

Б.О. Манько, В.В. Манько

## Вплив аденозиндифосфату на дихання мітохондрій *in situ* ацинарних клітин підшлункової залози щурів

Досліджено вплив аденозиндифосфату (АДФ) на дихання мітохондрій *in situ* ацинарних клітин підшлункової залози. Для цього використано модель оброблених дигітоніном панкреатичних ацинусів. Встановлено, що сукцинат або суміш пірувату, глутамату і малату інтенсифікували дихання пермеабілізованих клітин. АДФ у низькій концентрації (100 мкмоль/л) не впливав на швидкість споживання кисню. Тоді як за вищої його концентрації (750 мкмоль/л) спостерігалася короткочасна інтенсифікація дихання у номінально безкальцієвому середовищі. За зниження вмісту  $Ca^{2+}$  у середовищі до 100 нмоль/л АДФ не впливав на споживання кисню, а швидкість дихання, стимульованого сумішшю пірувату, глутамату і малату, зроста. Швидкість сукцинатстимульованого дихання не залежала від вмісту  $Ca^{2+}$  у середовищі. Наявність АТФ у середовищі знижувало стимульовальну дію АДФ, але збільшувало її тривалість. Однак ефекти АДФ не блокувались олігоміцином як за окиснення сукцинату, так і суміші пірувату, глутамату і малату. Отже, інтенсифікація дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів при додаванні у середовище АДФ, яка проявляється лише за підвищеного вмісту  $Ca^{2+}$  у середовищі, не пов'язана з окисним фосфорилуванням. Виявлений ефект АДФ може бути новим «функціональним маркером» розвитку патологічних процесів у мітохондріях ацинарних панкреатитів.

Ключові слова: ацинарні панкреатити, мітохондрії *in situ*, споживання кисню,  $Ca^{2+}$ , АДФ.

### ВСТУП

У фізіології важливо застосовувати ті методи, які дають можливість найкраще спостерігати за певним процесом і чинять на нього мінімальний вплив. Це стосується і біоенергетики. Останнім часом спостерігається відхід від класичних методів, які давали змогу досліджувати кінетику окисних процесів на субклітинних елементах: ізольованих мітохондріях, мікросомах, екстрактах водорозчинних ферментів чи їхніх системах, а також ізольованих мембранних ферментах, вбудованих у штучні мембрани. Застосування такого підходу дало знання про структуру, функції та можливості регуляції окисних систем клітини. Проте це аж ніяк не значить, що ми можемо перенести ці знання на реальну динаміку окисних процесів у живій клітині за різних її станів. Саме для цього розробляють методи, які дають змогу аналізувати стан

© Б.О. Манько, В.В. Манько

мітохондрій у клітинах. До таких належать, зокрема, ядерно-магнітний резонанс і флуоресцентні методи. І хоча останні дають можливість з високою точністю та наближеністю до умов *in vivo* в реальному часі аналізувати вміст ключових «діючих осіб» мітохондріального окиснення – відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАДН), відновленого флавінаденіндинуклеотиду (ФАДН<sub>2</sub>), АТФ, мітохондріального мембранного потенціалу [16, 22–24], вони втрачають переваги методів-попередників. А саме, обмежується доступ до мітохондрій речовин, непроникних через плазматичну мембрану – іонів, субстратів окиснення, аденилових нуклеотидів, деяких специфічних активаторів чи інгібіторів; це не дає можливості повністю контролювати чи модифікувати склад внутрішньоклітинного середовища для виявлення та аналізу механізмів дії певних досліджуваних чинни-

ків. Щоб подолати ці недоліки, проникність плазматичної мембрани для досліджуваних речовин збільшують за допомогою хімічної пермеабілізації або застосовуючи методи patch-clamp і двофотонної лазерної мікроскопії [7, 8, 23].

Нашу увагу привернув метод дослідження дихання мітохондрій у пермеабілізованих клітинах, або за умов *in situ*, апробований на м'язових клітинах [14, 19], гепатоцитах [1] і клітинах лімфоми [11]. Цей підхід є одним із способів поєднати переваги дослідження дихання ізольованих мітохондрій та цілісних клітин. Він полягає у селективній пермеабілізації плазматичної мембрани неіонним детергентом дигітоніном із подальшою реєстрацію споживання кисню за різних метаболічних станів мітохондрій, які близькі до станів ізольованих мітохондрій, описаних Чансом та Вільямсом [5]. Як стверджують піонери цього методу [14, 19], такий підхід має кілька переваг: збережені взаємозв'язки мітохондрій з іншими органелами, мітохондрії не зазнають пошкоджень у процесі пермеабілізації плазматичної мембрани, для аналізу достатньо порівняно невеликої кількості тканини.

У попередньому дослідженні [15] ми підібрали умови пермеабілізації та спробували змодельовати стани мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів, близькі до станів за Чансом. Однак ми не виявили стимулювальної дії АДФ на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів. Метою цієї роботи було детально дослідити вплив АДФ на дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів за різних умов інкубації.

## МЕТОДИКА

Досліди виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 250–300 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Щурів наркотизували хлороформом, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко видаляли підшлункову залозу.

Усі маніпуляції з тваринами проводились 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».

