

## ВПЛИВ $\text{Ca}^{2+}$ НА ПРОЦЕСИ ДИХАННЯ ГЕПАТОЦИТІВ ЗА УМОВ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

В. Мерлавський, О. Іккерт, В. Манько\*

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: vvmanko@lnu.edu.ua*

Дослідження проведені на нелінійних щурах-самцях масою 180–220 г, які були поділені на дві групи – контрольну (введення фізіологічного розчину, 1 мл) та дослідну (внутрішньоочеревинне одноразове введення розчину стрептозотозину, 50 мг/кг). Дихання інтактних гепатоцитів реєстрували за окиснення ендогенних субстратів і додавання динітрофенолу (0,1 ммоль/л), а пермеабілізованих – за окиснення ендогенних і екзогенних субстратів – суміші пірувату, малату і глутамату (по 5 ммоль/л) чи сукцинату (5 ммоль/л), та додавання АДФ (750 мкмоль/л) і динітрофенолу (0,1 ммоль/л). Кінетичні параметри сукцинатстимульованого дихання досліджували, додаючи сукцинат у концентраціях від 0,1 до 5 ммоль/л до суспензії пермеабілізованих гепатоцитів, яка містила АДФ і ротенон. Встановлено, що на ранніх стадіях розвитку стрептозотозиніндукованого цукрового діабету відбувається інтенсифікація енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки. Так, швидкість дихання інтактних гепатоцитів діабетичних тварин є на 40,8% більшою, ніж у контролі. За додавання суміші пірувату, малату і глутамату (стан  $S_4$ ) спостерігали інтенсифікацію споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами контрольних щурів за всіх концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі (0,01, 0,1, 1 і 10 мкмоль/л) до практично одного і того ж рівня. У тварин із модельованим діабетом найбільша інтенсифікація дихання цієї сумішшю спостерігається за 10 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Наступне внесення АДФ (стан  $S_3$ ) збільшує швидкість дихання у контролі лише за 0,01 і 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. У діабетичних тварин АДФ-стимульоване дихання є максимальним за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Подібна залежність швидкості субстрат- і АДФ-стимульованого дихання від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі спостерігається і за окиснення сукцинату. Крім того, за окиснення сукцинату максимальна функціональна здатність мітохондрій (відповідь на додавання АДФ і динітрофенолу) у контрольних тварин спостерігається, коли в середовищі 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , а у дослідних – коли в середовищі 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . За низької концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 мкмоль/л) коефіцієнт Хілла  $h$  і  $V_{\max}$  сукцинатстимульованого дихання мітохондрій діабетичних тварин зменшуються. За 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі ці параметри залишаються такими ж, як і в контролі, що теж зумовлено, очевидно, зменшенням чутливості мітохондрій до його токсичних концентрацій.

Отже, на ранніх етапах розвитку стрептозотозиніндукованого діабету інтенсифікується дихання гепатоцитів завдяки, зокрема, підвищенню стійкості до токсичних кількостей  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій.

*Ключові слова:* гепатоцити, клітинне дихання,  $\text{Ca}^{2+}$ , діабет, стрептозотозин.

Печінка є ключовим органом в організмі, який визначає інтенсивність чи не всіх метаболічних процесів і, зокрема, енергетичного обміну. Її функціонування чітко регулюється нервовими і гуморальними чинниками, одним із яких є інсулін [19]. Основним типом клітин у печінці (до 80 %) є гепатоцити [22]. Мітохондрії саме гепатоцитів є центральною ланкою біохімічних трансформацій, залучених у енергетичний метаболізм. Суттєвий вплив на функціонування мітохондрій мають катіони  $\text{Ca}^{2+}$  [5, 10, 15]. Піруват-, ізоцитрат-,

$\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази активуються  $\text{Ca}^{2+}$ , що призводить до зростання рівня окисненого НАД<sup>+</sup> та збільшення мембранного потенціалу мітохондрій [10]. Важливим регулятором нормального функціонування мітохондрій і підтримання їхнього мембранного потенціалу є мітохондріальна пора неспецифічної проникності (mitochondrial permeability transition pore) – високоселективний потенціалзалежний іонний канал у внутрішній мембрані мітохондрій, який пропускає молекули розміром до 1,5 кДа [11]. Перевантаження мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$ , яке виникає за високих його концентрацій у цитозолі, призводить до їх набрякання, руйнування зовнішньої мембрани та виходу цитохрому *c* та інших проапоптичних факторів у цитозоль [11]. Саме з відкриттям пори неселективної проникності пов'язують деякі патологічні зміни, які виникають під час розвитку цукрового діабету [17, 18, 24]. Метою роботи було дослідити процеси дихання ізольованих гепатоцитів щурів у середовищах із різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету.

