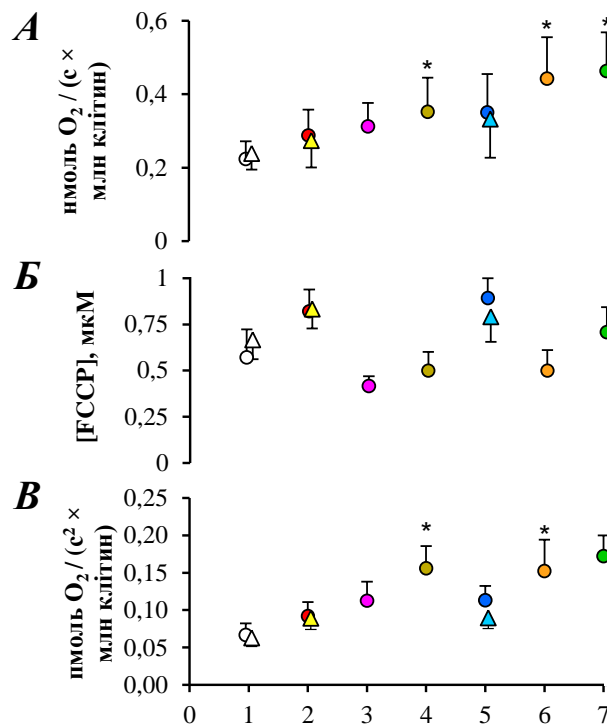


Рис. 3.4. Максимальна швидкість роз'єданого дихання, оптимальна концентрація FCCP та прискорення дихання гепатоцитів за використання різних субстратів: *A* – максимальна швидкість роз'єданого дихання; *B* – оптимальна концентрація FCCP; *V* – прискорення дихання; 1 – ендогенні субстрати, 2 – [глутамін], 3 – [α-кетоглутарат], 4 – [диметил-α-кетоглутарат], 5 – [піруват], 6 – [сукцинат], 7 – [монометил-сукцинат], = 2 ммоль/л; [глюкоза] = 10 ммоль/л; прискорення дихання вимірювали лише за концентрації FCCP 0,25 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Внаслідок додавання до середовища субстратів окиснення спостерігалася виражена тенденція до збільшення максимальної швидкості роз'єданого дихання. Але це збільшення досягало необхідного рівня достовірності лише за використання диметил-α-кетоглутарату, сукцинату та монометил-сукцинату (рис. 3.4 *A*). Найвищою максимальна швидкість роз'єданого дихання є за використання монометил-сукцинату, і дещо зменшується у послідовності:

монометил-сукцинат > сукцинат > піруват > диметил- α -кетоглутарат > α -кетоглутарат > глутамін > глюкоза.

Для оптимальної концентрації FCCP послідовність субстратів є дещо іншою (рис. 3.4 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 субстрати здатні підтримувати дихання на високому рівні. За додавання у середовища сукцинату чи α -кетоглутарату їхній пул у матриксі мітохондрій залишається невисоким. Однією з причин цього (але не єдиною) може бути недостатній рівень транспортування цих субстратів через клітинні мембрани. Тому оптимальна концентрація FCCP за використання їхніх метилових естерів є дещо вищою.

Послідовність субстратів для прискорення дихання внаслідок додавання FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л є дещо подібною до послідовності для максимальної швидкості роз'єданого дихання. Проте незважаючи на достатньо високу максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію FCCP, піруват забезпечує незначне прискорення дихання. Ймовірно, це пов'язано з тим, що після включення пірувату у процес окиснення наявні дві повільні ланки циклу Кребса (утворення цитрату та α -кетоглутарату), тоді коли інші досліджені нами екзогенні субстрати оминають їх.

Цікаво, що додавання глюкози до середовища, яке вже містило піруват, не лише не збільшувало, а навіть дещо зменшувало середньоарифметичне значення максимальної швидкості роз'єданого дихання (вихідні дані представлені на рис. 3.4 А). Аналогічно, тенденція до зменшення максимальної швидкості роз'єданого дихання спостерігалась за наявності у середовищі суміші глутаміну і глюкози. Додавання глюкози до піруватвмісного чи глутамінвмісного середовища також не впливало ні на оптимальну концентрацію FCCP, ні на прискорення дихання внаслідок додавання FCCP у

концентрації 0,25 мкмоль/л (рис. 3.4 *Б* і *В*). Отже, наявність глюкози у високій концентрації не покращує, а навіть дещо погіршує максимальну окисну здатність мітохондрій.

Зручним інструментом для визначення адаптаційної здатності мітохондрій є протонофори, які знижують мембранний потенціал шляхом транспортування протонів крізь клітинні мембрани і запускають компенсаторну реакцію дихального ланцюга. Одним із параметрів, який ми розраховували, щоб оцінити адаптаційну здатність мітохондрій, було прискорення дихання гепатоцитів внаслідок додавання FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л. Прискорення дихання впливає на максимальну швидкість дихання за FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л, але це неєдиний параметр, який на неї впливає.

Потрібно зазначити, що мітохондрії різних тканин чи за різних функціональних станів клітини можуть бути по різному налаштовані на використання субстратів окиснення. А відтак і базальна швидкість дихання за їхнього окиснення є різною. Зокрема, нами зареєстровано, що базальні швидкості дихання мітохондрій гепатоцитів за окиснення сукцинату і пірувату є суттєво більшими, ніж за окиснення інших субстратів (див. рис. 3.1 *В*, *С*, 3.2 *В* і 3.3 *В*). Оскільки адаптаційна здатність мітохондрій визначається як різниця між максимальною окисною здатністю і базальним диханням, це може мати суттєве значення для трактування результатів.

Для формалізації оцінки адаптаційної здатності мітохондрій і уникнення залежності від базальної швидкості дихання, ми розраховували площу приросту під кривими залежності швидкості дихання у діапазоні досліджуваних концентрацій FCCP:

$$S = \int_0^1 \Delta v_i(C) \cdot dC ,$$

де S – площа приросту під кривою (нмоль $O_2 \times$ мкмоль/л FCCP / (с² \times млн клітин) або, для зручності, у.о.), Δv_i – приріст швидкості дихання за певної

концентрації FCCP ($\Delta v_i = v_i - v_0$; нмоль O_2 / ($s^2 \times$ млн клітин)), C – концентрація FCCP (мкмоль/л).

Такий підхід дає змогу також врахувати в інтегральній оцінці нахил кривої зміни швидкості споживання кисню, а не лише оптимальну концентрацію FCCP.

За площею під кривою приросту швидкості дихання гепатоцитів від концентрації FCCP субстрати розміщуються у порядку зростання: глюкоза (0.063 у.о.) : ендогенні субстрати (0.067 у.о.) : глутамін (0.092 у.о.) : піруват (0.113 у.о.) : α -кетоглутарат (0.116 у.о.) : сукцинат (0.152 у.о.) : диметил- α -кетоглутарат (0.156 у.о.) : монометил-сукцинат (0.172 у.о.).

Цікаво, що ця послідовність є досить близькою до послідовності, що описує залежність прискорення дихання від субстрату окиснення (рис. 3.4 С). Відмінності між цими двома послідовностями зумовлені, очевидно, процесами сповільнення дихання, яке реєструється за високих концентрацій FCCP, і що частково враховується під час розрахунку площі під кривою приросту швидкості дихання.

Виходячи з того, що за використання монометил-сукцинату і диметил- α -кетоглутарату площі під кривою приросту швидкості дихання були вищими, ніж за використання, властиво, сукцинату і α -кетоглутарату, можна припустити, що швидкості транспортування цих субстратів окиснення крізь плазматичну мембрану є недостатньо високими, щоб тривалий час підтримувати швидкість дихання, а відтак і адаптаційну здатність мітохондрій, на високому рівні.

Сам по собі сукцинат та α -кетоглутарат забезпечують високу адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів. Сукцинат краще ніж α -кетоглутарат підтримує окисні процеси у мітохондріях цілісних гепатоцитів, і це корелює із вищою спорідненістю NaDC до нього: для сукцинату K_m становить ~ 6.4 мкмоль/л, а для α -кетоглутарату – ~ 10 мкмоль/л [139].

Піруват з досить високою спорідненістю (K_m від 0,6 [37] до 1,3 ммоль/л [60]) транспортується крізь плазматичну мембрану монокарбоксилатними

транспортерами [95], і забезпечує адаптаційну здатність мітохондрій на середньому рівні.

Висока швидкість окисних процесів за використання пірувату зумовлена також і високою активністю піруватдегідрогеназного комплексу (за допомогою якого піруват перетворюється на ацетил-КоА) та піруваткарбоксилази (здійснює карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату), які забезпечують наявність початкових субстратів для циклу трикарбонових кислот. До того ж, за окиснення пірувату високою є протонтранспортувальна здатність дихального ланцюга мітохондрій. Разом це все спричинює і високе значення базальної швидкості дихання, і високу адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.

Глутамін, так як і піруват, забезпечує середню адаптаційну здатність мітохондрій. Транспортування глутаміну крізь плазматичну мембрану гепатоцитів щурів здійснюється SNAT з K_m 1,25 ммоль/л та Na^+ -незалежною системою – з K_m 4 ммоль/л [39]. Глутамін включається в цикл трикарбонових кислот через глутамат і α -кетоглутарат, оминаючи початкові повільні ділянки циклу трикарбонових кислот. Тим не менше, адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів за його окиснення є невисокою, а базальна швидкість дихання є порівняно низькою.

Найнижчою адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів є за окиснення глюкози, транспорт якої крізь плазматичну мембрану гепатоцитів здійснює низькоафінний GLUT-2 [113, 121] з $K_m \sim 17$ ммоль/л [129].

Оскільки після включення глюкоза розщеплюється до пірувату, але за її використання адаптаційна здатність мітохондрій є меншою, ніж за використання екзогенного пірувату, то можна припустити, що через високе значення K_m транспорт глюкози у гепатоцити занадто повільний, щоб стимулювати дихання, або процеси повного окиснення ендогенної глюкози вже запуснені на повну потужність за умов відсутності екзогенної глюкози, або ж ендогенне дихання підтримується на подібному до глюкози рівні, але за

рахунок окиснення інших субстратів. Також причиною низької адаптаційної здатності мітохондрій за окиснення глюкози можуть бути особливості її метаболізму у гепатоцитах, оскільки основною функцією печінки є запасання глюкози у формі глікогену, а не її окиснення.

Підсумок. Обґрунтовано такі критерії оцінки адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів, як максимальна швидкість роз'єданого дихання, оптимальна концентрація FCCP, прискорення дихання внаслідок додавання FCCP, площа приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP. Площа під кривою обернено корелює із K_m транспортерів субстратів окиснення, а відтак, адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить від наявності субстратів окиснення та спорідненості транспортерів до цих субстратів, і є найвищою за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату.

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
2. 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.
3. 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; 20.
4. 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. Київ, 2019; 65(3): 32–33.

3.2. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів від способу виділення клітин

Адаптаційна здатність мітохондрій, яка є різною за різних функціональних станів клітин, є важливим чинником, що визначає життєздатність цих клітин [79]. Щоб охарактеризувати адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, отриманих різними способами, визначали максимальну швидкість роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій протонофора FCCP) та оптимальну концентрацію FCCP (концентрація, за якої ця швидкість зареєстрована).

За окиснення ендогенних субстратів швидкість базального дихання гепатоцитів, виділених методом перфузії печінки *in vitro* (рис. 3.5 А), становила $0,08 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (с × млн клітин). Якщо печінку перфузували *in situ* (рис. 3.5 Б), цей показник був дещо вищим і становив $0,12 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с × млн клітин). Але різниця між швидкостями базального дихання, коли використовували ці два методи перфузії печінки, є невірогідною ($P = 0,11$).

В обох випадках швидкість споживання кисню гепатоцитами внаслідок додавання до полярографічної комірки FCCP у низьких концентраціях збільшувалася, а високих концентраціях – дещо зменшувалася. Тим не менше, чутливість до FCCP у випадку перфузії печінки *in vitro* була дещо вищою.

Як описано вище, максимальна швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів за перфузії печінки *in situ* становила $0,22 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (с × млн клітин). Коли ж печінку перфузували *in vitro*, максимальна швидкість роз'єданого дихання виявилася статистично достовірно нижчою ($P = 0,04$) і становила $0,15 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (с × млн клітин). Подальше збільшення концентрації FCCP за перфузії печінки *in vitro* спричиняло суттєвіше зменшення швидкості роз'єданого дихання, ніж за перфузії *in situ* (див. рис. 3.5 А і Б).

Швидкість роз'єданого дихання досягала свого максимального значення за різної концентрації FCCP – 0,09 мкмоль/л у випадку перфузії печінки *in vitro* та 0,6 мкмоль/л у випадку перфузії печінки *in situ*. Отже, залежність швидкості роз'єданого дихання гепатоцитів від концентрації FCCP у випадку використання перфузії печінки *in vitro* є виражено зміщеною вліво.

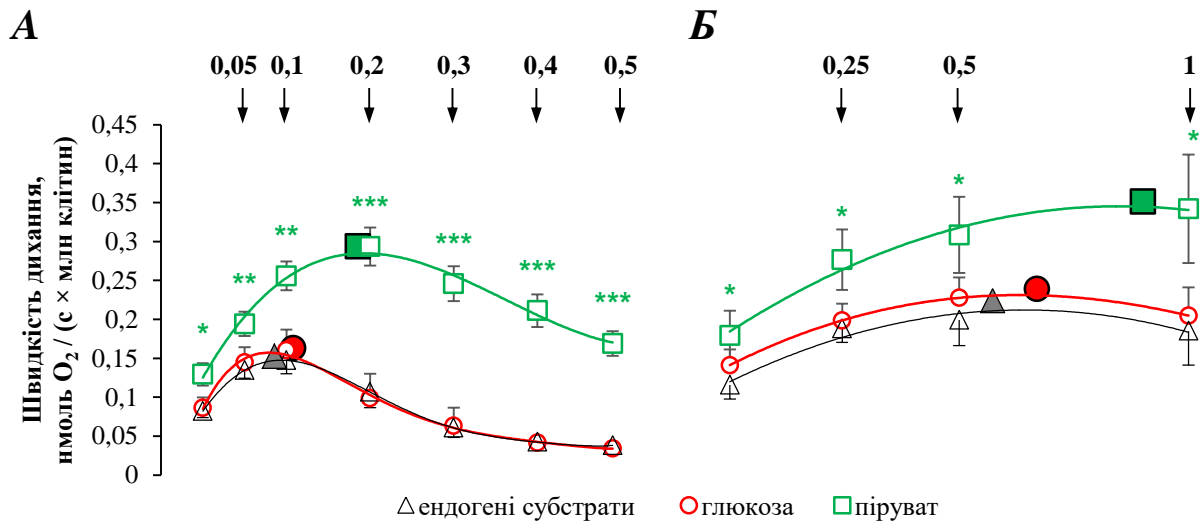


Рис. 3.5. Залежність дихання цілісних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), від концентрації FCCP за окиснення ендогенних субстратів, глюкози та пірувату: ■, ● та ▲ – значення максимальної швидкості роз'єданого дихання за оптимальної концентрації FCCP; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення лише ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Додавання до середовища глюкози не спричинило суттєвого збільшення швидкості базального і FCCP-стимульованого дихання гепатоцитів як за перфузії печінки *in vitro*, так і *in situ* (рис. 3.5 А і Б). Характер залежності швидкості від концентрації протонофора і максимальна швидкість роз'єданого дихання в обох випадках теж не змінювалися.

Продуктом окиснення глюкози у процесі гліколізу є піруват. Крім того, джерелом пірувату є лактат, який надходить у печінку із скелетних м'язів [118]. Тому ми перевірили, як впливає наявність цього субстрату на максимальну швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів у випадку перфузії печінки *in vitro* та *in situ*.

Встановлено, що внаслідок додавання до середовища пірувату швидкості базального та FCCP-стимульованого дихання в обох випадках суттєво збільшувалися (рис. 3.5). Правда, максимальна швидкість роз'єданого дихання за перфузії печінки *in vitro* збільшувалася у 1,9 разів ($P = 0,0009$), а за перфузії печінки *in situ* – у 1,6 разів, але $P = 0,056$. В обох випадках оптимальна концентрація FCCP у разі окиснення екзогенного пірувату була зміщена вправо і це свідчить про вищу адаптаційну здатність мітохондрій (рис. 3.5).

Окрім пірувату, глутамін є ще одною молекулою, яка забезпечує включення енергетичних субстратів у цикл трикарбонових кислот через почергове перетворення у глутамат і α -кетоглутарат [38]. Швидкості FCCP-стимульованого дихання, коли субстратом окиснення був глутамін або α -кетоглутарат, а печінку перфузували *in vitro*, були дещо вищими, ніж за окиснення ендогенних субстратів, і практично не відрізнялися між собою (рис. 3.6). У випадку перфузії *in situ* α -кетоглутарат виявився кращим субстратом за низьких концентрацій FCCP, а глутамін – за високих, про що свідчить значення оптимальної концентрації FCCP.

Самі по собі сукцинат забезпечує високу адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів. Він краще ніж α -кетоглутарат підтримує окисні процеси у мітохондріях цілісних гепатоцитів, що корелює із вищою спорідненістю транспортерів до нього [139]. На відміну від окиснення глутаміну і α -кетоглутарату, максимальна швидкість роз'єданого дихання за окиснення сукцинату (рис. 3.7) у порівнянні до окиснення ендогенних субстратів статистично достовірно зростала в обох випадках.

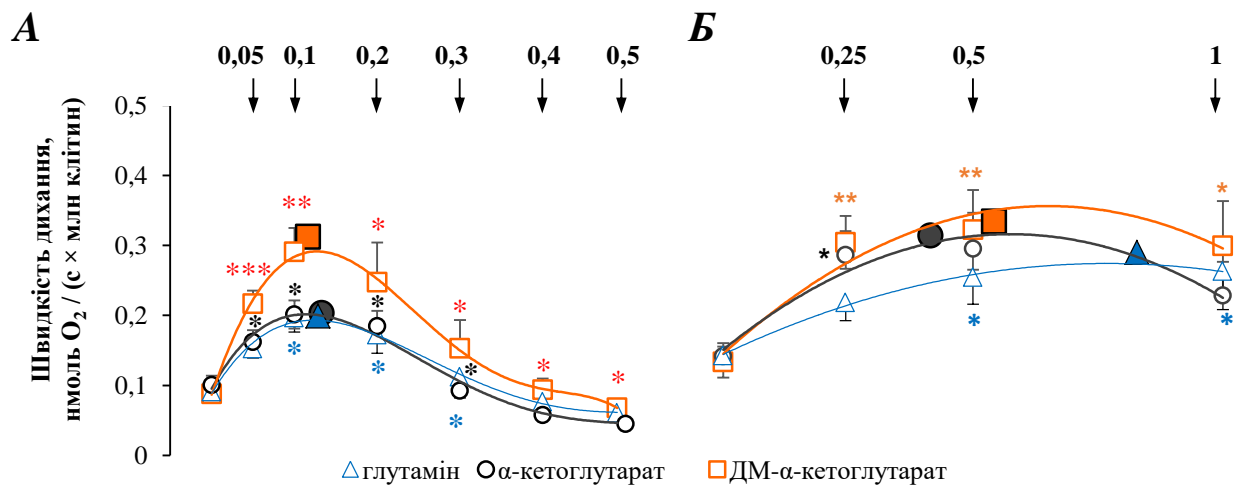


Рис. 3.6. Залежність дихання цілісних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), від концентрації FCCP за окиснення глутаміну, α -кетоглутарату та диметил- α -кетоглутарату: ■, ● та ▲ – значення максимальної швидкості роз’єданого дихання за оптимальної концентрації FCCP; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP; [глутамін], [α -кетоглутарат], [диметил- α -кетоглутарат] = 2 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення лише ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Проникність екзогенного α -кетоглутарату та сукцинату крізь плазматичну мембрану, незважаючи на наявність Na^+ -дикарбоксилатних котранспортерів (NaDC), дещо обмежена [87]. Рогнстад показав, що ліпофільні естери дво- та трикарбонових кислот краще проникають крізь плазматичну мембрану клітин [104], і оскільки тканина печінки характеризується значною естеразною активністю [17, 55, 86], ці естери розщеплюються у цитоплазмі гепатоцитів. Тому ми використали метильовані похідні α -кетоглутарату та сукцинату для оцінки процесів дихання за використання цих двох методів перфузії.

У порівнянні до окиснення α -кетоглутарату і сукцинату, використання метильованих похідних не змінює швидкості базального дихання гепатоцитів за обох способів перфузії печінки. Якщо перфузували печінку *in vitro*, то диметил- α -кетоглутарат та монометил-сукцинат спричинювали суттєве збільшення максимальної швидкості роз’єданого дихання, але не характер залежності швидкостей дихання від концентрації FCCP (див. рис. 3.6 і 3.7). Коли ж

використовували перфузію *in situ*, використання метильованих похідних зміщувало оптимальну концентрацію FCCP вправо, що дає підстави говорити про вищу стійкість окисних процесів.

