

## РОЛЬ РІАНОДИНЧУТЛИВИХ $\text{Ca}^{2+}$ -КАНАЛІВ У РЕГУЛЯЦІЇ ДИХАННЯ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

Н. Купиняк<sup>1,2</sup>, О. Іккерт<sup>1</sup>, В. Манько<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького  
вул. Пекарська, 69, Львів 79000, Україна  
e-mail: nadiya.kupnyak@gmail.com

Досліджено роль mRyRs у регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за різної позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  та окиснення сукцинату, пірватату і  $\alpha$ -кетоглутарату. Ізольовані мітохондрії отримували методом диференційного центрифугування. Інтактність отриманих мітохондрій визначали методом електронної мікроскопії. АТФ-азну активність суспензії мітохондрій, як показник відсутності залишків плазматичної мембрани та мембран ендоплазматичного ретикулуму, визначали на основі змін вмісту неорганічного фосфату в середовищі після інкубації мітохондрій з еозином Y, оубаїном і тапсигаргіном. Швидкість дихання реєстрували полярографічним методом з використанням електрода Кларка. Для з'ясування ролі mRyRs у регуляції мітохондріального дихання суспензію мітохондрій преінкубували з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л або вносили його у концентрації 0,1 мкмоль/л безпосередньо в полярографічну комірку. Встановлено, що після преінкубації суспензії мітохондрій з ріанодином упродовж 5 та 10 хв за окиснення сукцинату відбувається зниження споживання кисню. Унаслідок безпосереднього внесення ріанодину до мітохондрій у полярографічну комірку з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі 0,1 і 1 мкмоль/л за окиснення сукцинату швидкість споживання кисню зменшилася у станах  $S_4$ ,  $S_3$  та  $S_4^{\text{ATP}}$ . За окиснення пірватату преінкубація мітохондрій з ріанодином спричиняла зниження споживання кисню, як і після безпосереднього внесення ріанодину в полярографічну комірку з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі 0,1 мкмоль/л. За концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі 1 мкмоль/л зареєстроване збільшення швидкості споживання кисню під впливом ріанодину у станах  $S_4$  та  $S_3$  на 12,2 і 17,2 % відповідно. Споживання кисню мітохондріями за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату після додавання ріанодину в полярографічну комірку з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 мкмоль/л у середовищі зростало у станах  $S_4$  та  $S_3$ , а в середовищі з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  1 мкмоль/л – зростало у стані  $S_4$  на 19,1 % та зменшилось у стані  $S_4^{\text{ATP}}$  на 14,6 %. Аналіз даних дає змогу стверджувати, що у мітохондріях гепатоцитів mRyRs є важливою ланкою адаптивного регуляторного зв'язку між величиною мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання за низьких значень позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  й окиснення пірватату. Якщо ж переважає окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату чи позамітохондріальна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  є високою, то надходження  $\text{Ca}^{2+}$  за участю mRyRs призводить до пригнічення процесів дихання.

*Ключові слова:* ріанодин, mRyRs, мітохондріальне дихання, субстрати окиснення, гепатоцити

Акумуляція мітохондріями катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  відіграє важливу роль у регуляції метаболічних процесів у клітині [21, 29, 31]. Причому ця роль реалізується як через активацію акумулятованими катіонами  $\text{Ca}^{2+}$  внутрішньомітохондріальних процесів, що завершуються синтезом АТФ, так і опосередковано – через їхню здатність змінювати концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$

у цитозолі і, відтак, генерацію цитозольних  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналів [1, 8, 22]. У внутрішній мембрані мітохондрій гепатоцитів наявні такі  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи, які забезпечують вихід  $\text{Ca}^{2+}$  з матриксу: мітохондріальна пара транз'єнтної проникності [7] та  $\text{H}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  обмінник [10, 23, 32]. До  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем, що забезпечують акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій гепатоцитів, належать  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер [19], система швидкого захоплення катіона (RaM) [22, 33, 35] та мітохондріальні ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали (mRyRs) [26].

Ідентифіковано mRyRs у кардіоміоцитах [15], у нейронах [24], а згодом і в гепатоцитах [26]. З'ясувалося, що вони за своїми біохімічними, фармакологічними та функціональними властивостями подібні до типу 1 RyRs саркоплазматичного ретикулуму і відіграють важливу роль в акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях [15, 24]. Аналогічно RyRs саркоплазматичного ретикулуму, для активації mRyRs характерна куполоподібна залежність від концентрації катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитозолі. Їхня максимальна активність спостерігається за концентрації 10 мкмоль/л, а повне інгібування – за 0,1–1 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  [12]. Ріанодин (10 мкмоль/л) індукує напівпровідний стан mRyR кардіоміоцитів, який триває лише кілька секунд [12]. А нещодавно ідентифіковані mRyRs гепатоцитів інгібуються ріанодином у концентраціях від 0,05 до 1 мкмоль/л, що супроводжується зниженням внутрішньомітохондріальної концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$  [26]. Зважаючи на те, що mRyRs мають вищу електричну провідність  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортер мітохондрій, ймовірно, саме mRyRs відповідає за поглинання  $\text{Ca}^{2+}$  з мікродомених у ділянці МММ (мітохондрійасоційованих мембран на стику ендоплазматичного ретикулуму і мітохондрій) [20].

Експресовані у внутрішній мембрані мітохондрій кардіоміоцитів і нейронів mRyRs забезпечують акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  в матриксі у відповідь на зростання його цитозольної концентрації [15, 22]. У серці така акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  мітохондріями стимулює споживання кисню [14]. У цьому дослідженні показано, що позамітохондріальні катіони  $\text{Ca}^{2+}$  у концентрації 10 мкмоль/л (але не у вищих) стимулювали споживання кисню і що цей ефект інгібувався ріанодином [14].