#### Матеріали та методи

Дослідження виконували на нелінійних щурах-самцях масою 180–220 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні, поділивши на контрольну та дослідну групи. Щурам дослідної групи внутрішньоочеревинно одноразово вводили розчин стрептозоточину (50 мг/кг), а тваринам контрольної групи – фізіологічний розчин (1 мл). Розвиток цукрового діабету контролювали за вмістом глюкози у крові, який визначали глюкозооксидазним методом із використанням стандартного набору реактивів (Філісіт-Діагностика, Україна) на 3-тю і 14-ту добу після введення стрептозоточину. Для подальших досліджень використовували тварин, рівень глюкози у крові яких становив не менше 14 ммоль/л (після 18-годинного голодування).

На 15-й день експерименту тварин наркотизували діетиловим ефіром, декапітували та швидко виділяли печінку. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена [21]. Після декапітації тварини печінку виділяли та промивали безкальцієвим позаклітинним розчином для відмивання від крові. Далі перфузували розчином колагенази (120 од./мл) впродовж 10–15 хв. Після завершення руйнування колагенового матриксу печінку промивали базовим позаклітинним розчином. Усі процедури виконували за температури 37°C. Після перфузії печінку поміщали у базовий позаклітинний розчин та ізолювали гепатоцити легким піпетуванням. Суспензію фільтрували від згустків клітин через нейлоновий фільтр і тричі центрифугували при 50 g для вилучення метаболітів, залишків позаклітинного матриксу та пошкоджених клітин. Для перевірки цілісності плазматичних мембран гепатоцити фарбували 0,1% розчином трипанового синього. Частка клітин із цілісною плазматичною мембраною становила 81–94%. Їх підрахунок виконували за допомогою камери Горяєва.

Далі визначали швидкість споживання кисню інтактними гепатоцитами за окиснення ними ендогенних субстратів. Для детальнішого дослідження енергетичних процесів клітини пермеабілізували дигітоніном (50 мкг/млн клітин) у внутрішньоклітинному розчині за температури 37°C. Інтенсивність дихання як інтактних, так і пермеабілізованих гепатоцитів оцінювали, використовуючи полярографічний метод. Значення дифузного струму реєстрували за допомогою установки, складеної на базі електрода Кларка, кисневого монітора YSI 5300, мультиметра UT60E, магнітної мішалки для розмішування суспензії та скляної термостатованої закритої комірки, об'ємом 1,6 мл.

Дослідження проводили за окиснення інтактними та пермеабілізованими клітинами печінки ендогенних субстратів, а потім – за додавання до суспензії пермеабілізованих

гепатоцитів суміші субстратів – пірувату, малату і глутамату (по 5 ммоль/л) чи сукцинату (5 ммоль/л), а також АДФ (750 мкмоль/л) та динітрофенолу (ДНФ; 0,1 ммоль/л) за різного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі (0,01, 0,1, 1 і 10 мкмоль/л).

Для дослідження кінетичних параметрів процесів окиснення сукцинату його додавали у полярографічну комірку в наростаючих концентраціях (від 0,1 до 5 ммоль/л) у середовищах, які містили 750 мкмоль/л АДФ, 0,1 або 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  та без чи з інгібітором комплексу I дихального ланцюга ротеноном (10 мкмоль/л). Концентрацію вільного  $\text{Ca}^{2+}$  було розраховано за допомогою програми Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 (<http://maxchelator.stanford.edu>).

Необхідні статистичні обчислення виконували за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*, коефіцієнт достовірності різниці між двома статистичними групами визначали за Ст'юдентом (P) [1].

Кінетичні параметри рівняння Хілла обчислювали, лінеаризуючи залежність швидкості дихання від концентрації субстрату в модифікованих координатах Іді-Хофсті  $\{v; v/[S]^h\}$  методом ітерації показника  $h$  так, щоб коефіцієнт апроксимації  $R^2$  був максимально наближеним до 1 [2]. Вірогідність апроксимації визначали із застосуванням F-статистики. Апроксимацію вважали вірогідною за значення  $P \leq 0,05$ .

#### Результати і їхнє обговорення

На сьогодні дані щодо змін процесів енергетичного забезпечення у мітохондріях за умов цукрового діабету є суперечливими [8, 16, 20, 25]. Так, у публікаціях Олівейри повідомляється про зниження споживання кисню мітохондріями серця щурів зі стрептозотозиніндукованим діабетом [16]. Те ж саме показано в роботах на мітохондріях печінки [20]. І навпаки, Сінг і співавт. [23] зареєстрували збільшення швидкостей дихання клітин нирок, а Гартман і співавт. [12] – мононуклеарних клітин периферійної крові.

Нами встановлено, що на ранніх стадіях розвитку стрептозотозиніндукованого цукрового діабету відбувається інтенсифікація енергетичних процесів у мітохондріях клітин печінки. Так, швидкість дихання інтактних гепатоцитів за окиснення ендогенних субстратів діабетичних тварин є на 40,8% більшою, ніж у контролі ( $P < 0,05$ ,  $n = 5-6$ ), а максимальна окисна здатність, оцінена за дії ДНФ, є меншою у тварин із модельованим діабетом (збільшення швидкості споживання кисню під впливом ДНФ на 80%, а у контролі – на 145%), що, на нашу думку, зумовлене вищим вихідним рівнем клітинного дихання у них. Завдяки чому це відбувається? Щоб відповісти на це питання, необхідно дослідити, за окиснення яких субстратів інтенсифікується дихання у хворих тварин.

