

ВПЛИВ Ca^{2+} НА КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ДИХАННЯ МІТОХОНДРІЙ *IN SITU* АЦИНАРНИХ ПАНКРЕАЦИТІВ

Б. О. МАНЬКО, В. В. МАНЬКО

Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;
e-mail: mankobo@gmail.com

Досліджено залежність швидкості дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів щурів від концентрації у середовищі субстратів окислення і від вмісту за різних $[\text{Ca}^{2+}] - 10^{-8}-10^{-6}$ М. Панкреати пермеабілізували дигітоніном у розрахунку 50 мкг на 1 млн. клітин. Швидкість дихання визначали полярографічним методом із використанням електрода Кларка за окислення сукцинату, а також пірувату чи глутамату в присутності малату. Параметри рівняння Міхаеліса–Ментен розраховували методом Корніш–Боудена або з використанням координат Іді–Гофсті, а параметри рівняння Хілла – координат $\{v; v/[S]^h\}$. У досліджуваному діапазоні $[\text{Ca}^{2+}]$ кінетична залежність дихання за окислення пірувату описується рівнянням Міхаеліса–Ментен, а за окислення сукцинату чи глутамату – рівнянням Хілла з $h = 1,11-1,43$ та $0,50-0,85$ відповідно. Уявна константа напівактивації дихання ($K_{0,5}$) не зазнавала істотних змін у досліджуваному діапазоні $[\text{Ca}^{2+}]$ і становила за 10^{-7} М Ca^{2+} для сукцинату $0,90 \pm 0,06$ мМ, пірувату – $0,096 \pm 0,007$ мМ, глутамату – $0,34 \pm 0,03$ мМ. Максимальна швидкість дихання V_{\max} за окислення пірувату зростає від $0,077 \pm 0,002$ до $0,119 \pm 0,002$ і $0,140 \pm 0,002$ нмоль $\text{O}_2/(\text{с}\cdot\text{млн. клітин})$ внаслідок підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ від 10^{-7} до $5\cdot 10^{-7}$ чи 10^{-6} М відповідно. Ca^{2+} істотно не впливає на V_{\max} за окислення сукцинату чи глутамату. Отже, підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ стимулює дихання мітохондрій ацинарних панкреатитів *in situ* за окислення екзогенного пірувату (очевидно внаслідок активації піруватдегідрогенази), але не сукцинату чи глутамату.

Ключові слова: ацинарні панкреати, мітохондрії *in situ*, дихання, Ca^{2+} , піруват, сукцинат, глутамат, кінетика, рівняння Хілла, рівняння Міхаеліса–Ментен.

Дослідження взаємозв'язків між внутрішньоклітинними сигнальними та метаболічними шляхами є актуальною проблемою сучасної фізіології. Такі взаємодії виявлено між системою сигнальної трансдукції за участю Ca^{2+} та процесами мітохондріального дихання й окисного фосфорилування.

Ще в ранніх кінетичних дослідженнях із використанням ензимних екстрактів або ізольованих мітохондрій різних тканин доведено наявність регуляції Ca^{2+} ключових дегідрогеназ циклу Кребса: піруватдегідрогенази [1–4], ізоцитратдегідрогенази [4–6] і α -кетоглутаратдегідрогенази [2, 4, 6, 7].

Окремою проблемою є те, що закономірності залежності активності ізольованих ензимів від $[\text{Ca}^{2+}]$ не завжди адекватно переносити на цілісні клітини. І в першу чергу тому, що ефективність регуляції катіонами Са піруватдегідрогенази (або інших ензимів мітохондрій) у клітинах визначається властивостями цитозольних Ca^{2+} -сигналів, інтенсивністю транспортування Ca^{2+} в мітохондрії та Ca^{2+} -буферними властивостя-

ми мітохондріального матриксу. Крім того, активація певного ензиму метаболічної системи не завжди виявляється у зростанні метаболічного потоку [8].

З іншого боку, дослідження на клітинному рівні часто є непрямим, а інтерпретація одержаних даних ускладнюється взаємодіями між великою кількістю клітинних процесів. Попри те, такі дослідження є адекватнішими, оскільки дають змогу спостерігати взаємозв'язки між клітинним сигналюванням і метаболізмом в умовах, максимально наближених до фізіологічних.

На клітинному рівні виявлено, що цитозольні Ca^{2+} -сигнали можуть впливати на мітохондріальні процеси гепатоцитів [9], клітин лінії HeLa [10], ацинарних клітин привушних залоз [11], гладеньких м'язів [12], секреторних клітин слинних залоз личинки дзвінця [13] тощо.

За дії агоністів холінорецепторів в ацинарних клітинах підшлункової залози вивільнення Ca^{2+} із депо супроводжується його транспортуванням у мітохондрії [14]. Паралельно з цим активація холінорецепторів спричиняє

інтенсифікацію клітинного дихання [15, 16], короточасне зниження мітохондріального мембранного потенціалу [17], підвищення рівнів NADH [14] і ATP [18]. І хоча ці зміни зазвичай пов'язують з активацією катіонами Ca мітохондріальних дегідрогеназ, прямі підтвердження цієї гіпотези для ацинарних панкреатитів досі відсутні.

Нещодавно ми обґрунтували доцільність використання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів для дослідження дихання їхніх мітохондрій *in situ* [19]. Ми припускаємо, що проведення кінетичного аналізу залежності дихання мітохондрій *in situ* від концентрації субстратів дасть змогу адекватніше оцінити роль Ca²⁺ в регуляції мітохондріального окислення ацинарних панкреатитів. Адже, по-перше, невідомо, які концентрації субстратів існують у клітині за різних рівноважних та нерівноважних станів системи окисного фосфорилування. По-друге, кінетичні параметри дають змогу зробити достатньо вірні висновки щодо механізмів регуляції цієї системи. І, по-третє, швидкість дихання за цих умов залежить як від взаємодії трьох основних компонентів окисного фосфорилування: ензимів циклу Кребса, дихального ланцюга і ATP-синтази, так і від цитозольних факторів, у т. ч. і Ca²⁺. Тому кінетичні параметри швидкості споживання кисню, визначені за різних концентрацій субстратів, описуватимуть властивості загального метаболічного потоку в системі окисного фосфорилування.

Наведене вище обґрунтувало мету нашої роботи — дослідити кінетичну залежність дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів від концентрації субстратів циклу Кребса за впливу Ca²⁺.

Матеріали і методи

Всі маніпуляції із тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, та законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Досліди виконували на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–300 г, яких утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Декапітацію наркотизованих хлороформом щурів здійснювали в лабораторії ізольовано від інших тварин.

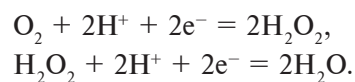
Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів одержували з використанням колагенази за модифікованим методом Вільямса і

співавт. [20]. Після декапітації та знекровлення тварини розтинали черевну стінку. На спільну жовчну протоку в місці її впадання у дванадцятипалу кишку накладали лігатуру. Другу лігатуру підводили під голку, введену в початок протоки. Через неї одноразовим шприцом в протоку повільно вводили 5 мл базового позаклітинного середовища, що містило колагеназу (220 од./мл). Після закінчення перфузії голку витягали з протоки і лігатуру затягували. Всі наступні процедури проводили за Вільямсом і співавт. [20].

Клітини підраховували за допомогою камери Горяєва. Для досягнення достатньої точності методу підраховували мінімум 400 клітин. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували 0,1%-им трипановим синім. Кількість клітин із цілісними плазматичними мембранами становила не менше 95%. Після виділення ацинуса зберігали в базовому позаклітинному середовищі у відкритій конічній колбі зі струшуванням частотою 120 циклів/хв при кімнатній температурі. У колбу подавали свіже повітря з-поза об'єму колби, як і під час інкубації з колагеназою.

Для уможливлення дослідження дихання мітохондрій *in situ* здійснювали пермеабілізацію плазматичної мембрани ацинарних клітин із використанням дигітоніну. Ізольовані ацинуса центрифугували і позаклітинне середовище замінювали на одне із середовищ інкубації пермеабілізованих панкреатитів із різним вмістом Ca²⁺. Після цього додавали дигітонін (у розрахунку 50 мкг/млн. клітин у 1 мл суспензії) та інкубували суспензію протягом 5 або 10 хв при 37 °C [19].

Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом, який базується на реєстрації електрохімічного відновлення фізично розчиненого кисню на катоді за накладання потенціалу 0,6–0,7 В [21]:



Величину дифузного струму реєстрували за допомогою установки, зібраної на базі електрода Кларка, полярографа YSI 5300, цифрового вольтметра (у деяких випадках — потенціометра КСП-4), комп'ютера, магнітної мішалки для розмішування суспензії і скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл. Температура інкубації становила 37 °C.

У полярографічну комірку вносили суспензію оброблених дигітоніном панкреатичних ацинусів (приблизно 1–1,6 млн. клітин) та реєстрували швидкість споживан-

ня кисню. Дихання, стимульоване сукцином (0,1–10 мМ), досліджували за наявності ротенону (10 мкМ), а піруватом (0,05–5 мМ) або глутаматом (0,05–5 мМ) – за наявності малату (1 мМ) або без нього. Субстрати додавали в комірку у зростаючих концентраціях. На відміну від дослідів на мітохондріях *in vitro* [21], чи мітохондріях *in situ* інших тканин (скелетних м'язів [22, 23], печінки [24]), де ADP додавали в насичуючій концентрації, окисне фосфорилування в мітохондріях *in situ* ацинарних панкреатитів здійснюється завдяки наявності ендогенних запасів ADP [19]. Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль O₂ [25].

У дослідях використовували такі реактиви: CaCl₂, HEPES, соєвий інгібітор трипсину, БСА, сукцинат, малат, піруват натрію, глутамат, колагеназу типу IV – Sigma-Aldrich (США); NaCl, KCl, K₂HPO₄, MgCl₂, глюкозу, сахарозу – Альфарус (Україна); дигітонін – Fisher scientific (США); EGTA – Acros Organics (Бельгія).

Базове позаклітинне середовище містило (мМ): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0, глюкоза – 10,0; БСА – 2,5 мг/мл; соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл; рН 7,4. У деяких випадках склад розчину модифікували: додавали колагеназу (220 од./мл) або підвищували вміст альбуміну до 40 мг/мл.

Базове сахарозовмісне середовище інкубації пермеабілізованих панкреатитів містило (мМ): сахароза – 250,0, K₂HPO₄ – 2,0, MgCl₂ – 1,0, EGTA – 1,0, CaCl₂ – 0,38 ([Ca²⁺] = 10⁻⁷ М), HEPES – 10,0; соєвий інгібітор трипсину – 0,1%; рН 7,2. На основі попереднього виготовляли середовища з різним вмістом Ca²⁺ з використанням Ca²⁺-EGTA буферів: для створення [Ca²⁺] = 10⁻⁸ М додавали 1 мМ EGTA і 0,06 мМ CaCl₂; для створення [Ca²⁺] = 5×10⁻⁷ М додавали 1 мМ EGTA і 0,75 мМ CaCl₂; для створення [Ca²⁺] = 10⁻⁶ М додавали 1 мМ EGTA і 0,86 мМ CaCl₂. Концентрацію вільного Ca²⁺ було розраховано за допомогою програми Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 (<http://maxchelator.stanford.edu>).

Кожен експеримент повторювали як мінімум на трьох окремих препаратах ізольованих клітин, одержаних від різних тварин ($n \geq 3$). Експериментальні дані записували на комп'ютер із допомогою цифрового вольтметра. Миттєву швидкість споживання кисню визначали за допомогою лінійної регресії кривої в діапазоні значень ± 7 с від точки, для якої встановлювали швидкість,

знаходячи коефіцієнт k (тангенс кута нахилу) апроксимованої лінійної функції. Середню швидкість споживання кисню визначали таким самим методом у діапазоні ≥ 1 хв.

Необхідні статистичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютера з використанням пакета програм Microsoft Office Excel. При цьому визначали середнє арифметичне (M), стандартну похибку (m), середньоквадратичне відхилення (σ), коефіцієнт варіації (C_v). Цифрові результати подано як $M \pm m$. Вірогідність різниці середніх арифметичних двох вибірок (P) визначали за парним t -тестом Стьюдента, якщо дві вибірки було отримано за дослідження аліквот однієї суспензій клітин в однакових середовищах; за гетероскедастичним t -тестом Стьюдента для вибірок із різною дисперсією; за гомоскедастичним t -тестом Стьюдента в інших випадках.

Кінетичні параметри (V_{\max} , $K_{0,5}$) розраховували за непараметричним методом Корніш-Боудена [26]. Залежності V_{\max} від $K_{0,5}$ для кожної пари експериментальних даних (концентрації субстрату і відповідної швидкості дихання) розраховували згідно з формулою:

$$V_{\max} = v + v \times [S]/K_{0,5}$$

Серед розрахованих V_{\max} і $K_{0,5}$, одержаних як координати перетинів усіх прямих, вибирали медіани, що й вважається найкращою апроксимацією до реальних V_{\max} і $K_{0,5}$. Крім того, використовували лінійну регресію в координатах Іді-Гофсті (v від $v/[S]$) [27, 28]. Кінетичні параметри рівняння Хілла розраховували в координатах Хілла або в координатах $\{v; v/[S]^h\}$ (модифікованих координатах Іді-Гофсті) методом ітерації показника h [29]. Найкращу відповідність одержаної залежності експериментальним даним визначали за допомогою лінійної регресії. Тобто підбирали таке значення h , за якого коефіцієнт апроксимації R^2 був найближчим до 1 [29]. Вірогідність апроксимації визначали з допомогою F -статистики. Коефіцієнт апроксимації вважали вірогідним, якщо значення $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Оптимізація дослідження кінетичної залежності дихання мітохондрій in situ ацинарних панкреатитів. У дослідженнях кінетичних параметрів необхідно максимально усувати чинники, які створюють неспецифічні додаткові впливи на досліджуваний параметр, залежну змінну, у цьому разі – швидкість споживання кисню. Такими чинниками можуть бути залишки ендогенних субстратів, що не

лише збільшують рівень ендogenous дихання, а й можуть модулювати окислення екзогенного субстрату.

Для досягнення істотного вимивання ендogenous субстратів із пермеабілізованих клітин, їх інкубували з дигітоніном у дослідних середовищах впродовж 5 або 10 хв. Встановлено, що після 10-хвилинної пермеабілізації швидкість ендogenous дихання панкреатитів у базовому внутрішньоклітинному середовищі ($[Ca^{2+}] = 10^{-7}$ М) становила $0,034 \pm 0,008$ нмоль O_2 /(с-млн. клітин) ($n = 15$), що на $34 \pm 7\%$ нижче, ніж у разі 5-хвилинної інкубації ($n = 10$). При цьому, максимальні показники субстрат-стимульованого дихання не залежали від часу інкубації і відповідали виявленим раніше [19]. Отже, за зменшення кількості ендogenous субстратів інтактність мітохондрій зберігалась. Далі, для розрахунку кінетичних параметрів показник швидкості ендogenous дихання віднімали від усіх інших показників.

Іншим способом усунути неспецифічні компоненти для кращого виявлення кінетичної залежності є блокування шляхів дихального ланцюга, які не задіяні в окисненні досліджуваного субстрату. Так, у ході дослідження кінетики окислення сукцинату перед внесенням клітин у полярографічну комірку ми додавали інгібітор комплексу I дихального ланцюга ротенон. За його наявності швидкість ендogenous дихання знижувалась до $0,008 \pm 0,002$ нмоль O_2 /(с-млн. клітин), тобто на $68 \pm 4\%$ ($n = 12$, $P \leq 0,01$) порівняно з ендogenous диханням після 10 хв дії дигітоніну. Отже, ендogenous дихання мітохондрій *in situ* ацинарних клітин значною мірою пов'язане із функціонуванням комплексу I дихального ланцюга.

Залежність швидкості дихання від концентрації сукцинату. На тлі ротенону сукцинат (0,1–10 мМ) дозозалежно інтенсифікує дихання. Під час розрахунків кінетичних параметрів залежності швидкості дихання від концентрації сукцинату віднімали швидкість ендogenous дихання, яке не інгібувалось ротеноном, – немітохондріальне споживання кисню.

Виявилось, що кінетика окислення сукцинату значно відрізняється від кінетики Міхаеліса–Ментен (рис. 1, А). У координатах Іді–Гофсті спостерігається характерне відхилення від лінійної залежності поблизу осі x. Тому ми спробували описати цю складну залежність за допомогою рівняння Хілла у координатах $\{v; v/[S]^h\}$ [29].