Як впливає активація mRyR на енергетичні процеси у гепатоцитах, достеменно не відомо. Тому мета цієї роботи – з'ясувати роль mRyRs у регуляції мітохондріального дихання гепатоцитів щурів за різної позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Матеріали та методи

Досліди виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Тварин наркотизували хлороформом, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко виділяли печінку. Ін'єкцію та декапітацію здійснювали в лабораторії, ізольовано від інших тварин. Усі маніпуляції з 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».

Мітохондрії печінки щурів виділяли методом диференційного центрифугування [25]. Для цього печінку після виділення зважували та перфузували розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7,  $\text{MgCl}_2$  – 1,  $\text{CaCl}_2$  – 0,1, глюкоза – 5, HEPES – 10, EGTA – 1; pH 7,4. Охолоджену й відперфузовану печінку подрібнювали через прес і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма зі швидкістю 800 об./хв за 3 вертикальних ходи товчачика у співвідношенні 1 г тканини до 8 мл середовища гомогенізації. Середовище гомогенізації містило (ммоль/л): сахарозу – 250, HEPES – 10, EGTA – 1; pH 7,2. Гомогенат центрифугували 3 хв за прискорення 150 g та 5 хв за 300 g без зупинки центрифуги для осадження уламків клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували з надосадової рідини цен-

трифугуванням супернатанту впродовж 15 хв за 4500 g і температури 0–2 °С. Отриманий осад мітохондрій ресуспензували середовищем виділення у співвідношенні 1 г тканини до 0,1 мл середовища. Отриману суспензію мітохондрій використовували для подальших досліджень. Концентрацію мітохондріального білка вимірювали за методом Лоурі [27].

Для електронної мікроскопії суспензію мітохондрій промивали какодилатним буфером (0,2 моль) та фіксували 1,5 % розчином глутарового альдегіду (2 год) і 1 % розчином OsO<sub>4</sub> (2 год), виготовленими на какодилатному буфері. Після цього зразки переносили у 1,5 % водний розчин уранілацетату на 12 год. Фіксовані зразки промивали і зневоднювали за кімнатної температури у зростаючих концентраціях етанолу (в діапазоні від 70 до 100 %). Зневоднені зразки переносили в чисту епоксидну смолу, поміщали у капсули для полімеризації й витримували 24 год за температури 40 °С в термостаті й 48 год за температури 60 °С. Зрізи виготовляли за допомогою ультрамикротому УМТП-6М. Контрастували їх у 1,5 % розчині уранілацетату, виготовленому на 70 % етанолі. Ще раз контрастували зрізи у плюмбум (II) цитрат за Рейнольдсом [30], після чого переглядали і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЕМ-100.

АТФ-азну активність суспензії мітохондрій, як показник відсутності залишків плазматичної мембрани та мембран ендоплазматичного ретикулу, визначали на основі змін вмісту неорганічного фосфату ( $\Phi_{\text{н}}$ ) в середовищі інкубації мітохондрій методом УФ-детекції та методом Фіске-Суббароу [18]. Для цього суспензію мітохондрій розділяли на аліквоти й інкубували у відповідних середовищах упродовж 15 хв. З метою інгібування Ca<sup>2+</sup>-помпи плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулу до середовища інкубації додавали еозин Y (20 мкмоль/л), для інгібування Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-помпи – оубаїн (10 мкмоль/л), для інгібування Ca<sup>2+</sup>-помпи ендоплазматичного ретикулу – тапсигаргін (1 мкмоль/л), для блокування дихального ланцюга – натрію азид (10 ммоль/л). АТФ-азну реакцію запускали додаванням до середовища АТФ (3 ммоль/л). Після інкубації суспензію мітохондрій центрифугували упродовж 5 хв за прискорення 1600 g і швидко відбирали проби для визначення концентрації. Концентрацію Ca<sup>2+</sup> у середовищі моделювали, використовуючи Ca<sup>2+</sup>-ЕГТА-буфер (100 мкмоль/л ЕГТА). Різницю між вмістом  $\Phi_{\text{н}}$  у середовищі з концентрацією Ca<sup>2+</sup> 10<sup>-7</sup> моль/л і у середовищі, котре містило 2 ммоль/л ЕГТА (безкальцієве), вважали показником Ca<sup>2+</sup>-чутливої АТФ-азної активності.

Швидкість споживання кисню реєстрували полярографічним методом за температури 26 °С. Для цього у полярографічну комірку, що містила розчин відповідного субстрату окиснення, вносили 100 мкл суспензії мітохондрій. Концентрація білка у комірці становила 5–7 мг/мл. Середовище для дихання містило (ммоль/л): сахарозу – 250, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2, ЕГТА – 0,1, CaCl<sub>2</sub> – 1, NEMES – 10; рН 7,2. Як субстрати окиснення використовували сукцинат, піруват і  $\alpha$ -кетоглутарат у концентраціях 5 ммоль/л. Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л). За полярограмами визначали швидкість дихання у станах S<sub>4</sub>, S<sub>3</sub> і S<sub>4</sub><sup>АТФ</sup> за Чансом і Вільямсом, отримані значення перераховували на мг білка [16].

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом. За статистично достовірні приймали зміни з P<0,05.

### Результати і їхнє обговорення

Дослідження ролі mRyRs у функціонуванні мітохондрій гепатоцитів проведено нами на суспензії ізольованих мітохондрій. На наведеній **електронно-мікроскопічній фотографії** (рис. 1) видно значну кількість функціонально повноцінних, неушкоджених мітохондрій, які перебувають на різних стадіях розвитку (молоді, зрілі та старі). Суспензія

містить незначну кількість мембран, які асоційовані з мітохондріями або утворюють замкнені везикули. У такій суспензії краще зберігаються функціональні властивості мітохондрій і краще проявляються фізіологічні ефекти [5]. Ця гіпотеза була підтверджена роботами А.М. Бабського на кафедрі фізіології людини і тварин ЛНУ ім. Івана Франка [2–4].