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримували з використанням колагенази (220 од./мл) за модифікованим методом Вільямса і співавт. [25], як описано раніше [15]. Клітини (мінімальна кількість 400) підраховували за допомогою камери Горяєва. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували трипановим синім (0,1 %). Кількість клітин з цілісними плазматичними мембранами становила не менше ніж 90 %. Після виділення ацинуси зберігали у базовому позаклітинному середовищі у відкритій конічній колбі, струшуючи із частотою 120 циклів за 1 хв, за кімнатної температури. У колбу подавали свіже повітря, як і під час інкубації з колагеназою.

Для дослідження дихання мітохондрій *in situ* за окиснення екзогенних субстратів ми здійснювали пермеабілізацію плазматичної мембрани з використанням дигітоніну. Ізольовані ацинуси центрифугували і замінювали позаклітинне середовище на одне з середовищ інкубації пермеабілізованих панкреатитів. Після внесення суспензії у полярографічну комірку додавали дигітонін (у розрахунку 50 мкг/10<sup>6</sup> клітин у 1 мл суспензії) [15]. Тривалість дії дигітоніну перед внесенням субстрату окиснення становила 5 хв.

Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом [5]. Значення дифузного струму реєстрували за допомогою полярографічної установки, зібраної на базі електрода Кларка, полярографа YSI 5300, потенціометра КСП-4, магнітної мішалки для розмішування суспензії та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл. Дихання мітохондрій панкреатичних ацинусів *in situ* реєстрували за температури інкубації 37°C. Для активації ФАД-залежного шляху використовували як субстрат окиснен-

ня сукцинату (5 ммоль/л), а для максимальної активації НАД-залежних шляхів – суміш пірувату, глутамату і малату (по 5 ммоль/л). Для стимуляції окисного фосфорилування додавали АДФ до концентрації 100 або 750 мкмоль/л. Кількість фосфорильованого АДФ розраховували, помноживши кількість поглинутого кисню у фазі стимуляції дихання АДФ на величину загальноприйнятих коефіцієнтів P/O (1,6 – для сукцинату, 2,3 – для НАД-залежних субстратів [10]). Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль O<sub>2</sub> [4].

Базове позаклітинне середовище містило (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 1,3, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, HEPES – 10,0, глюкоза – 10,0; бичачий сироватковий альбумін – 2,5 мг/мл, соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл; рН 7,4. У деяких випадках склад розчину модифікували: додавали колагеназу («Sigma» або «Gibco», type IV, 220 од./мл) або підвищували вміст альбуміну до 40 мг/мл. Базове (EGTA-вмісне) середовище інкубації пермеабілізованих панкреатитів містило (ммоль/л): KCl – 127,0, NaCl – 20,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 2,0, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, EGTA – 1,0, CaCl<sub>2</sub> – 0,28 ([Ca<sup>2+</sup>] = 10<sup>-7</sup> моль/л), HEPES – 10,0; соєвий інгібітор трипсину – 0,1%; рН 7,2 [8]. Концентрація вільного Ca<sup>2+</sup> була розрахована за допомогою програми Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 (<http://maxchelator.stanford.edu>). Також це середовище модифікували: не додавали EGTA і CaCl<sub>2</sub>, створюючи номінально безкальцієве середовище. Концентрація Ca<sup>2+</sup> у ньому, визначена з допомогою Ca<sup>2+</sup>-селективного електрода Corning Calcium 476041, становила 6,54±2,86 мкмоль/л (n = 6). Крім того, у деяких дослідженнях додавали АДФ у концентрації 2 ммоль/л.

Кожну серію досліджень проводили на 3–5 окремих препаратах ацинусів, отриманих із різних тварин. Необхідні статистичні розрахунки здійснювали за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм Microsoft Office Excel. Результати представлені як M ± m. Вірогідність різниці середніх

арифметичних двох вибірок оцінювали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### *Дослідження впливу АДФ на дихання пермеабілізованих панкреатитів у різних середовищах*

Проникнення субстратів мітохондріального окиснення через плазматичну мембрану клітини є обмеженим. Відомо, що плазматична мембрана гепатоцитів майже непроникна для сукцинату та глутамату [9]. Доведено проникність через інтактну плазмалему ацинарних клітин підшлункової залози лише для пірувату [26] і глутамату [12]. Однак у наших попередніх дослідженнях піруват, глутамат, малат, сукцинат чи субстрат АТФ-синтази АДФ не стимулювали дихання суспензії інтактних панкреатичних ацинусів [15]. Навіть якщо деяка кількість цих речовин і проникала у клітину, цього недостатньо для стимуляції дихання.

Власне, це й зумовило необхідність використання методу пермеабілізації плазматичної мембрани для дослідження дихання мітохондрій *in situ*. Для цього ми застосували дигітонін – неіонний детергент, який селективно зв'язується із холестериним, утворює з ним нерозчинні комплекси, що й призводить до виникнення пор у плазматичній мембрані [17]. Вміст холестерину в плазмалемі на кілька порядків вищий, ніж у інших мембранах клітини [6]. Це дає змогу селективно пермеабілізувати плазмалему, підбравши оптимальну концентрацію дигітоніну, що і було здійснено у попередніх дослідженнях [15].