У разі застосування кінетики Хілла (рис. 1, Б) найкраще вдалося лінеаризувати функцію

за коефіцієнта Хілла $h = 1,43$ (1,50 у координатах Хілла; в усіх наступних випадках, коли розраховані в різних координатах коефіцієнти Хілла були дуже близькими за значенням, наведено лише результати розрахунків у координатах $\{v; v/[S]^h\}$). Однак ми не можемо трактувати одержані дані як оцінку кооперативності, оскільки йдеться не про дослідження кінетики зв'язування субстрату з кількома сайтами одного ензиму, а про кінетичну залежність роботи складної багатокомпонентної системи окисного фосфорилування від концентрації субстрату. Тим більше, що свідченням справжньої позитивної кооперативності є значне відхилення залежності у координатах Іді–Гофсті поблизу осі y, а не x [30, 31]. Тобто має спостерігатись відхилення (надмірне зростання) швидкості дихання за високих концентрацій субстрату, а не зниження значень швидкості за низьких концентрацій, як у цьому досліді. Розрахована за рівнянням Хілла V_{max} була рівною $0,41 \pm 0,02$ нмоль O_2 /(с-млн. клітин), а $K_{0,5} = 0,90 \pm 0,06$ мМ. Варто звернути увагу на досить високе значення $K_{0,5}$, що свідчить про низьку спорідненість окисних систем мітохондрій *in situ* до екзогенного сукцинату.

Ми припускаємо, що в основі виявленої складної залежності швидкості дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів від концентрації сукцинату може лежати або конкурентне інгібування сукцинатдегідрогенази залишками ендogenous субстратів (зокрема, оксалацетатом), що усувається за високих концентрацій сукцинату, або нижча спорідненість систем транспортування сукцинату до нього порівняно із системами його окислення.

Кінетична залежність швидкості дихання від концентрації пірувату. Додавання екзогенного пірувату в концентраціях 0,05–5 мМ, як виявилось, істотно не впливає на споживання кисню ($n = 3$; рис. 2). Однак за попереднього внесення малату (1 мМ) піруват дозозалежно підвищує швидкість дихання. У цій серії досліджень найвища швидкість дихання – $0,114 \pm 0,004$ нмоль O_2 /(с-млн. клітин) – спостерігається за 1 мМ пірувату.

Нездатність пірувату за відсутності малату інтенсифікувати дихання є зрозумілою – накопичення ацетил-КоА інгібує піруватдегідрогеназу [32]. За відсутності пірувату швидкість малатстимульованого дихання є незначною і становить $0,023 \pm 0,006$ нмоль O_2 /(с-млн. клітин). Причиною цього є те, що за окислення лише малату і відсутності джерела

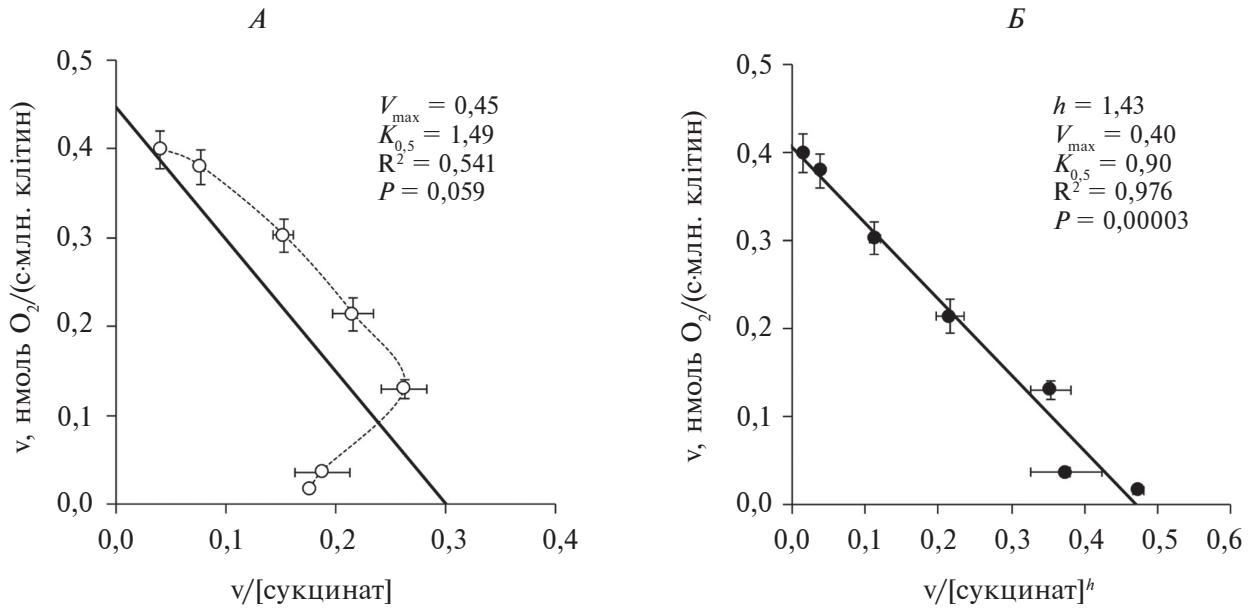


Рис. 1. Кінетична залежність швидкості дихання (v) пермеабілізованих ацинарних панкреатитів від концентрації сукцинату: А – розрахунки параметрів рівняння Міхаеліса–Ментен у координатах Іді–Гофсті (пряма лінія – апроксимована функція, штрихова лінія відображає реальну залежність); Б – розрахунки за рівнянням Хілла, дані представлені у координатах $\{v; v/[S]^h\}$; [сахароза] = 250 мМ, $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$ М, [ротенон] = 10 мкМ, [сукцинат] = 0,1–10 мМ; $n = 3$

ацетил-КоА утворений оксалацетат не може в подальшому ні метаболізуватися, ні проникати крізь внутрішню мітохондріальну мембрану. За накопичення оксалацетату малатдегідрогеназа може каталізувати й зворотну реакцію – утворення малату з оксалацетату [33]. Крім цього, за окислення малату постачання відновлюваних еквівалентів до дихального ланцюга іншими дегідрогеназами (окрім малатдегідрогенази) є практично відсутнім.

Проте варто зазначити, що малатстимульована частка дихання пермеабілізованих панкреатитів становить $20 \pm 4\%$ від максимальної швидкості дихання за окислення пірувату й малату ($n = 9$), тоді як в ізольованих мітохондріях м'язів – лише 1,3% [34]. Цілком можливо, що у пермеабілізованих панкреатитах наявні певні ендogenousні запаси пірувату (~15 мкМ згідно з розрахованою залежністю, представленої на рис. 3), що утворився ще в інтактних клітинах. З іншого боку, малатстимульоване дихання може бути пов'язаним із функціонуванням виключно малатдегідрогенази, а його відносно високий рівень може бути особливістю мітохондрій підшлункової залози.

Для одержання істинної залежності швидкості дихання від [пірувату] ми здійснили два варіанти розрахунку кінетичних параметрів:

1) віднімали від усіх точок залежності малатстимульовану частку дихання, припустивши, що вона є незалежним компонентом; 2) не віднімали її, оскільки малатстимульована частка може відображати окислення ендogenousного пірувату разом із малатом. Виявилось, що в разі віднімання частки малатстимульовано-

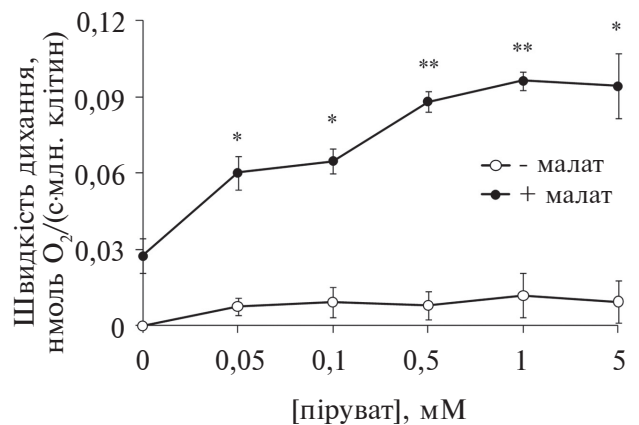


Рис. 2. Вплив малату на піруватстимульоване споживання кисню: ендogenousне дихання віднімали; [сахароза] = 250 мМ, $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$ М, [малат] = 1 мМ, [піруват] = 0,05–5 мМ; * статистично вірогідна різниця щодо результату експерименту без малату з $P \leq 0,05$; ** – з $P \leq 0,01$; $n = 3$