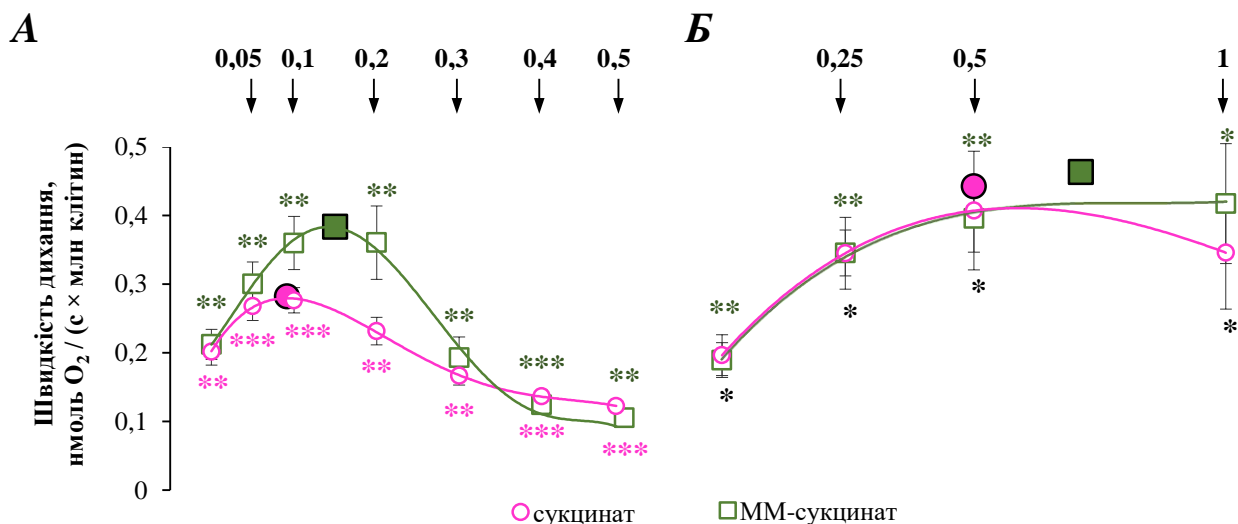


Рис. 3.7. Залежність дихання цілісних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (A) та *in situ* (B), від концентрації FCCP за окиснення сукцинату та монометил-сукцинату: ■ та ● – значення максимальної швидкості роз’єданого дихання за оптимальної концентрації FCCP; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP; [сукцинат], [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно швидкості дихання за окиснення лише ендогенних субстратів з $P < 0,05$, $n = 6$

Загалом, внаслідок додавання до середовища екзогенних субстратів швидкості дихання гепатоцитів збільшувалися. Але якщо максимальна швидкість роз’єданого дихання за перфузії печінки *in vitro* збільшувалася майже завжди (за винятком глюкози), то у випадку перфузії *in situ* – лише тоді, коли використовували α -кетоглутарат, сукцинат та монометил-сукцинату. Не менш важливим показником є, очевидно, оптимальна концентрація FCCP, яка суттєвіше змінювалася у випадку перфузії *in situ*.

Для визначення залежності адаптаційної здатності гепатоцитів від способу виділення клітин ми зобразили залежність максимальної швидкості роз’єданого дихання від оптимальної концентрації FCCP (рис. 3.8).

Спектр адапційної відповіді дихання мітохондрій суттєво залежить від способу перфузії. У випадку перфузії печінки *in vitro* спостерігається значно щільніше скупчення множини точок у лівій частині графіка (рис. 3.8), що ми розцінюємо як свідчення про суттєво вузький спектр адапційної відповіді мітохондрій. 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*.

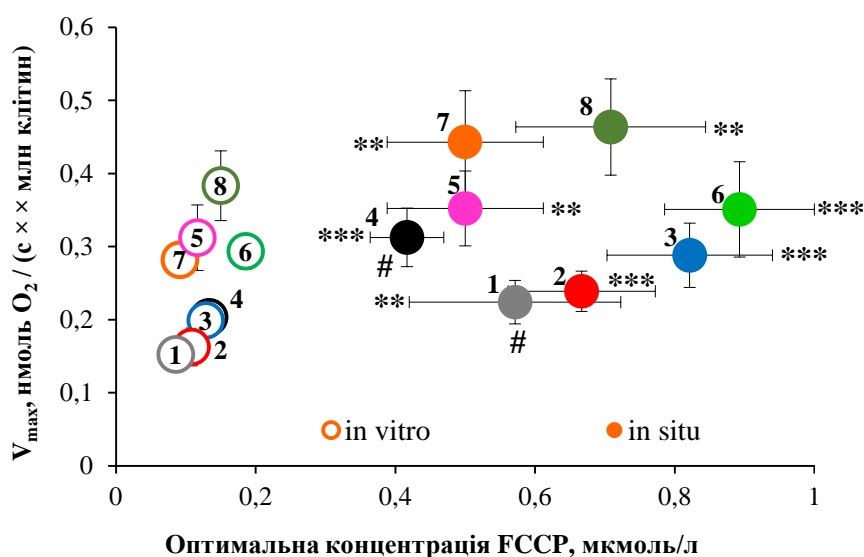


Рис. 3.8. Залежність максимальної швидкості роз'єданого дихання від оптимальної концентрації FCCP: 1 – ендогенні субстрати, 2 – глюкоза, 3 – глутамін, 4 – α -кетоглутарат, 5 – диметил- α -кетоглутарат, 6 – піруват, 7 – сукцинат, 8 – монометил-сукцинат; первинні дані представлені на рис. 1 і 2; * – статистично 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*, $n = 6$

Для встановлення ступеня впливу способу перфузії печінки та субстратів окиснення на максимальну швидкість роз'єданого дихання, був проведений дисперсійний аналіз. Встановлено, що на максимальну швидкість роз'єданого дихання 34 % впливу має спосіб перфузії печінки ($P = 5,8 \times 10^{-7}$), а 10 % впливу

мають субстрати окиснення ($P = 1,6 \times 10^{-4}$). Взаємодія між цими двома факторами відсутня.

Отже, функціональний стан ізольованих гепатоцитів, а відтак і результати експериментів проведені на цих клітинах залежать від використаних методів перфузії печінки під час ізолювання гепатоцитів. Під час перфузії печінки можуть виникнути негативні чинники – підвищення в'язкості крові, зменшення перфузійного тиску в судинах органа, гіпоксія, які на нашу думку і зумовлюють головний вплив на життєздатність гепатоцитів та їхню метаболічну активність [69]. 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 та здатність (чи нездатність) адекватно відповідати на екзогенні чинники під час експерименту.

Описані вище результати змін максимальної швидкості роз'єданого дихання та оптимальної концентрації FCCP, підтверджують, що використання перфузії печінки *in situ* дає змогу отримати кращі клітини для проведення експериментів. Окрім того, що під час використання перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання та оптимальні концентрації FCCP є вищими, найбільш показово різниця спостерігається між використанням сукцинату, α -кетоглутарату та їхніх метильованих естерів. Адже метилові естери сукцинату під час використання перфузії печінки *in situ* підтримують дихання гепатоцитів на тому ж рівні, що і сукцинат. Проте за перфузії печінки *in vitro* швидкість дихання гепатоцитів за використання монометил-сукцинату є вищими, ніж за окиснення сукцинату (рис. 3.6). Ймовірно, причиною цього може бути пошкодження NaDC або II комплексу дихального ланцюга. Подібний вплив методу перфузії печінки на швидкість дихання гепатоцитів спостерігається і за окиснення α -кетоглутарату.

Підсумок. Під час дослідження адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів потрібно враховувати методи ізолювання гепатоцитів; вона є вищою, коли використовувати перфузії печінки *in situ*. Незалежно від способу

виділення клітин, найвищою максимальна швидкість роз'єданого дихання є за використання монометил-сукцинату, а оптимальна концентрація FCCP – за окиснення пірувату. Для ізолювання стабільних, метаболічно активних гепатоцитів, які здатні підтримують дихальні процеси на високому рівні, необхідно використовувати перфузію печінки *in situ*.

1. 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.
2. Галан С., Мазур Г., Мерлавський В., Манько Б.О., Манько В.В. Адаптаційна здатність мітохондрій ізолюваних гепатоцитів залежить від способу виділення клітин. Молодь і поступ біології : збірник тез XV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 135 річниці від дня народження Я. Парнаса. Львів, 2019; 148–149.

3.3. Процеси дихання та окисного фосфорилування пермеабілізованих гепатоцитів за спричиненої Ca^{2+} активації мітохондріальної пори перехідної проникності

mPTP активується катіонами Ca^{2+} у високій концентрації у матриксі мітохондрій [98]. Це спричиняє деполяризацію внутрішньої мембрани мітохондрій, припинення синтезу АТФ, виснаження піридинових нуклеотидів та набухання матриксу, що у свою чергу викликає мобілізацію цитохрому *c*, розрив зовнішньої мітохондріальної мембрани і, в кінцевому підсумку, вивільнення проапоптичних білків і, як наслідок, загибель клітин [16, 93, 98]. 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.

3.3.1. Вплив циклоспорину А на дихання пермеабілізованих гепатоцитів на тлі олігоміцину за різних концентрацій Ca^{2+}

CsA здатний блокувати mPTP і запобігати порушенню функцій мітохондрій [33]. Ряд авторів висувують припущення, що субодиниці F_0F_1 АТФ-синтази беруть участь у формуванні mPTP [45], а олігоміцин (Omu) посилює захисний вплив CsA на тимчасову проникність мітохондрій [30]. Тому важливо перевірити вплив CsA на дихання ізольованих пермеабілізованих гепатоцитів на тлі олігоміцину за різних концентрацій Ca^{2+} .

У цій серії дослідів пермеабілізовані гепатоцити додавали у полярографічну комірку, де вже були Ca^{2+} (у концентраціях 0,1 і та 10 мкмоль/л) та 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), Omu (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 (рис. 3.9 А і 3.10 А).

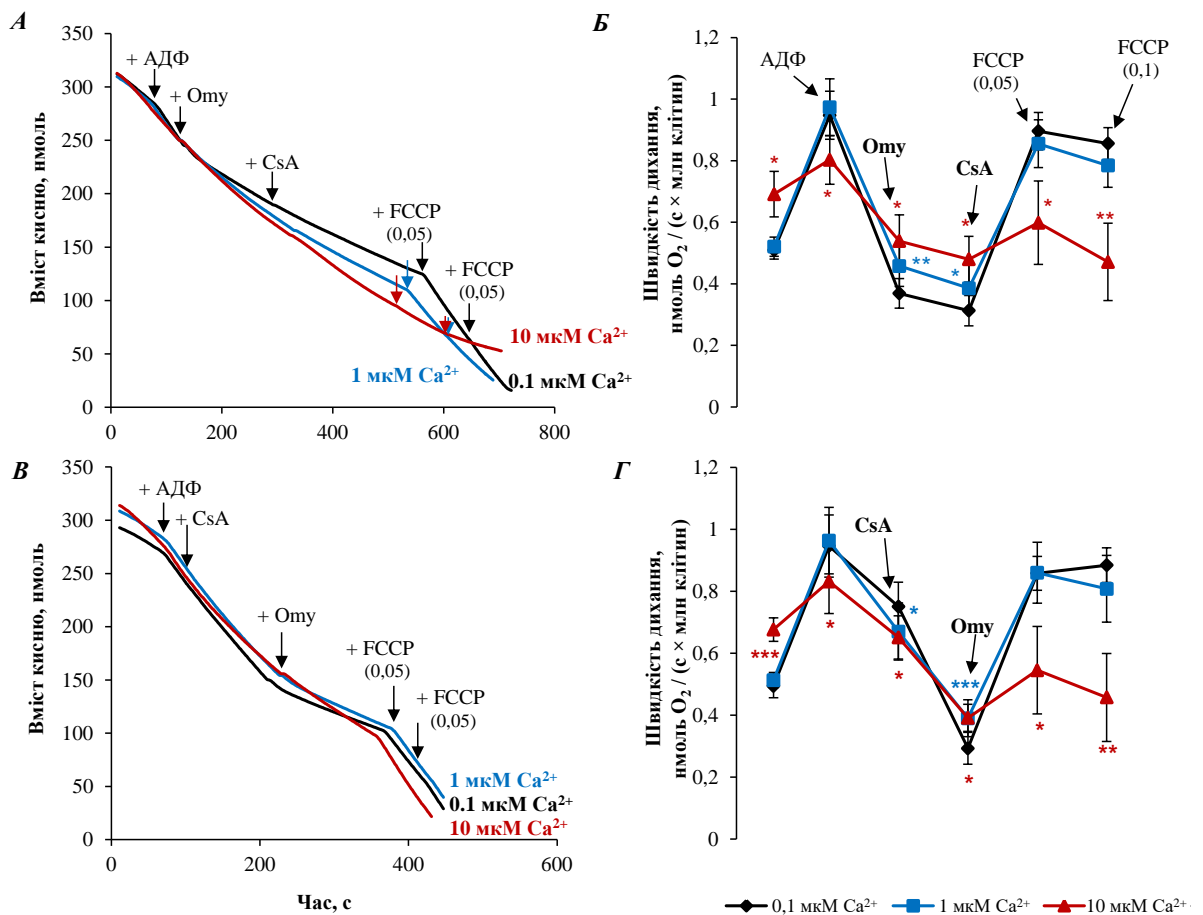


Рис. 3.9. Вплив CsA на швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату у середовищах з 0,1, 1 and 10 мкмоль/л Ca²⁺: *A* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *B* – швидкості дихання гепатоцитів за послідовного додавання у комірку Omy – CsA; *C* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *D* – швидкості дихання гепатоцитів за послідовного додавання у комірку CsA – Omy; [сукцинат] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [Omy] = 3 мкмоль/л, [FCCP] = 0,05 та 0,1 мкмоль/л; за допомогою астериска відзначена статистично вірогідна різниця лише порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca²⁺ з P < 0,05 (*), P < 0,01 (**) чи P < 0,001 (***); n = 7

Встановлено, що за окиснення сукцинату додавання у полярографічну комірку АДФ майже однаково стимулювало дихання пермеабілізованих гепатоцитів у середовищі з 0,1 (P = 0,0000002) чи 1 (P = 0,000006) мкмоль/л Ca²⁺, але практично не змінювало дихання, коли концентрація Ca²⁺ становила 10 мкмоль/л (P = 0,02) (рис. 3.9 *B*). Внесення у комірку Omy (на тлі АДФ)

знижувало швидкість дихання гепатоцитів у всіх випадках, хоча чим вища концентрація Ca^{2+} , тим менш вираженим був ефект ($P=0,0003$; $0,0005$, $0,008$). Коли вносили у полярографічну комірку CsA, швидкість дихання гепатоцитів знижувалась за $0,1$ ($P=0,001$) чи 1 ($P=0,01$) мкмоль/л Ca^{2+} , але не 10 мкмоль/л. FCCP у концентрації $0,05$ мкмоль/л стимулював дихання за цих же концентрацій Ca^{2+} – ($P=0,000009$), ($P=0,0004$). А підвищення концентрації FCCP до $0,1$ мкмоль/л спричинило відносне зниження швидкості дихання, коли концентрація Ca^{2+} становила 1 ($P=0,04$) або 10 ($P=0,002$) мкмоль/л.

Зареєстроване пригнічення ефектів АДФ та Оту 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+} FCCP-стимульоване (у концентрації $0,05$ мкмоль/л) дихання виявилось найменшим, а FCCP-спричинене пригнічення (у концентрації $0,1$ мкмоль/л) – найбільшим внаслідок, очевидно, деполяризації 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 Оту (рис. 3.9 В, Г), то за окиснення сукцинату суттєвих змін швидкості дихання після додавання FCCP у концентрації $0,05$ і $0,1$ мкмоль/л не зареєстровано.

За окиснення суміші малату, глутамату і пірувату (рис. 3.10 Б), як і в попередньому випадку, АДФ стимулював дихання, якщо концентрація Ca^{2+} становила $0,1$ ($P = 0,0000008$) чи 1 ($P = 0,003$) мкмоль/л, але не 10 мкмоль/л. Оту інгібував дихання гепатоцитів за окиснення суміші цих субстратів у середовищі з $0,1$ ($P = 0,0003$) та 1 ($P = 0,00006$) мкмоль/л Ca^{2+} , але не за 10 мкмоль/л Ca^{2+} . Додавання у комірку CsA (на тлі Оту) інгібувало дихання гепатоцитів у середовищі з 1 ($P = 0,01$) чи 10 ($P = 0,01$) мкмоль/л Ca^{2+} та не змінювало швидкості дихання за $0,1$ мкмоль/л Ca^{2+} . FCCP у концентрації $0,05$ мкмоль/л стимулював дихання лише за концентрації Ca^{2+} $0,1$ ($P = 0,01$)

мкмоль/л, а підвищення концентрації FCCP до 0,1 мкмоль/л не змінювало швидкості дихання за жодної концентрації Ca^{2+} .

Швидкість дихання гепатоцитів за дії FCCP у концентраціях 0,05 та 0,1 мкмоль/л не змінювалась, коли до середовища спочатку додавали CsA (на тлі АДФ), а потім Omy (рис. 3.10 В, Г).

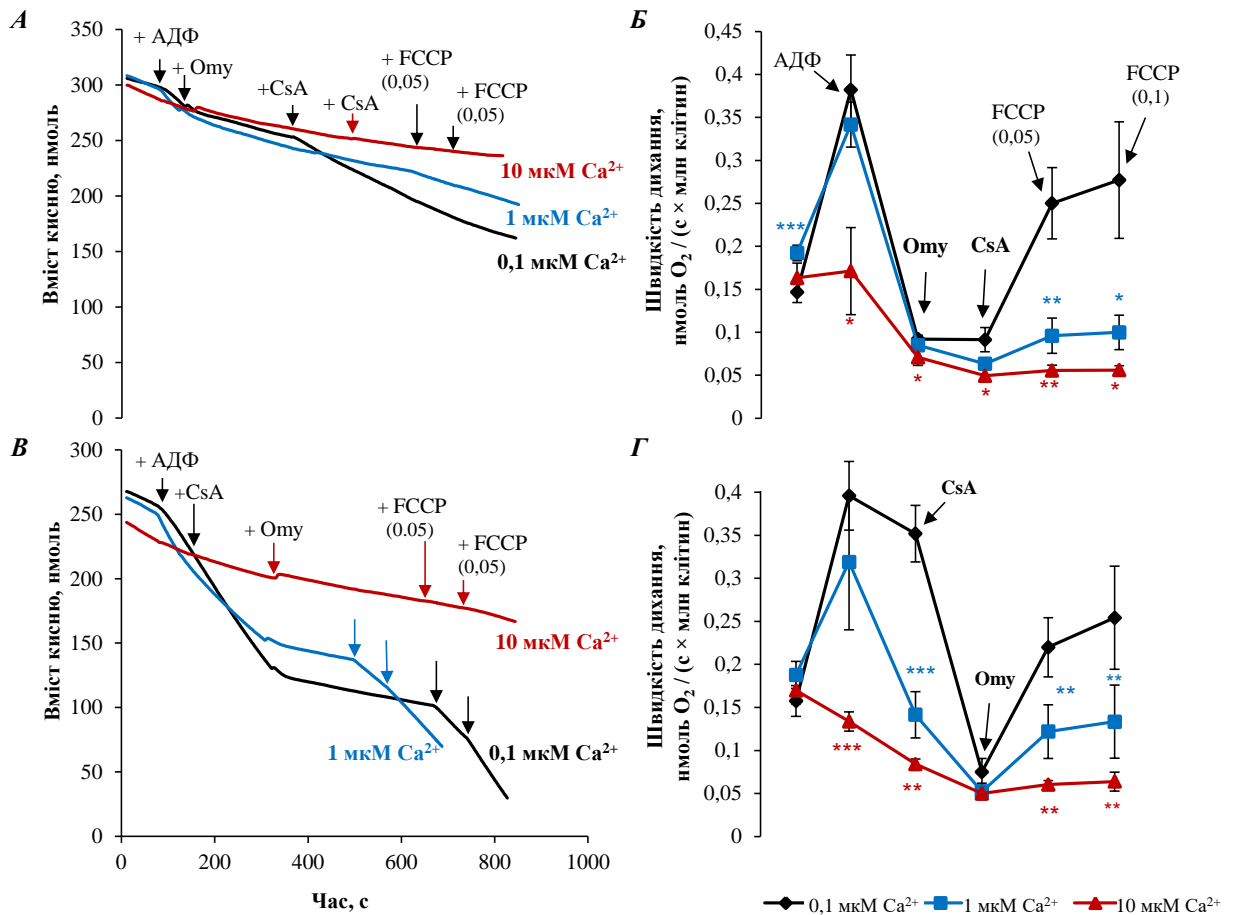


Рис. 3.10. Вплив CsA на швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату у середовищах з 0,1, 1 and 10 мкмоль/л Ca^{2+} : *A* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *B* – швидкості дихання гепатоцитів за послідовного додавання у комірку Omy – CsA; *C* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *D* – швидкості дихання гепатоцитів за послідовного додавання у комірку CsA – Omy; [малат], [глутамат], [піруват] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [Omy] = 3 мкмоль/л, [FCCP] = 0,05 та 0,1 мкмоль/л; за допомогою астериска відзначена статистично вірогідна різниця лише порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} з $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) чи $P < 0,001$ (***) ; $n = 7$

Отже, ефекти Ому суттєво не залежать від послідовності додавання у полярографічну комірку як за окиснення сукцинату, так і суміші малату, глутамату та пірувату. На відміну від ефектів CsA. Причому, 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.