Для того щоб перевірити проникність плазматичної мембрани для субстратів та інтактність мітохондрій пермеабілізованих клітин, експеримент проводили за такою схемою. У полярографічну комірку вносили суспензію інтактних ацинусів та протягом декількох хвилин реєстрували дихання. Після цього здійснювали пермеабілізацію плазматичної мембрани панкреатитів, дода-

ючи дигітонін. Через 5 хв вносили субстрат окиснення, а згодом – 750 мкмоль/л АДФ.

За інкубації у номінально безкальцієвому середовищі швидкість ендogenous дихання інтактних ацинарних панкреатитів, зібраних у ацинуса, становила  $0,26 \pm 0,04$  нмоль  $O_2$  / (с ·  $10^6$  клітин; рис. 1). Це дещо більше, ніж дихання повністю ізольованих ацинарних панкреатитів [13, 20]. Після додавання дигітоніну ми спостерігали поступове зниження швидкості дихання, яка стабілізувалася приблизно через 3–5 хв. Новий стан виникав, очевидно, внаслідок заміни іонного складу цитозолу та виходу ендogenous субстратів окиснення із клітини в процесі пермеабілізації і характеризувався нижчою на 35–45 % швидкістю споживання кисню порівняно з диханням інтактних ацинусів ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ; рис. 1,а,б). Як і в попередніх дослідженнях на інших тканинах [1, 11], ФАД-залежний субстрат сукцинат суттєво інтенсифікував споживання кисню до  $0,34 \pm 0,04$  нмоль  $O_2$  / (с ·  $10^6$  клітин) ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,а). Наступне додавання АДФ інтенсифіку-

вало дихання ще на  $98 \pm 13$  % ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,а, фаза 1). Після завершення стимулювальної дії АДФ швидкість дихання зменшувалась і була така сама, як і перед його додаванням (див. рис. 1,а, фаза 2). За використання ЕГТА-вмісного середовища швидкість дихання інтактних чи пермеабілізованих панкреатитів у більшості випадків не відрізнялася від попередніх результатів (див. рис. 1,а,б). Однак, парадоксально, додавання до ЕГТА-вмісного середовища АДФ не стимулювало дихання (див. рис. 1,а).

Дещо інші результати отримано за окиснення суміші пірувату, глутамату і малату (НАД-залежні субстрати). Додавання до номінально безкальцієвого середовища цих субстратів стимулювало дихання до  $0,19 \pm 0,01$  нмоль  $O_2$  / (с ·  $10^6$  клітин) ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,б). Внесення АДФ на їхньому тлі призвело до стимуляції дихання ще на  $136 \pm 21$  % ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 5$ ; див. рис. 1,б, фаза 1). Як і в попередній серії, через деякий час швидкість дихання знижувалася до того самого рівня, як і перед додаванням АДФ

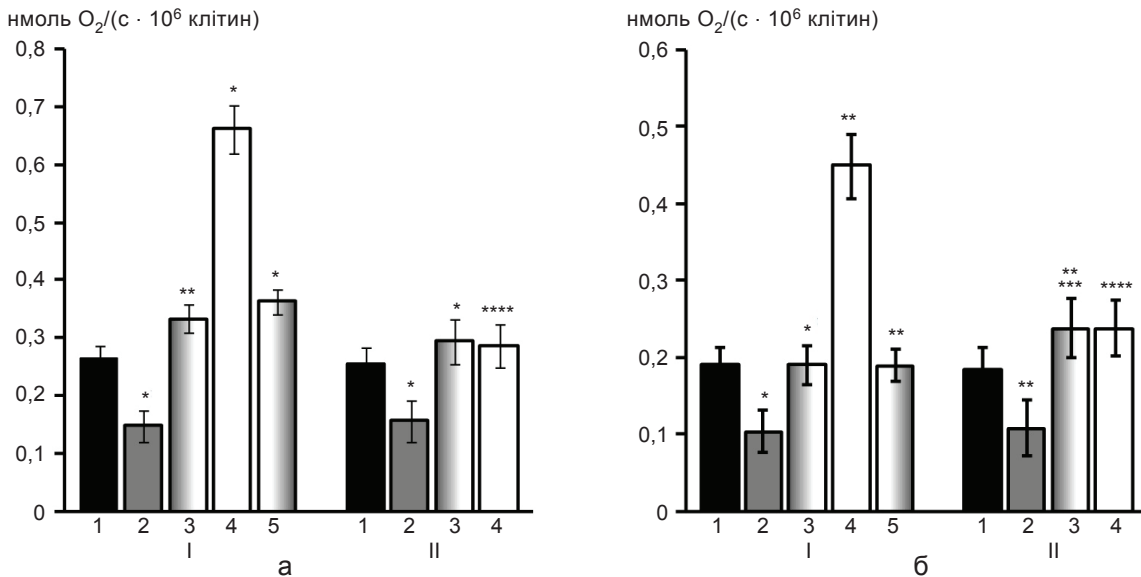


Рис. 1. Вплив середовища інкубації на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів за окиснення сукцинату (а) або суміші пірувату, глутамату і малату (б): I – номінально безкальцієве середовище, II – ЕГТА-вмісне середовище; 1 – дихання інтактних клітин; 2 – додано дигітонін; 3 – додано субстрат окиснення; 4 – додано АДФ, фаза 1; 5 – АДФ, фаза 2; \* статистично вірогідна різниця щодо попереднього показника з  $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* статистично вірогідна різниця щодо показника у номінально безкальцієвому середовищі з  $P \leq 0,05$ , \*\*\*\* з  $P \leq 0,001$