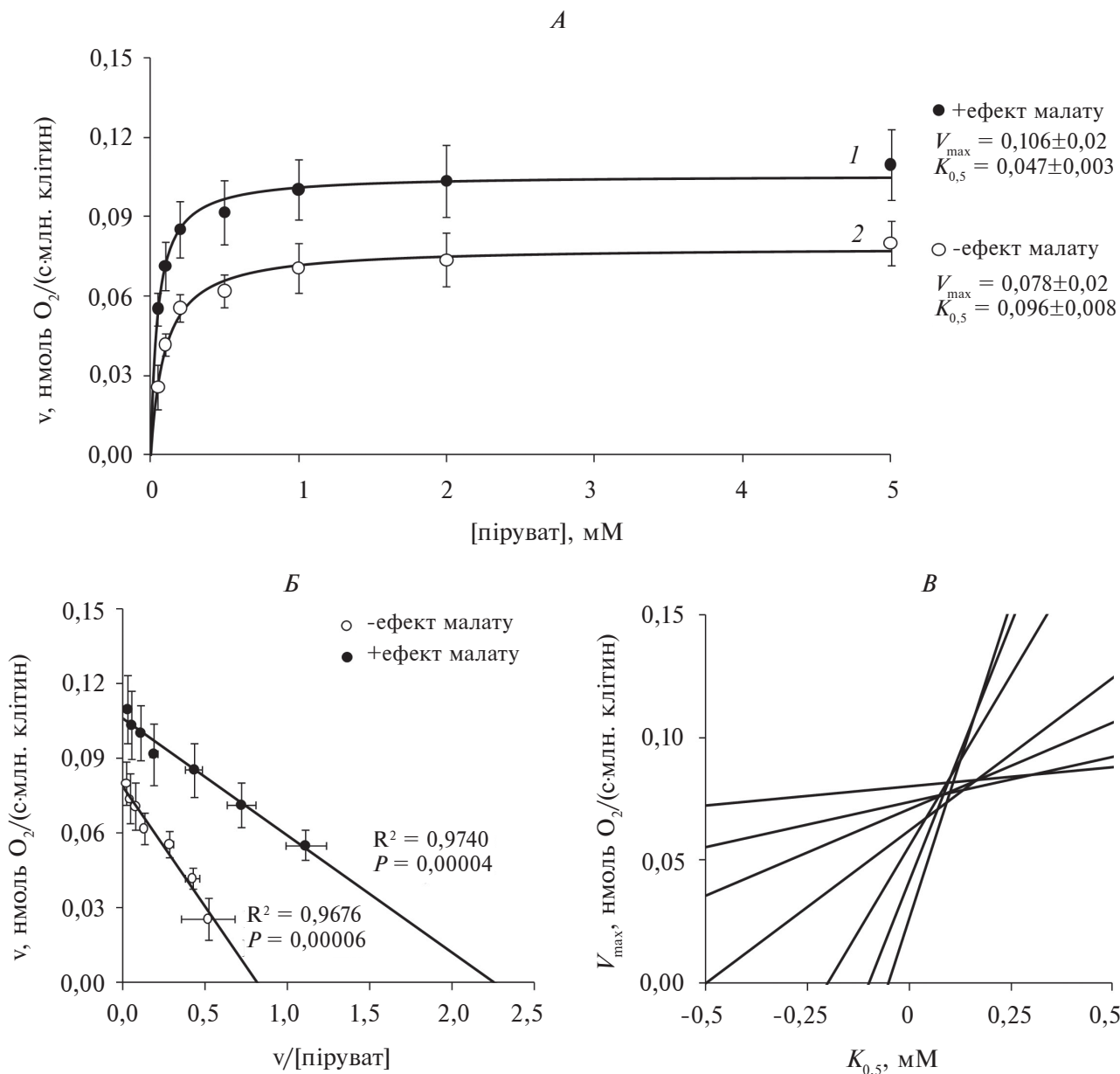


Рис. 3. Кінетичні параметри швидкості дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів за окислення пірувату: А – графік залежності швидкості дихання від концентрації пірувату; окислення пірувату досліджували у присутності малату, для розрахунку кінетичних параметрів частку впливу самого малату віднімали (2) або ні (1); Б – лінеаризація у координатах Іді–Гофсті, позначення, як на графіку А; В – прямолінійна діаграма Корніш-Бодена (у цьому разі ефект малату віднімали); [сахараза] = 250 мМ, $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$ М, [малат] = 1 мМ, [піруват] = 0,05–5 мМ; $n = 4$

го дихання коефіцієнт Хілла, розрахований у координатах $\{v; v/[S]\}$ становить 1,12. Якщо ж малатстимульований компонент не віднімати, коефіцієнт Хілла дорівнює 0,8. Це вказує на відсутність істотних відхилень від кінетики Міхаеліса–Ментен.

Для розрахунку кінетичних параметрів окислення пірувату за рівнянням Міхаеліса–Ментен ми використовували непараметрич-

ний метод Корніш-Бодена (рис. 3, В) та координати Іді–Гофсті (рис. 3, А).

У разі віднімання ефекту малату розраховані методом Іді–Гофсті кінетичні параметри дорівнюють: $K_{0,5} = 0,096 \pm 0,007$ мМ, а $V_{max} = 0,078 \pm 0,002$ нмоль O_2 /(с·млн. клітин) ($n = 4$; рис. 3, А). У разі врахування малатстимульованої частки $K_{0,5}$ становить $0,047 \pm 0,003$ мМ і $V_{max} = 0,106 \pm 0,002$ нмоль

O_2 /(с-млн. клітин). Дуже схожі результати було одержано із застосуванням методу Корніш-Бодена: $K_{0,5}$ та V_{max} – 0,100 мМ та 0,079 нмоль O_2 /(с-млн. клітин) у першому випадку і 0,048 мМ та 0,106 нмоль O_2 /(с-млн. клітин) у другому.

На перший погляд, обидві криві (як із врахуванням малатстимульованого дихання, так і без нього) добре описуються рівнянням Міхаеліса–Ментен (рис. 3, А). Проте ми вважаємо, що одержані у другому випадку нижчі значення $K_{0,5}$ (а також коефіцієнта Хілла) є лише підтвердженням того факту, що малатстимульоване дихання значною мірою є незалежним компонентом, не пов'язаним із окисненням ендogenous пірувату, а лише з роботою малатдегідрогенази. Тому врахування малатстимульованого компонента призводить до спотворення кінетичної залежності окислення пірувату: причиною зниження $K_{0,5}$ та коефіцієнтів Хілла є адитивний ефект малату, що особливо сильно відображається на зростанні швидкості дихання за низьких концентрацій пірувату. Ми вважаємо, що для розрахунку кінетики окислення пірувату мітохондріями *in situ* ацинарних панкреатитів малатстимульований компонент необхідно віднімати.

Оскільки за окислення пірувату спостерігається залежність, подібна до кінетики Міхаеліса–Ментен, виникає спокуса припустити, що ми маємо справу з реакцією, що каталізується лише одним ферментом, наприклад, піруватдегідрогеназою, і, відповідно, трактувати одержані результати лише в контексті активності цього ферменту. Однак насправді відповідність одержаної залежності кінетиці Міхаеліса–Ментен викликає здивування. Адже відомо, що за окислення суміші пірувату і малату активними є більшість ферментів циклу Кребса (за винятком, хіба що, сукцинатдегідрогенази і фумарази [35]), а також дихального ланцюга й АТР-синтаза. Тому відповідність кінетиці Міхаеліса–Ментен, мабуть, вказує на лімітуючу роль одного з ферментів (найімовірніше, піруватдегідрогенази) за всіх досліджуваних концентрацій субстрату.

Виявлено, що значення $K_{0,5}$ для пірувату на порядок нижчі, ніж для сукцинату. Це й не дивно, оскільки транспорт пірувату в мітохондрії та його подальше окислення є природним процесом, що відбувається в цілісних клітинах, на відміну від транспорту і окислення екзогенного щодо мітохондрій сукцинату.