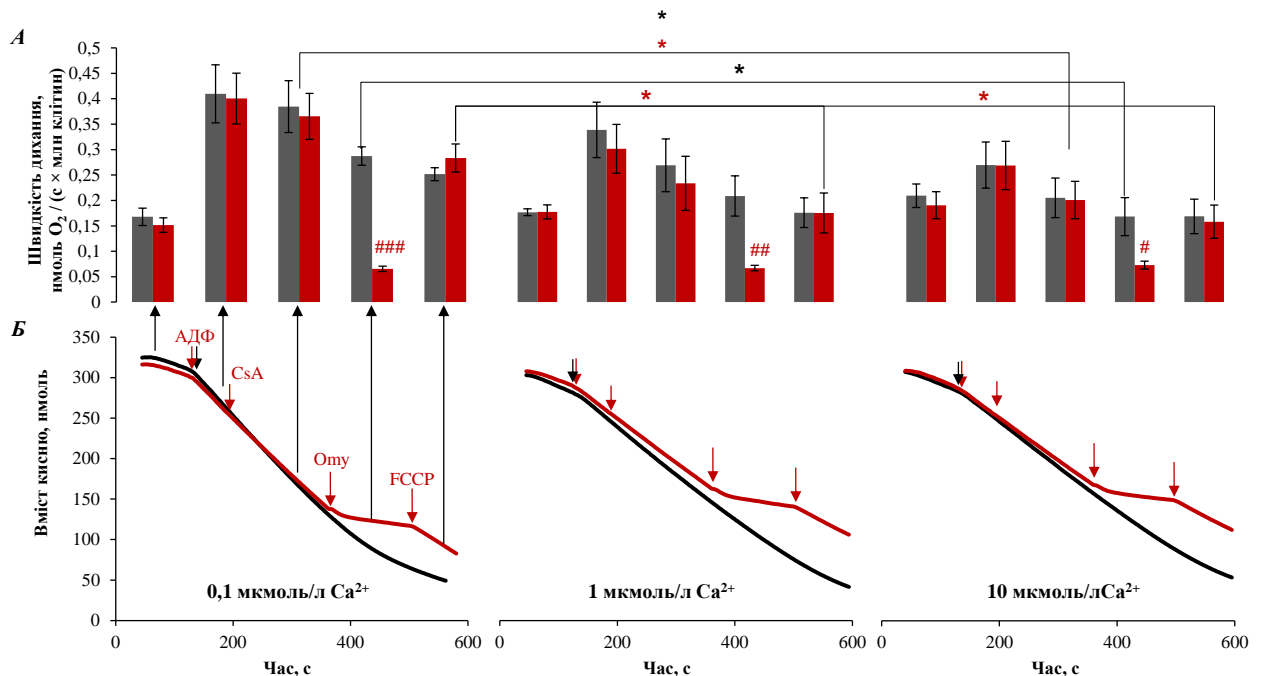


Рис. 3.11. Швидкість дихання гепатоцитів знижується не внаслідок дії CsA: А – швидкість дихання гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату; Б – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; [малат], [глутамат], [піруват] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [Ому] = 3 мкмоль/л, [FCCP] = 0,05 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} ; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без CsA); n = 6

У контролі цієї серії до середовища у полярографічній комірці, що вже містило субстрат окиснення, додавали пермеабілізовані гепатоцити і через 120 с АДФ, а далі реєстрували швидкість дихання протягом чотирьох часових інтервалів – 140–160 с, 325–355 с, 455–485 с та 500–540 с. У дослідній пробі почергово додавали АДФ, CsA, Ому та FCCP (0,05 мкмоль/л), реєструючи зміни напруження кисню у полярографічній комірці у ті самі проміжки часу, що і в контролі (рис. 3.11 Б).

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 внаслідок додавання CsA як за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату (рис. 3.11 А), так і сукцинату (дані на рисунку ненаведені). 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.

3.3.2. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за умови додавання циклоспорину А у полярографічну комірку перед збільшенням концентрації Ca^{2+}

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. Як і в попередніх серіях дослідів, підвищення концентрації Ca^{2+} у середовищі пригнічувало АДФ і FCCP-стимульоване дихання. Причому, цей ефект не залежав від субстрату окиснення (рис. 3.12 Б і 3.13 Б).

Внесення у комірку CsA перед катіонами Ca^{2+} нівелювало, назагал, негативний ефект їхній високих концентрацій, як за окиснення сукцинату (рис. 3.12 Г), так і за окиснення суміші субстратів (рис. 3.13 Г).

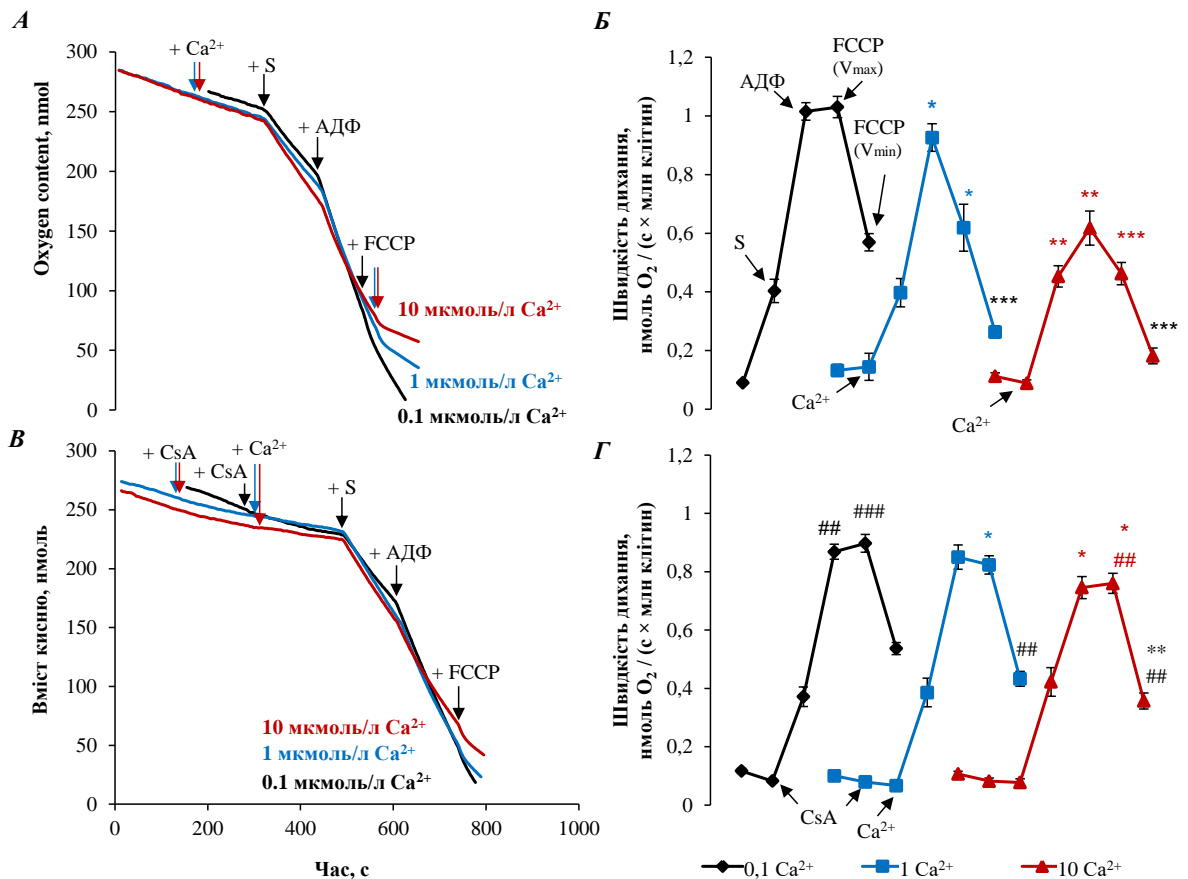


Рис. 3.12. Вплив CsA на швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату у середовищах з 0,1, 1 and 10 мкмоль/л Ca^{2+} : *A* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *B* – швидкості дихання гепатоцитів при відсутності CsA у середовищі; *C* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *D* – швидкості дихання гепатоцитів за наявності CsA у середовищі; [сукцинат] = 5 ммоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л, [FCCCP] = 0,25 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} ; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без CsA); n = 6

Але коли субстратом окиснення був сукцинат, внесення CsA запобігало Ca^{2+} -спричиненому зменшенню АДФ-стимульованого і FCCCP-стимульованого дихання. 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 FCCCP-стимульованого дихання і, навіть, пришвидшував його. Водночас CsA не впливає на негативний ефект Ca^{2+} у високих концентраціях на АДФ-стимульоване дихання за цих умов.

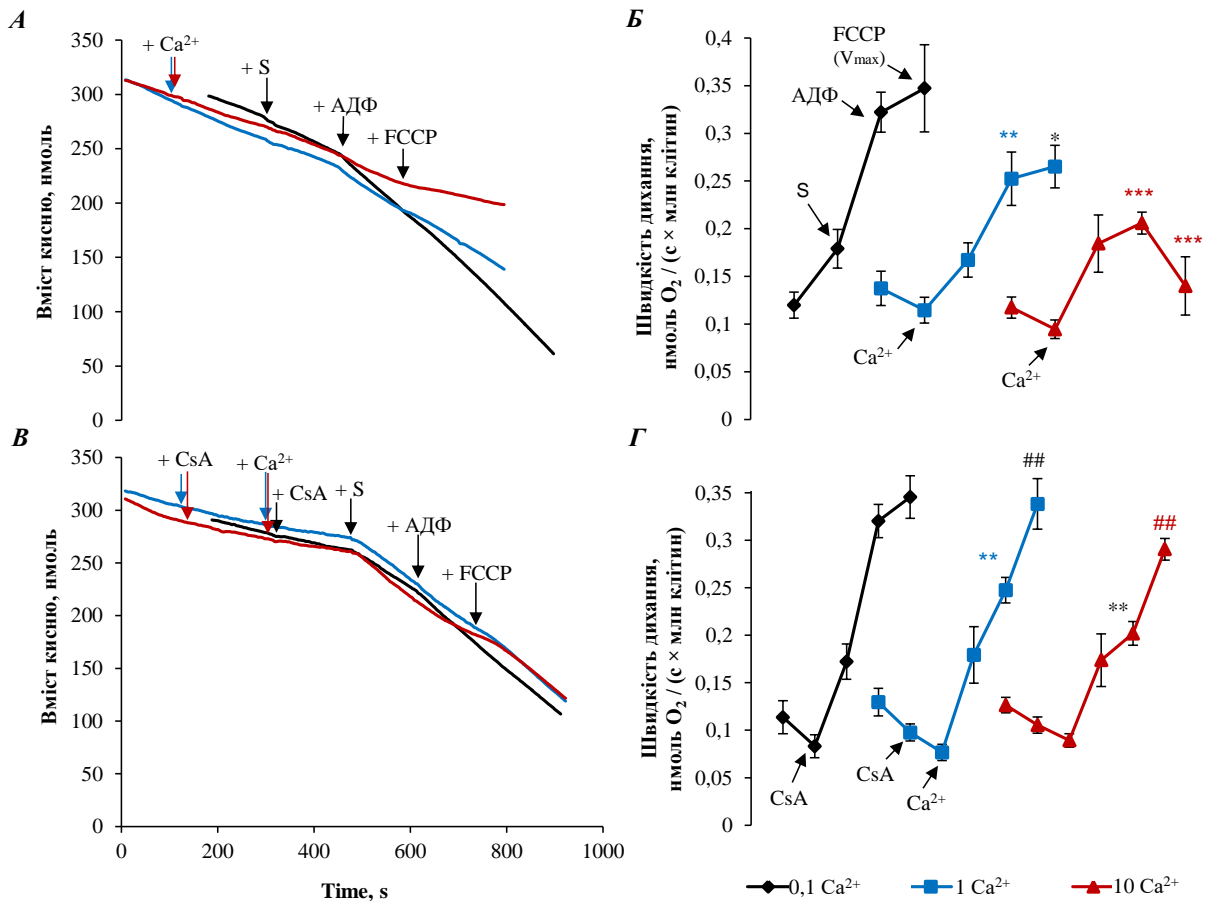


Рис. 3.13. Вплив CsA на швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату у середовищах з 0,1, 1 and 10 мкмоль/л Ca^{2+} : *A* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *B* – швидкості дихання гепатоцитів при відсутності CsA у середовищі; *C* – оригінальний запис споживання кисню суспензією гепатоцитів; *D* – швидкості дихання гепатоцитів за наявності CsA у середовищі; [малат], [глутамат], [піруват] = 5 ммоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л, [FCCP] = 0,25 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca^{2+} ; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без CsA); n = 7

Цікаво, що Ca^{2+} -індукована деполіаризація мембрани ізольованих мітохондрій печінки щурів, розвитку якої запобігає додавання CsA до середовища, відбувається швидше за окиснення НАД-залежних субстратів [24]. Цілком можливо, що власне з цим пов'язане зареєстроване нами пришвидшення FCCP-стимульованого дихання за окиснення суміші субстратів малату, глутамату і пірувату.

3.3.3. Дихальний контроль пермеабілізованих гепатоцитів у середовищах з різною концентрацією Ca^{2+}

Висновок про вплив CsA на швидкості АДФ-стимульованого та FCCP-стимульованого дихання підтверджується розрахованими дихальними контролями за окиснення сукцинату чи суміші субстратів. Як дихальний контроль ми використовували відношення швидкості АДФ-стимульованого дихання (ADP/S) чи FCCP-стимульованого дихання (FCCP/S) до швидкості дихання після внесення субстрату окиснення. У першому випадку дихальний контроль визначається активністю АТФ-синтази та процесами окисного фосфорилування, а у другому – тільки роботою дихального ланцюга мітохондрій.

Встановлено, що дихальні контролі суттєво зменшувалися внаслідок підвищення концентрації Ca^{2+} у середовищі як за наявності сукцинату, так і суміші малату, глутамату і пірувату. За окиснення сукцинату і високих концентрацій Ca^{2+} зменшення ADP/S і FCCP/S частково нівелювалося CsA (рис. 3.14 А). Коли окиснювалася суміш малату, глутамату та пірувату, CsA запобігав зменшенню лише FCCP/S (рис. 3.14 Б).

Відомо, що підвищення концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі гепатоцитів супроводжується швидким транспортуванням цих катіонів у мітохондріальний матрикс, що забезпечується наявними у внутрішній мембрані мітохондрій системами «швидкого входу Ca^{2+} » [115], Ca^{2+} -уніпортера [3] та мітохондріальних ріанодинових рецепторів [72].

Надходження Ca^{2+} у мітохондрії має важливе фізіологічне значення, оскільки він активує три ферменти циклу трикарбонових кислот (піруватдегідрогеназу, α -кетоглутаратдегідрогеназу та ізоцитратдегідрогеназу) [83] і, відтак, регулює процеси дихання та окисного фосфорилування [61]. Оскільки транспортування Ca^{2+} здійснюється за рахунок енергії потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій, тому він може стимулювати процеси окисного фосфорилування лише за мікромольних концентрацій (0,1–0,8

мкмоль/л) у позамітохондріальному середовищі, коли це транспортування не спричиняє суттєвого зменшення мембранного потенціалу мітохондрій [88].

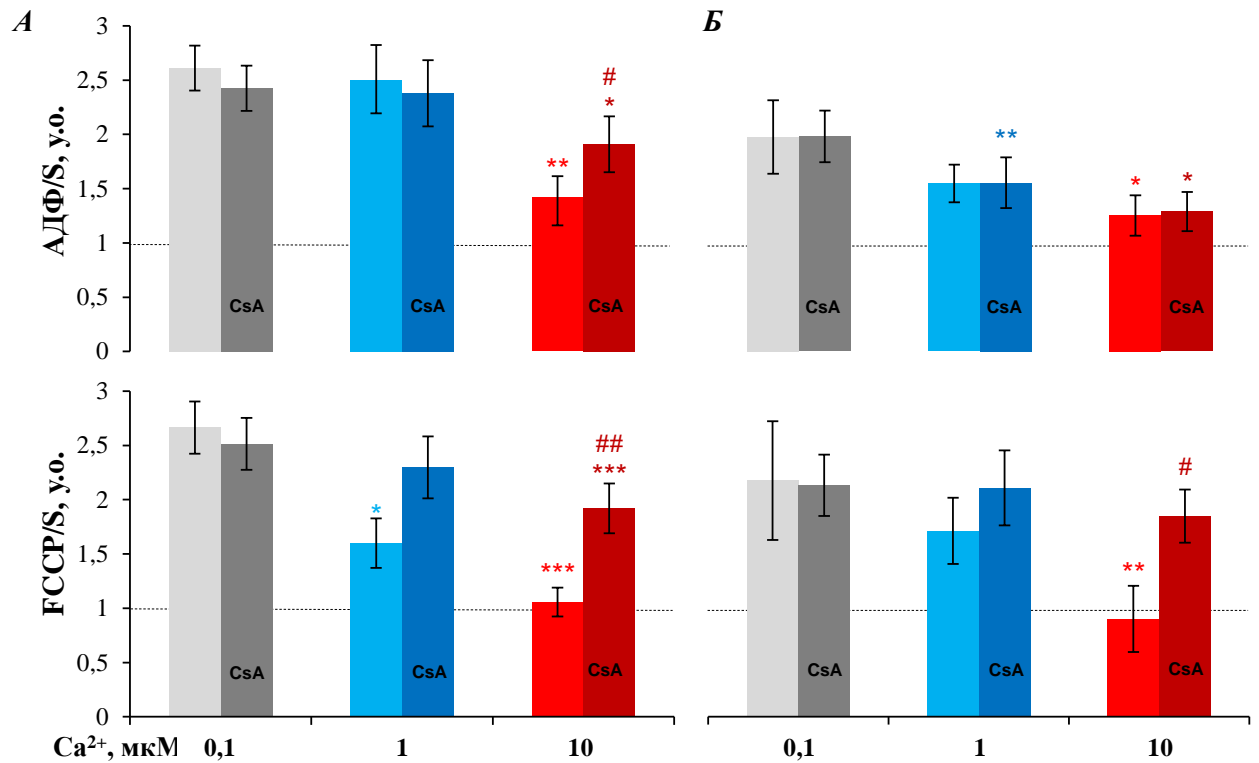


Рис. 3.14. Дихальний контроль пермеабілізованих гепатоцитів у середовищах з 0,1, 1 and 10 мкмоль/л Ca²⁺: *A* – дихальний контроль за окиснення сукцинату за відсутності чи наявності CsA у середовищі; *B* – дихальний контроль за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату за відсутності чи наявності CsA у середовищі; [сукцинат], [малат], [глутамат], [піруват] = 5 ммоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л, [FCCP] = 0,25 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця порівняно з 0,1 мкмоль/л Ca²⁺; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без CsA); n = 7

Аномально високі концентрації Ca²⁺ (внаслідок кількаразової добавки до концентрації 10–20 мкмоль/л) після попередньої інтенсифікації пригнічують мітохондріальне дихання та зменшують мембранний потенціал мітохондрій за окиснення сукцинату або суміші малату і глутамату [24]. Такі зміни дихання та мембранного потенціалу мітохондрій, як доводять автори, зумовлені активацією mPTP. Ми зареєстрували зменшення АДФ-стимульованого стимульованого дихання під впливом Ca²⁺ у концентрації 10 мкмоль/л. Але

зменшується не тільки відношення ADP/S, а й FCCP/S, що дає нам змогу говорити не лише про пригнічення окисного фосфорилування, а й про зниження мембранного потенціалу мітохондрій. Причому, ці зміни спричинені не стільки із використанням енергії мембранного потенціалу мітохондрій на транспортування Ca^{2+} (як це передбачав Ніколлс [88]), а з активацією CsA-чутливої mPTP катіонами Ca^{2+} .

Ця пора наявна у внутрішній мембрані мітохондрій та забезпечує вихід Ca^{2+} з матриксу. Тривале відкриття mPTP призводить до дифузії H^+ у матрикс мітохондрій, деполяризації їхньої внутрішньої мембрани мітохондрій, вивільнення Ca^{2+} , набряку мітохондрій та некрозу клітин [51, 93]. Додавання CsA до чи після наявності Ca^{2+} у середовищі блокує відкриття mPTP, здійснюючи протекторний ефект на Ca^{2+} -індуковане набрякання мітохондрій [30]. Згідно наших результатів CsA усував ефекти високих концентрацій Ca^{2+} лише за умови, коли його додавали перед Ca^{2+} .