(див. рис. 1,б, фаза 2). У середовищі з ЕГТА субстрати окиснення сильніше стимулювали споживання кисню клітинами – до рівня, який на  $27,1 \pm 8,7\%$  вищий, ніж за їх інкубації у номінально безкальцієвому середовищі. Як і за окиснення сукцинату, АДФ не стимулював дихання ацинарних клітин. Правда, у трьох окремих експериментах (результати не представлені) ми не спостерігали інтенсифікації дихання за внесення АДФ незалежно від складу середовища.

*Дослідження природи АДФ-стимульованого дихання пермеабілізованих ацинарних клітин підшлункової залози*

Під час подальшого аналізу показників окисного дихання і окисного фосфорилування нашу увагу привернула надто короткочасна тривалість перебігу фази інтенсифікації споживання кисню після додавання АДФ за використання номінально безкальцієвого середовища (табл. 1). Відомо, що за умов *in situ* фаза АДФ-стимульованого дихання є здебільшого набагато тривалішою, ніж при дослідженні ізольованих мітохондрій (до декількох хвилин), і не припиняється навіть у часових рамках досліду [1, 11, 14, 19]. Це можливо через високу активність внутрішньоклітинних АТФаз, які постійно підтримують достатню для окисного фосфорилування концентрацію АДФ.

Відповідно до незначної тривалості «стану фосфорилування» значення коефіцієнтів Р/О, розраховані як співвідношення кількості доданого АДФ до кількості поглинутого атомарного кисню у фазі стимуляції (див. рис. 1,а,б, фаза 1), виявилися парадоксально високими за всіх умов досліду. Так, відомо, що

при інтактності мітохондрій ці коефіцієнти становлять, в середньому, 2,3 за окиснення субстратів НАД-залежних дегідрогеназ і 1,6 – за окиснення сукцинату [10]; для ізольованих мітохондрій не виявлено вищих коефіцієнтів, ніж 4 [10]. Одним з пояснень феномену надвисоких стехіометричних відношень Р/О може бути те, що за умов підвищених концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  у внутрішньоклітинному середовищі лише незначна частина доданого АДФ зазнає фосфорилування. Якщо припустити, що за цих умов відношення Р/О залишаються нормальними, то згідно з розрахунками фосфорилується лише 1–3% екзогенного АДФ (див. табл. 1). Отже, ймовірно, мітохондрії швидко втрачають здатність фосфорилувати АДФ у номінально безкальцієвому середовищі. Варто зазначити також, що визначення співвідношення Р/О для окисного фосфорилування мітохондрій *in situ* може бути не зовсім коректним, оскільки вміст ендогенних аденілових нуклеотидів невідомий.

З іншого боку, можливим є і те, що стимуляція дихання за додавання АДФ взагалі не пов'язана з окисним фосфорилуванням. Для перевірки цієї гіпотези ми дослідили зміни швидкості дихання при послідовному внесенні різних доз АДФ. Вміст АДФ у інтактних ацинарних панкреацитах становить  $0,36\text{--}1,07 \text{ нмоль} / 10^6 \text{ клітин}$  [13], а у дослідженнях мітохондріального дихання застосовують АДФ у концентраціях  $0,1\text{--}1 \text{ ммоль/л}$  [5, 14, 19]. Якщо під час АДФ-стимульованого дихання відбувається фосфорилування, тривалість ефекту мала б залежати від доданої його кількості. Зазвичай активація окисного фосфорилування ізольованих мітохондрій

**Таблиця 1. Показники окисного фосфорилування мітохондрій ацинарних панкреацитів *in situ* за використання номінально безкальцієвого середовища**

Умови досліду	Тривалість «стану фосфорилування», с	Відношення Р/О	Кількість фосфорильованого АДФ, нмоль	Кількість фосфорильованого АДФ, % від доданого
Сукцинат	$18,8 \pm 3,0$	$127,8 \pm 34,2$	$19,7 \pm 6,0$	$1,6 \pm 0,5$
Піруват, глутамат, малат	$17,5 \pm 2,3$	$140,8 \pm 17,7$	$20,7 \pm 2,9$	$1,7 \pm 0,2$

проходить за досить низьких концентрацій АДФ (на рівні  $10^{-4}$  моль/л). Але у наших дослідженнях внаслідок додавання у полярографічну комірку 0,16 нмоль АДФ (кінцева концентрація 100 мкмоль/л) дихання не інтенсифікувалося ( $n = 3$ ; рис. 2,а,б). Наступне внесення 1,2 нмоль/л АДФ (збільшення концентрації на 750 мкмоль/л) спричиняло тимчасову інтенсифікацію дихання. Якщо ж після завершення фази стимуляції повторно вносили ще 1,2 нмоль/л АДФ (збільшення концентрації ще на 750 мкмоль/л), його ефект на дихання був значно меншим, ніж попередній. Тобто меншими були швидкість стимульованого дихання (див. рис. 2,а,б), тривалість АДФ-стимульованого стану, і, відповідно, кількість кисню, поглинутого у цьому стані ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 3$ ; табл. 2). А теоретично за умов повного фосфорилування перших 1,2 нмоль/л АДФ ефект наступних 1,2 нмоль/л мав би бути таким самим.