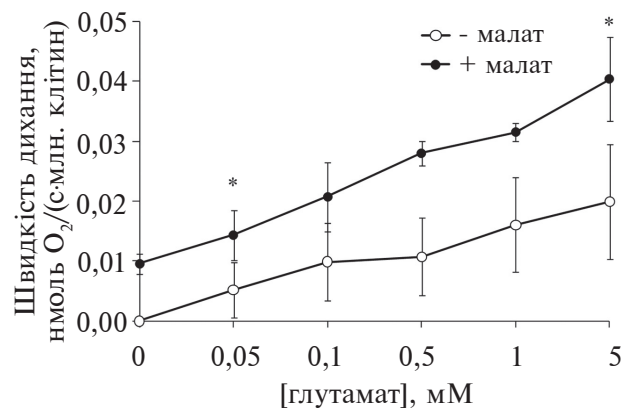


Рис. 4. Вплив малату на глутаматстимульоване споживання кисню: ендogenous дихання віднімали; [сахароза] = 250 мМ, $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$ М; [малат] = 1 мМ; [глутамат] = 0,05–5 мМ; * статистично вірогідна різниця щодо результату експерименту без малату з $P \leq 0,05$; $n = 3$

Кінетична залежність швидкості дихання від концентрації глутамату. За внесення глутамату в концентраціях 0,05–5 мМ швидкість дихання поступово зростає (рис. 4). Але за попереднього внесення малату (1 мМ) стимуляція глутаматом приблизно вдвічі сильніша. Це збігається з даними, отриманими на мітохондріях м'язів [36, 37]. За відсутності малату глутамат окислюється лише глутаматдегідрогеназою. У разі наявності малату свій вклад в окислення глутамату вносить також аспартатамінотрансфераза, яка перетворює глутамат в α -кетоглутарат, а малат – в аспартат. У подальшому α -кетоглутарат окислюється в циклі Кребса. Саме тому, мабуть, малат потенціює ефекти глутамату.

Розрахунок кінетичних параметрів залежності швидкості дихання від концентрації глутамату проводили у присутності в середовищі малату. Як і за окислення сукцинату, кінетика окислення глутамату є відмінною від кінетики Міхаеліса–Ментен (рис. 5). Якщо малатстимульовану частку дихання враховували, одержана залежність не описується достатньо добре ні рівнянням Міхаеліса–Ментен, ні рівнянням Хілла.

Тому ми віднімали малатстимульовану частку дихання. У цьому разі коефіцієнт Хілла h становить 0,85 (рис. 5) у базовому середовищі, а за інших $[Ca^{2+}]$ ще менше (таблиця). Це, а також характер відхилень від прямолінійності в координатах Іді–Гофсті, вказують на «негативну кооперативність» [30, 31] за окислення

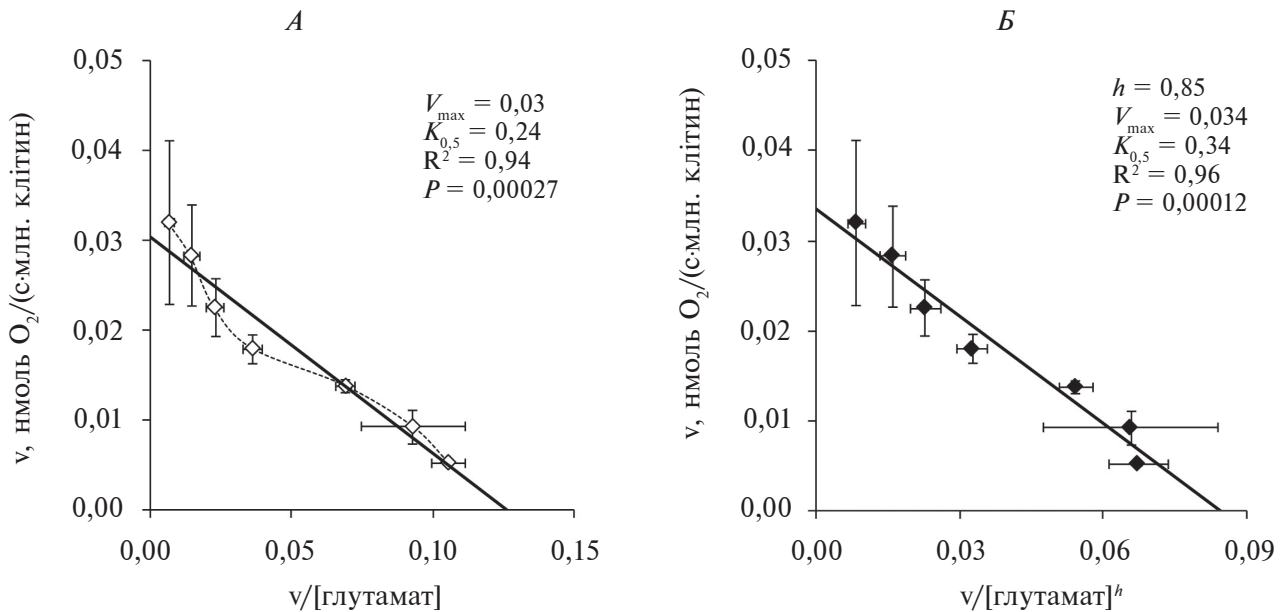


Рис. 5. Кінетична залежність окислення глутамату в пермеабілізованих ацинарних панкреацитах: А – розрахунки за рівнянням Міхаеліса–Ментен у координатах Іді–Гофсті (пряма лінія – апроксимована функція, штрихова лінія відображає реальну залежність); Б – розрахунки за рівнянням Хілла у координатах $\{v; v/[S]^h\}$; [сахароза] = 250 мМ, $[Ca^{2+}] = 10^{-7}$ М, [малат] = 1 мМ, [глутамат] = 0,05–5 мМ; $n = 3$

Кінетичні параметри дихання пермеабілізованих ацинарних панкреацитів за різних $[Ca^{2+}]$

$[Ca^{2+}]$, М	$K_{0,5}$, мМ	V_{max} , нмоль O_2 /(с·млн. клітин)	Коефіцієнт Хілла (h)
<i>Параметри сукцинатстимульованого дихання</i>			
10^{-8}	$1,28 \pm 0,06$	$0,40 \pm 0,01$	1,11
10^{-7}	$0,90 \pm 0,06$	$0,41 \pm 0,02$	1,43
5×10^{-7}	$1,16 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,02$	1,33
10^{-6}	$0,85 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,01$	1,40
<i>Параметри піруватстимульованого дихання</i>			
10^{-8}	$0,09 \pm 0,01$	$0,083 \pm 0,003$	1,47
10^{-7}	$0,09 \pm 0,01$	$0,077 \pm 0,002$	1,12
5×10^{-7}	$0,16 \pm 0,01$	$0,119 \pm 0,002$	0,86
10^{-6}	$0,09 \pm 0,01$	$0,140 \pm 0,002$	0,94
<i>Параметри глутаматстимульованого дихання</i>			
10^{-8}	$0,65 \pm 0,06$ (0,19)	$0,045 \pm 0,003$ (0,033)	0,60 (1)
10^{-7}	$0,34 \pm 0,03$ (0,15)	$0,034 \pm 0,002$ (0,030)	0,85 (1)
5×10^{-7}	$1,46 \pm 0,18$ (0,32)	$0,067 \pm 0,005$ (0,046)	0,50 (1)
10^{-6}	$0,39 \pm 0,04$ (0,28)	$0,045 \pm 0,003$ (0,043)	0,76 (1)

Параметри рівняння Хілла розраховано з використанням координат $\{v; v/[S]^h\}$; в дужках подано параметри, розраховані для рівняння Міхаеліса–Ментен за методом Корніш-Боудена; окислення пірувату чи глутамату досліджували за присутності малату (1 мМ), однак для розрахунку кінетичних параметрів частку впливу самого малату віднімали.

глутамату, що відображає складну взаємодію ензимів і транспортувальних систем із різною спорідненістю до глутамату: аспартат/глутаматного транспортера, аспартатамітотрансферази і глутаматдегідрогенази. Можливо, що в умовах також активна і α -кетоглутаратдегідрогеназа завдяки утворенню α -кетоглутарату із глутамату. Розрахована за рівнянням Хілла V_{\max} є досить низькою – $0,034 \pm 0,002$ нмоль O_2 /(с·млн. клітин), а $K_{0,5}$ – $0,34 \pm 0,03$ мМ.

Вплив Ca^{2+} на кінетичну залежність швидкості дихання від концентрації субстратів. Згідно із сучасними даними Ca^{2+} може відігравати важливу роль у регуляції мітохондріальних окисних процесів ацинарних панкреатитів [14–18]. Наведені вище результати одержані за 10^{-7} М Ca^{2+} у середовищі, що відповідає стану спокою клітини. Нас зацікавило питання, як змінюються кінетичні параметри дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів за зростання $[Ca^{2+}]$ в середовищі (а отже, й у цитозолі пермеабілізованих клітин).