Виявилось, що АДФ-стимульоване дихання зменшилося під впливом Ca^{2+} у концентрації 10 мкмоль/л і за окиснення сукцинату, і за окиснення суміші малату, глутамату та пірувату. Також із збільшенням концентрації Ca^{2+} зменшується FCCP-стимульоване дихання. Додавання до середовища CsA запобігає зменшенню FCCP/S в обох випадках внаслідок, очевидно, збереження мембранного потенціалу мітохондрій.

Ca^{2+} -спричинене зменшення ADP/S частково нівелюється внаслідок інгібування mPTP лише за окиснення сукцинату, а не суміші малату, глутамату і пірувату. Відомо, що за окиснення сукцинату є вищою Ca^{2+} -ємність мітохондрій печінки [70], пізніше, за більшої кількості добавок Ca^{2+} розвивається індуковане ними зменшення мембранного потенціалу мітохондрій [24]. Крім того, під час активації mPTP із матриксу мітохондрій можуть дифундувати у цитоплазму молекули НАД, тому швидкість окиснення малату, глутамату і пірувату може зменшуватися драматичніше, ніж окиснення сукцинату. Але якщо активація mPTP й спричиняє суттєве зменшення

швидкості окиснення НАД-залежних субстратів, то це не може бути причиною відсутності ефекту CsA на ADP/S. Вклад швидкості реакцій циклу Кребса в обидва показники – ADP/S, і FCCP/S – є, очевидно, однаковий.

Ймовірною причиною того, що CsA усував ефекти високих концентрацій Ca^{2+} на FCCP/S, але не запобігав зменшенню ADP/S, є порушення транспорту фосфатів чи АДФ/АТФ. Згідно гіпотези Джорджію [45] у формуванні mPTP беруть участь субодиниці АТФ-синтази, але тоді CsA не здійснював би протекторний вплив на ADP/S за окиснення не лише суміші малату, глутамату і пірувату, а й сукцинату.

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

1. 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.
2. 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.
3. 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.

3.4. Вплив етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату

Основна частина алкоголю, що потрапляє в організм, метаболізується в печінці трьома основними шляхами: ферментом алкогольдегідрогеназою, через мікосомальну P450-етанолоксидантну і каталазну системи. У цитоплазмі гепатоцитів за участю фермента алкогольдегідрогенази етанол окиснюється до ацетальдегіду, який далі у мітохондріях за участю альдегіддегідрогенази окиснюється до ацетил-КоА, який вступає у цикл Кребса, в результаті якого перетворюється на CO₂ і виділяється енергія. У випадку, коли швидкість окиснення етанолу є меншою за швидкість його надходження, накопичення етанолу призводить до ураження клітин печінки, а згодом – до розвитку алкогольної хвороби печінки. Оскільки мітохондріальне дихання, яке є важливим у формуванні адаптаційної здатності мітохондрій, відіграє важливу роль в метаболізмі алкоголю (шляхом регенерації НАД⁺, які регулюють рівень ферментів алкогольдегідрогенази та альдегіддегідрогенази і є необхідними для етанол-ацетальдегід метаболізму) [52, 138], тому ми вирішили використати розроблені нами критерії для оцінки впливу етанолу *in vitro* на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів.

3.4.1. Дослідження впливу етанолу *in vitro* на дихання ізольованих гепатоцитів

За рахунок того, що молекула етанолу розчинна у водному та ліпідному середовищі, вона добре проникає у цитоплазму клітин, де і починається перший етап її катаболізму – окиснення до ацетальдегіду [112]. Для дослідження впливу етанолу на адаптаційну здатність мітохондрій ми використали такі критерії, як максимальна швидкість FCCP-роз'єданого дихання та оптимальна концентрація FCCP.

У цій серії дослідів ізольовані гепатоцити інкубували протягом 60 хв з етанолом (50 ммоль/л) у середовищі з глюкозою (10 ммоль/л) та з субстратами

окиснення (піруват або монометил-сукцинат, по 2 ммоль/л) чи без них. Для оцінювання швидкості дихання гепатоцити після преінкубації вносили у полярографічну комірку та додавали FCCP у концентраціях 0,25, 0,5 і 1 мкмоль/л.

Встановлено, що додавання у полярографічну комірку 0,25 мкмоль/л FCCP, у контролі, майже однаково стимулювало дихання гепатоцитів за окиснення глюкози ($P = 0,02$), пірувату ($P = 0,02$) чи монометил-сукцинату ($P = 0,03$) (рис. 3.15).

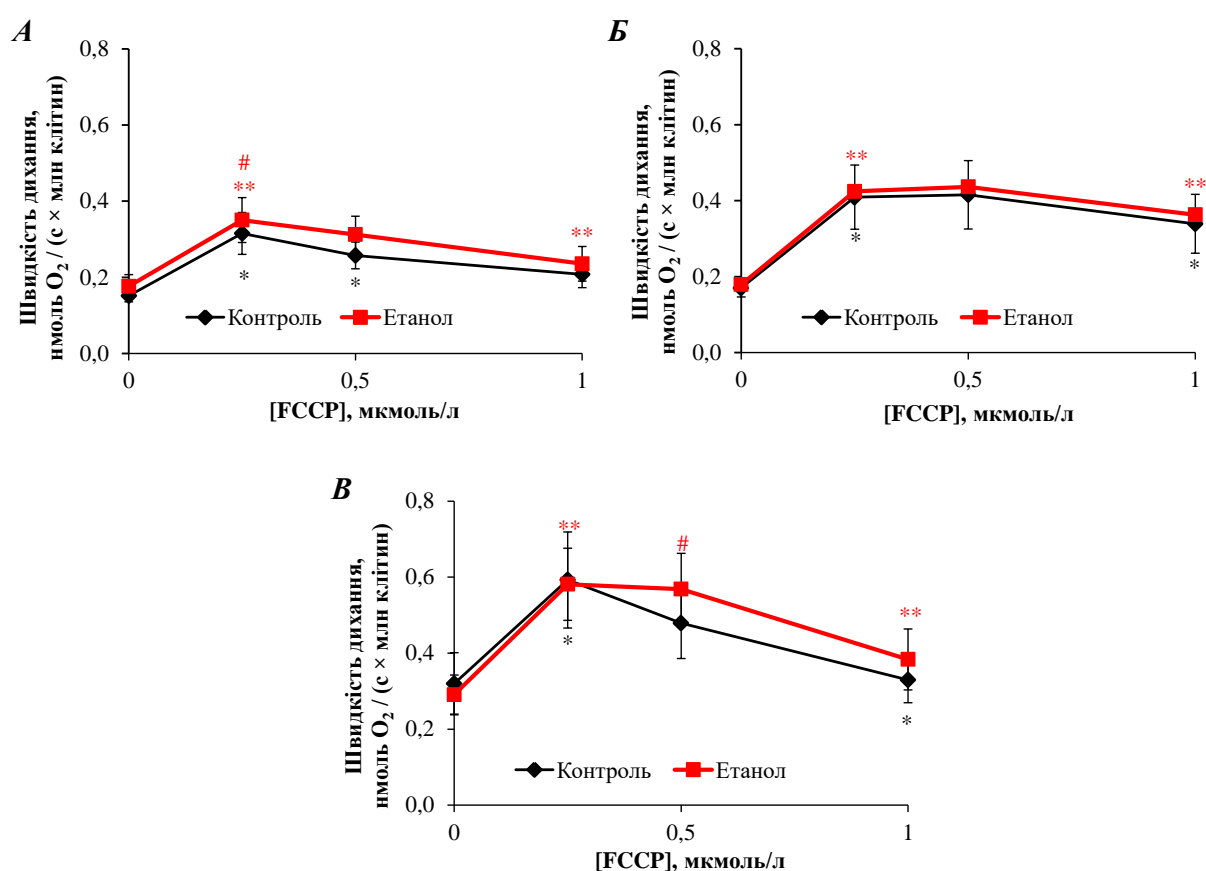


Рис. 3.15. Вплив етанолу *in vitro* на швидкість дихання гепатоцитів за окиснення глюкози (А), пірувату (Б) та монометил-сукцинату (В): [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [монометил-сукцинат] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім станом дихання; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без етанолу); n = 5

За окиснення глюкози статистично достовірне зниження швидкості дихання гепатоцитів, у порівнянні до попереднього стану дихання, спостерігалось вже за концентрації FCCP 0,5 мкмоль/л ($P = 0,04$) (рис. 3.15 А), тоді коли за окиснення пірувату та сукцинату спостерігалась лише тенденція до зниження швидкості дихання гепатоцитів (рис. 3.15 Б, В). На противагу цим даним, вища концентрація FCCP – 1 мкмоль/л, у порівнянні до попереднього стану дихання, призводила до зниження дихання гепатоцитів за окиснення пірувату ($P = 0,01$) та монометил-сукцинату ($P = 0,01$), але не глюкози (рис. 3.15).

За наявності у середовищі етанолу, зміни швидкості споживання кисню гепатоцитами, у порівнянні до попереднього стану дихання, за виключенням окиснення глюкози, були подібними до тих, що ми спостерігали у контролі. За окиснення глюкози, внаслідок інкубування гепатоцитів протягом 60 хв з етанолом, зниження швидкості дихання, у порівнянні до попередньої добавки протонофора, спостерігалось за концентрації FCCP 1 мкмоль/л ($P = 0,002$) (рис. 3.15 А), а не 0,5 мкмоль/л, як у контролі. Таке підвищення окисного потенціалу глюкози відбулося, ймовірно, внаслідок генерації НАДН, які утворюються в процесі катаболізму етанолу та здатні окиснюватися в циклі трикарбонових кислот, тим самим здійснюючи противагу впливу FCCP.

У порівнянні до контролю, етанол не впливав на базальне дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, монометил-сукцинату чи пірувату на тлі глюкози, отже, можна припустити, що мітохондріальне окиснення етанолу гепатоцитами за таких умов є несуттєвим. Але інкубація гепатоцитів протягом 60 хв з етанолом зумовлювала підвищення FCCP-стимульованого дихання гепатоцитів 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 (рис. 3.15 А, В), що свідчить про залучення етанолу як субстрату окиснення за таких умов. Етанол жодним чином не впливав на дихання гепатоцитів за наявності пірувату (рис. 3.15 Б).

Щодо впливу самих субстратів окиснення, то наявність у середовищі пірувату та монометил-сукцинату не впливала на базальне дихання гепатоцитів у контролі. Однак, у середовищі з етанолом зростання базального дихання спостерігалось лише за окиснення монометил-сукцинату. Самі по собі піруват та монометил-сукцинат підвищували FCCP-роз'єднане дихання, як у контролі, так і за наявності у середовищі етанолу (рис. 3.15).

Максимальна швидкість FCCP-роз'єданого дихання за впливу етанолу змінювалась лише за окиснення глюкози – етанол на 12 % підвищував максимальне FCCP-стимульоване дихання (рис. 3.16 А).

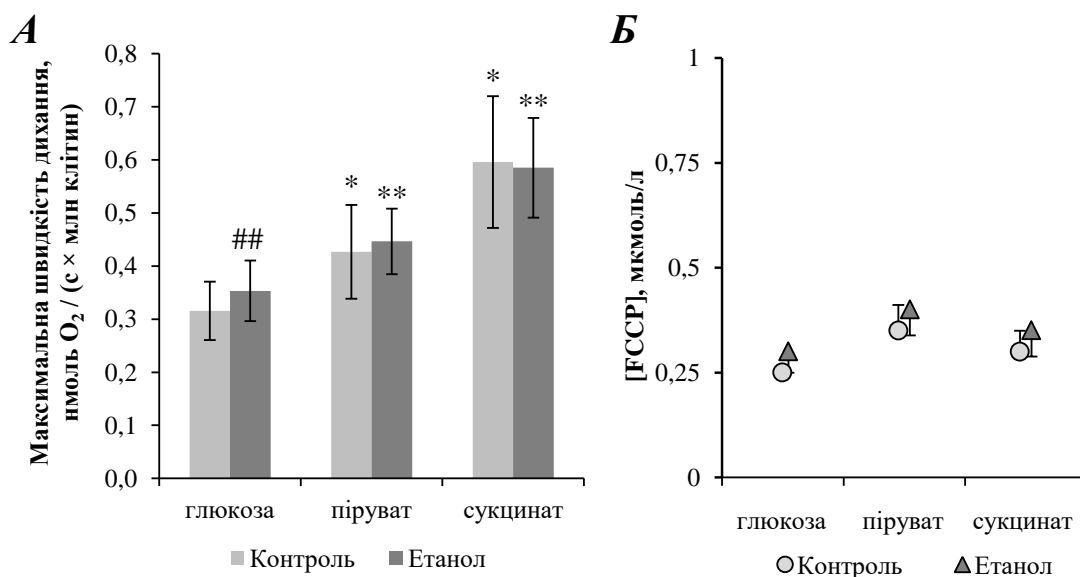


Рис. 3.16. Вплив етанолу *in vitro* на максимальну швидкість роз'єданого дихання (А) та оптимальну концентрацію FCCP (Б): за окиснення [глюкози] = 10 ммоль/л, [пірувату] та [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з глюкозою; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без етанолу); P < 0,05; n = 5

Етанол жодним чином не впливав на максимальне роз'єдане дихання за наявності пірувату й монометил-сукцинату, які самі по собі значно підвищували це дихання (рис. 3.16 А). Відсутність впливу етанолу на оптимальну концентрацію FCCP ми спостерігали за окиснення кожного з досліджуваних субстратів (рис. 3.16 Б).

Отже, у більшості випадків кисень, який поглинається гепатоцитами використовується для окиснення НАДН, отриманого внаслідок окиснення етанолу. Споживання алкоголю призводить до адаптивного збільшення метаболізму етанолу – гіперметаболічний стан, який характеризується швидким збільшенням метаболізму алкоголю, зростанням мітохондріального дихання та розпрямленням окисного фосфорилування, але цей стан настає лише через 2–3 години після введення етанолу [123] – що є ймовірною причиною відсутності впливу алкоголю *in vitro* на дихання гепатоцитів.

3.4.2. Дихання ізольованих гепатоцитів за впливу етанолу та циклоспорину А *in vitro*

Відомо, що гостре споживання алкоголю зумовлює вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо гепатоцитів [131]. Очікується, що внаслідок збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} , він буде накопичуватися мітохондріями, що потенційно може призвести до перевантаження мітохондрій Ca^{2+} та подальшого їх пошкодження внаслідок відкриття mPTP. Оскільки CsA є інгібітором mPTP, тому ми вирішили перевірити чи зміниться вплив етанолу на дихання гепатоцитів за наявності у середовищі CsA.

У цій серії дослідів ізольовані гепатоцити інкубували протягом 60 хв з CsA (0,5 мкмоль/л) та з етанолом (50 мМ), чи без нього, у глюкозовмісному середовищі (10 ммоль/л), що містило, або не містило, субстрати окиснення (піруват або монометил-сукцинат, по 2 ммоль/л). Далі, як і в попередньому дослідженні, гепатоцити уносили у полярографічну комірку та додавали FCCP у концентраціях 0,25, 0,5 і 1 мкмоль/л.

Встановлено, що за наявності у середовищі CsA базальне дихання гепатоцитів становило $0,17 \pm 0,07$ нмоль O_2 / (с × млн клітин), а додавання у полярографічну комірку 0,25 мкмоль/л FCCP стимулювало дихання гепатоцитів за окиснення глюкози ($P = 0,0009$), пірувату ($P = 0,01$) чи монометил-сукцинату ($P = 0,003$), у порівнянні до попереднього стану дихання (рис. 3.17). FCCP у

концентрації 0,5 мкмоль/л не впливав на швидкість дихання гепатоцитів за окиснення кожного із субстратів. Проте збільшення концентрації FCCP до 1 мкмоль/л зумовлювало зниження дихання гепатоцитів за окиснення глюкози ($P = 0,03$) та пірувату ($P = 0,004$) (рис. 3.17), але не сукцинату, у порівнянні до попереднього стану дихання.

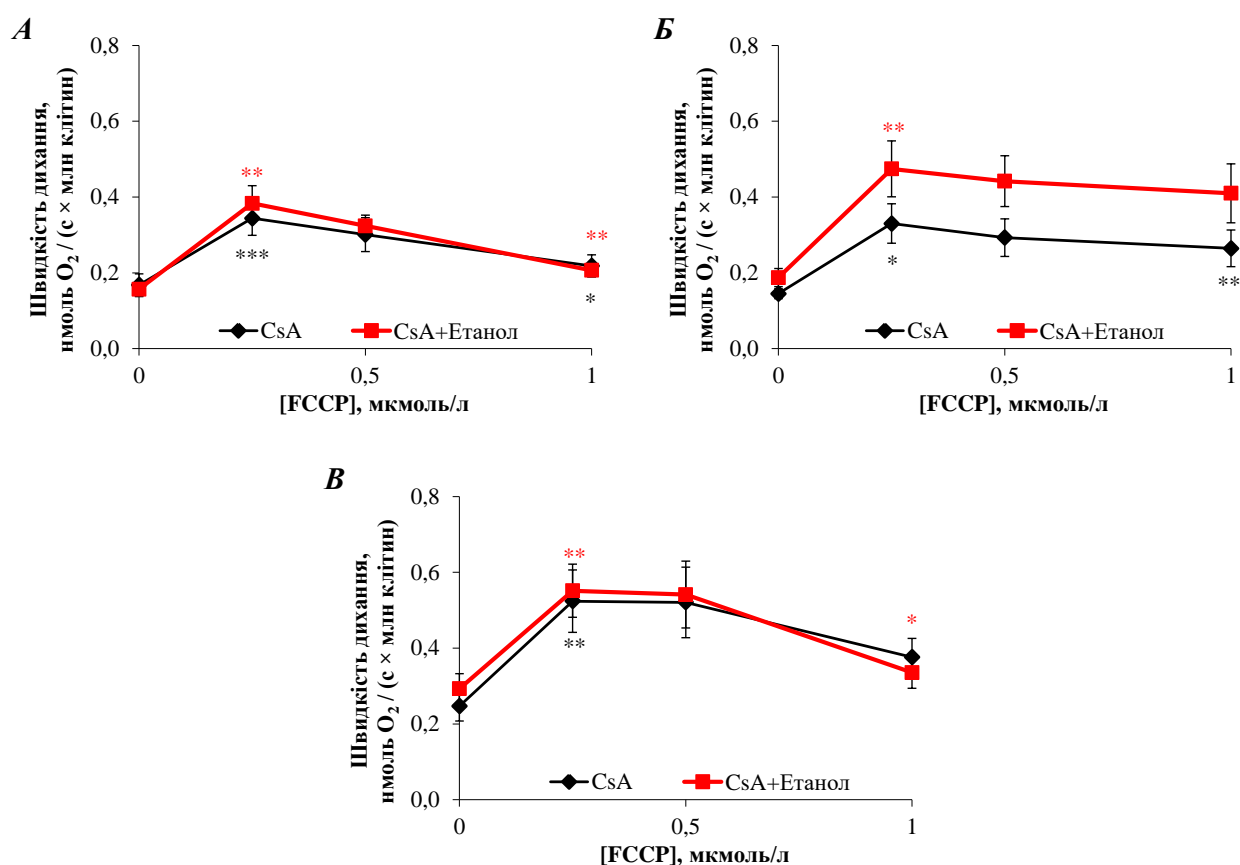


Рис. 3.17. Вплив CsA та етанолу *in vitro* на швидкість дихання гепатоцитів за окиснення глюкози (А), пірувату (Б) та монометил-сукцинату (В): [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [монометил-сукцинат] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім станом дихання; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (CsA без етанолу); n = 5

Коли у середовищі інкубації були присутні CsA та етанол, то FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л збільшував дихання гепатоцитів за окиснення глюкози ($P = 0,001$) чи сукцинату ($P = 0,003$), у порівнянні до попереднього стану дихання, а у концентрації 1 мкмоль/л – зменшував його ($P = 0,003$) чи ($P = 0,02$), (рис. 3.17 А, В). За окиснення пірувату у цих умовах FCCP стимулював

швидкість дихання у концентрації 0,25 мкмоль/л ($P = 0,005$), а у вищих концентраціях не впливав на дихання гепатоцитів (рис. 3.17 Б).

Сам CsA не впливав на базальне та FCCP-стимульоване дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи сукцинату, порівняно до контролю (без CsA). Наявність у середовищі інкубації CsA з етанолом, у порівнянні до контролю (CsA без етанолу) не змінювали базальне та FCCP-роз'єднане дихання гепатоцитів (рис. 3.17).

Щодо впливу самих субстратів окиснення, то у контролі (CsA) наявність у середовищі пірувату не впливало на базальне та FCCP-роз'єднане дихання гепатоцитів. У середовищі CsA з етанолом за окиснення пірувату дихання гепатоцитів зростало лише за концентрації FCCP 1 мкмоль/л ($P = 0,04$). Наявність у середовищі монометил-сукцинату статистично достовірно підвищувало базальне та FCCP-роз'єднане дихання, як у контролі, так і за наявності у середовищі CsA та етанолу (рис. 3.17).