Для додаткової перевірки, чи АДФ-індукована стимуляція споживання кисню пов'язана з окисним фосфорилуванням, ми застосували інгібітор АТФ-синтази олігоміцин. Виявлено, що дихання інтактних клітин у номінально безкальцієвому середовищі

приблизно наполовину знижується після додавання цього інгібітора ( $P \leq 0,01$ ,  $n = 3$ ; див. рис. 2,а,б). Ендогенне дихання пермеабілізованих клітин не змінювалося внаслідок додавання олігоміцину. Швидкості субстрат-чи субстрат+АДФ-стимульованого дихання за наявності олігоміцину були нижчими на 10–25 % ( $n = 3$ ; див. рис. 2,а,б), однак ці зміни не виявилися статистично вірогідними. І це є парадоксальним, адже олігоміцин не усував стимуляції дихання при додаванні високих доз АДФ. Тому отримані результати підтверджують те, що АДФ-індукована стимуляція дихання не пов'язана із його фосфорилуванням. Причиною цього може бути порушення мітохондріальних функцій внаслідок того, що у номінально безкальцієвому середовищі концентрація  $Ca^{2+}$  є значно вищою, ніж фізіологічна.

Так, у недавніх дослідженнях, проведених на ізольованих мітохондріях панкреатитів [18], показано, що вже за мікромольних концентрацій  $Ca^{2+}$  деполаризується внутрішня мембрана мітохондрій підшлункової залози. Цікаво, що класичний блокатор мітохондріальної пори неспецифічної проникності циклоспорин А лише наполовину блокував деполаризацію мітохондріальної мембрани і

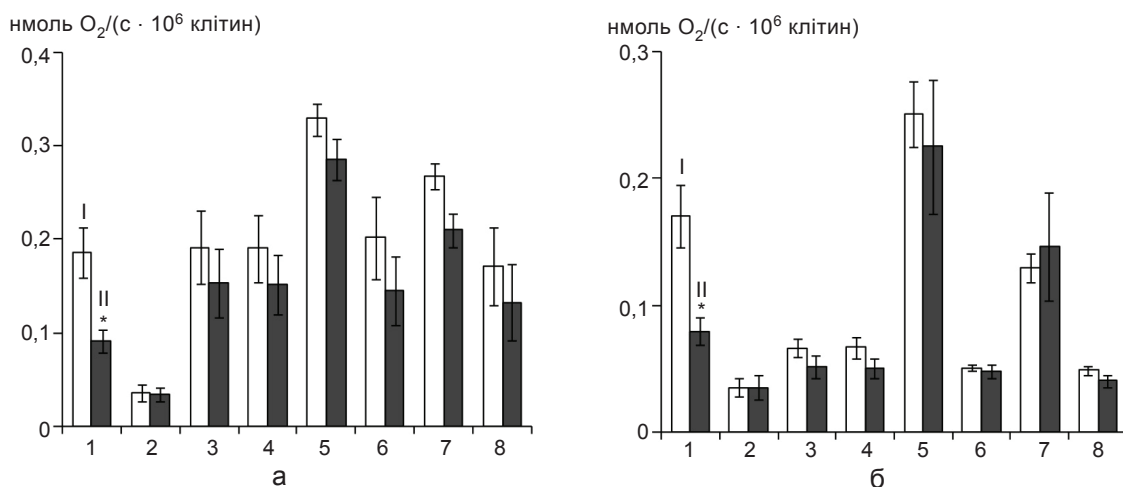


Рис. 2. Вплив олігоміцину та різних доз АДФ на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів у номінально безкальцієвому середовищі за окиснення сукцинату (а) або суміші пірувату, глутамату і малату (б): I – контроль; II – олігоміцин; 1 – дихання інтактних клітин; 2 – додано дигітонін; 3 – додано субстрат окислення; 4 – додано 0,16 нмоль АДФ; 5 – додано 1,2 нмоль АДФ, фаза 1; 6 – АДФ, фаза 2; 7 – додано ще 1,2 нмоль АДФ, фаза 1; 8 – АДФ, фаза 2; \* статистично вірогідна різниця щодо контролю з  $P \leq 0,05$

Таблиця 2. Параметри АДФ-стимульованого дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів за дії олігоміцину

Умови досліджу		Тривалість активного дихання після додавання АДФ, с		Кількість поглинутого кисню у стані активного дихання після додавання АДФ, нмоль O <sub>2</sub>	
		контроль	олігоміцин	Контроль	олігоміцин
Сукцинат	АДФ 1	50,7±24,6	39,3±17,8	6,24±0,92	4,42±0,86
	АДФ 2	21,3±9,4	12,6±4,3	1,21±0,34*	0,82±0,48*
Піруват, глутамат, малат	АДФ 1	21,3±4,7	22,0±3,8	4,73±1,17	4,71±1,76
	АДФ 2	9,97±2,7	15,0±5,0	0,93±0,31*	1,98±1,02*

Примітка: АДФ 1 – перше внесення 1,2 нмоль АДФ; АДФ 2 – друге внесення 1,2 нмоль АДФ; \* статистично вірогідна різниця щодо показника при першому внесенні АДФ з  $P \leq 0,05$ .