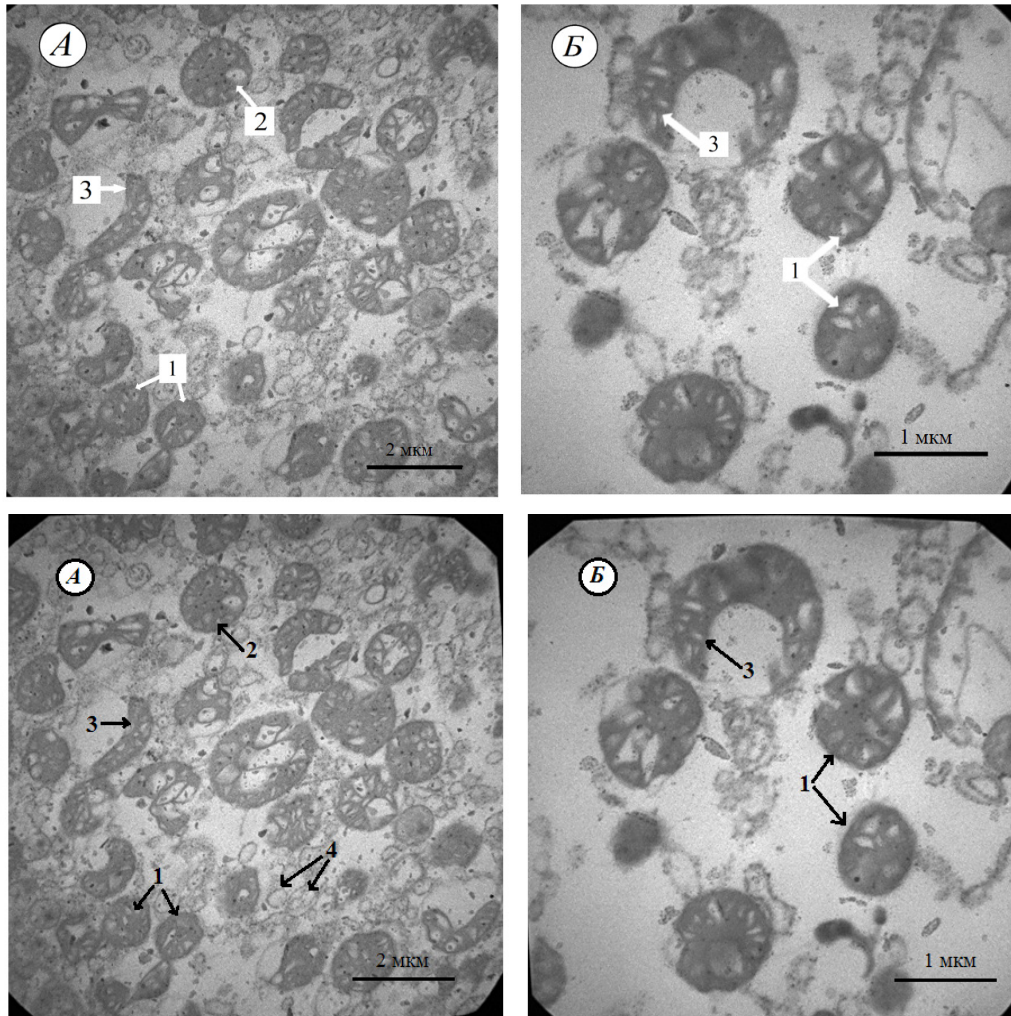


Рис. 1. Електронно-мікроскопічна фотографія суспензії мітохондрій гепатоцитів за збільшення  $\times 4000$  (А) і  $\times 10\,000$  (Б): 1 – молоді мітохондрії; 2 – зрілі мітохондрії; 3 – старі мітохондрії; 4 – везикули з немітохондріальних мембран

Для оцінки ролі немітохондріальних мембранних структур суспензії у депонуванні  $\text{Ca}^{2+}$  визначали АТФ-азну активність цієї суспензії. Встановлено, що вміст  $\Phi_{\text{H}}$  у суспензії мітохондрій за дії інгібітора  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -ази плазматичної мембрани оубаїну [13], інгібітора  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ -аз плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму еозину Y [6, 11], а також інгібітора  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ -ази ендоплазматичного ретикулуму тапсигаргіну [34] суттєво не змінювався і був у межах від 0,058 до 0,080  $\mu\text{M}$  / (мг білка  $\times$  15 хв). Це свідчить, що досліджувана суспензія містить незначну кількість немітохондріальних мембран,



а їхній внесок у депонування  $\text{Ca}^{2+}$ , порівняно з мітохондріями, є несуттєвим, тому зміни, отримані за дії ріанодину, можна пов'язувати саме з мітохондріальними ріанодинчутливими  $\text{Ca}^{2+}$ -каналами.

Для визначення ролі mRyRs у процесах мітохондріального дихання отриману суспензію мітохондрій преінкубували з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л за температури 2–4 °С упродовж 5 або 10 хв. Після цього мітохондрії вносили у полярографічну комірку та реєстрували швидкість споживання кисню. Паралельно з преінкубацією мітохондрій з ріанодином, в інших серіях ріанодин у концентрації 0,1 мкмоль/л вносили безпосередньо у полярографічну комірку до мітохондрій.

Після 5 хв преінкубації суспензії мітохондрій з ріанодином за окиснення сукцинату відбувається зниження споживання кисню тільки у стані  $S_4^{\text{ATP}}$  – на 22,8 % (рис. 2, А). На відміну від цього, після преінкубації 10 хв спостерігали зниження сукцинатстимульованого дихання у трьох станах –  $S_4^{\text{ATP}}$  (на 44,3 %),  $S_4$  (на 41,2 %) та  $S_3$  (на 38,8 %).