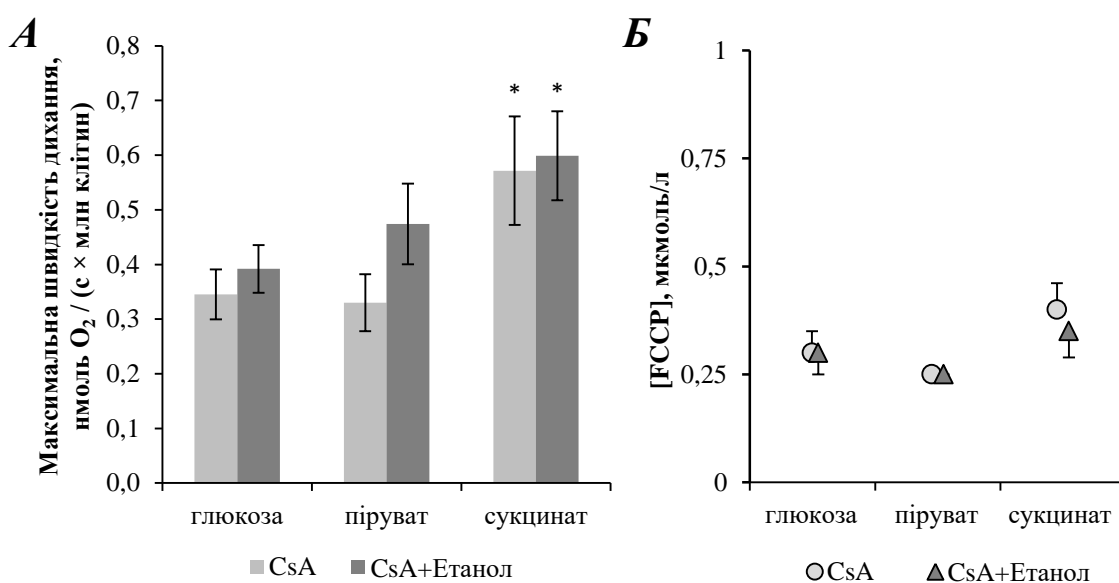


Рис. 3.18. Вплив CsA та етанолу *in vitro* на максимальну швидкість роз'єданого дихання (А) та оптимальну концентрацію FCCP (Б): за окиснення $[\text{глюкози}] = 10 \text{ мМоль/л}$, $[\text{пірувату}]$ та $[\text{монометил-сукцинату}] = 2 \text{ мМоль/л}$, * – статистично вірогідна різниця порівняно з глюкозою; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (CsA без етанолу); $P < 0,05$; $n = 5$

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. 3.18 А). Ми спостерігали лише вплив субстрату окиснення – сукцинат у середовищах, що містили CsA ($P = 0,01$) та CsA з етанолом ($P = 0,02$) значно підвищував максимальне роз'єдане дихання у порівнянні до того, що спостерігалось за окиснення глюкози (рис. 3.18 А). Оптимальна концентрація FCCP не змінювалась за жодних із досліджуваних умов (рис. 3.18 Б).

Провівши аналіз ANOVA для чотирьох піддослідних груп, ми не отримали підтвердження впливу етанолу чи CsA на максимальну швидкість роз'єданого дихання. Дисперсійний аналіз ANOVA показав значний вплив субстрату окиснення на швидкість дихання гепатоцитів з $P = 0,01$ (рис. 3.19).

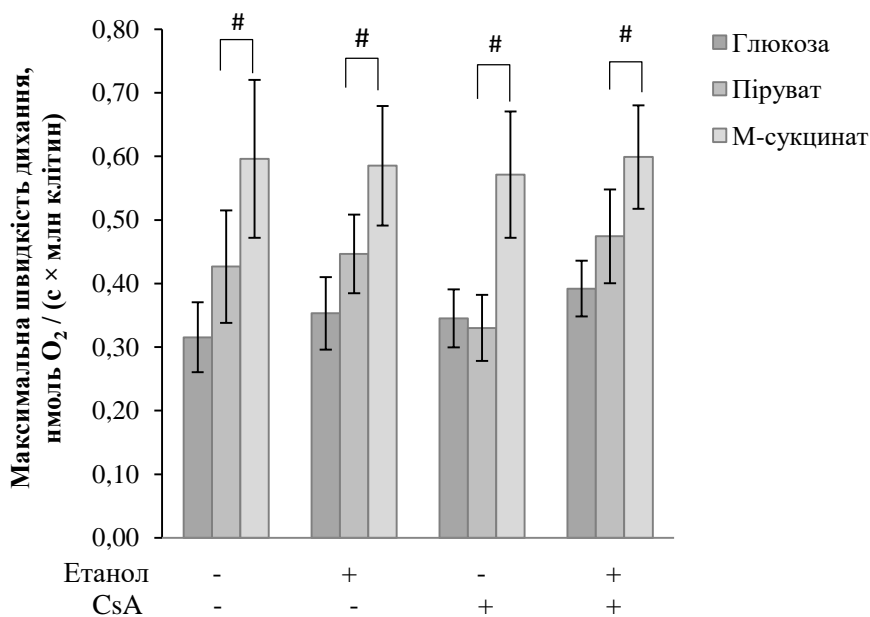


Рис. 3.19. Вплив CsA та етанолу *in vitro* на максимальну швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів: за окиснення [глюкози] = 10 ммоль/л, [пірувату] та [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л; # – статистично вірогідна різниця за ANOVA; $P < 0,05$; $n = 5$

Після додавання FCCP можна спостерігати три фази дихання: збільшення швидкості дихання (фаза прискорення), пік швидкості дихання (фаза максимального дихання) та зменшення дихання (фаза сповільнення) [79].

Оскільки вплив етанолу на максимальне роз'єднане дихання гепатоцитів був незначним, тому ми досліджували вплив алкоголю на сповільнення швидкості дихання внаслідок додавання FCCP у концентрації 1 мкмоль/л.

За окиснення глюкози у контрольній групі сповільнення швидкості дихання становило $3,40 \pm 2,42$ нмоль O_2 / (хв \times млн клітин). Піруват не впливав на сповільнення швидкості дихання, а монометил-сукцинат зумовлював зміну цього показника до $5,31 \pm 3,36$ нмоль O_2 / (хв \times млн клітин) ($P = 0,03$) (рис. 3.20).

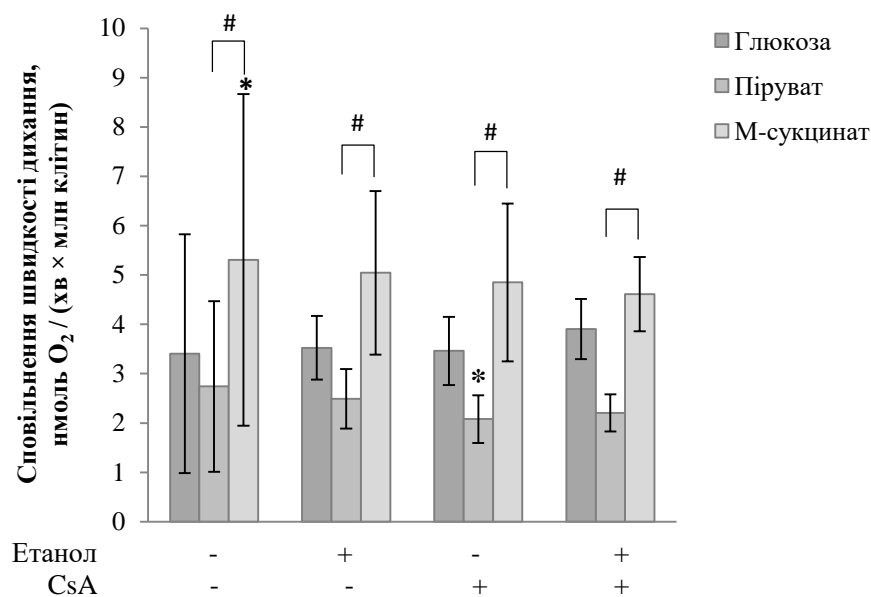


Рис. 3.20. Вплив CsA та етанолу *in vitro* на сповільнення швидкості дихання гепатоцитів: за окиснення [глюкози] = 10 ммоль/л, [пірувату] та [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з глюкозою за Стюдентом; # – статистично вірогідна різниця за ANOVA; $P < 0,05$; $n = 5$

У групі з наявністю у середовищі CsA сповільнення швидкості дихання знижувалось лише за окиснення пірувату до $2,08 \pm 1,09$ нмоль O_2 / (хв \times млн клітин) ($P = 0,03$) у порівнянні до глюкози (рис. 3.20).

Наявність у середовищі алкоголю чи CsA не впливало на сповільнення швидкості дихання гепатоцитів. Дисперсійний аналіз підтвердив відсутність ефекту етанолу чи CsA, і підтвердив лише вплив субстрату окиснення на сповільнення швидкості дихання гепатоцитів (рис. 3.20).

Отже, якщо порівнювати вплив CsA на метаболізм етанолу (у порівнянні до наявності у середовищі тільки етанолу), то ми не спостерігали змін базального чи FCCP-стимульованого дихання за окиснення жодного із субстратів. Ймовірною причиною відсутності ефекту CsA може бути відсутність негативного впливу етанолу на дихання гепатоцитів, тобто гепатоцити активно метаболізують ту кількість етанолу, яка була присутня у середовищі, і етанол не спричиняв значного підвищення цитозольного Ca^{2+} , а відповідно і відкривання mPTP та негативних змін дихання гепатоцитів.

3.4.3. Вплив етанолу *in vitro* на мембранний потенціал та НАДН-автофлуоресценцію мітохондрій гепатоцитів

Методом флуоресцентної мікроскопії з використанням барвника родамін 123 ми досліджували вплив етанолу на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів за дії FCCP та ротенону (рис. 3.21).

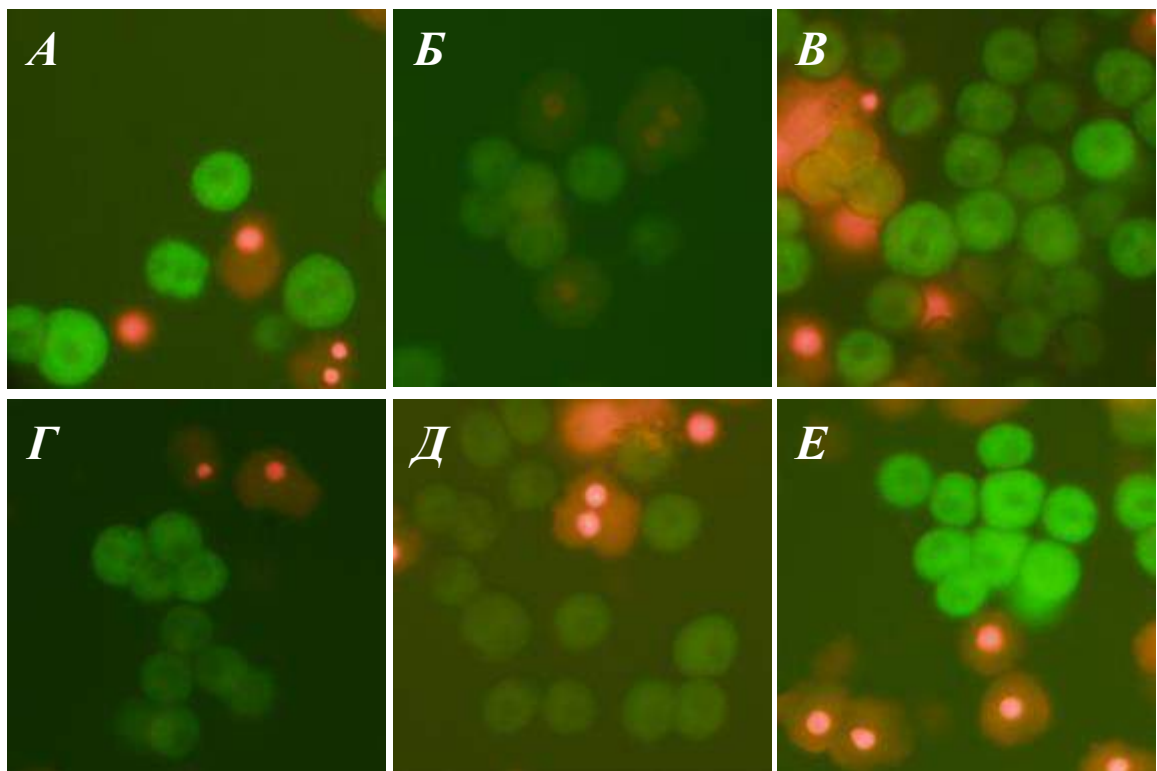


Рис. 3.21. Мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів за впливу етанолу (Г, Д, Е): А, Г – контроль, Б, Д – 2 мкмоль/л FCCP, В, Е – ротенон.

Встановлено, що за окиснення глюкози FCCP у концентрації 0,01 мкмоль/л чи ротенон не впливали на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів. За окиснення глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату та дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л мембранний потенціал мітохондрій знижується на 27 (P=0,008, n=5), 58 (P=0,004, n=5) та 44% (P=0,01, n=5) відповідно (рис. 3.22). Ротенон не впливав на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів як за окиснення пірувату так і за окиснення монометил-сукцинату.

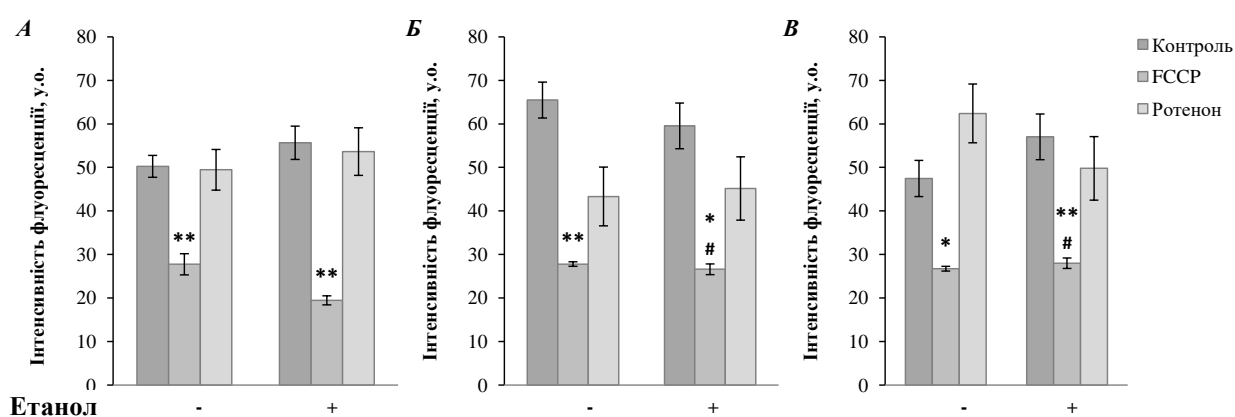


Рис. 3.22. Вплив етанолу *in vitro* на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів: за окиснення глюкози (А), пірувату (Б) чи монометил-сукцинату (Б); [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] та [монометил-сукцинат] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; # – статистично вірогідна різниця порівняно з глюкозою; P < 0,05; n = 5

За наявності у середовищі етанолу FCCP у концентрації 2 мкмоль/л зумовлював зниження мембранного потенціалу мітохондрій на 65% (P=0,003, n=5) за окиснення глюкози, на 55% (P=0,01, n=5) за окиснення пірувату та на 51% (P=0,003, n=5) за окиснення монометил-сукцинату у порівнянні до контролю (без FCCP) (рис. 3.22). Ротенон не змінював мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів як за окиснення глюкози, так і за окиснення пірувату чи монометил-сукцинату.

Етанол не впливав на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів як за окиснення глюкози, так і за окиснення пірувату та монометил-сукцинату.

Дисперсійний аналіз ANOVA показав відсутність впливу етанолу чи субстрату окиснення на мембранний потенціал мітохондрій гепатоцитів.

Аналізуючи флуоресцентний сигнал НАДН (рис. 3.23) за окиснення різних субстратів, встановлено, що у контролі за окиснення глюкози під впливом FCCP у концентрації 0,01 мкмоль/л НАДН-автофлуоресценція знижувалась на 20% ($P=0,04$, $n=5$). За концентрації FCCP 2 мкмоль/л НАДН-автофлуоресценція знижується як за окиснення глюкози, так і за окиснення пірувату та монометил-сукцинату на 27 ($P=0,001$, $n=5$), 37 ($P=0,003$, $n=5$) та 27% ($P=0,008$, $n=5$) відповідно (рис. 3.24).

Ротенон не впливав на НАДН-автофлуоресценцію гепатоцитів у порівнянні до контролю, проте за окиснення пірувату, у порівнянні до глюкози, ротенон спричиняв зниження НАДН-автофлуоресценції клітин печінки ($P=0,009$, $n=5$) (рис. 3.24 Б)

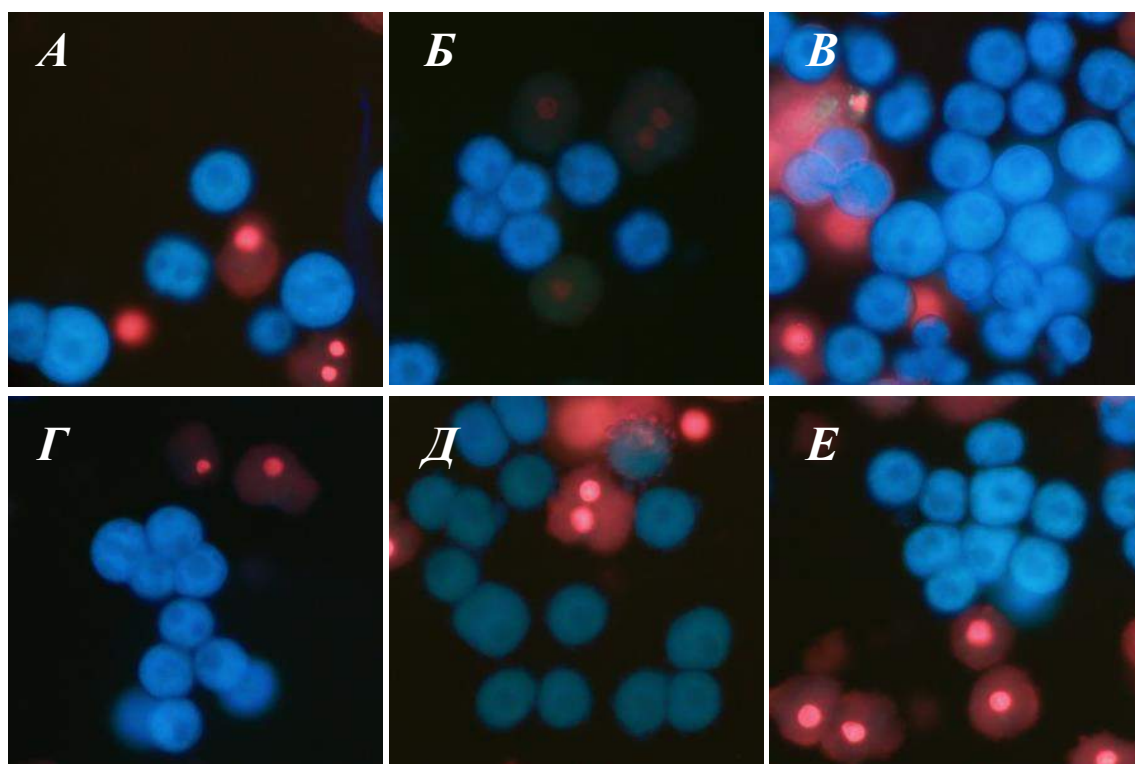


Рис. 3.23. НАДН-автофлуоресценція мітохондрій гепатоцитів за впливу етанолу (Г, Д, Е): А, Г – контроль, Б, Д – 2 мкмоль/л FCCP, В, Е – ротенон

За наявності у середовищі етанолу та окиснення глюкози НАДН-автофлуоресценція знижувалась за концентрації FCCP 0,01 ($P=0,03$, $n=5$) та 2 мкмоль/л ($P=0,0003$, $n=5$), у порівнянні до контролю (без FCCP) (рис. 3.24 А). За окиснення пірувату НАДН-автофлуоресценція знижувалась за концентрації FCCP 2 мкмоль/л на 42% ($P=0,0005$, $n=5$) у порівнянні до контролю (рис. 3.24 Б). За окиснення монометил-сукцинату НАДН-автофлуоресценція знижувалась за концентрації FCCP 2 мкмоль/л на 37% ($P=0,001$, $n=5$) (рис. 3.24 В).