не пригнічував вихід цитохрому *c* з них. Натомість, блокатор мітохондріального транспортера аденинових нуклеотидів бонгкрекова кислота, а також АДФ у високій (!) концентрації повністю інгібували вихід цитохрому *c* і запобігали деполяризації [18]. Вважають, що цей транспортер є або компонентом активної циклоспоринчутливої пори неспецифічної проникності, або суттєво впливає на її стан [2]. Отже, АДФ, як і бонгкрекова кислота, зв'язуючись із транспортером, якимось чином впливає на функціонування циклоспоринчутливої пори неспецифічної проникності за перевантаження мітохондрій Ca<sup>2+</sup>.

Ми припустили, що інтенсифікація дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів внаслідок додавання АДФ теж пов'язана зі зміною стану мітохондріального транспортера аденинових нуклеотидів. На наступному етапі було досліджено вплив АТФ (речовини, що також впливає на стан цього транспортера) на АДФ-індуковані зміни дихання за окиснення субстратів НАД-залежних дегідрогеназ. Для цього здійснювали преінкубацію пермеабілізованих клітин з АТФ (2 ммоль/л) у номінально безкальцієвому середовищі протягом 15 хв. АТФ статистично вірогідно підвищував швидкість субстратстимульованого дихання, але до внесення у комірку АДФ. Швидкість АДФ-стимульованого дихання, навпаки, знижувалася ( $P \leq 0,05$  або  $\leq$

0,01,  $n = 5$ ; рис. 3). Ймовірно, що швидкість субстратстимульованого дихання зростала внаслідок кращого збереження клітинних функцій за наявності АТФ, наприклад, уможливлення функціонування Ca<sup>2+</sup>-помп ендоплазматичного ретикула, що усували б надлишковий Ca<sup>2+</sup> із середовища [21]. Проте не виключаємо можливості збільшення пулу ендogenous АДФ за активації внутрішньоклітинних АТФаз. Відсутність впливу АТФ на дихання після додавання АДФ вказує на зміну функціонального стану мітохондрій, природа якої залишається невідомою.

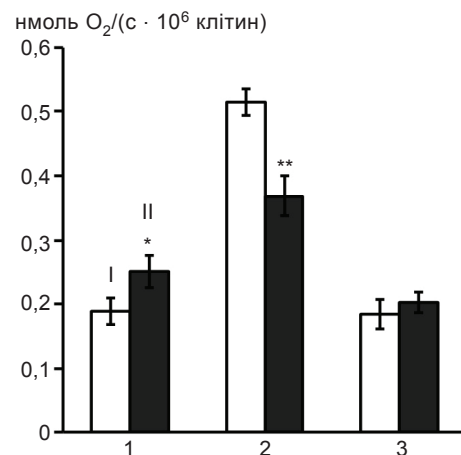


Рис. 3. Вплив АТФ та АДФ на дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів: I – контроль; II – АТФ; 1 – субстратстимульоване дихання; 2 – АДФ (фаза 1, стимуляція); 3 – АДФ (фаза 2, після стимуляції); \* статистично вірогідна різниця щодо контролю,  $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$

АТФ, поряд із зниженням швидкості АДФ-стимульованого дихання, статистично вірогідно підвищив тривалість цієї фази від  $21,96 \pm 1,64$  до  $63,18 \pm 16,50$  с ( $P \leq 0,05$ ,  $n = 5$ ). Фактично, наявність АТФ не вплинула на кількість спожитого кисню у фазу АДФ-стимульованого дихання, а лише «розтягнула» ефект АДФ у часі. Оскільки АДФ-індукована інтенсифікація дихання не пов'язана із фосфорилуванням, інгібіторний вплив АТФ реалізується, очевидно, через модуляцію активності транспортера аденінових нуклеотидів.

Варто зазначити, що у пермеабілізованих ацинарних панкреатитах наявна, ймовірно, достатня кількість ендogenous АДФ для підтримання фосфорилування. Адже відомо, що після пермеабілізації у цитозолі та мітохондріях гепатоцитів залишаються високі його запаси [3]. Це підтверджується тим, що у середовищі із фізіологічною концентрацією  $Ca^{2+}$  (100 нмоль/л) олігоміцин суттєво знижував швидкість субстратстимульованого дихання [15]. Тобто вже після додавання екзогенних субстратів до пермеабілізованих ацинарних панкреатитів виникає стан мітохондрій, подібний до стаціонарного стану 3 за Чансом [5].

Натомість у середовищі з підвищеною концентрацією  $Ca^{2+}$  (номінально безкальцієвому) спостерігався аномальний ефект АДФ зниження швидкості дихання за окиснення субстратів НАД-залежних дегідрогеназ. Виходячи з наведених даних, ми припускаємо, що за умов підвищеної концентрації  $Ca^{2+}$  та, ймовірно, деполяризації мітохондрій [18], екзогенний АДФ у високій концентрації здатний стимулювати дихання завдяки зв'язуванню з транспортером аденінових нуклеотидів та/або зміною стану циклоспоринчутливої пори неспецифічної проникності [2]. Інгібування пори при додаванні АДФ повинне впливати на такі характеристики мітохондрій, як мембранний потенціал, внутрішньомітохондріальний іонний склад чи набрякання. Очевидно, це відображається у зафіксованій нами короткочасній інтенсифікації дихання.