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

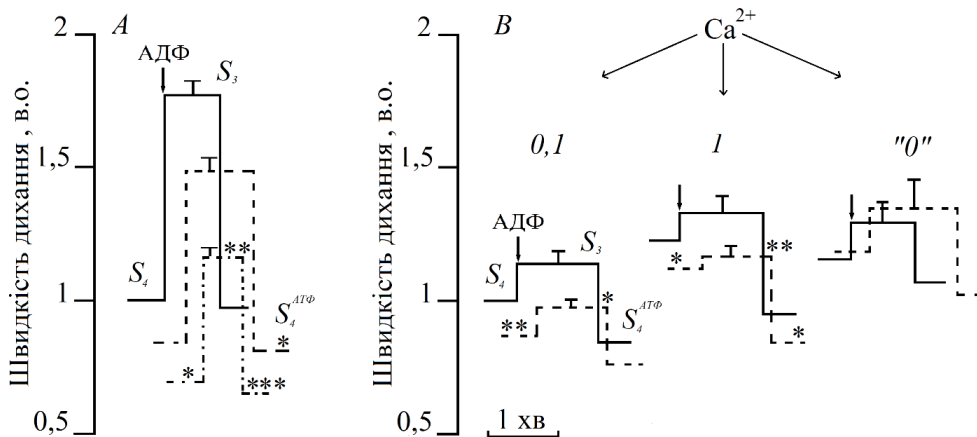


Рис. 2. Дихання суспензії мітохондрій за окиснення сукцинату: А – преінкубація мітохондрій з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л (— контроль, - - - 5 хв, - · - 10 хв;  $[\text{Ca}^{2+}]$  – 0,1 мкмоль/л); Б – вплив внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) у полярографічну комірку на дихання суспензії мітохондрій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

Слід зазначити, що саме по собі споживання кисню мітохондріями у станах  $S_4$  і  $S_3$  за окиснення сукцинату зростає внаслідок підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі від 0,1 до 1 мкмоль/л ( $P = 0,009$  і  $0,003$  відповідно). Крім того, в середовищі з 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$

дихальний контроль за Ларді (відношення швидкостей у станах  $S_3$  і  $S_4$ ) становив 1,15, а в середовищі з 1 мкмоль/л – зменшився до 1,08 (на 5,93 %,  $P=0,048$ ; див. таблицю). Дихальний контроль за Чансом ( $S_3/S_4^{ATP}$ ) становив 1,38, коли концентрація була 0,1 мкмоль/л, і 1,40 за концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі 1 мкмоль/л. Назагал, такі низькі дихальні контролю, які спостерігаються, є свідченням роз'єднання дихання й окисного фосфорилування – у першу чергу внаслідок високої швидкості дихання у стані  $S_4$  чи  $S_4^{ATP}$ . Збільшення концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі 1 мкмоль/л супроводжується підвищення ступеня роз'єднання дихання й окисного фосфорилування у стані  $S_4$ , але не  $S_4^{ATP}$ . Подібну закономірність – збільшення швидкості дихання у стані  $S_4$  і відсутність змін у стані  $S_3$  внаслідок збільшення позамітохондріальної концентрації  $Ca^{2+}$  від 0,1 до 1 мкмоль/л – зареєстровано за окиснення сукцинату і на пермеабілізованих гепатоцитах щурів [9].

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

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

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

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

Сукцинатдегідрогеназа не є  $Ca^{2+}$ -залежним ферментом [28]. Але у цих дослідженнях ми не використовували інгібітори комплексу I дихального ланцюга. Тому залежність інтенсивності сукцинатстимульованого дихання ізольованих мітохондрій від концентрації  $Ca^{2+}$  у середовищі спричинена, мабуть, підтоком ендогенних субстратів  $Ca^{2+}$ -залежних дегідрогеназ. Цікаво, що за цих умов ріанодин знижує швидкість дихання мітохондрій як у серії з преінкубацією, так і за безпосереднього внесення у полярографічну комірку. Мембранний потенціал мітохондрій унаслідок дії ріанодину в концентраціях 0,05–1 мкмоль/л за окиснення сукцинату практично не змінювався [26]. Трохи складнішою є залежність вмісту  $Ca^{2+}$  у матриці мітохондрій від концентрації ріанодину: коли його концентрація становить 0,05 мкмоль/л і як субстрат окиснення використовується сукцинат, вміст акумульованого  $Ca^{2+}$  зменшується, а за вищих концентрацій – змін немає [26]. Такий ефект ріанодину може бути спричинений лише інгібуванням mRyRs – зменшенням надходжень  $Ca^{2+}$  у матрикс мітохондрій і, відтак, пригніченням  $Ca^{2+}$ -залежних дегідрогеназ. Але спричинене ріано-

дином зниження швидкості дихання за окиснення сукцинату є незначним, тому суттєво не змінюється ні акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  у матриці мітохондрій, ні їхній мембранний потенціал.

**За окиснення пірувату** преінкубація мітохондрій з ріанодином упродовж 5 хв зумовлювала зниження споживання кисню у станах  $S_4$  та  $S_3$  на 27,9 і 32,7 % відповідно (рис. 3, А). Після преінкубації упродовж 10 хв спостерігали зменшення споживання кисню мітохондріями у трьох станах –  $S_4$  (на 40,8 %),  $S_3$  (на 44,9 %) та  $S_4^{\text{ATФ}}$  (на 41,4 %).