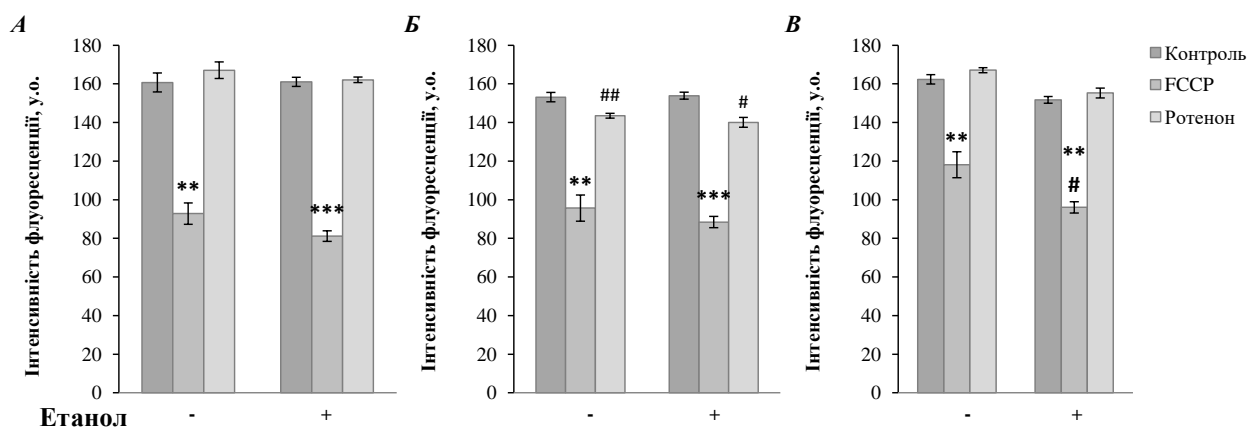


Рис. 3.24. Вплив етанолу *in vitro* на НАДН-автофлуоресценцію мітохондрій гепатоцитів: за окиснення глюкози (А), пірувату (Б) чи монометил-сукцинату (В); [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] та [монометил-сукцинат] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; # – статистично вірогідна різниця порівняно з глюкозою; $P < 0,05$; $n = 5$

Сам етанол жодним чином не впливав на НАДН-автофлуоресценцію як за окиснення глюкози, так і за окиснення пірувату та монометил-сукцинату і відсутність впливу етанолу підтвердив дисперсійний аналіз ANOVA. Проте дисперсійний аналіз підтвердив вплив субстрату окиснення на НАДН-автофлуоресценцію гепатоцитів.

Відсутність впливу етанолу на мембранний потенціал та НАДН-автофлуоресценцію мітохондрій гепатоцитів ймовірно пов'язана з коротким часом його впливу.

3.4.4. Вплив етанолу *in vitro* на розвиток лактат-ацидозу у гепатоцитах щурів

Оскільки в результаті окиснення етанолу відбувається накопичення у клітинах НАДН, то це може призводити до підвищення синтезу лактату з пірувату та спричиняти розвиток лактат-ацидозу і, відповідно, зміну рН. Тому ми досліджували вплив етанолу на розвиток лактат-ацидозу в гепатоцитах щурів.

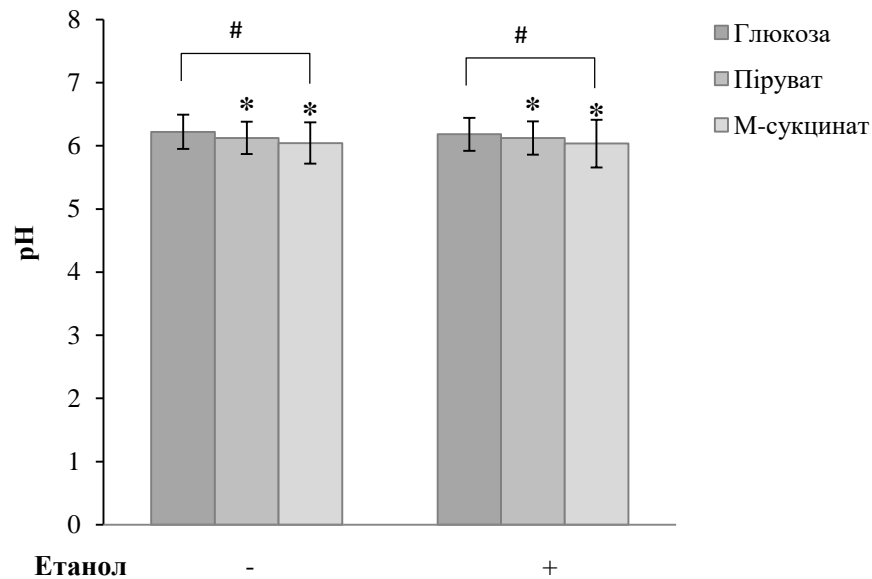


Рис. 3.25. Вплив етанолу *in vitro* на розвиток лактат-ацидозу у гепатоцитах щурів: за окиснення [глюкози] = 10 ммоль/л, [пірувату] та [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з глюкозою за Стюдентом; # – статистично вірогідна різниця за ANOVA; $P < 0,05$; $n = 5$.

Встановлено, що у контролі за окиснення глюкози рН середовища, у якому перебували гепатоцити, становило $6,22 \pm 0,27$. За наявності у середовищі пірувату чи глюкози рН знижувалось до $6,12 \pm 0,26$ та $6,04 \pm 0,33$ відповідно (рис. 3.25).

Подібно до контролю, за наявності у середовищі інкубації етанолу рН знижувалось, у порівнянні до глюкози, як за окиснення пірувату так і монометил-сукцинату. Сам етанол не змінював рН середовища за окиснення глюкози, пірувату чи монометил-сукцинату. Тест ANOVA підтвердив лише

вплив субстрату окиснення – монометил-сукцинату ($P = 0,02$). Отже, наші дослідження не підтвердили гіпотезу, що надлишок НАДН, через обмежену потужність дихального ланцюга для його окиснення, використовується в процесі перетворення пірувату в лактат, що може спричиняти розвиток лактат-ацидозу.

Підсумок. Етанол не впливав на максимальне роз'єднане дихання за наявності пірувату та монометил-сукцинату, які самі по собі значно підвищували це дихання. Наявність у середовищі інкубації CsA жодним чином не змінювало впливу етанолу на дихання гепатоцитів.

1. Галан С., Мазур Г., Мерлавський В., Манько Б.О., Манько В.В. Вплив етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату або монометилсукцинату. 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.

3.5. Адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів щурів за тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти

На сьогодні вплив алкоголю на функціонування мітохондрій є широко досліджуваним питанням. Показано, що у щурів та мишей, які попередньо споживали алкоголь, спостерігається посилення метаболізму етанолу та посилення споживання кисню гепатоцитами. Однак вище описаний ефект алкоголю не підтвердився при його впливі на вже виділену печінку [123]. Інші дослідження стверджують, що дихання гепатоцитів зростало після 20 хв інкубації з етанолом [57]. Незважаючи на значну кількість експериментів, результати стосовно метаболізму алкоголю печінкою та його впливу на функції мітохондрій є неоднозначними [52, 57, 123]. 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.

3.5.1. Вплив короткотривалого хронічного споживання алкоголю на швидкість дихання гепатоцитів

Швидкість базального дихання гепатоцитів за окиснення ендогенних субстратів становить $0,06 \pm 0,004$ нмоль O_2 / (с \times млн. кл) (рис. 3.26 А). За впливу FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л швидкість дихання гепатоцитів зростає на 74 % ($P=0,008$). При підвищенні концентрації FCCP до 0,5, 1 та 1,5 мкмоль/л дихання гепатоцитів знижується на 34 ($P=0,003$), 27 ($P=0,005$) та 21 % ($P=0,003$) відповідно, у порівнянні до попереднього стану дихання (рис. 3.26 А). Подібні зміни швидкості дихання спостерігаються і за окиснення глюкози, пірувату та монометил-сукцинату. FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л не змінює дихання гепатоцитів за окиснення пірувату, а у концентрації 0,25 мкмоль/л – за окиснення монометил-сукцинату (рис. 3.27).

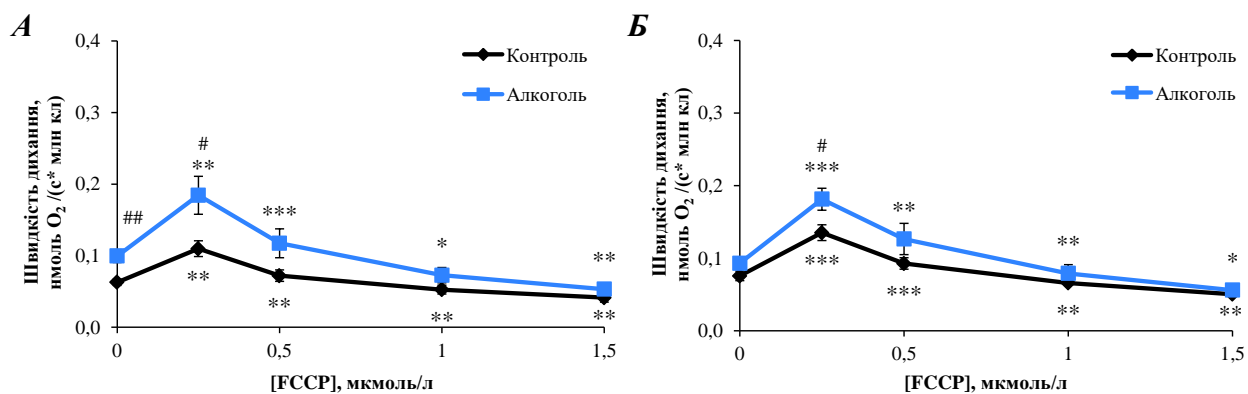


Рис. 3.26. Вплив алкоголю на швидкість дихання гепатоцитів за окиснення ендогенних субстратів (ЕС) (А) та глюкози (Б): [глюкоза] = 10 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім станом дихання; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; n = 5

Щодо впливу самих субстратів окиснення, то у контролі наявність у середовищі пірувату підвищувало базальне та FCCP-роз'єднане дихання гепатоцитів. Наявність у середовищі монометил-сукцинату підвищувало лише базальне дихання гепатоцитів, а глюкози – роз'єднане дихання за концентрації FCCP 0,5 та 1 мкмоль/л, у порівнянні до окиснення ендогенних субстратів.

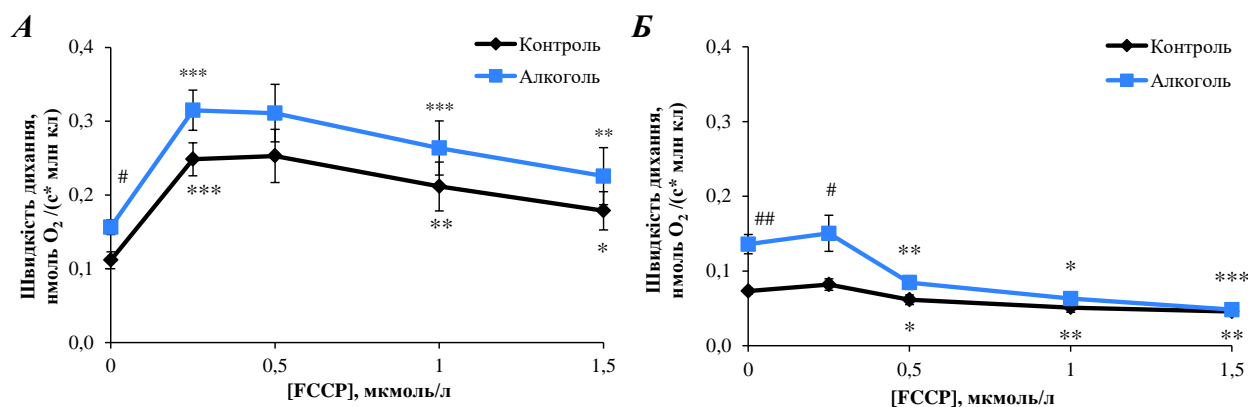


Рис. 3.27. Вплив алкоголю на швидкість дихання гепатоцитів за окиснення пірувату (А) та монометил-сукцинату (Б): [піруват], [монометил-сукцинат] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім станом дихання; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; n = 5

За тривалого введення алкоголю швидкість базального дихання гепатоцитів за окиснення ендogenous субстратів зростає до $0,10 \text{ нмоль } O_2 / (\text{с} \times \text{млн кл})$ ($P = 0,007$) у порівнянні до контролю (рис. 3.26 А). За концентрації FCCP $0,25 \text{ мкмоль/л}$ алкоголь зумовлював збільшення швидкості поглинання кисню на 68% ($P = 0,04, n=6$) (рис. 3.26 А). За концентрації FCCP $0,5, 1$ та $1,5 \text{ мкмоль/л}$ алкоголь не впливав на швидкості дихання гепатоцитів порівняно з контролем. За окиснення глюкози алкоголь не впливав на базальну швидкість дихання гепатоцитів та збільшував FCCP-роз'єднане дихання лише за концентрації протонофора $0,25 \text{ мкмоль/л}$ ($P = 0,04, n=6$, рис. 3.26 Б).

За окиснення пірувату алкоголь збільшував FCCP-роз'єднане дихання лише за концентрації протонофора $0,25 \text{ мкмоль/л}$ ($P = 0,01, n=6$, рис. 3.27 А). А за наявності у середовищі монометил-сукцинату алкоголь збільшував базальне дихання ($P = 0,002, n=6$) та FCCP-роз'єднане дихання лише за концентрації $0,25 \text{ мкмоль/л}$ ($P = 0,03, n=6$, рис. 3.27 Б).

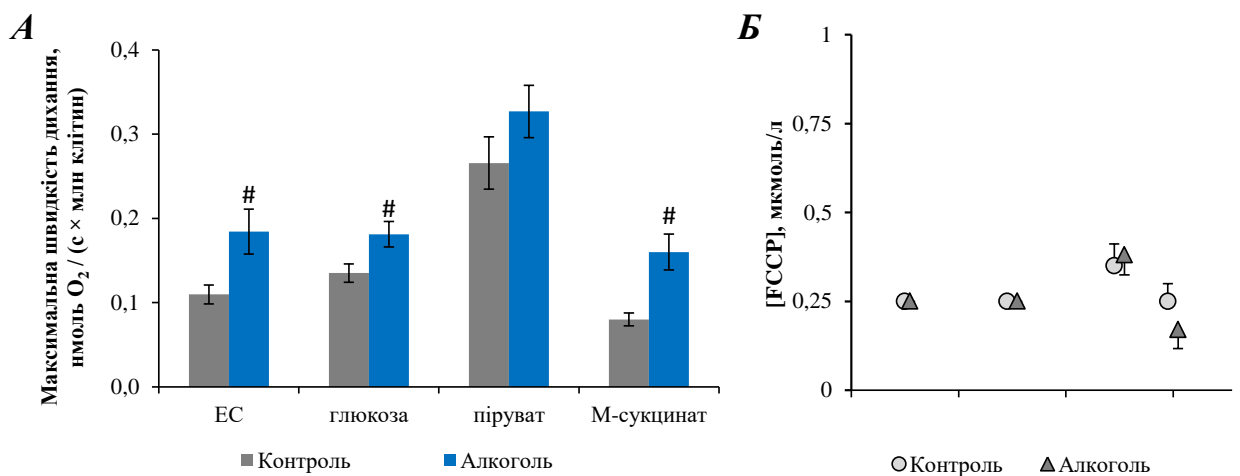


Рис. 3.28. Вплив алкоголю на максимальну швидкість роз'єданого дихання (А) та оптимальну концентрацію FCCP (Б): за окиснення ендogenous субстратів (ЕС), [глюкози] = 10 ммоль/л , [пірувату] чи [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л , * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без алкоголю); $P < 0,05$; $n = 6$

Алкоголь, за тривалого введення, 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. 3.28 А).

Алкоголь не змінював оптимальну концентрацію FCCP та ступінь спряження процесів дихання і окисного фосфорилування. Оптимальна концентрація FCCP у контролі становила 0,25 мкмоль/л у безсубстратному середовищі та за окиснення глюкози та сукцинату, і 0,35 мкмоль/л за окиснення пірувату (рис. 3.28 Б).

3.5.2. Вплив пірувату *in vivo* на дихання гепатоцитів за короткотривалого хронічного споживання алкоголю

Окиснення етанолу в печінці обмежено потужністю дихального ланцюга мітохондрій, внаслідок чого відбувається накопичення відновних еквівалентів [52, 138]. Існує припущення, що введення пірувату може прискорити окиснення етанолу шляхом уловлювання відновлювальних еквівалентів під час перетворення пірувату в лактат [119]. Тому ми вирішили перевірити вплив пірувату *in vivo* на енергетичні процеси печінки щурів за короткотривалого хронічного введення алкоголю.

Коли щурам робили ін'єкції пірувату, швидкість базального дихання гепатоцитів за окиснення ендogenous субстратів становить $0,07 \pm 0,004$ нмоль O_2 / (с \times млн. кл). За впливу FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л швидкість дихання гепатоцитів зростає на 62 % ($P=0,02$, $n=6$). При підвищенні концентрації FCCP до 0,5 та 1 мкмоль/л дихання гепатоцитів знижується на 34 % ($P=0,002$, $n=6$) та 33 % ($P=0,006$, $n=6$) та не змінюється за концентрації протонофора 1,5 мкмоль/л, у порівнянні до попереднього стану дихання (рис. 3.29 А).

За окиснення глюкози чи пірувату FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л підвищує швидкість дихання гепатоцитів, а у концентраціях 0,5, 1 та 1,5 мкмоль/л – знижує її, у порівнянні до попереднього стану дихання (рис. 3.29 та 3.30). За окиснення монометил-сукцинату FCCP у концентрації 0,25 мкмоль/л не змінює дихання гепатоцитів, а у концентраціях 0,5, 1 та 1,5 мкмоль/л зумовлює зниження швидкості дихання гепатоцитів (рис. 3.30 Б).

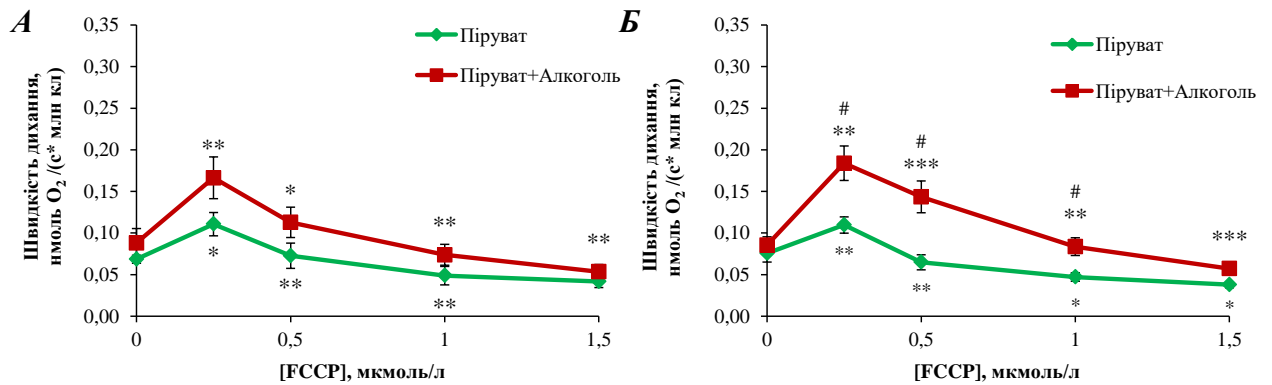


Рис. 3.29. Вплив пірувату та алкоголю на швидкість дихання гепатоцитів за окиснення ендогенних субстратів (ЕС) (А) та глюкози (Б): [глюкоза] = 10 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім станом дихання; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; n = 5

Щодо впливу самих субстратів окиснення, то наявність у середовищі пірувату підвищувало базальне та FCCP-роз'єднане дихання гепатоцитів. Наявність у середовищі глюкози чи монометил-сукцинату не впливало на дихання гепатоцитів, у порівнянні до окиснення ендогенних субстратів.

За тривалого введення алкоголю та ін'єкцій пірувату базальне та FCCP-роз'єднане дихання гепатоцитів за окиснення ендогенних субстратів не змінювалось (рис. 3.29 А).

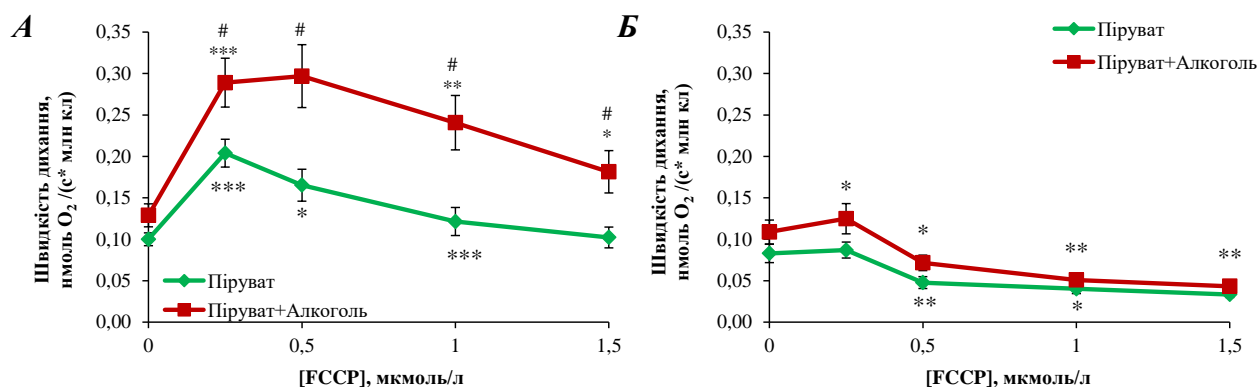


Рис. 3.30. Вплив пірувату та алкоголю на швидкість дихання гепатоцитів за окиснення пірувату (А) та монометил-сукцинату (Б): [піруват], [сукцинат] = 2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім станом дихання; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем; n = 5

За окиснення глюкози алкоголь не впливав на базальну швидкість дихання гепатоцитів та збільшував FCCP-роз'єднане дихання за концентрації протонофора 0,25, 0,5 та 1 мкмоль/л (рис. 3.29 Б) у порівнянні до контролю (ін'єкції пірувату). За окиснення пірувату алкоголь не впливав на базальне дихання та збільшував FCCP-роз'єднане дихання за усіх досліджуваних концентрації протонофора (рис. 3.30 А). А за наявності у середовищі монометил-сукцинату алкоголь не впливав базальне та FCCP-роз'єднане дихання гепатоцитів (рис. 3.30 Б).