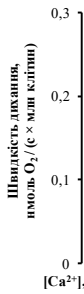
Зважаючи на те, що глюкоза у процесі гліколізу метаболізується у піруват, який окиснюється в циклі трикарбонних кислот, ми оцінювали зміни процесів дихання за додавання суміші субстратів (малату, глутамату і пірувату) до суспензії пермеабілізованих гепатоцитів у різних станах за Чансом. За додавання лише цієї суміші субстратів (стан  $S_4$ ) спостерігали інтенсифікацію споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами контрольних щурів за всіх концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  до практично одного і того ж рівня (рис. 1, А). Тоді як внесення АДФ (стан  $S_3$ ) збільшує швидкість дихання лише за 0,01 і 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі.

ДНФ не має вираженого ефекту на інтенсивність споживання кисню гепатоцитами контрольних тварин за всіх концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ .

У тварин із модельованим діабетом (рис. 1, Б) за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  виявлено такі ж, як і у контрольних, закономірності окиснення суміші малату, глутамату і пірувату. Але у середовищах з 0,01 та 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  дихальні контролю за Ларді (відношення швидкості

дихання у стані  $S_3$  до швидкості дихання у стані  $S_4$ ) у дослідних щурів є достовірно більшими (на 20,0 і 97,4% відповідно,  $P < 0,01$  і  $P < 0,001$ ,  $n = 5-6$ ), ніж у контрольних тварин.

**A**



**B**

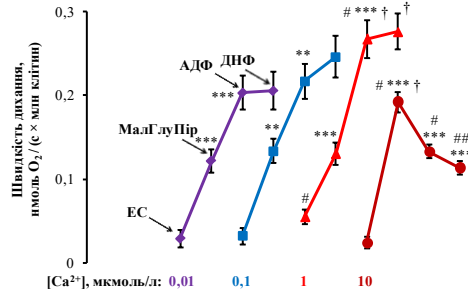
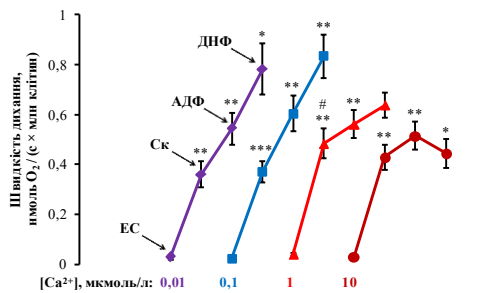


Рис. 1. Споживання кисню пермеабілізованими гепатоцитами за окиснення суміші малату, глутамату і пірватату у середовищах із різними концентраціями  $Ca^{2+}$  в контролі (A) та за діабету (B): ЕС – ендогенні субстрати, МалГлуПір – суміш 5 ммоль/л малату, 5 ммоль/л глутамату і 5 ммоль/л пірватату, [АДФ]=0,75 ммоль/л, [ДНФ]=0,1 ммоль/л; \* – зміни достовірні щодо попереднього показника з  $P \leq 0,05$ , \*\* – з  $P \leq 0,01$ , \*\*\* – з  $P \leq 0,001$ ; # – зміни достовірні щодо відповідного показника за 0,1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  з  $P \leq 0,05$ , ## – з  $P \leq 0,01$ ; † – зміни достовірні щодо відповідного показника у контролі з  $P \leq 0,05$ .

За 10 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  швидкість дихання гепатоцитів діабетичних щурів у стані  $S_4$  є найбільшою, порівняно зі середовищами з іншими концентраціями  $Ca^{2+}$ , але після внесення АДФ за таких умов швидкість споживання кисню є достовірно меншою на 30,6% ( $P < 0,001$ ,  $n = 6$ ); водночас у контролі статистично достовірних змін не зареєстровано.

За окиснення сукцинату швидкість дихання пермеабілізованих гепатоцитів контрольних щурів виявилася найвищою за 1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  (рис. 2, A), тоді як подальші послідовні додавання АДФ і ДНФ стимулювали дихання гепатоцитів лише за нижчих концентрацій  $Ca^{2+}$  (0,01 і 0,1 мкмоль/л).

**A**



**B**

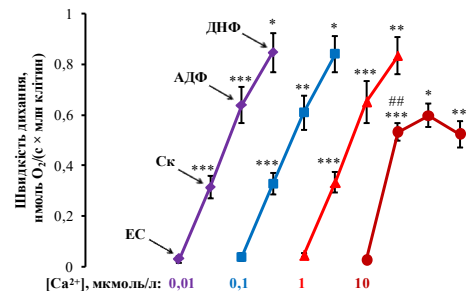


Рис. 2. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату в середовищах із різними концентраціями  $Ca^{2+}$  в умовах контролю (A) і модельованого діабету (B): Ск – 5 ммоль/л сукцинату, [АДФ]=0,75 ммоль/л, [ДНФ]=0,1 ммоль/л; \* – зміни достовірні щодо попереднього показника з  $P \leq 0,05$ , \*\* – з  $P \leq 0,01$ , \*\*\* – з  $P \leq 0,001$ , # – зміни достовірні щодо відповідного показника за 0,1 мкмоль/л  $Ca^{2+}$  з  $P \leq 0,05$ , ## – з  $P \leq 0,01$ .