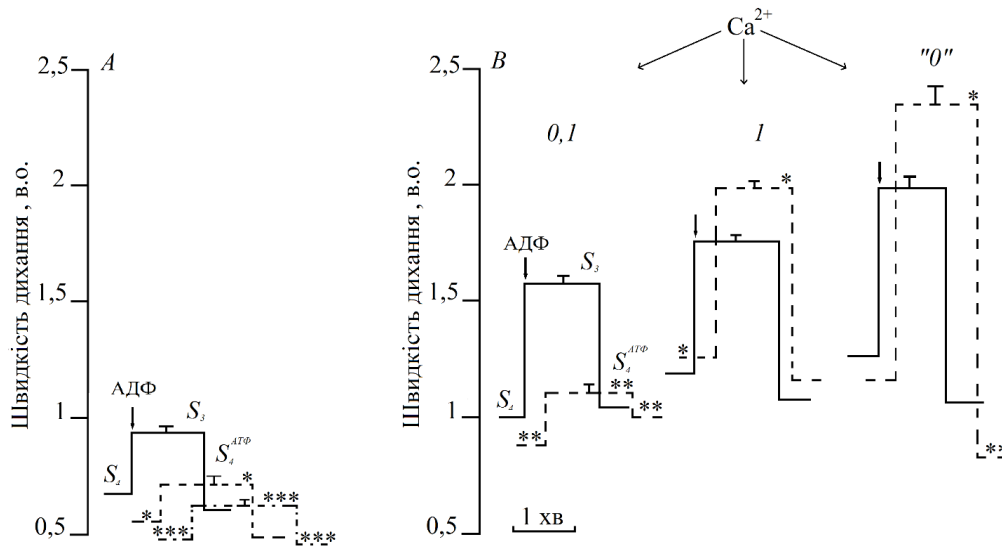


Рис. 3. Дихання суспензії мітохондрій за окиснення пірувату: А – преінкубація мітохондрій з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л (— контроль, - - - 5 хв, - · - 10 хв,  $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1$  мкмоль/л; за одиницю взято швидкість у стані  $S_4$  за окиснення сукцинату); Б – вплив внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) у полярографічну комірку на дихання суспензії мітохондрій у середовищі з різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (— контроль, - - - дослід; за одиницю взято швидкість у стані  $S_4$  за окиснення пірувату); [піруват] = 5 мкмоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л; \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ,  $n=4$

Унаслідок безпосереднього внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) в полярографічну комірку з концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі 0,1 мкмоль/л швидкість споживання кисню мітохондріями знижувалась у станах  $S_4$ ,  $S_3$  та  $S_4^{\text{ATФ}}$  на 22,2, 32,1 та 8,2 % відповідно (рис. 3, Б). Але за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  1 мкмоль/л у середовищі під впливом ріанодину спостерігали не зниження, а підвищення швидкості дихання у станах  $S_4$  та  $S_3$  – на 12,2 і 17,2 % відповідно. Коли концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі не задавали, споживання кисню мітохондріями під впливом ріанодину у стані  $S_3$  зросло на 20,0 %, а у стані  $S_4^{\text{ATФ}}$  – знизилось на 24,8 %.

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

За концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  1 ммоль/л дихальні контролю під впливом ріанодину достовірно не змінювалися (див. таблицю), тобто за цих умов ріанодин не змінює ступінь спряженості дихання й окисного фосфорилування.

Раніше нами встановлено, що за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  в середовищі 0,1 мкмоль/л мембранний потенціал мітохондрій зменшився внаслідок дії ріанодину (0,01 мкмоль/л; у інших концентраціях ріанодину зменшення не досягнуло першого ступеня достовірності) [26]. Ще суттєвіше знизився вміст акумульованого в матриксі мітохондрій  $\text{Ca}^{2+}$  за дії ріанодину в усіх концентраціях [26]. Тому з досить високою ймовірністю можемо стверджувати, що за 0,1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  ріанодин у концентрації 0,05 і 0,01 мкмоль/л інгібує mRyRs, що спричиняє зменшення надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, пригнічення піруватдегідрогеназного комплексу, зниження швидкості дихання і мембранного потенціалу мітохондрій. Причому зниження мембранного потенціалу не спричиняє за цих умов компенсаторного підвищення швидкості дихання. Лише за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  і 0,1 мкмоль/л ріанодину швидкість дихання зростає. Нам важко пояснити цей феномен. Цілком можливо, що ріанодин має різний ефект на mRyRs за різних концентрацій цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ . Або зниження мембранного потенціалу мітохондрій є настільки виражене, що включаються інші, не  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні, адаптаційні механізми, спрямовані на інтенсифікацію мітохондріального дихання.

Дентон [17] дослідив залежність активності піруватдегідрогеназного та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексів мітохондрій серця від позамітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Він встановив, що активність піруватдегідрогеназного комплексу зростала за збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  від 0,01 до 0,1 мкмоль/л, а за вищої концентрації – навіть трохи зменшилася [17]. Ці дані корелюють із результатами дослідження дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення суміші малату, глутамату і пірувату [9]. Авторами встановлено, що АДФ-стимульоване дихання пермеабілізованих гепатоцитів інтенсифікувалося за збільшення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі до 0,1 мкмоль/л. Коли ж концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 1 мкмоль/л, АДФ-стимульоване дихання, навпаки, трохи сповільнилося [9].

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

Цікаво, що чутливість  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до  $\text{Ca}^{2+}$  є, мабуть, трохи вищою, ніж чутливість піруватдегідрогеназного комплексу. Так, у своїй роботі Дентон [17] наводить дані, що активність  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу зростає зі збільшенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  вже від 0,001 мкмоль/л (хоча до тих самих 0,1 мкмоль/л, що й активність піруватдегідрогеназного комплексу). За **окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату** статистично достовірних змін швидкості дихання після преінкубації з ріанодинем у концентрації 0,05 мкмоль/л нами не зареєстровано (рис. 4, А). Але внаслідок додавання ріанодину (0,1 мкмоль/л) до полярографічної комірки швидкість дихання мітохондрій у різних станах змінювалася, а напрям цих змін залежав від концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у середовищі. Якщо у середовищі концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становила 0,1 мкмоль/л, то ріанодин спричиняв збільшення швидкості дихання мітохондрій у стані  $S_4$  на 25,7 %, а у стані  $S_3$  – на 16,3 % (рис. 4, Б). Дихальний контроль за Чансом у контролі становив 1,51, а за дії ріанодину збільшився (!) на 34,8 % ( $P=0,030$ ; див. таблицю).