Проте для підтвердження цієї гіпотези слід провести дослідження впливу АДФ на інші мітохондріальні показники, зокрема, потенціал мітохондрій з використанням потенціалчутливих мітохондріальних барвників.

За використання номінально безкальцієвого середовища мітохондрії зберігають певну функціональну активність, а не гинуть повністю. Про це свідчить стимуляція дихання пермеабілізованих клітин субстратами окиснення. Відомо також, що у номінально безкальцієвому середовищі мітохондрії пермеабілізованих ацинарних панкреатитів здатні впродовж тривалого періоду інтенсивно акумулювати  $Ca^{2+}$  [20]. Тому ми вважаємо, що за умов використання номінально безкальцієвого середовища мітохондрії *in situ* характеризуються лише частковим порушенням функцій, що відповідає початковим етапам розвитку патологічних процесів, зокрема, апоптозу [18]. У зв'язку із цим виявлений ефект короткочасної інтенсифікації дихання за дії високої концентрації АДФ може бути новим «функціональним маркером» патологічних процесів у мітохондріях підшлункової залози, а також ключем для розуміння механізмів їх розвитку.

*Автори висловлюють щире подяку доцентіві кафедри анатомії і фізіології Львівського державного університету фізичної культури, кандидатів біологічних наук Гриньків М. Я. за надану методичну допомогу.*

**Б.А. Манько, В.В. Манько**

#### **ВЛИЯНИЕ АДЕНОЗИНДИФОСФАТА НА ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ IN SITU АЦИНАРНЫХ КЛЕТОК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС**

Исследовано влияние адениндиндифосфата (АДФ) на дыхания митохондрий *in situ* ацинарных клеток поджелудочной железы. Для этого использована модель обработанных дигитонином панкреатических ацинусов. Установлено, что вследствие добавления сукцината или смеси пирувата, глутамата и малата дыхание пермеабелизованных клеток интенсифицировалось. АДФ в низкой концентрации (100 мкмоль/л) не влиял на скорость поглощения кислорода. Тогда как при более высокой его концентрации (750 мкмоль/л) наблюдалась кратковременная интенсифика-



ция дыхания в номинально безкальциевой среде. При снижении содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в среде до 100 нмоль/л АДФ не влиял на поглощения кислорода, а скорость дыхания, стимулированного смесью пирувата, глутамата и малата, выросла. Скорость сукцинатстимулированного дыхания не зависела от содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в среде. Наличие АТФ в среде снижало стимулирующее действие АДФ, но увеличивало его продолжительность. Однако эффекты АДФ не блокировались олигомицином как при окислении сукцината, так и смеси пирувата, глутамата и малата. Таким образом, интенсификация дыхания пермеабилizованих ацинарных панкреатитов при добавлении в среду АДФ, проявляющаяся только при повышенной содержания  $\text{Ca}^{2+}$  в среде, не связана с окислительным фосфорилированием. Обнаруженный эффект АДФ может быть новым «функциональным маркером» развития патологических процессов в митохондриях ацинарных панкреатитов.

Ключевые слова: ацинарные панкреатиты, митохондрии *in situ*, поглощение кислорода,  $\text{Ca}^{2+}$ , АДФ.

**В.О. Manko, V.V.Manko**

#### INFLUENCE OF ADENOSINE DIPHOSPHATE ON RESPIRATION OF RAT PANCREATIC ACINAR CELLS MITOCHONDRIA IN SITU

The influence of adenosine diphosphate (ADP) on respiration of pancreatic acinar cell mitochondria *in situ* was studied. The model of digitonin-treated pancreatic acini was used. It was found that succinate or a mixture of pyruvate, glutamate and malate intensified respiration of permeabilized cells. Low ADP concentration (100  $\mu\text{M}$ ) did not influence the rate of oxygen uptake, whereas at higher concentration (750  $\mu\text{M}$ ) brief intensification of respiration was observed when using nominally  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium. When the medium with 100 nM  $\text{Ca}^{2+}$  was used, ADP had no effect on oxygen uptake, while the rate of respiration stimulated by a mixture of pyruvate, glutamate and malate increased. Rate of succinate-stimulated respiration did not depend on  $\text{Ca}^{2+}$  content in medium. The presence of ATP in the medium reduced the stimulatory effect of ADP, but increased its duration. Intensification of respiration by ADP, occurred only at elevated  $\text{Ca}^{2+}$  content, was not associated with oxidative phosphorylation because oligomycin did not inhibit it. The effect of ADP might be a novel “functional marker” of development of pathological processes in the mitochondria of acinar pancreocytes.

Key words: acinar pancreocytes, mitochondria *in situ*, oxygen uptake,  $\text{Ca}^{2+}$ , ADP.