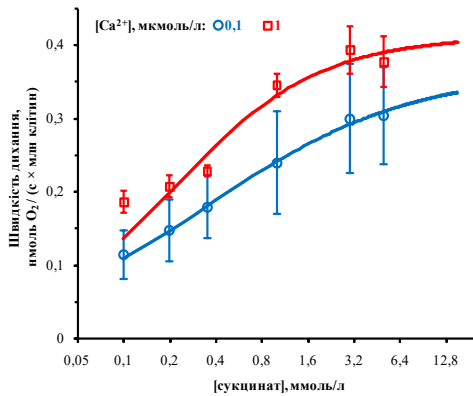
У тварин із модельованим діабетом залежність швидкості дихання пермеабілізованих гепатоцитів від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі за окиснення сукцинату (як і суміші малату, глутамату і пірватату) є іншою. Найбільше цей субстрат інтенсифікує споживання кисню за 10 мкмоль/л  $Ca^{2+}$ , а наступні додавання АДФ і ДНФ стимулювали дихання на відміну від контролю вже за трьох концентрацій  $Ca^{2+}$  – 0,01, 0,1 і 1 мкмоль/л. За окиснення

сукцинату гепатоцитами тварин-діабетиків у середовищах з 0,01 і 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  дихальні контролю за Ларді є достовірно більшими, ніж у контрольних шурів, на 35,9 ( $P < 0,01$ ,  $n = 5-6$ ) та 66,5% ( $P < 0,001$ ,  $n = 5-6$ ) відповідно.

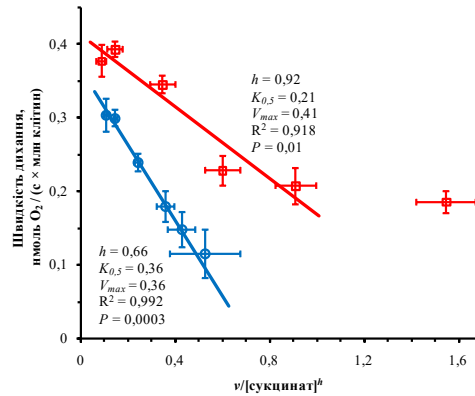
У подальших дослідженнях ми визначали кінетичні параметри дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату в середовищах з  $[\text{Ca}^{2+}]$  0,1 і 1 мкмоль/л. Такі концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  було обрано, враховуючи те, що максимальна функціональна здатність мітохондрій (відповідь на додавання АДФ і ДНФ) у контрольних тварин спостерігається за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, а за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  – у дослідних.

Виявлено, що кінетика процесів дихання гепатоцитів за обох концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  добре описується рівнянням Хілла як у контролі, так і за умов стрептозоциніндукованого діабету (рис. 3). За вищої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  коефіцієнт Хілла  $h$  є дещо більшим, порівняно з 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , як у контрольній, так і в дослідній групі шурів. Близькість коефіцієнта  $h$  до 1 за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі свідчить про відсутність вираженої кооперативності за таких умов. За низької ж концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  коефіцієнт  $h$  суттєво менший 1 – внаслідок наявності негативної кооперативності, спричиненої підтоком ендогенних субстратів.

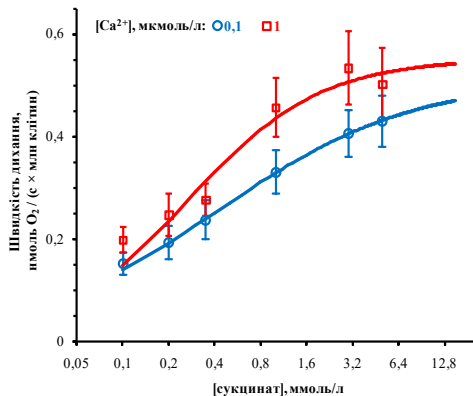
A



B



B



Г

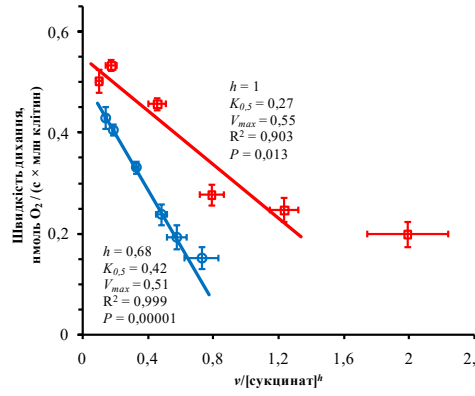
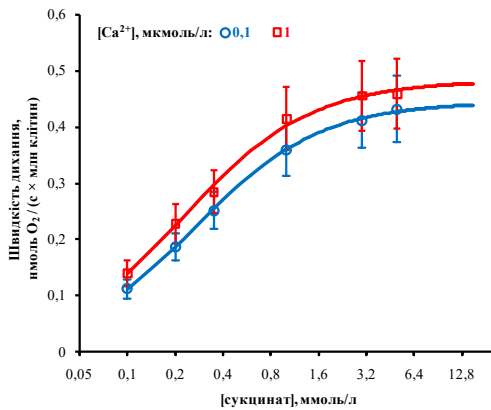