Такі зміни швидкостей дихання і дихального контролю за Чансом дають змогу припустити, що коли субстратом окиснення є  $\alpha$ -кетоглутарат, то ріанодин, обмежуючи акумуляцію  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі, усуває його негативний ефект на процеси дихання. Очевидно, за окиснення лише  $\alpha$ -кетоглутарату процеси дихання є менш стійкими, ніж за окиснення, наприклад, пірувату, і негативний ефект  $\text{Ca}^{2+}$  проявляється вже за концентрації 0,1 мкмоль/л. Тому, мабуть, достовірних змін мембранного потенціалу мітохондрій і вмісту в матриксі  $\text{Ca}^{2+}$  за цієї концентрації позамітохондріального  $\text{Ca}^{2+}$  не зареєстровано [26].



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

Під впливом ріанодину швидкість дихання мітохондрій за 1 мкмоль/л  $\text{Ca}^{2+}$  зросла у стані  $S_4$  – на 19,2 %, а у стані  $S_4^{\text{АДФ}}$  – знизилася на 14,6 %. Але найсуттєвішим є те, що за цих умов немає стимулюючого ефекту АДФ на швидкість дихання. У безкальцієвому середовищі споживання кисню мітохондріями внаслідок дії ріанодину зменшувалося у стані  $S_3$  на 12,9 %, а у стані  $S_4^{\text{АДФ}}$  – на 14,2 % (рис. 4, Б).

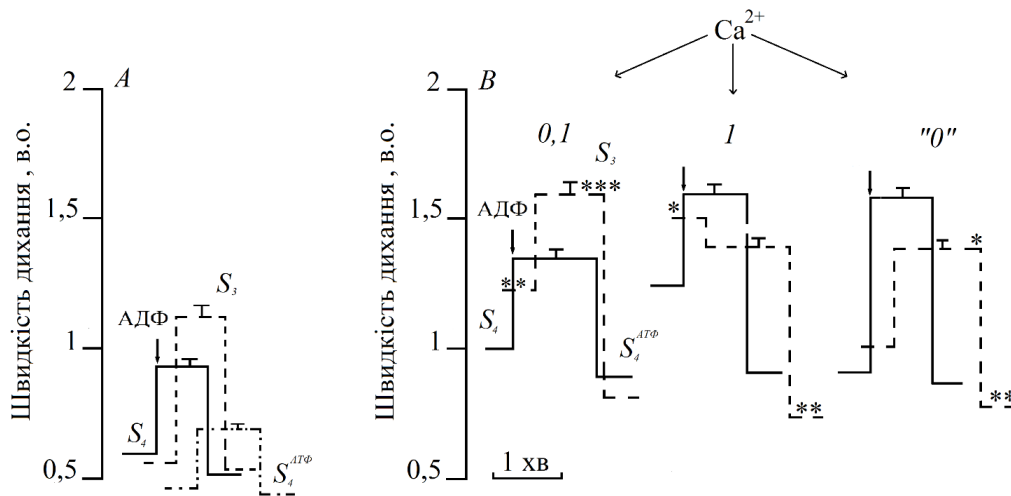


Рис. 4. Дихання суспензії мітохондрій за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату: А – преінкубація мітохондрій з ріанодином у концентрації 0,05 мкмоль/л (— контроль, - - - 5 хв, - · - 10 хв,  $[\text{Ca}^{2+}] = 0,1$  мкмоль/л; за одиницю взято швидкість у стані  $S_4$  за окиснення сукцинату); Б – вплив внесення ріанодину (0,1 мкмоль/л) у полярографічну комірку на дихання суспензії мітохондрій у середовищі з різною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$  (— контроль, - - - дослід; за одиницю взято швидкість у стані  $S_4$  за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату);  $[\alpha\text{-кетоглутарат}] = 5$  мкмоль/л,  $[\text{АДФ}] = 200$  мкМ; \* –  $P \leq 0,05$ , \*\* –  $P \leq 0,01$ , \*\*\* –  $P \leq 0,001$ ,  $n=4$

Інгібування ріанодином mRyRs може модулювати процеси дихання мітохондрій опосередковано через (1) зміну їхнього мембранного потенціалу і (2) зміну активності  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ та, відтак, активності дихального ланцюга. У свою чергу, між мембранним потенціалом і диханням мітохондрій наявні двобічні зв'язки – зменшення мембранного потенціалу інтенсифікує процеси дихання, що, у свою чергу веде до підвищення мембранного потенціалу і сповільнення дихання. Система через наявність великої кількості прямих і зворотних зв'язків є складною, тому за різних умов (різної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ , використання різних субстратів окиснення, вихідного значення мембранного потенціалу мітохондрій тощо) ефекти ріанодину є різними.

Дихання ізольованих мітохондрій печінки у контролі інтенсифікується внаслідок підвищення концентрації у середовищі  $\text{Ca}^{2+}$  від 0,1 до 1 мкмоль/л за використання усіх трьох субстратів окиснення. У разі окиснення пірувату й  $\alpha$ -кетоглутарату механізм цього підвищення є зрозумілий, оскільки підвищення концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій активує піруват- і  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназні комплекси [17]. За використання сукцинату як субстрату окиснення інтенсифікація дихання внаслідок збільшення концентрації

$\text{Ca}^{2+}$  від 0,1 до 1 мкмоль/л (див. рис. 2, Б) спричинена, мабуть, залученням до окиснення ендогенних субстратів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ.