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. 3.31 А).

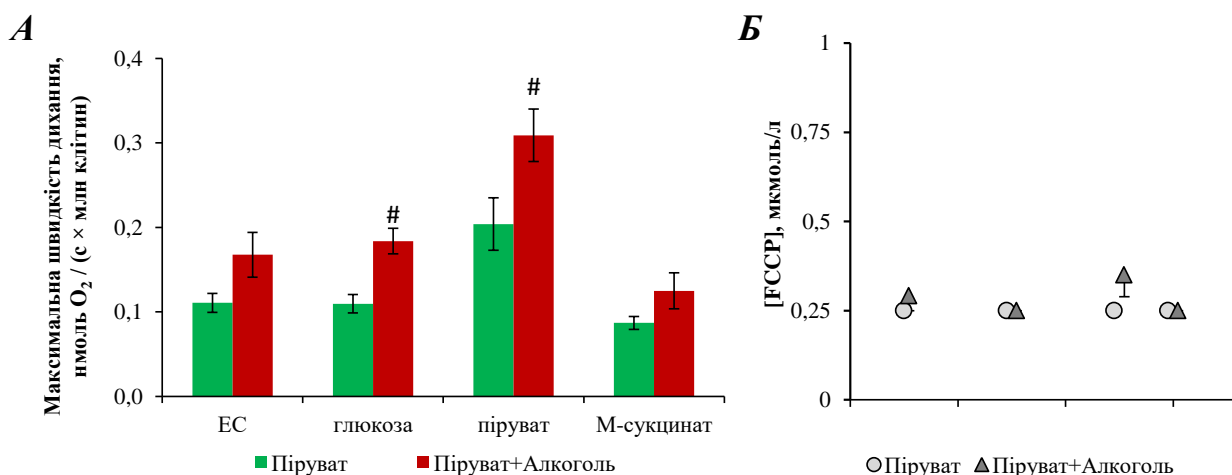


Рис. 3.31. Вплив алкоголю та пірувату на максимальну швидкість роз'єданого дихання (А) та оптимальну концентрацію FCCP (Б): за окиснення ендогенних субстратів (ЕС), [глюкози] = 10 ммоль/л, [пірувату] чи [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л; # – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем (без алкоголю); $P < 0,05$; $n = 6$

Алкоголь не змінював оптимальну концентрацію FCCP. Оптимальна концентрація FCCP у контролі у безсубстратному середовищі становила 0,29 мкмоль/л, за окиснення глюкози та сукцинату – 0,25 мкмоль/л, і 0,35 мкмоль/л за окиснення пірувату (рис. 3.31 Б).

Також для чотирьох піддослідних груп був проведений дисперсійний аналіз ANOVA, який підтвердив вплив алкоголю на максимальну швидкість роз'єданого дихання за окиснення ендогенних субстратів ($P = 0,007$), глюкози ($P = 0,001$), пірувату ($P = 0,01$) та монометил-сукцинату ($P = 0,003$) (рис. 3.32). Дисперсійний аналіз не підтвердив впливу ін'єкцій пірувату на максимальну швидкість роз'єданого дихання.

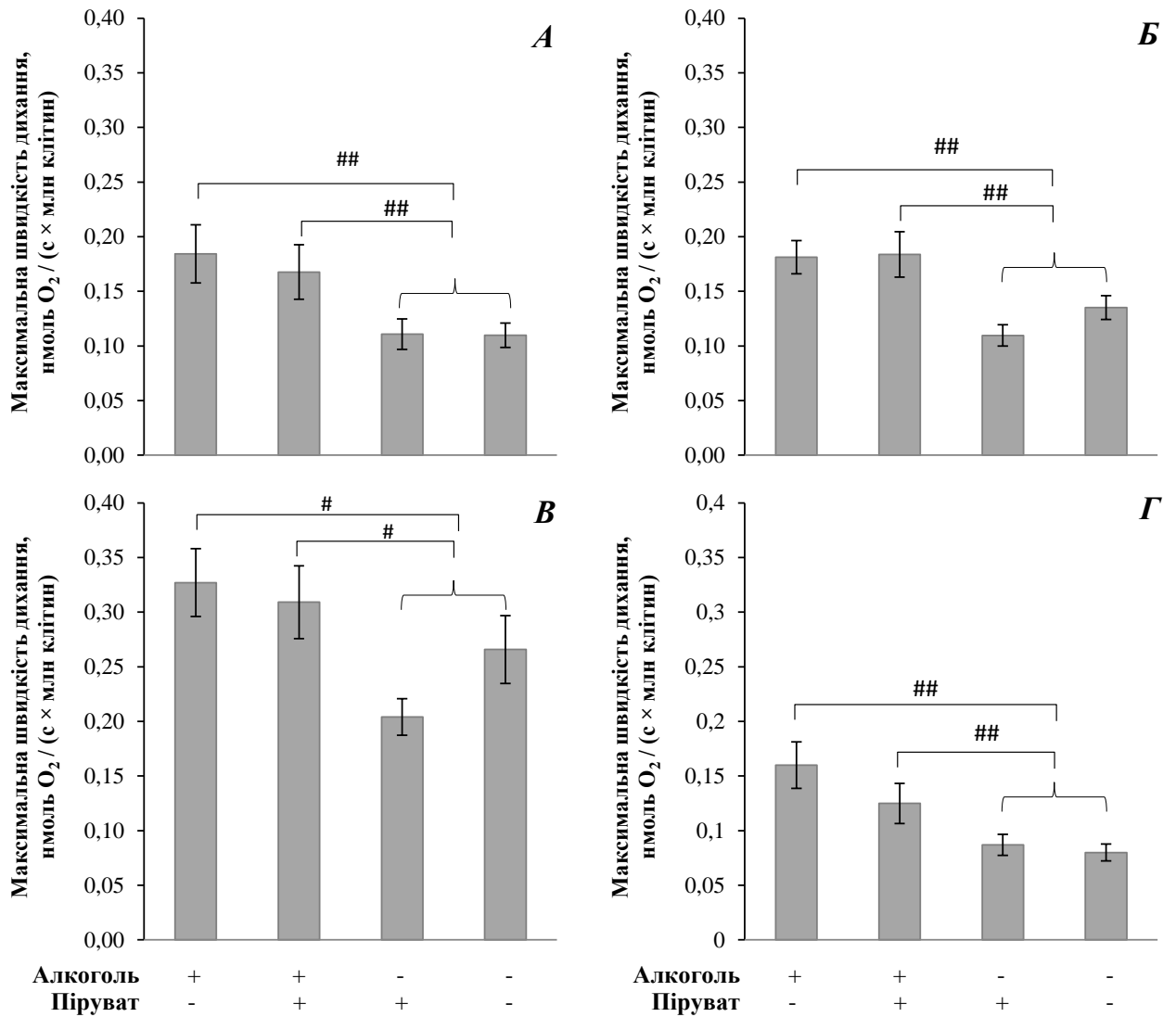


Рис. 3.32. Вплив алкоголю та пірувату *in vivo* на максимальну швидкість FCCP-роз'єднаного дихання гепатоцитів: за окиснення ендогенних субстратів (А), [глюкози] = 10 ммоль/л (Б), [пірувату] (В) та [монометил-сукцинату] = 2 ммоль/л (Г); # – статистично вірогідна різниця за ANOVA; P < 0,05; n = 5

Зростання швидкості споживання кисню мітохондріями гепатоцитів в результаті окиснення алкоголю може бути пов'язаним і зростанням кількості НАДН, яке утворюється в процесі метаболізму етанолу і може залучатися в ЦТК, і як результат – зростання швидкості дихання. Отримані нами дані співвідносяться з даними впливу етанолу на мітохондрії мишей [21]. Було показано, що алкоголь індукував зростання стану III дихання в ізольованих мітохондріях, збільшення мітохондріальних рівнів NAD⁺ і NADH та зміни в

морфології мітохондрій зі збільшенням числа подовжених мітохондрій, і підвищення мітохондріального біогенезу в печінці [52]. Отже, внаслідок хронічного споживання алкоголю мітохондрії печінки можуть реагувати на підвищені потреби в метаболізмі алкоголю шляхом адаптаційних пластичних змін.

Підсумок. 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. Зростання мітохондріального дихання гепатоцитів щурів може свідчити про активацію компенсаторних механізмів, спрямованих на збереження енергетичного гомеостазу гепатоцитів, як відповідь на метаболічний стрес, що викликаний споживанням алкоголю.

1. 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.
2. 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.

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

У цій дисертаційній роботі експериментально охарактеризовано критерії адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів та досліджено вплив субстратів окиснення, високих концентрацій Ca^{2+} , та алкоголю на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів. Отримані нами результати свідчать, що адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів залежить не тільки від властивостей дихального ланцюга мітохондрій та активності піруватдегідрогенази та ферментів циклу трикарбонових кислот, а й від доступності субстратів окиснення як за фізіологічних, так і патологічних умов. На основі отриманих результатів (червоним кольором на рис. 4.1) та даних літератури пропонуємо схему взаємозв'язків між адаптаційною здатністю мітохондрій гепатоцитів та факторами, які на неї впливають (рис. 4.1).

Для дослідження адаптаційної здатності та визначення критеріїв за якими її можна охарактеризувати необхідно було створити умови для підвищення функціонального навантаження мітохондрій гепатоцитів. Для цього ми використовували FCCP – протоніофор, який деполяризує мембрану мітохондрій шляхом транспортування протонів крізь клітинні мембрани і таким чином запускає компенсаторну реакцію дихального ланцюга [22]. Тривала деполяризація з протоніофором, що призводить спочатку до активації дихання, а потім до поступової втрати дихальної здатності, слугує як експериментальна модель дисфункції мітохондрій і як діагностичний інструмент для оцінки їхньої адаптаційної здатності. Під час використання протоніофора можна спостерігати три фази дихання: збільшення швидкості дихання (фаза прискорення), пік швидкості дихання (фаза максимального дихання) та зменшення швидкості дихання (фаза сповільнення) [79].

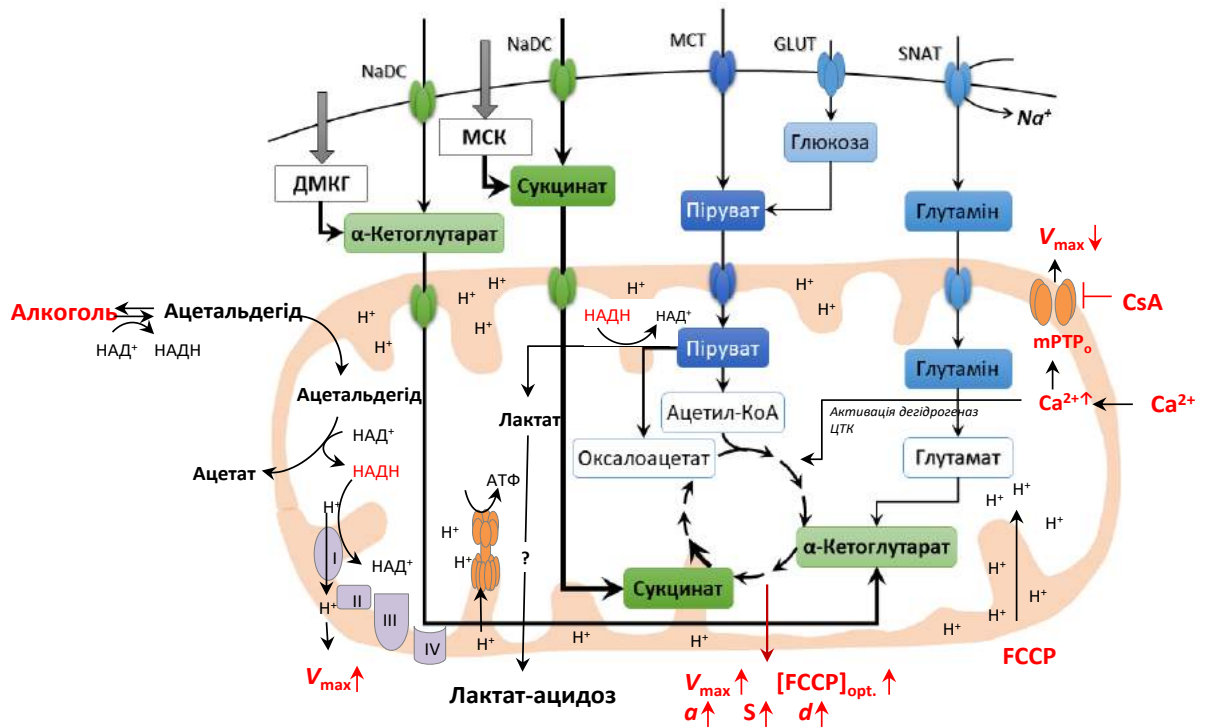


Рис. 4.1. Схема взаємозв'язків між адапційною здатністю мітохондрій гепатоцитів та факторами, які на неї впливають: ДМКГ – диметил- α -кетоглутарат, МСК – монометил-сукцинат, NaDC – Na⁺-дикарбоксилатний котранспортер, МСТ – монокарбоксилатний транспортер, GLUT – транспортер глюкози, SNAT – Na⁺- транспортери амінокислот системи N; V_{max} – максимальна швидкість роз'єданого дихання; [FCSRP]_{opt.} – оптимальна концентрація FCSRP; a – прискорення швидкості дихання; d – сповільнення швидкості дихання S – площа приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCSRP; → – товщина стрілок пропорційна до здатності субстрату окиснення підтримувати адапційну здатність мітохондрій гепатоцитів

Отже, на основі результатів дослідження, ми визначили 5 основних критеріїв, за якими можна оцінити адапційну здатність мітохондрій гепатоцитів: *максимальна швидкість роз'єданого дихання* (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій FCSRP), *оптимальна концентрація FCSRP* (концентрація, за якої ця швидкість зареєстрована), *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 $a = \frac{dv}{dt}$ та *площа приросту під*

кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP $S = \int_0^1 \Delta v_i(C) \cdot dC$, що дає змогу врахувати в інтегральній оцінці нахил кривої зміни швидкості споживання кисню, а не лише оптимальну концентрацію FCCP (рис. 4.1).

Ми встановили, що здатність мітохондрій компенсувати енергетичні витрати клітини у значній мірі залежить від типу та проникнення субстратів окиснення, адже транспортування одних і тих самих субстратів у клітини різних типів може відбуватись транспортерами з різною спорідненістю (K_m) до цих субстратів [39, 63, 95, 139].

Ми встановили, що адаптаційна здатність мітохондрій є найвищою за використання монометил-сукцинату і диметил- α -кетоглутарату, ніж за використання сукцинату і α -кетоглутарату, і дійсно визначається швидкістю транспортування субстрату через плазматичну мембрану. Тобто швидкості транспортування метилових естерів цих субстратів крізь плазматичну мембрану є достатньо високими, щоб тривалий час підтримувати адаптаційну здатність мітохондрій на високому рівні. Хоча немає однозначної відповіді, як саме відбувається транспортування метилових естерів сукцинату і α -кетоглутарату. Вони надходять у клітини або шляхом дифузії через ліпідний бішар, або можуть бути більш спорідненими з дикарбоксилатними котранспортерами [104]. На противагу цьому встановлено, що наявність глюкози у середовищі не покращує адаптаційну здатність мітохондрій. Причиною цього може бути низька селективність транспортера глюкози або ж особливості її метаболізму у гепатоцитах, оскільки основною функцією печінки є запасання глюкози у формі глікогену, а не її окиснення.

Оскільки на функціональний стан ізольованих клітин можуть впливати підвищення у процесі перфузії печінки в'язкості крові, зменшення перфузійного тиску в судинах, а відтак і гіпоксія, тому далі ми дослідили адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів за використання різних способів перфузії печінки – *in situ* та *in vitro*. 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.

Оскільки процеси дихання гепатоцитів регулюються катіонами Ca^{2+} , то на наступному етапі ми досліджували вплив різних концентрацій Ca^{2+} на адаптаційну здатність мітохондрій. Зважаючи на припущення, що F_0F_1 АТФ-синтаза бере участь у формуванні mPTP [45], а Omu може посилювати захисний вплив CsA запобігаючи порушенням функцій мітохондрій [30, 33], ми досліджували чи будуть залежати ефекти Omu та CsA від послідовності їх додавання у полярографічну комірку у середовищах з різними концентраціями Ca^{2+} .

Нами встановлено, що Ca^{2+} у концентрації 10 мкмоль/л спричиняє пригнічення ефектів АДФ та Omu, відбувається зниження FCCP-стимульованого дихання та зростає FCCP-спричинене пригнічення дихання пермеабілізованих гепатоцитів. Окрім того, ми виявили, що ефекти Omu, на відміну від ефектів CsA, суттєво не залежать від послідовності додавання у полярографічну комірку, як за окиснення сукцинату, так і суміші малату, глутамату та пірувату.

На наступному етапі ми реєстрували швидкість дихання гепатоцитів протягом чотирьох часових інтервалів – 140–160 с (АДФ), 325–355 с (CsA), 455–485 с (Omu) та 500–540 с (FCCP) за наявності чи відсутності CsA та Omu. З'ясувалося, що додавання CsA до полярографічної комірки, де вже наявний Ca^{2+} , не змінює швидкості дихання гепатоцитів, а у контролі зменшення швидкості АДФ-стимульованого дихання відбувається із часом.

Зважаючи на відсутність ефекту CsA коли його додавали у комірку до середовища, яке вже містило Ca^{2+} , далі ми додавали CsA у полярографічну комірку перед збільшенням концентрації катіонів Ca^{2+} . Підвищення концентрації Ca^{2+} у середовищі пригнічувало АДФ і FCCP-стимульоване

дихання. Ми встановили, що 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.

Після встановлення особливостей залежності адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів від концентрацій Ca^{2+} і зважаючи на дані літератури, що гостре споживання алкоголю зумовлює вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо гепатоцитів [131], ми досліджували вплив алкоголю на адаптаційну здатність мітохондрій за наявності чи відсутності у середовищі CsA.

Метод ANOVA не підтвердив впливу етанолу чи CsA, але підтвердив вплив субстрату окиснення на дихання гепатоцитів. Оптимальна концентрація FCCP не змінювалась за впливу етанолу. Також тест ANOVA показав відсутність впливу етанолу на мембранний потенціал та НАДН-автофлуоресценцію мітохондрій гепатоцитів, проте підтвердив вплив субстрату окиснення на НАДН-автофлуоресценцію гепатоцитів. Споживання алкоголю призводить до адаптивного збільшення метаболізму етанолу, що характеризується зростанням мітохондріального дихання та розпряженням окисного фосфорилування, але цей стан настає лише через 2–3 години після введення етанолу [123], що є ймовірною причиною відсутності впливу етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів.

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 та ін'єкцій пірувату, який потенційно може зменшувати несприятливі наслідки впливу алкоголю [119].

Нами встановлено, що алкоголь 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.

Збільшення швидкості мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за дії алкоголю пов'язано з мітохондріальною пластичністю печінки, яка може бути важливою адаптаційною реакцією на метаболічний стрес спричинений вживанням алкоголю.