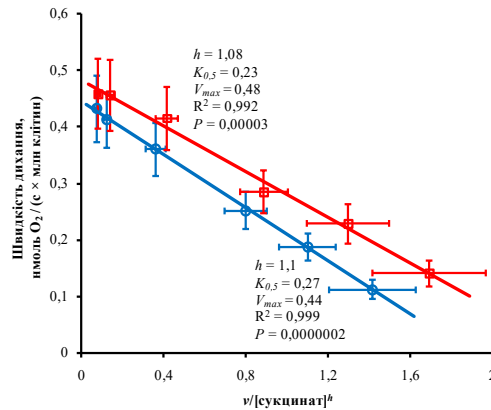
Рис. 3. Кінетичні параметри дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату в середовищах з 0,1 і 1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ : A і B – концентраційна залежність впливу сукцинату в напівлогарифмічних координатах у контролі та за діабету відповідно; B і Г – лінеаризація у виводжених координатах Іді-Хофсті у контролі та за діабету; при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості дихання від концентрації сукцинату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [сукцинат]=0,1–5 ммоль/л.

З метою визначення кінетичних параметрів окиснення лише сукцинату, без впливу НАД-залежних субстратів (дегідрогенази яких є  $\text{Ca}^{2+}$ -регульованими), ми використали інгібітор комплексу I дихального ланцюга мітохондрій – ротенон [7]. Унаслідок його застосування (рис. 4) у контролі спостерігається нівелювання різниці між значеннями коефіцієнта Хілла за різних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ , причому  $h$  стає дещо більшим від 1 в обох випадках. Як висновок описана негативна кооперативність за низьких концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  у попередньому досліді дійсно зумовлена підтоком ендогенних НАД-залежних субстратів. Крім того, слід зазначити, що за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у контрольних щурів унаслідок інгібування ротеноном комплексу I дихального ланцюга нівелюється розвиток субстратного інгібування за найвищої концентрації сукцинату (5 ммоль/л). Цілком можливо, що ці два параметри залежності мітохондріального дихання від концентрації сукцинату за відсутності ротенону – негативна кооперативність і розвиток субстратного інгібування – мають одну й ту ж природу.

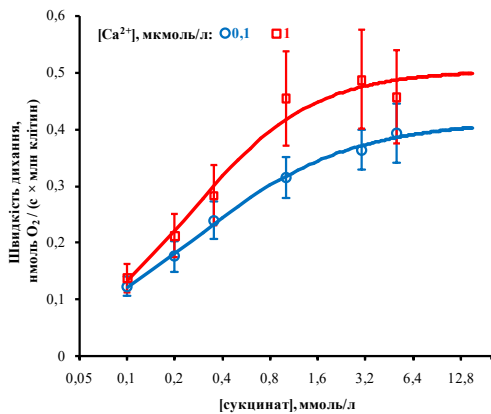
**A**



**Б**



**В**



**Г**

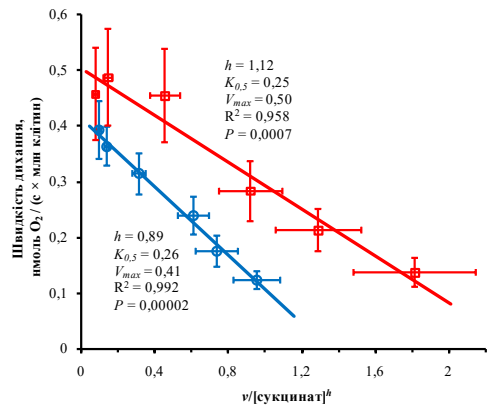


Рис. 4. Кінетична залежність швидкості дихання пермеабілізованих клітин печінки від концентрації сукцинату за наявності ротенону в середовищах з  $[\text{Ca}^{2+}]$  0,1 і 1 мкМ: А і В – концентраційна залежність впливу сукцинату на фоні ротенону в напівлогарифмічних координатах у контролі (А) та за умов діабету (В); Б і Г – лінеаризація у змінених координатах Іді–Хофсті, у контролі (Б) та за умов діабету (Г), позначення, як на графіку А; при розрахунках кінетичних параметрів залежності швидкості споживання кисню від концентрації сукцинату віднімали показник швидкості дихання, який був після додавання АДФ; [ротенон]=10 мкМ, [сукцинат]=0,1–5 мМ, n=4.

У діабетичних щурів коефіцієнт Хілла за нижчої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  є меншим від 1 ( $h=0,89$ ), а за вищої – таким як у контролі ( $h=1,12$ ). Отже, за нижчої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  і без підтоку НАД-залежних субстратів у дихальній системі мітохондрій діабетичних щурів виникає негативна кооперативність.