У наших дослідженнях $[Ca^{2+}]$ у середовищах був на рівні 10^{-8} , 10^{-7} М (що відповідає стану спокою) або 5×10^{-7} і 10^{-6} М (відповідає стану генерації Ca^{2+} -сигналів) [38–40]. Дослідження впливу Ca^{2+} у вищих концентраціях, ніж у дослідженому нами діапазоні, стосується вже патологічних станів, оскільки в нормі у цитозолі ці концентрації навряд чи виникають.

З'ясувалося, що параметри рівняння Хілла дихання за окислення сукцинату у

присутності ротенону розраховані з використанням координат $\{v; v/[S]^h\}$, практично не залежать від $[Ca^{2+}]$ (рис. 6, табл.). Однак, за 10^{-8} М Ca^{2+} залежність є гіперболічною ($h = 1,11$), на відміну від інших випадків.

Ці результати свідчать про відсутність істотного впливу Ca^{2+} у досліджуваних концентраціях на метаболічний потік через систему окислення сукцинату, що складається, як мінімум, із транспортних систем для сукцинату, сукцинатдегідрогенази, комплексів III і IV дихального ланцюга. Окрім того відомо, що швидкість дихання у стані 3 за Чансом, тобто за насичуючих концентрацій субстратів окислення і ADP, значною мірою контролюється функціонуванням АТФ-синтази чи/і систем, що постачають її субстрати (транспортери аденілових нуклеотидів і фосфату) [8]. Наші дані дають можливість стверджувати, що активність цих систем не залежить від $[Ca^{2+}]$ у дослідженому діапазоні концентрацій сукцинату. Принаймні не відбувається достатніх змін жодної ланки, щоб вплинути на загальний метаболічний потік. З огляду на це Ca^{2+} , очевидно, не відіграє важливої ролі у фізіологічній регуляції задіяних в окисленні сукцинату мітохондріальних систем ацинарних панкреатитів.

Відомостей про регуляцію піруватдегідрогенази Ca^{2+} , одержаних на різних тканинах, досить багато [1–4, 9]. Однак такі дані відсутні для ацинарних клітин підшлункової залози, що й обумовило необхідність

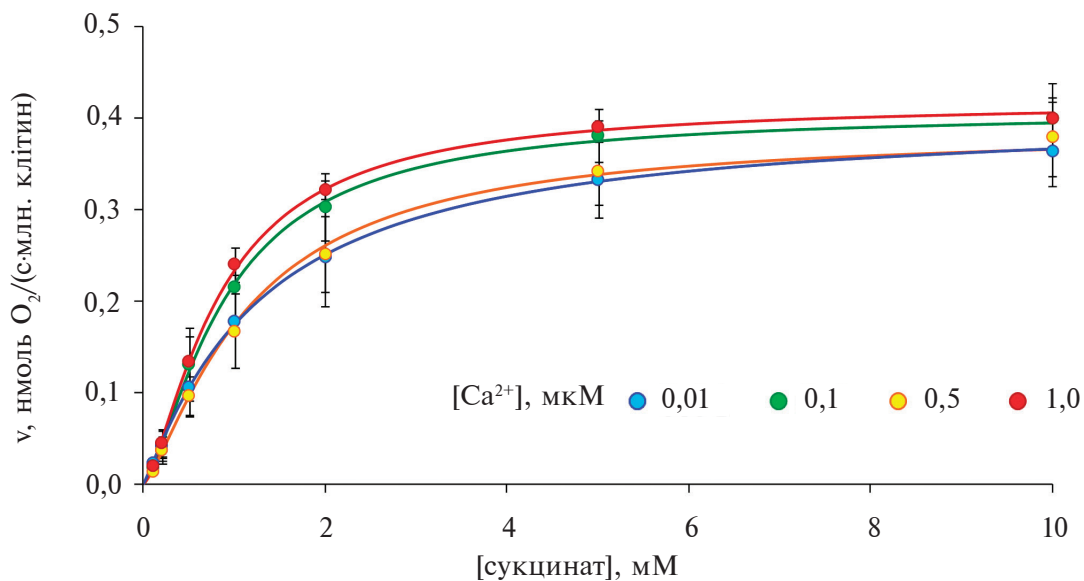


Рис. 6. Вплив Ca^{2+} на залежність швидкості дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів від концентрації сукцинату: криві будували за рівнянням Хілла; ендогенне дихання віднімали; $[сахароза] = 250$ мМ, $[ротенон] = 10$ мкМ, $[сукцинат] = 0,1$ – 10 мМ; $n = 3$

дослідження впливу Ca^{2+} на кінетичну залежність окислення пірувату.

Коефіцієнти Хілла близькі до 1 за всіх $[\text{Ca}^{2+}]$ (табл.), за винятком хіба що за 10^{-8} М Ca^{2+} . Однак це був єдиний випадок, коли h , розрахований у координатах Хілла (1,28), значно відрізняється від визначеного у координатах $\{v; v/[S]^h\}$ (1,47). Також за 10^{-8} М Ca^{2+} інші кінетичні параметри окислення пірувату, розраховані за рівнянням Хілла, істотно не відрізняються від одержаних за 10^{-7} М Ca^{2+} . Однак за підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ до 5×10^{-7} М одночасно спостерігається підвищення V_{\max} на 56% і зростання $K_{0,5}$ на 76%. За $[\text{Ca}^{2+}] 10^{-6}$ М V_{\max} ще більше зростає – на 83% порівняно з результатом за $[\text{Ca}^{2+}] 10^{-7}$ М, а $K_{0,5}$ не відрізняється від константи за 10^{-7} М $[\text{Ca}^{2+}]$ (табл., рис. 7). Отже, за зростання у середовищі $[\text{Ca}^{2+}]$ спостерігається двофазна зміна кінетики окислення пірувату. За 5×10^{-7} М Ca^{2+} зростає і V_{\max} , і $K_{0,5}$; за 10^{-6} М Ca^{2+} $K_{0,5}$ повертається до попереднього рівня, а V_{\max} продовжує зростати. Ці ефекти цілком пов'язані з окисленням пірувату, оскільки ні швидкість ендogenous дихання, ні швидкість дихання за окислення малату не залежить від $[\text{Ca}^{2+}]$. Підвищення V_{\max} за зростання $[\text{Ca}^{2+}]$ характерне для препаратів піруватдегідрогенази з інших тканин і відбувається внаслідок збільшення кількості активного нефосфорильованого ензиму [4]. На нашу думку, саме такий механізм функціонує і в ацинарних панкреацитах. Тим-

часове зниження $K_{0,5}$ (за підвищеного V_{\max}) насправді відображає відсутність ефекту Ca^{2+} за низьких концентрацій пірувату і його прояв – за високих. Механізм такого складного впливу Ca^{2+} необхідно з'ясувати в подальших дослідженнях.

Загалом, причиною зміни кінетичних параметрів дихання за окислення пірувату може бути регуляція на рівні комплексу 1 дихального ланцюга або/і ензимів циклу Кребса, зокрема піруватдегідрогенази.

Відомо, що катіони Ca^{2+} здатні регулювати мітохондріальне окислення, не транспортуючись у мітохондрії. Підвищення цитозольного рівня Ca^{2+} може спричинити активацію мітохондріальних транспортерів аспартату/глутамату, що прискорює транспортування NADH із цитозолу в мітохондрії шляхом активації малат-аспартатного човникового механізму [41]. Якщо робота дихального ланцюга в клітині лімітується наявністю NADH, це може інтенсифікувати дихання та окисне фосфорилування. Для перевірки, чи у ацинарних панкреацитах цей механізм відіграє важливу роль, ми дослідили вплив Ca^{2+} на кінетичну залежність окислення глутамату у присутності малату. За цих умов мають функціонувати системи малат-аспартатного човникового механізму.