*Ivan Franko National University of Lviv*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мерлавський В.М., Манько Б.О., Іккерт О.В., Манько В.В. Енергетичні процеси ізольованих гепатоцитів за різної тривалості дії інсуліну // *Studia Biologica*. – 2010. – 4, № 3. – С. 15–22.

2. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol. Rev.* – 1999. – 79, № 4. – P. 1127–1155.
3. Brocks D.G., Siess E.A., Wieland O.H. Validity of the digitonin method for metabolite compartmentation in isolated hepatocytes // *Biochem. J.* – 1980. – 188. – P. 207–212.
4. Carpenter J.H. New measurements of oxygen solubility in pure and natural water // *Limnol. Oceanogr.* – 1966. – 11. – P. 264–277.
5. Chance B., Williams G.R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state // *J. Biol. Chem.* – 1955. – 217. – P. 409–427.
6. Colbeau A., Nachbaur J., Vignais P.M. Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1971. – 249, № 2. – P. 462–492.
7. Gerasimenko J.V., Sherwood M., Tepikin A.V., Petersen O.H., Gerasimenko O.V. NAADP, cADPR and IP<sub>3</sub> all release  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area // *J. Cell Sci.* – 2006. – 119. – P. 226–238.
8. Gerasimenko Yu., Lur G., Sherwood M.W., Ebisui E., Tepikin A.V., Mikoshiba K., Gerasimenko O.V., Petersen O.H. Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on  $\text{Ca}^{2+}$  release via acid store IP<sub>3</sub> receptors // *PNAS.* – 2009. – 106, № 26. – P. 10758–10763.
9. Hems R., Stubbs M., Krebs H.A. Restricted permeability of rat liver for glutamate and succinate // *Biochem. J.* – 1968. – 107. – P. 807–815.
10. Hinkle P.C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – 1706. – P. 1–11.
11. Horbay R.O., Manko B.O., Manko V.V., Lootsik M.D., Stoika R.S. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma // *Cell Biol. Int.* – 2012. – 36, № 1. – P. 71–77.
12. Howell J.A., Matthews A.D., Swanson K.C., Harmon D.L., Matthews J.C. Molecular identification of high-affinity glutamate transporters in sheep and cattle forestomach, intestine, liver, kidney, and pancreas // *J. Anim. Sci.* – 2001. – 79. – P. 1329–1336.
13. Kosowski H., Schild L., Kunz D., Halangk W. Energy metabolism in rat pancreatic acinar cells during anoxia and reoxygenation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – 1367. – P. 118–126.
14. Kuznetsov A.V., Veksler V., Gellerich F.N., Saks V., Margreiter R., Kunz W.S. Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells // *Nat. Protoc.* – 2008. – 3, № 6. – P. 965–976.
15. Manko B.O., Klevets M.Y., Manko V.V. An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under *in situ* conditions // *Cell Biochem. Funct.* – 2013. – 31, № 2. – P. 115–121.
16. Matsumoto T., Kanno T., Seo Y., Murakami M., Watari H. Phosphorus nuclear magnetic resonance in isolated

- perfused rat pancreas // Amer. J. Physiol. – 1988. – **254**. – P. G575–G579.
17. Nishikawa M., Nojima Sh., Akiyama T. Sankawa U., Inoue K. Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol // J. Biochem. – 1984. – **96**. – P. 1231–1239.
18. Odnokova I.V., Sung K.-F., Mareninova O.A., Hermann K., Evtodienko Y., Andreyev A., Gukovsky I., Gukovskaya A.S. Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria // Gut. – 2009. – **58**. – P. 431–442.
19. Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., Kunz W.S. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function *in vivo* // Mol. Cell. Biochem. – 1998. – **184**. – P. 81–100.
20. Schulz H.U., Pross M., Meyer F., Matthias R., Halangk W. Acinar cell respiration in experimental acute pancreatitis // Shock. – 1995. – **3**, № 3. – P. 184–188.
21. Streb H., Schulz I. Regulation of cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in acinar cells of rat pancreas // Amer. J. Physiol. – 1983. – **245**. – P. G347–G357.
22. Voronina S., Sukhomlin T., Johnson P.R., Erdemli G., Petersen O.H., Tepikin A. Correlation of NADH and  $\text{Ca}^{2+}$  signals in mouse pancreatic acinar cells // J. Physiol. – 2002. – **539**, № 1. – P. 41–52.
23. Voronina S.G., Barrow S.L., Gerasimenko O.V., Petersen O.H., Tepikin A.V. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating  $\Delta\Psi_m$  // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, № 26. – P. 27327–27338.
24. Voronina S.G., Barrow S.L., Simpson A.W.M., Gerasimenko O.V., da Silva Xavier G., Rutter G.A., Petersen O.H., Tepikin A.V. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells // Gastroenterology. – 2010. – **138**. – P. 1976–1987.
25. Williams J.A., Korc M., Dormer R.L. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini // Amer. J. Physiol. – 1978. – **235**, № 5. – P. 517–524.
26. Zhao C., Wilson M.C., Schuit F. Halestrap A.P., Rutter G.A. Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas // Diabetes. – 2001. – **50**. – P. 361–366.

Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка  
E-mail: [mankobo@gmail.com](mailto:mankobo@gmail.com)

Матеріал надійшов до  
редакції 08.04.2013