У той же час константа напівактивації  $K_{0,5}$  трохи зменшується зі збільшенням  $[\text{Ca}^{2+}]$  (причому як у контролі, так і за модельованого діабету) лише коли комплекс I дихального ланцюга є незайнятий ротеноном. Це переконливо доводить, що трохи більша швидкість мітохондріального дихання за окиснення сукцинату зумовлена окисненням ендогенних субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ.

Значення максимальної швидкості  $V_{max}$  мітохондріального дихання за окиснення сукцинату в усіх випадках (як у контрольних, так і у дослідних тварин, з ротеноном чи без нього) є трохи вищою за вищої концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Найбільша різниця між значеннями  $V_{max}$  за 0,1 та 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  і наявності ротенону в середовищі спостерігається у діабетичних тварин.

Отримані результати переконливо свідчать про чутливість процесів мітохондріального дихання до рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , що має важливе значення у пристосуванні до енергетичних потреб клітини. За надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій зростає активність кількох дегідрогеназ і, як наслідок, – інтенсифікується дихання, збільшується мембранний потенціал мітохондрій і синтез АТФ. Водночас у високих концентраціях катіони  $\text{Ca}^{2+}$  (особливо за умов окисативного стресу) зумовлюють суттєве порушення функціонування мітохондрій унаслідок активації мітохондріальної пори неспецифічної проникності та зменшення їх мембранного потенціалу [9, 13, 25]. Вважається, що  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковані мітохондріальні дисфункції зумовлюють широкий спектр розладів, включно з цукровим діабетом [4, 6, 10].

Сатав [20] припускає, що на ранніх етапах розвитку цукрового діабету дихального потенціалу достатньо для забезпечення енергетичних потреб клітин печінки. Проте в цій роботі відзначають зниження інтенсивності процесів дихання ізольованих мітохондрій діабетичних тварин за окиснення пірувату і малату, але не сукцинату. У наших попередніх роботах показано зниження активності сукцинатдегідрогенази у печінці діабетичних тварин, яке, тим не менше, не супроводжується зниженням поглинання кисню за використання сукцинату. Зниження активності сукцинатдегідрогенази було також показано у гепатоцитах щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом іншими авторами [14] та у лімфоцитах дітей із цукровим діабетом I типу [3].

Одним із можливих механізмів підтримання дихання мітохондрій інсуліннезалежних тканин діабетичних тварин є зростання рівня глюкози у крові. Це призводить до посилення її надходження у гепатоцити, за участю мембранного транспортера глюкози GLUT2, і розщеплення її до пірувату. Аналогічне припущення зроблене і Сінгом зі співавт. [23] для клітин проксимальних трубочок нирок. У цих дослідженнях зареєстровано також суттєве зростання максимальної окисної здатності мітохондрій за умов діабету [23]. Нами з'ясовано, що максимальна окисна здатність інтактних клітин печінки є меншою у тварин з модельованим цукровим діабетом. Але, як свідчать результати наших досліджень на пермеабілізованих гепатоцитах, ефекти ДНФ залежать від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі, тому не завжди дані різних авторів можна адекватно порівняти.

Наголошуючи на важливому значенні іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у регуляції процесів дихання, варто зазначити, що на ранніх етапах розвитку діабету мітохондрії гепатоцитів стають менш чутливими до токсичних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$ . Зокрема, у діабетичних тварин максимальна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$ , за якої ще зберігається здатність мітохондрій відповідати на до-

давання АДФ, змінюється від 0,1 до 1 мкмоль/л. Крім того, за низької концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 мкмоль/л) коефіцієнт Хілла  $h$  і  $V_{\max}$  сукцинатстимульованого дихання мітохондрій діабетичних тварин зменшуються. За 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі ці параметри залишаються такими ж, як і в контролі, що теж зумовлено, на нашу думку, зменшенням чутливості мітохондрій до його токсичних концентрацій.

Зменшення чутливості до токсичних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  є одним із механізмів, який підтримує утилізацію надмірних кількостей пірувату на ранніх етапах розвитку діабету. Це ж зменшення чутливості мітохондрій до токсичних чи субтоксичних концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  може бути причиною розбіжності даних різних авторів щодо швидкості клітинного дихання за розвитку цукрового діабету.