Однак залежність розрахованих параметрів рівнянням Хілла від $[\text{Ca}^{2+}]$ за окислення глутамату є дуже складною і неоднозначною

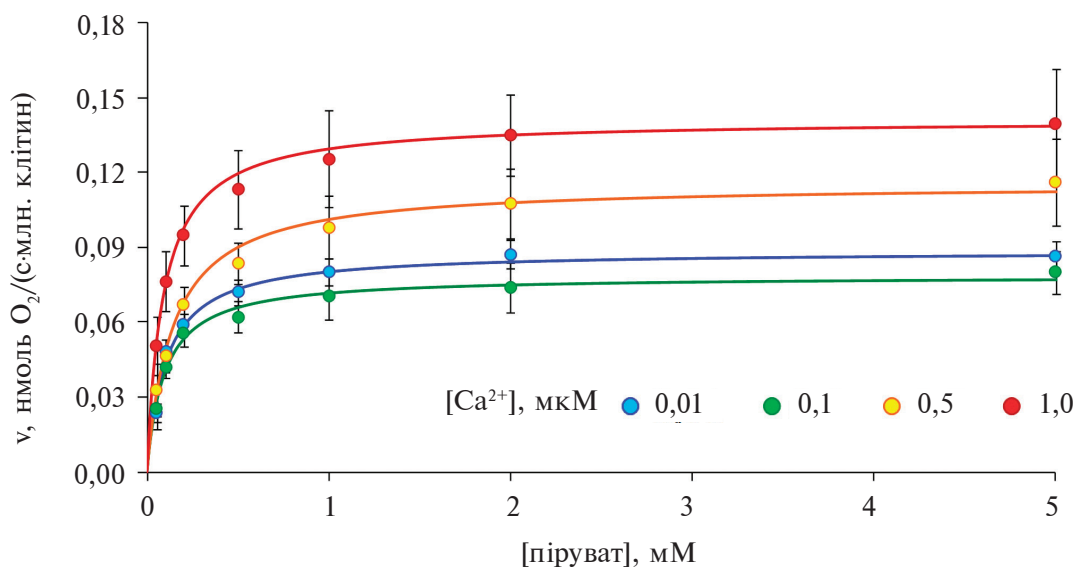


Рис. 7. Вплив Ca^{2+} на кінетику швидкості дихання пермеабілізованих ацинарних панкреацитів від концентрації пірувату: криві будували за рівнянням Міхаеліса–Ментен; малатстимульований компонент дихання віднімали; [сахароза] = 250 мМ, [малат] = 1 мМ, [піруват] = 0,05–5 мМ; $n = 4$

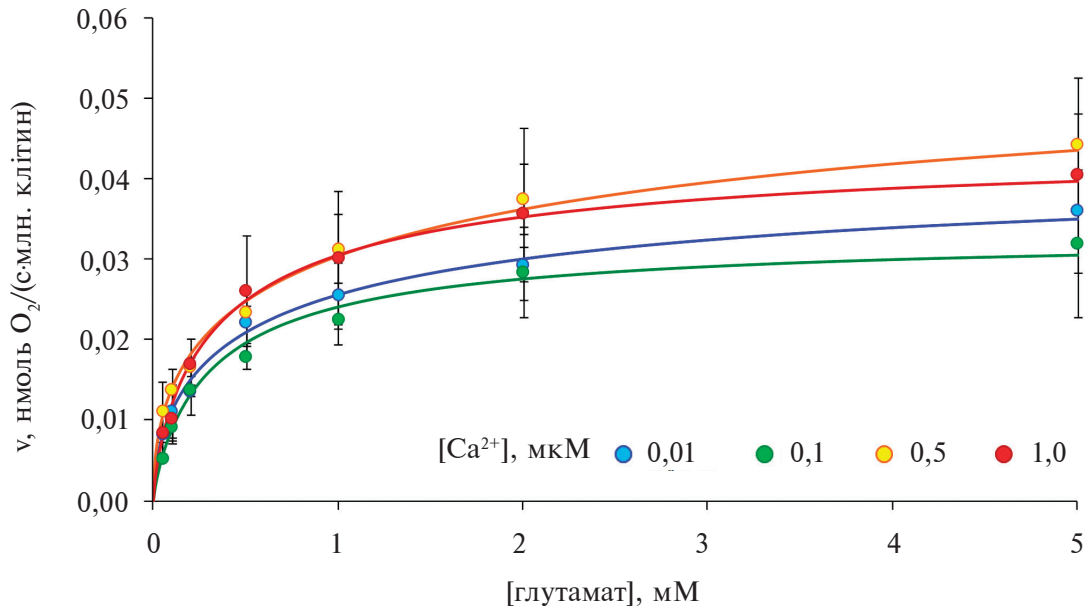


Рис. 8. Вплив Ca^{2+} на залежність швидкості дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів від концентрації глутамату: криві побудовані за рівнянням Хілла; ендогенне дихання віднімали; $[\text{сахароза}] = 250 \text{ мМ}$, $[\text{малат}] = 1 \text{ мМ}$, $[\text{глутамат}] = 0,05\text{--}5 \text{ мМ}$; $n = 3$

(табл., рис. 8). Зокрема, виявлено значні коливання коефіцієнта Хілла. У разі застосування рівняння Міхаеліса–Ментен розраховані за методом Корніш–Бодена кінетичні параметри істотно відрізняються від попередніх. У цьому разі спостерігається тенденція до зростання як V_{max} , так і $K_{0,5}$ за $[\text{Ca}^{2+}]$ 5×10^{-7} і 10^{-6} М , що не свідчить ні на користь інгібування, ні активації катіонами Са окислення глутамату.

Отже, ми не виявили чіткої залежності кінетики окислення глутамату від $[\text{Ca}^{2+}]$. Можна припустити, що у ацинарних клітинах підшлункової залози Ca^{2+} суттєво не впливають на функціонування систем окислення глутамату та малат–аспартатного човникового механізму перенесення NADH. Однак варто зазначити, що швидкості дихання за окислення глутамату були дуже низькими порівняно із відповідними швидкостями за окислення інших субстратів. Більше того, криві індивідуальних експериментів сильно варіювали, незалежно від $[\text{Ca}^{2+}]$. Обидва фактори зменшують точність розрахунків (особливо за низьких концентрацій субстрату) та обмежують наші можливості інтерпретувати одержані дані. Цілком можливо, що дослідження кінетичної залежності за окислення є неточним внаслідок відносно високого ендогенного дихання. Однак поки що ми

не знаємо експериментального рішення, що дозволило б одночасно усунути ендогенне дихання та досліджувати кінетичні залежності за окислення NAD-залежних субстратів.

Внаслідок проведених досліджень з'ясовано кінетичну залежність швидкості дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів від концентрації субстратів циклу Кребса. Показано, що окислення пірувату або глутамату необхідно досліджувати у присутності малату. Кінетична залежність дихання за окислення пірувату описується рівнянням Міхаеліса–Ментен, а у разі окислення сукцинату чи глутамату – рівнянням Хілла. За підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ до 5×10^{-7} або 10^{-6} М істотно зростає V_{max} за окислення пірувату, але не сукцинату чи глутамату. Ці дані можна розцінювати як підтвердження активації піруватдегідрогенази за зростання $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозолі ацинарних клітин підшлункової залози. Вивчення кінетичних параметрів дихання мітохондрій *in situ*, на нашу думку, знайде широке застосування в дослідженні біохімічних та фізіологічних механізмів впливу різноманітних чинників на особливості мітохондріального дихання за збереження мітохондрій в їх природному оточенні – у клітині.

ВЛИЯНИЕ Ca^{2+} НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ *IN SITU* АЦИНАРНЫХ ПАНКРЕАЦИТОВ

Б. А. Манько, В. В. Манько

Львовский национальный университет
имени Ивана Франко, Украина;
e-mail: mankobo@gmail.com

Исследована зависимость скорости дыхания пермеабелизованных ацинарных панкреатитов крыс от концентрации в среде субстратов цикла Кребса при различных $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-8}$ – 10^{-6} М. Панкреатиты пермеабелизовали дигитонином в расчете 50 мкг на 1 млн клеток. Скорость дыхания определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка при окислении сукцината, а также пирувата или глутамата в присутствии малата. Параметры уравнения Михаэлиса–Ментен рассчитывали методом Корниш–Боудена или с использованием координат Иди–Хофсти, а параметры уравнения Хилла – координат $\{v; v/[S]^h\}$. В исследуемом диапазоне $[\text{Ca}^{2+}]$ кинетическая зависимость дыхания окисления пирувата описывается уравнением Михаэлиса–Ментен, а окисления сукцината или глутамата – уравнением Хилла с $h = 1,11$ – $1,43$ и $0,50$ – $0,85$ соответственно. Кажущаяся константа полуактивации дыхания ($K_{0,5}$) не испытывала существенных изменений в исследуемом диапазоне $[\text{Ca}^{2+}]$ и при 10^{-7} М Ca^{2+} составила для сукцината $0,90 \pm 0,06$ мМ, пирувата – $0,096 \pm 0,007$ мМ, глутамата – $0,34 \pm 0,03$ мМ. Максимальная скорость дыхания V_{\max} при окислении пирувата увеличилась от $0,077 \pm 0,002$ до $0,119 \pm 0,002$ и $0,140 \pm 0,002$ нмоль $\text{O}_2/(\text{с}\cdot\text{млн клеток})$ вследствие повышения $[\text{Ca}^{2+}]$ от 10^{-7} до 5×10^{-7} или 10^{-6} М соответственно. При окислении сукцината или глутамата ионы Ca^{2+} существенно не влияют на V_{\max} . Следовательно, повышение $[\text{Ca}^{2+}]$ стимулирует дыхание митохондрий ацинарных панкреатитов в условиях *in situ* при окислении экзогенного пирувата (вследствие, очевидно, активации пируватдегидрогеназы), но не сукцината или глутамата.