Тут варто згадати, що рівень мембранного потенціалу мітохондрій печінки найвищий, коли субстратом окиснення є сукцинат [26]. Оскільки рушійна сила транспорту катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  залежить як від їхньої концентрації у середовищі, так і від мембранного потенціалу мітохондрій, то швидкість акумуляції (як і концентрація [26])  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій за окиснення сукцинату є найвищою. За таких умов система стає дуже чутливою до ріанодину. Тому інтенсивність дихання знижується за дії ріанодину навіть за переважаючого окиснення сукцинату, але не настільки, щоб змінився мембранний потенціал мітохондрій.

Зниження мембранного потенціалу мітохондрій печінки та вмісту в них  $\text{Ca}^{2+}$  внаслідок дії ріанодину у широкому діапазоні концентрацій (від 0,05 до 1 мкмоль/л) зареєстровано лише за окиснення пірувату [26]. І оскільки ріанодин (0,05–0,1 мкмоль/л) спричиняє значне пригнічення процесів дихання за концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 мкмоль/л (див. рис. 3), ми можемо стверджувати, що mRyRs є важливою ланкою зв'язку між мембранним потенціалом мітохондрій і їхнім диханням. Вилучення цієї ланки спричиняє зниження ступеня цього зв'язку та переведення енергетичного рівня мітохондрій на нижчий рівень.

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

Вихідне значення мембранного потенціалу мітохондрій печінки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату є нижчим, ніж за окиснення сукцинату і пірувату [26]. Але концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату є трохи вищою, ніж за окиснення пірувату [26]. Тому рушійна сила транспорту катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  теж є, очевидно, найнижчою. Достовірних змін мембранного потенціалу мітохондрій унаслідок дії ріанодину за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату не зареєстровано, хоча спостерігається виражена тенденція до зниження [26]. Дихання ж мітохондрій унаслідок додавання ріанодину в полярографічну комірку, коли концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  становить 0,1 мкмоль/л, інтенсифікується (див. рис. 4, Б). І ця інтенсифікація, зважаючи на трохи вищу чутливість  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до  $\text{Ca}^{2+}$  [17], нагадує таку ж інтенсифікацію за окиснення пірувату і концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  1 мкмоль/л (див. рис. 3, Б). В її основі справді може лежати усунення негативного впливу катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  у надмірній кількості на процеси дихання внаслідок інгібування mRyRs.

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

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабіч Л. Г., Шликов С. Г., Костерін С. О. Транспортування іонів Са в мітохондріях гладеньких м'язів // Укр. біохім. журнал. 2014. Т. 86. Вип. 6. С. 18–30.
2. Бабский А. М. Влияние адреналина на окислительное фосфорилирование и обмен ионов кальция в митохондриях печени и слизистой оболочки тонкого кишечника крысы: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.13. Пушино, 1985. 20 с.
3. Бабский А. М., Кондрашова М. Н., Шостаковская И. В. Действие и последствие адреналина на дыхание митохондрий // Физиол. журнал. 1985. Вып. 31. С. 301–306.
4. Бабский А. М., Стефанкив Ю. С., Кондрашова М. Н. Субстратно-гормональная система янтарная кислота – катехоламины. Новые данные // Митохондрии в патологии. Пушино: ОНТИ, 2001. С. 14–21.
5. Захарченко М. В., Кондрашова М. Н., Хундерякова Н. В. Важность сохранения биофизической организации изолированных митохондрий для выявления физиологической регуляции их функций // Биофизика. 2011. Вип. 56. С. 840–847.
6. Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Бабич Л. Г. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. біохім. журнал. 1996. Т. 68. Вип. 6. С. 50–61.
7. Кравенська Є. В. Неспецифічна проникність внутрішньої мембрани мітохондрій та її модифікація катіонами металів: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.13. Львів, 2010. 20 с.
8. Манько В. В. Системи транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у секреторних клітинах екзокринних залоз: монографія. Львів: ЛНУ Івана Франка, 2011. 271 с.
9. Мерлавський В. М., Іккерт О. В., Манько В. В. Вплив  $\text{Ca}^{2+}$  на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2015. Вип. 70. С. 294–304.
10. Наливайко Н. В., Вовканич Л. С., Дубицький Л. О. Порівняльний аналіз механізмів взаємодії катіонів двовалентних металів з  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обмінниками мітохондрій печінки // Вісн. Харк. нац. ун-ту. Біофіз. вісн. 2006. Вип. 17. С. 48–53.
11. Слинченко Н. Н., Браткова Н. Ф., Костерин С. А. и др. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность  $\text{Mg}^{2+}$ , АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып. 6. С. 812–819.
12. Altschafel B. A., Beutner G., Sharma V. K. et al. The mitochondrial ryanodine receptor in rat heart: A pharmaco-kinetic profile // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1768. N 7. P. 1784–1795.
13. Aperia A., Akkuratov E. E., Fontana J. M., Brismar H.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, a new class of plasma membrane receptors // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2016. Vol. 310. N. 7. P. 491–495.
14. Beutner G., Sharma V. K., Lin L. et al. Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling // Biochim. Biophys. Acta. 2005. Vol. 1717. N 1. P. 1–10.
15. Beutner G., Sharma V., Giovannucci D. et al. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. N 24. P. 21482–21488.
16. Chance B., Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state // J. Biol. Chem. 1955. Vol. 217. P. 409–427.
17. Denton R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1787. N 11. P. 1309–1316.
18. Fiske C. H., SubbaRow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. 1925. N 66. P. 375–400.