Колектив авторів висловлює щирі подяки Ірині Вікторівні Ференц за надану методичну допомогу в роботі з діабетичними тваринами.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Є. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 207 с.
2. Манько В. В. Використання рівняння Хілла для кінетичного аналізу  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем секреторних клітин личинки *Chironomus plumosus* // Біологічні студії. 2007. Т. 1. № 1. С. 5–18.
3. Маркевич В. Е., Глуценко Н. В. Особливості енергетичного забезпечення дітей, хворих на цукровий діабет 1 типу // Перинатологія та педіатрія. 2011. № 3 (47). С. 114–117.
4. Brookes P. S., Yoon Y., Robotham J. L. et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2004. Vol. 287. P. C817–C833.
5. Cardoso A. R., Queliconi B. B., Kowaltowski A. J. Mitochondrial ion transport pathways: Role in metabolic diseases // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1797. N 6–7. P. 832–838.
6. Csordás G., Thomas A. P., Hajnóczky G. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 96–108.
7. Fato R., Bergamini C., Bortolus M. et al. Differential effects of mitochondrial complex I inhibitors on production of reactive oxygen species // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1787. N 5. P. 384–392.
8. Ferreira F. M., Palmeira C. M., Seica R., Santos M. S. Alterations of liver mitochondrial bioenergetics in diabetic Goto-Kakizaki rats // Metabolism. 1999. Vol. 48. N 9. P. 1115–1119.
9. Gunter T. E., Buntinas L., Sparagna G. C., Gunter K. K. The  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms of mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake from physiological-type  $\text{Ca}^{2+}$  transients // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1366. P. 5–15.
10. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. Calcium and mitochondria // FEBS Lett. 2004. Vol. 567. P. 96–102.
11. Gustafsson A., Gottlieb R. Heart mitochondria: gates of life and death // Cardiovasc. Res. 2008. Vol. 77. N 2. P. 334–343.
12. Hartman M. L., Shirihai O. S., Holbrook M. et al. Relation of mitochondrial oxygen consumption in peripheral blood mononuclear cells to vascular function in type 2 diabetes mellitus // Vasc. Med. 2014. Vol. 19. N 1. P. 67–74.
13. Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel // Nature. 2004. Vol. 427. P. 360–364.
14. Narasimhulu G., Kesireddy S., Rao P. et al. Hepato-protective effects of *Pimpinella tirupatensis* extract on cytosolic and mitochondrial enzymes against streptozotocin (STZ)-injected pathogenic diabetic rats // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2014. Vol. 6. Suppl. 2. P. 792–797.



15. Nicholls D. G. Mitochondria and calcium signaling // *Cell Calcium*. 2005. Vol. 38. P. 311–317.
16. Oliveira P., Seiça R., Coxito P. et al. Enhanced permeability transition explains the reduced calcium uptake in cardiac mitochondria from streptozotocin-induced diabetic rats // *FEBS Lett*. 2003. Vol. 554. P. 511–514.
17. Oliveira P. J., Esteves T. C., Seiça R. et al. Calcium-dependent mitochondrial permeability transition is augmented in the kidney of Goto-Kakizaki diabetic rat // *Diabetes Metab. Res. Rev*. 2004. Vol. 20. P. 131–136.
18. Riojas-Hernández A., Bernal-Ramírez J., Rodríguez-Mier D. et al. Enhanced oxidative stress sensitizes the mitochondrial permeability transition pore to opening in heart from Zucker Fa/fa rats with type 2 diabetes // *Life Sci*. 2015. Vol. 141. P. 32–43.
19. Rui L. Energy metabolism in the liver // *Compr. Physiol*. 2014. Vol. 4. N 1. P. 177–197.
20. Satav J. G., Katyare S. S. Effect of streptozotocin-induced diabetes on oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria – a comparative study of early and late effects // *Indian J. Clinical Biochem*. 2004. Vol. 19. N 2. P. 23–31.
21. Seglen P. O. Preparation of isolated rat liver cells // *Methods Cell Biol*. 1976. Vol. 13. P. 29–83.
22. Seyer P., Vallois D., Poitry-Yamate C. et al. Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence // *J. Clin. Invest*. 2013. Vol. 123. P. 1662–1676.
23. Singh P., Thomas J., Pham H. et al. Increased oxygen consumption and basal metabolism of the proximal tubule in early diabetes // *The FASEB J*. 2015. Vol. 29. N 1. Suppl. 963.8.
24. Sloan R., Moukdar F., Frasier C. et al. Mitochondrial permeability transition in the diabetic heart: contributions of thiol redox state and mitochondrial calcium to augmented reperfusion injury // *J. Mol. Cell Cardiol*. 2012. Vol. 52. N 5. P. 1009–1018.
25. Zavodnik I. B., Lapshina E. A., Cheshchevik V. T. et al. Melatonin and succinate reduce rat liver mitochondrial dysfunction in diabetes // *J. Physiol. Pharmacol*. 2011. Vol. 62. N 4. P. 421–427.

*Стаття: надійшла до редакції 22.04.15*

*доопрацьована 19.10.15*

*прийнята до друку 20.10.15*

## **Ca<sup>2+</sup> INFLUENCE ON RESPIRATION PROCESSES UPON STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS**

**V. Merlavsky, O. Ikkert, V. Manko**

*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: vvmanko@lnu.edu.ua*

The experiments were carried out using underbred rat males (180–220 g). The animals were separated into two groups – control group (injection of physiological solution, 1 ml) and experimental group (single injection of streptozotocin intraperitoneally, 50 mg/kg). The respiration rate of intact hepatocytes was registered upon endogenous substrates oxidation and dinitrophenol (0.1 mmol/l) addition. The respiration rate of permeabilized hepatocytes was registered upon the endogenous and exogenous substrates oxidation – a mixture of pyruvate, malate and glutamate (5 mmol/l of each) or succinate (5 mmol/l), and ADP (750 μmol/l) and dinitrophenol (0.1 mmol/l) addition. Kinetic parameters of succinate-stimulated respiration were investigated upon succinate (from 0.1 to 5 mmol/l) adding to suspension of permeabilized hepatocytes containing ADP and rotenone. Mitochondrial energetic processes