Ключевые слова: ацинарные панкреатиты, митохондрии *in situ*, дыхание, Ca^{2+} , пируват, сукцинат, глутамат, кинетика, уравнение Хилла, уравнение Михаэлиса–Ментен.

INFLUENCE OF Ca^{2+} ON KINETIC PARAMETERS OF PANCREATIC ACINAR MITOCHONDRIA *IN SITU* RESPIRATION

B. O. Manko, V. V. Manko

Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;
e-mail: mankobo@gmail.com

The dependence of respiration rate of rat permeabilized acinar pancreaticocytes on oxidative substrates concentration was studied at various $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-8}$ – 10^{-6} M. Pancreaticocytes were permeabilized with 50 μg of digitonin per 1 million cells. Respiration rate was measured polarographically using the Clark electrode at oxidation of succinate or pyruvate either glutamate in the presence of malate. Parameters of Michaelis-Menten equation were calculated by the method of Cornish-Bowden or using Idi-Hofsti coordinates and parameters of Hill equation – using coordinates $\{v; v/[S]^h\}$. In the studied range of $[\text{Ca}^{2+}]$ the kinetic dependence of respiration at pyruvate oxidation is described by the Michaelis-Menten equation, and at oxidation of succinate or glutamate – by Hill equation with $h = 1.11$ – 1.43 and 0.50 – 0.85 , respectively. The apparent constant of respiration half-activation ($K_{0,5}$) did not significantly change in the studied range of $[\text{Ca}^{2+}]$ while at 10^{-7} M Ca^{2+} it was 0.90 ± 0.06 mM for succinate, 0.096 ± 0.007 mM for pyruvate and 0.34 ± 0.03 mM for glutamate. Maximum respiration rate V_{\max} at pyruvate oxidation increased from 0.077 ± 0.002 to 0.119 ± 0.002 and 0.140 ± 0.002 nmol $\text{O}_2/(\text{s}\cdot\text{million cells})$ due to the increase of $[\text{Ca}^{2+}]$ from 10^{-7} to 5×10^{-7} or 10^{-6} M, respectively. At oxidation of succinate or glutamate Ca^{2+} did not significantly affect V_{\max} . Thus, the increase of $[\text{Ca}^{2+}]$ stimulates respiration of mitochondria *in situ* of acinar pancreaticocytes at oxidation of exogenous pyruvate (obviously due to pyruvate dehydrogenase activation), but not at succinate or glutamate oxidation.

Key words: acinar pancreaticocytes, mitochondria *in situ*, respiration, Ca^{2+} , pyruvate, succinate, malate, kinetics, Hill equation, Michaelis-Menten equation.

1. Denton R. M., Randle P. J., Martin B. R. // Biochem. J. – 1972. – **128**. – P. 161–163.
2. Denton R. M., McCormack J. G., Edgell N. J. // Biochem. J. – 1980. – **190**. – P. 107–117.

3. *Denton R. M., McCormack J. G., Rutter G. A. et al.* // *Adv. Enzyme Regul.* – 1996. – **36**. – P. 183–198.
4. *McCormack J. G., Denton R. M.* // *Biochem. J.* – 1980. – **190**. – P. 95–105.
5. *Denton R. M., Richards D. A., Chin J. G.* // *Biochem. J.* – 1978. – **176**. – P. 899–906.
6. *McCormack J. G., Denton R. M.* // *Biochem. J.* – 1981. – **196**. – P. 619–624.
7. *McCormack J. G., Denton R. M.* // *Biochem. J.* – 1979. – **180**. – P. 533–544.
8. *Brown G. C.* // *Biochem. J.* – 1992. – **284**. – P. 1–13.
9. *Robb-Gaspers L. D., Burnett P., Rutter G. A. et al.* // *EMBO J.* – 1998. – **17**. – P. 4987–5000.
10. *Jouaville L. S., Pinton P., Bastianutto C. et al.* // *PNAS.* – 1999. – **96**, N 24. – 13807–13812.
11. *Bruce J. I. E., Giovannucci D. R., Blinder G. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, N 13. – P. 12909–12917.
12. *Chalmers S., McCarron J. G.* // *J. Cell Sci.* – 2008. – **121**. – P. 75–85.
13. *Великопольська О. Ю., Манько Б. О., Манько В. В.* // *Укр. біохім. журн.* – 2012 – **84**, № 5. – С. 76–88.
14. *Voronina S., Sukhomlin T., Johnson P. R. et al.* // *J. Physiol.* – 2002. – **539**. – P. 41–52.
15. *Bauduin H., Colin M., Dumont J. E.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1969. – **174**. – P. 722–733.
16. *Manko B. O., Manko V. V.* // *Acta Physiol. (Oxf.)*. – 2013. doi: 10.1111/apha.12119.
17. *Voronina S. G., Barrow S. L., Gerasimenko O. V. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**. – P. 27327–27338.
18. *Voronina S. G., Barrow S. L., Simpson A. W. et al.* // *Gastroenterology.* – 2010. – **138**. – 1976–1987.
19. *Manko B. O., Klevets M. Yu., Manko V. V.* // *Cell Biochem. Funct.* – 2013. – **31**(2). – P. 115–121.
20. *Williams J. A., Korc M., Dormer R. L.* // *Am. J. Physiol.* – 1978. – **235**. – P. 517–524.
21. *Chance B., Williams G. R.* // *J. Biol. Chem.* – 1955. – **217**. – P. 409–427.
22. *Saks V. A., Belikova Y. O., Kuznetsov A. V. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – **1074**. – P. 302–311.
23. *Kuznetsov A. V., Veksler V., Gellerich F. N. et al.* // *Nat. Protoc.* – 2008. – **3**. – P. 965–976.
24. *Мерлавський В. М., Манько Б. О., Іккерт О. В., Манько В. В.* // *Біологічні студії / Studia Biologica* – 2010. – **4**, № 3. – С. 15–22.
25. *Carpenter J. H.* // *Limnol. Oceanogr.* – 1966. – **11**. – P. 264–277.
26. *Eisenthal R., Cornish-Bowden A.* // *Biochem. J.* – 1974. – **139**. – P. 715–720.
27. *Eadie G. S.* // *J. Biol. Chem.* – 1942. – **146**. – P. 58–93.
28. *Hofstee B. H. J.* // *J. Biol. Chem.* – 1952. – **199**. – P. 357–364.
29. *Манько В. В.* // *Біологічні студії / Studia Biologica* – 2007. – **1**, № 1. – С. 5–18.
30. *Childs R. E., Bardsley W. G.* // *J. Theor. Biol.* – 1976. – **63**. – P. 1–18.
31. *Neet K. E.* // *Meth. Enzymol.* – 1995. – **249**. – P. 519–567.
32. *Reed L. J., Yeaman S. J.* // *Enzymes.* – 1987. – **18**. – P. 77–95.
33. *Minarik P., Tomasková N., Kollarova M., Antalík M.* // *Gen. Physiol. Biophys.* – 2002. – **21**. – P. 257–265.
34. *Messer J. I., Jackman M. R., Willis W. T.* // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2004. – **286**. – P. C565–572.
35. *Gnaiger E.* / Steiger Druck GmbH, Axams, Austria, 2007. – 97 p.
36. *Rasmussen U. F., Rasmussen H. N.* // *Mol. Cell. Biochem.* – 2000. – **208**. – P. 37–44.
37. *Puchowicz M. A., Varnes M. E., Cohen B. H. et al.* // *Mitochondrion.* – 2004. – **4**. – P. 377–385.
38. *Thorn P., Lawrie A. M., Smith P. M. et al.* // *Cell* – 1993. – **74**. – P. 661–666.
39. *Straub S. V., Giovannucci D. R., Yule D. I.* // *J. Gen. Physiol.* – 2000. – **116**. – P. 547–559.
40. *Cancela J. M., Van Coppenolle F., Galione A. et al.* // *EMBO J.* – 2002. – **21**. – P. 909–919.
41. *Satrústegui J., Pardo B., Del Arco A.* // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**. – P. 29–67.

Отримано 11.01.2013