19. Gunter T. E., Pfeiffer D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1990. Vol. 258. N 5. P. 755–786.
20. Gunter T. E., Sheu S. S. Characteristics and possible functions of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1787. N 11. P. 1291–1308.
21. Gunter T. E., Sheu S. S. Characteristics and possible functions of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1787. P. 1291–1308.
22. Gunter T. E., Yule D. I., Gunter K. K. et al. Calcium and mitochondria // *FEBS Letters.* 2004. Vol. 567. N 1. P. 96–102.
23. Hoppe U. C. Mitochondrial calcium channels // *FEBS Lett.* 2010. Vol. 584. N 10. P. 1975–1981.
24. Jakob R., Beutner G., Sharma V. et al. Molecular and functional identification of a mitochondrial ryanodine receptor in neurons // *Neuroscience Lett.* 2014. Vol. 575. P. 7–12.
25. Jonson D., Lardy H. *Methods in Enzymology.* New York. 1967. Vol. 10. P. 94–102.
26. Купиняк Н. І., Іккерт О. В., Шлыков С. Г. et al. Mitochondrial ryanodine-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels of rat liver // *Cell Biochem. Funct.* 2017. Vol. 35. N 1. P. 42–49.
27. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, N 1. P. 265–275.
28. Panov A. V., Scaduto R. C. Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. Vol. 316 N 2. P. 815–820.
29. Pierebon N., Renard-Rooney D. C., Gaspers L. D. Ryanodine receptors in liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 45. P. 34086–34095.
30. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. Vol. 17. P. 208–212.
31. Rizzuto R., Bastianutto C., Brini M. et al. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in intact cells // *J. Cell Biol.* 1994. Vol. 126. P. 1183–1194.
32. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M. et al.  $\text{Ca}^{2+}$  transfer from the ER to mitochondria: when, how and why // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1787. N 11. P. 1342–1351.
33. Sparagna G. C., Gunter K.K., Sheu S.S., Gunter T.E. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. N 46. P. 27510–27515.
34. Thastrup O., Cullen P. J., Dröbak B. K. et al. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 2466–2470.
35. Xu Z., Zhang D., He X. et al. Transport of calcium ions into mitochondria // *Curr Genomics.* 2016. Vol. 17. N 3. P. 215–219.

Стаття: надійшла до редакції 18.09.17

доопрацьована 28.09.17

прийнята до друку 04.10.17

**THE ROLE OF RYANODINE-SENSITIVE  $Ca^{2+}$  CHANNELS IN REGULATION  
RESPIRATION MITOCHONDRIA OF THE LIVER OF RATS**

**N. Kupyntyak<sup>1,2</sup>, O. Ikkert<sup>1</sup>, V. Manko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskyyi St., Lviv 79005, Ukraine*

<sup>2</sup>*Danylo Halytsky Lviv National Medical University  
69, Pekarska St., Lviv 79000, Ukraine*

*e-mail: nadiya.kupyntyak@gmail.com*

The role of mRyRs in regulation of rats hepatocytes mitochondrial respiration has been investigated at different submitochondrial concentrations of  $Ca^{2+}$  and by oxidation of succinate, pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate. Isolated mitochondria were obtained by differential centrifugation method. The intactness of the received mitochondria was determined by electron microscopy method. As an indicator of the absence of plasma membrane residues and endoplasmic reticulum membranes, the ATPase activity of the mitochondria suspension has been defined based on changes in the content of inorganic phosphate in the medium after the incubation of mitochondria with eosin Y, oubain and tapsigargin. The rate of respiration has been determined by polarographic method with Clark's electrode using. To identify the role of mRyRs in mitochondrial respiration regulation, the mitochondria suspension was preincubated with ryanodine at a concentration of 0.05  $\mu\text{mol/l}$  or ryanodine was introduced at a concentration of 0.1  $\mu\text{mol/l}$  directly into a polarographic chamber. Decreasing of mitochondrial oxygen consumption has been specified after the preincubation of the mitochondria suspension with ryanodine for 5 and 10 minutes by the succinate oxidation. Due to the direct application of ryanodine to mitochondria in a polarographic chamber with a  $Ca^{2+}$  concentration in the medium of 0.1 and 1  $\mu\text{mol/l}$  by succinate oxidation, the rate of oxygen consumption decreased in the states  $S_4$ ,  $S_3$  and  $S_4^{ATP}$ . The preincubation of mitochondria with ryanodine by pyruvate oxidation, caused a decreasing of oxygen consumption, as after the direct addition of ryanodine to a polarographic chamber with a concentration of  $Ca^{2+}$  in a medium of 0.1  $\mu\text{mol/l}$ . At the concentration of  $Ca^{2+}$  in the medium of 1  $\mu\text{mol/l}$  increasing of oxygen consumption has been detected under the influence of ryanodine in the states  $S_4$ ,  $S_3$  by 12.2 and 17.2 % respectively. The mitochondrial oxygen consumption by the  $\alpha$ -ketoglutarate oxidation after the addition of ryanodine to a polarographic chamber with a concentration of  $Ca^{2+}$  0.1  $\mu\text{mol/l}$  in the medium has increased in the state  $S_4$  and  $S_3$ , while in the respiratory medium with a concentration of  $Ca^{2+}$  1  $\mu\text{mol/l}$  has increased in the state  $S_4$  by 19.1 % and decreased by 14.6 % in state  $S_4^{ATP}$ . Data analysis suggests that mRyRs in the hepatocytes mitochondria is an important link in the adaptive regulatory bond between the value of membrane potential of mitochondria and the intensity of their respiration at low values of the non-mitochondrial  $Ca^{2+}$  concentration and pyruvate oxidation. If the oxidation of  $\alpha$ -ketoglutarate predominates, or the sub-mitochondrial concentration of  $Ca^{2+}$  is high, its mRyRs yields inhibition of respiration.

*Keywords:* ryanodine, mRyRs, mitochondrial respiration, oxidation substrates, hepatocytes