intensification in the liver cells was established at early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus development. Thus, respiration rate of intact hepatocytes in diabetic rats is 40.8% higher, than in control. The intensification of oxygen consumption by permeabilized hepatocytes in control rats upon all  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in the medium (0.01, 0.1, 1 and 10  $\mu\text{mol/l}$ ) was observed under conditions of pyruvate, malate and glutamate mixture addition (state  $S_1$ ). The greater intensification of respiration by that mixture in diabetic animals was observed at 10  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$ . The following ADP addition (state  $S_3$ ) increases respiration rate in control at 0.01 and 0.1  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$  in the medium only. ADP-stimulated respiration rate in diabetic rats is maximal at 1  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Similar dependence of substrate- and ADP-stimulated respiration rate on  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the medium was observed also upon succinate oxidation. In addition, upon succinate oxidation the maximal mitochondrial functional ability (a response to the ADP and dinitrophenol application) in control animals was observed at 0.1  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$  within the medium and in experimental rats at 1  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$ . Hill coefficient  $h$  and  $V_{\text{max}}$  of succinate-stimulated mitochondrial respiration in diabetic animals were decreased upon low  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (0.1  $\mu\text{mol/l}$ ). These parameters remained similar to the control at 1  $\mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$  in the medium. That was caused, obviously, by lowering of mitochondrial sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  toxic concentrations.

So, at the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus development, the hepatocytes respiration was intensified thanks to, in particular, the increase of resistance to toxic  $\text{Ca}^{2+}$  amounts within mitochondrial matrix.

*Keywords:* hepatocytes, cell respiration,  $\text{Ca}^{2+}$ , diabetes mellitus, streptozotocin.

## ВЛИЯНИЕ $\text{Ca}^{2+}$ НА ПРОЦЕССЫ ДЫХАНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

В. Мерлавский, О. Иккерт, В. Манько

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина  
e-mail: vvmanko@lnu.edu.ua*

Исследования проведены на нелинейных крысах-самцах массой 180–220 г, которые были разделены на две группы – контрольную (введение физиологического раствора, 1 мл) и экспериментальную (внутрибрюшинное однократное введение раствора стрептозотоцина, 50 мг/кг). Дыхание интактных гепатоцитов регистрировали при окислении эндогенных субстратов и добавлении динитрофенола (0,1 ммоль/л), а пермеабелизированных при окислении эндогенных и экзогенных субстратов – смеси пирувата, малата и глутамата (по 5 ммоль/л) или сукцината (5 ммоль/л), и добавлении АДФ (750 мкмоль/л) и динитрофенола (0,1 ммоль/л). Кинетические параметры сукцинатстимулированного дыхания исследовали, добавляя сукцинат в концентрациях от 0,1 до 5 ммоль/л к суспензии пермеабелизированных гепатоцитов, которая содержала АДФ и ротенон. Установлено, что на ранних стадиях развития стрептозототининдуцированного сахарного диабета происходит интенсификация энергетических процессов в митохондриях клеток печени. Так, скорость дыхания интактных гепатоцитов диабетических животных на 40,8% больше, чем в контроле. При добавлении смеси пирувата, малата и глутамата (состояние  $S_1$ ) наблюдали интенсификацию потребления кислорода пермеабелизированными гепатоцитами контрольных крыс при всех концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$  в среде (0,01, 0,1, 1 и 10 мкмоль/л) до практически одного и того же уровня. У животных с моделированным диабетом наибольшая интенсификация дыхания этой смесью наблюдается при 10 мкмоль/л

$\text{Ca}^{2+}$ . Следующее внесение АДФ (состояние  $S_3$ ) увеличивает скорость дыхания в контроле только при 0,01 и 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  в среде. У животных с диабетом АДФ-стимулированное дыхание является максимальным при 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Похожая зависимость скорости субстрат- и АДФ-стимулированного дыхания от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в среде наблюдается и при окислении сукцината. Кроме того, при окислении сукцината максимальная функциональная способность митохондрий (ответ на добавление АДФ и динитрофенола) у контрольных животных отмечается при наличии в среде 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , а у экспериментальных – при наличии 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ . Кроме того, при низкой концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 мкмоль/л) коэффициент Хилла  $h$  и  $V_{\text{max}}$  сукцинатстимулированного дыхания митохондрий диабетических животных уменьшаются. При 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  в среде эти параметры остаются такими же, как и в контроле, что также обусловлено, очевидно, уменьшением чувствительности митохондрий к его токсическим концентрациям.

Итак, на ранних этапах развития стрептозотоцининдуцированного диабета интенсифицируется дыхание гепатоцитов благодаря, в частности, повышению устойчивости к токсическим количествам  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксе митохондрий.

*Ключевые слова:* гепатоциты, клеточное дыхание,  $\text{Ca}^{2+}$ , диабет, стрептозотцин.