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 адаптаційної 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гренюх ВП, Манько БО, Сідорова ОО, Царик ЙВ, Голубєв МІ, Бабський АМ. Максимальна окисна здатність мітохондрій клітин лімфоми NK/Ly за використання метилових естерів енергетичних субстратів. Біологія тварин. 2015;17(4):42-48.
2. Деркач М, Гумецький Р, Чабан М. Курс варіаційної статистики. Вища школа. 1977;206.
3. Дубицький Л, Наливайко Н, Кравенська Є. Залежність Ca^{2+} -акумуляційної функції мітохондрій печінки від віку тварин. Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008;46:153–158.
4. Іккерт О, Кургалюк Н, Ткаченко Г, Гальків М, Гордій С. Особливості окиснення НАД- та ФАД-залежних субстратів дихального ланцюга мітохондрій під впливом екзогенного L-аргініну та N^{ω} -нітро-L-аргініну у щурів з різною резистентністю до гіпоксії. Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2002;31:225–32.
5. Пономаренко ОВ, Бабіч ЛГ, Горчев ВФ, Костерін СО. Дослідження Ca^{2+} -залежного набухання мітохондрій гладенького м'яза за допомогою методу проточної цитометрії та вплив сперміну на цей процес. Укр. біохім. журн. 2006;78(6):38-45.
6. Манько БО, Манько ВВ. Ca^{2+} -транспортувальні системи секреторних клітин екзокринних залоз. Вісн. Львів. ун-ту. Сер.біол. 2008;48:1–32.
7. Аكوпова ОВ, Сагач ВФ. Высвобождение кальция из митохондрий печени крыс в условиях коллапса мембранного потенциала. Укр. биохим. журн. 2005;77(3):68–75.
8. Ленинджер А. Биохимия : пер. с англ. Мир. 1974;2:955.
9. Asano T, Katagiri H, Tsukuda K, Lin JL, Ishihara H, Yazaki Y, Oka Y. Upregulation of GLUT2 mRNA by glucose, mannose, and fructose in isolated rat hepatocytes. Diabetes. 1992;41(1):22-25.

10. Bailey SM, Cunningham CC. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(1):11–6.
11. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434(7033):658–62.
12. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko S, Craigen WJ, Molkenin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol.* 2007;9(5):550–5.
13. Baird FE, Beattie KJ, Hyde AR, Ganapathy V, Rennie MJ, Taylor PM. Bidirectional substrate fluxes through the system N (SNAT5) glutamine transporter may determine net glutamine flux in rat liver. *J. Physiol.* 2004;559(2):367-381.
14. Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landázuri MO, Enríquez JA. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab.* 2012;16(3):378–86.
15. Bauer TM, Murphy E. Role of mitochondrial calcium and the permeability transition pore in regulating cell death. *Circ Res.* 2020;126(2):280–293.
16. Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Lisa F. Di, Forte M.A. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J.* 2006;273(10):2077–2099.
17. Berry LM, Wollenberg L, Zhao Z. Esterase activities in the blood, liver and intestine of several preclinical species and humans. *Drug Metab Lett.* 2009;3(2):70–77.
18. Bhutia YD, Ganapathy V. Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1863(10):2531–2539.
19. Boerries M, Most P, Gledhill JR, Walker JE, Katus HA, Koch WJ, Aebi U, Schoenenberger CA. Ca²⁺-dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase

- leads to an increased ATP content in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 2007;27(12):4365–73.
20. Bonen A, Heynen M, Hatta H. Distribution of monocarboxylate transporters MCT1-MCT8 in rat tissues and human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2006;31(1):31–39.
21. Bradford BU, Rusyn I. Swift increase in alcohol metabolism (SIAM): understanding the phenomenon of hypermetabolism in liver. *Alcohol.* 2005;35(1):13–7.
22. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011;435:297–312.
23. Brignac-Huber LM, Park JW, Reed JR, Backes WL. Cytochrome P450 organization and function are modulated by endoplasmic reticulum phospholipid heterogeneity. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(12):1859–66.
24. Briston T, Roberts M, Lewis S, Powney B, Staddon JM, Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability. *Sci Rep.* 2017;7(1):10492.
25. Brooks PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity – a review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 21(6):1073–82.
26. Carafoli E. The Calcium Cycle of Mitochondria. *FEBS Lett.* 1979;104(1):1–5.
27. Caruana NJ, Stroud DA. The road to the structure of the mitochondrial respiratory chain supercomplex. *Biochem Soc Trans.* 2020;29;48(2):621–629.
28. Cassim S, Raymond VA, Lapierre P, Bilodeau M. From *in vivo* to *in vitro*: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation. *PLoS One.* 2017;12(12):e0190366
29. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012;16(4):667–85.
30. Chavez E, Rodriguez JS, Garcia G, Garcia N, Correa F. Oligomycin strengthens the effect of cyclosporin A on mitochondrial permeability transition by inducing phosphate uptake. *Cell Biol Int.* 2005;29(7):551-558.

- 31.Chen X, Tsukaguchi H, Chen XZ, Berger UV, Hediger MA. Molecular and functional analysis of SDCT2, a novel rat sodium-dependent dicarboxylate transporter. *J Clin Invest.* 1999;103(8):1159–1168.
- 32.Crestanello J, Doliba Nic, Doliba Nat, Babsky A, Niibori K, Osbakken M, Whitman GJR. Effect of coenzyme Q10 supplementation on mitochondrial function after myocardial ischemia reperfusion. *J Surg Res.* 2002;102:221–228.
- 33.Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J.* 1988;255(1):357–360.
- 34.Denton RM, Randle PJ, Martin BR. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J.* 1972;128(1):161–163.
- 35.Doody EE, Groebner JL, Walker JR, Frizol BM, Tuma DJ, Fernandez DJ, Tuma PL. Ethanol metabolism by alcohol dehydrogenase or cytochrome P450 2E1 differentially impairs hepatic protein trafficking and growth hormone signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017;313(6):558–69.
- 36.Dym O, Eisenberg D. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins. *Protein Sci.* 2001;10(9):1712–1728.
- 37.Edlund GL, Halestrap AP. The kinetics of transport of lactate and pyruvate into rat hepatocytes. Evidence for the presence of a specific carrier similar to that in erythrocytes. *Biochem. J.* 1988;249(1):117-126.
- 38.Egnatchik RA, Leamy AK, Sacco SA, Cheah YE, Shiota M, Young JD. Glutamate-oxaloacetate transaminase activity promotes palmitate lipotoxicity in rat hepatocytes by enhancing anaplerosis and citric acid cycle flux. *J Biol Chem.* 2019;294 (9):3081–3090.
- 39.Fafournoux P, Demigne C, Rémésy C, Le Cam A. Bidirectional transport of glutamine across the cell membrane in rat liver. *Biochem J.* 1983;216(2):401–408.
- 40.Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial complex III rieske Fe-S protein processing and assembly. *Cell cycle.* 2018;17(6):681–687.

41. Fierro L, Parekh AB. Fast calcium-dependent inactivation of calcium release-activated calcium current (CRAC) in RBL 1 cells. *J Membr Biol.* 1999;168(1):9–17.
42. Formosa LE, Dibley MG, Stroud DA, Ryan MT. Building a complex complex: assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;76:154–162.
43. Fukagawa NK. Catabolic control of nicotinamide coenzyme level. *Nutrit Rev.* 1984;42(2):62–64.
44. Fukuda J, Tsujimura S, Kano K. Coulometric bioelectrocatalytic reactions based on NAD-dependent dehydrogenases in tricarboxylic acid cycle. *Electrochimica Acta Volume.* 2008;54(2):328–333.
45. Giorgio V, Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Szabo I, Lippe G, Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:5887–5892.
46. Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca^{2+} in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry.* 2012;51:2959–2973.
47. Gunter TE, Buntinas L, Sparagna GC, Gunter KK. The Ca^{2+} transport mechanisms of mitochondria and Ca^{2+} uptake from physiological-type Ca^{2+} transients. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1366(1–2):5–15.
48. Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett.* 2004;567(1):96–102.
49. Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell.* 1995;82(3):415–424.
50. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion – a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):372–85.
51. Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of 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(1):153–160.
- 52.Han D, Ybanez MD, Johnson HS, McDonald JN, Mesropyan L, Sancheti H, Martin G, Martin A, Lim AM, Dara L, Cadenas E, Tsukamoto H, Kaplowitz N. Dynamic adaptation of liver mitochondria to chronic alcohol feeding in mice. *J Biol Chem.* 2012;287(50):42165–79.
- 53.Hasumura Y, Teschke R, Lieber CS. Characteristics of acetaldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 1976;251(16):4908–13.
- 54.Haworth RA, Hunter DR. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. *Arch Biochem Biophys.* 1979;195(2):460-467.
- 55.Hayase K, Tappel A. Microsomal esterase of rat liver. *J Biol Chem.* 1969;244(9):2269–2274.
- 56.Hill BG, Higdon AN, Dranka BP, Darley-Usmar VM. Regulation of vascular smooth muscle cell bioenergetic function by protein glutathiolation. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(2):285–295.
- 57.Holmuhamedov E, Lemasters JJ. Ethanol exposure decreases mitochondrial outer membrane permeability in cultured rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2009;481(2):226–233.
- 58.Hopper RK, Carroll S, Aponte AM, Johnson DT, French S, Shen RF, Witzmann FA, Harris RA, Balaban RS. Mitochondrial matrix phosphoproteome:effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry.* 2006;45(8):2524–2536.
- 59.Huttemann M, Pecina P, Rainbolt M, Sanderson TH, Kagan VE, Samavati L, Doan JW, Lee I. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell:from respiration to apoptosis. *Mitochondrion.* 2011;11(3):369–381.
- 60.Jackson VN, Halestrap AP. The kinetics, substrate, and inhibitor specificity of the monocarboxylate (lactate) transporter of rat liver cells determined using the

- fluorescent intracellular pH indicator, 2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein. *J Biol Chem*. 1996;271(2):861-868.
61. Johnston JD, Brand MD. Stimulation of the respiration rate of rat liver mitochondria by submicromolar concentrations of extramitochondrial Ca^{2+} . *Biochem J*. 1987;245(1):217–222.
62. Kang J, Pervaiz S. Mitochondria:redox metabolism and dysfunction. *Biochem Res Int*. 2012;2012:896751.
63. Karim S, Adams DA, Lalor PF. Hepatic expression and cellular distribution of the glucose transporter family. *World J Gastroenterol*. 2012;18(46):6771–6781.
64. Kenney WC. Acetaldehyde adducts of phospholipids. *Alcohol Clin Exp Res*. 1982;6(3):412–6.
65. Kim HJ, Khalimonchuk O, Smith PM, Winge DR. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9):1604–1616.
66. Kim HJ, Winge DR. Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1827(5):627–636.
67. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med*. 2003;3(6):527–35.
68. King AL, Swain TM, Dickinson DA, Lesort MJ, Bailey SM. Chronic ethanol consumption enhances sensitivity to Ca^{2+} -mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore and increases cyclophilin D in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(4):G954–66.
69. Kon S, Imai M, Inaba H. Isoflurane attenuates early neutrophil-independent hypoxia-reoxygenation injuries in the reperfused liver in fasted rats. *Anesthesiology*. 1997;86:1128–1136.
70. Kondrashova M, Gogvadze V, Medvedev B, Babsky A. Succinic acid oxidation as only energy support of intensive calcium ion uptake by mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;109(2):376–381.

71. Krebs HA. Rate control of the tricarboxylic acid cycle. *Adv Enzyme Regul.* 1970;8:335–53.
72. Kupynyak NI, Ikkert OV, Shlykov SG, Babich LG, Manko VV. Mitochondrial ryanodine-sensitive Ca^{2+} channels of rat liver. *Cell Biochem Funct.* 2017;35(1):42–49.
73. Kwong JQ, Molkentin JD. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart. *Cell Metab.* 2015;21(2):206–214.
74. Lancaster CRD. Succinate:quinone oxidoreductases:an overview. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1553:1–6.
75. Leung AWC, Halestrap AP. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777(7–8):946–52.
76. Li D, Zhao H, Gelernter J. Strong association of the alcohol dehydrogenase 1B gene (ADH1B) with alcohol dependence and alcohol-induced medical diseases. *Biol Psychiatry.* 2011;70(6):504–512.
77. Mailloux RJ, Beriault R, Lemire J, Singh R, Chenier DR, Hamel RD, Appanna VD. The tricarboxylic acid cycle, an ancient metabolic network with a novel twist. *PLoS One.* 2007;2(8):e690.
78. Mallilankaraman K, Cardenas C, Doonan P, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenar T, Csordas G, Madireddi P, Yang J, Muller M, Miller R, Kolesar JE, Molgo J, Kaufman B, Hajnoczky G, Foskett JK, Madesh M. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol.* 2012;14(12):1336–1343.
79. Manko BO, Bilonoha OO, Manko VV. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization. *Ukr. Biochem J.* 2019;91(3):34–45.

- 80.Marco R, Pestana A, Sebastian J, Sols A. Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. *Mol Cell Biochem.* 1974;3(1):53–70.
- 81.Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie Z, Reed JC, Kroemer G. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med.* 1998;187(8):1261–1271.
- 82.McCommis KS, Finck BN. Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochem J.* 2015;466(3):443–454.
- 83.McCormack JG. Characterization of the effects of Ca^{2+} on the intramitochondrial Ca^{2+} -sensitive enzymes from rat liver and within intact rat liver mitochondria. *Biochem J.* 1985;231(3):581–595.
- 84.Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, Sweeney HL, Robbins J, Molkentin JD. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med.* 2008;14(4):442–447.
- 85.Miyata H, Silverman HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG. Measurement of mitochondrial free Ca^{2+} concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am J Physiol.* 1991;261(4):1123–1134.
- 86.Morgan EW, Yan B, Greenway D, Petersen DR, Parkinson A. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B). *Arch Biochem Biophys.* 1994;315(2):495–512.
- 87.Moseley RH, Jarose S, Permod P. Hepatic Na^{+} -dicarboxylate cotransport: identification, characterization, and acinar localization. *Am J Physiol.* 1992;263(6):G871-879.
- 88.Nicholls DG, Budd SL. Mitochondrial and neuronal survival. *Physiol rev.* 2000;80(1):315–350.
- 89.Nicholls DG. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:53–60.

- 90.Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem.* 2002;277(34):30409–12.
- 91.Pastorino JG, Hoek JB. Ethanol potentiates tumor necrosis factor- α cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology.* 2000;31(5):1141–52.
- 92.Pastorino JG, Marcineviciute A, Cahill A, Hoek JB. Potentiation by chronic ethanol treatment of the mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265(2):405–9.
- 93.Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* 2001;276(15):12030–4.
- 94.Pfleger J, He M, Abdellatif M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis.* 2015;6(7):e1835.
- 95.Poole RC, Halestrap AP. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol.* 1993;264(4):761–82.
- 96.Ramachandran A, Lebofsky M, Baines CP, Lemasters JJ, Jaeschke H. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radic Res.* 2011;45(2):156–164.
- 97.Randle PJ. Metabolic fuel selection:general integration at the whole-body level. *Proc Nutr Soc.* 1995;54(1):317–27.
- 98.Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* 2011;50(3):222–233.
- 99.Rencurel F, Waeber G, Antoine B, Rocchiccioli F, Maulard P, Girard J, Leturque A. Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *Biochem J.* 1996;314(3):903-909.

100. Reshef L, Olswang Y, Cassuto H, Blum B, Croniger CM, Kalhan SC, Tilghman SM, Hanson RW. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem*. 2003;278(33):30413–6.
101. Rich PR, Marechal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem*. 2010;47:1–23.
102. Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol*. 2000;529(1):37–47.
103. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*. 2006;86(1):369–408.
104. Rognstad R. Gluconeogenesis in rat hepatocytes from monomethyl succinate and other esters. *Arch Biochem Biophys*. 1984;230(2):605-609.
105. Rose S, Frye RE, Slattery J, Wynne R, Tippett R, Pavliv O, Melnyk S, James SJ. Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction in a subset of autism lymphoblastoid cell lines in a well-matched case control cohort. *PLoS One*. 2014;9(1):e85436.
106. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2014;4(1):177-197.
107. Sansbury BE, Jones SP, Riggs DW, Darley-Usmar VM, Hill BG. Bioenergetic function in cardiovascular cells:the importance of the reserve capacity and its biological regulation. *Chem Biol Interact*. 2011;191(1-3):288–295.
108. Seglen P. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol*. 1976;13:29–83.
109. Shalbueva N, Mareninova OA, Gerloff A, Yuan J, Waldron RT, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2013;144(2):437–446.
110. Sharma LK, Lu J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex i:structure, function and implication in human diseases. *Curr Med Chem*. 2009;16(10):1266–1277.

111. Shelmet JJ, Reichard GA, Skutches CL, Hoeldtke RD, Owen OE, Boden G. Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat, and protein oxidation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1988;81(4):1137–45.
112. Shinoda W. Permeability across lipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(10):2254–2265.
113. Shinoda Y, Suzuki T, Sugawara-Yokoo M, Nagamatsu S, Kuwano H, Takata K. Expression of sugar transporters by *in vivo* electroporation and particle gun methods in the rat liver: localization to specific membrane domains. *Acta Histochemica Et Cytochemica.* 2001;34:15–24.
114. Skala MC, Riching KM, Gendron-Fitzpatrick A, Eickhoff J, Eliceiri KW, White JG, Ramanujam N. *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(49):19494–9.
115. Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS, Gunter TE. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem.* 1995;270(46):27510-27515.
116. Stoll B, Hussinger D. Functional hepatocyte heterogeneity. Vascular 2-oxoglutarate is almost exclusively taken up by perivenous, glutamine-synthetase-containing hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1989;181(3):709-716.
117. Stoll B, McNelly S, Buscher HP, Haussinger D. Functional hepatocyte heterogeneity in glutamate, aspartate and α -ketoglutarate uptake: a histoautoradiographical study. *Hepatology.* 1990;13(2):247-253.
118. Summermatter S, Santos G, Pérez-Schindler J, Handschin C. Skeletal muscle PGC-1 α controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor α -dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(21):8738–8743.
119. Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Ibi T, Sahashi K, Koga Y. Therapeutic potential of pyruvate therapy for mitochondrial diseases. *Mitochondrion.* 2007;7(6):399-401.

120. Taylor WM, Pol E, Bygrave FL. The stimulation of tricarboxylic acid-cycle flux by alpha-adrenergic agonists in perfused rat liver. *Biochem J.* 1986;233(2):321–324.
121. Thorens B, Cheng ZQ, Brown D, Lodish HF. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol.* 1990;259(6):279-285.
122. Thurman RG, Handler JA. New perspectives in catalase-dependent ethanol metabolism. *Drug Metab Rev.* 1989;20(2–4):679–88.
123. Thurman RG, Paschal DL, Abu-Murad C, Pekkanen L, Bradford BU, Bullock K, Glassman E. Swift increase in alcohol metabolism (SIAM) in the mouse: Comparison of the effect of short-term ethanol treatment on ethanol elimination in four inbred strains. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982;223(1):45–9.
124. Tobon F, Mezey E. Effect of ethanol administration on hepatic ethanol and drug-metabolizing enzymes and on rates of ethanol degradation. *J Lab Clin Med.* 1971;77(1):110–121.
125. Trisolini L, Gambacorta N, Gorgoglione R, Montaruli M, Laera L, Colella F, Volpice M, Grassi A, Pierri CL. FAD/NADH dependent oxidoreductases: from different amino acid sequences to similar protein shapes for playing an ancient function. *J Clin Med.* 2019;8(12):2117.
126. Tuma DJ, Casey CA. Dangerous byproducts of alcohol breakdown – focus on adducts. *Alcohol Res Health.* 2003;27(4):285–90.
127. Tuma DJ, Smith SL, Sorrell MF. Acetaldehyde and microtubules. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;625:786–92.
128. Turkan A, Hiromasa Y, Roche TE. Formation of a complex of the catalytic subunit of pyruvate dehydrogenase phosphatase isoform 1 (PDP1c) and the L2 domain forms a Ca²⁺ binding site and captures PDP1c as a monomer. *Biochemistry.* 2004;43(47):15073–85.
129. Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.* 2002;524(1-3):199-203.

130. Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*. 2014;515(7525):80–84.
131. Wang G, Mémin E, Murali I, Gaspers LD. The effect of chronic alcohol consumption on mitochondrial calcium handling in hepatocytes. *Biochem J*. 2016;473(21):3903–3921.
132. Wang HW, Wei YH, Guo HW. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) fluorescence for the detection of cell death. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009;9(9):1012–7.
133. Wilson DF, Matschinsky FM. Ethanol metabolism:the good, the bad, and the ugly. *Med Hypotheses*. 2020;140:109638.
134. Wittig I, Schagger H. Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(6):672–80.
135. Yadava N, Nicholls DG. Spare respiratory capacity rather than oxidative stress regulates glutamate excitotoxicity after partial respiratory inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. *J Neurosci*. 2007;27(27):7310–7.
136. Ying W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death:regulation and biological consequences. *Antioxid Redox. Signal*. 2008;10(2):179–206.
137. Yokoyama H, Ishii H, Nagata S, Kato S, Kamegaya K, Tsuchiya M. Experimental hepatitis induced by ethanol after immunization with acetaldehyde adducts. *Hepatology*. 1993;17(1):14–9.
138. Zhong Z, Ramshesh VK, Rehman H, Liu Q, Theruvath TP, Krishnasamy Y, Lemasters JJ. Acute ethanol causes hepatic mitochondrial depolarization in mice: role of ethanol metabolism. *PLoS One*. 2014;9(3):e91308.
139. Zimmerli B, O'Neill B, Meier PJ. Identification of sodium-dependent and sodium-independent dicarboxylate transport systems in rat liver basolateral membrane vesicles. *Pflugers Arch*. 1992;421(4):329-335.

ДОДАТОК А

Список опублікованих праць за темою дисертації:

1. **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).*
2. **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 статистичному опрацюванні даних, 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 монометилсукцинату. 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. 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 наукової 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; 20.
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 В. 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.