

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ РІАНОДИНЧУТЛИВОГО Ca²⁺-ДЕПО ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ

С. Бичкова

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: s.bychkova@gmail.com*

У статті висвітлено особливості ріанодинчутливого Ca²⁺-депо гепатоцитів і зміни його функціонування у різних умовах (вікові зміни, вплив інсуліну). Проаналізовано концентрації, за яких ріанодин може активувати, а за яких блокувати вивільнення Ca²⁺. Обговорено взаємозв'язок між ріанодинчутливим депо та мітохондріями. Встановлено, що одночасне активування ріанодин- та IФ₃-чутливих Ca²⁺-каналів не викликало статистично достовірних змін депонованого Ca²⁺, але після перфузування печінки інсуліновмісним розчином спостерігалось зменшення флуоресценції Ca²⁺-хлортетрациклінового комплексу. Висвітлено особливості впливу ріанодину на АТФ-азні системи гепатоцитів і його зміни після перфузування печінки інсуліновмісним розчином.

Ключові слова: ріанодинчутливі Ca²⁺-канали, IФ₃-чутливі Ca²⁺-канали, мітохондрії, гепатоцити.

Ріанодинчутливі Ca²⁺-канали, або ріанодинові рецептори (RyRs) відкриваються у відповідь на підвищення концентрації йонів Ca²⁺ у цитозолі, а тому можуть відповідати за поширення внутрішньоклітинних Ca²⁺-сигналів шляхом Ca²⁺-індукованого вивільнення Ca²⁺ [21]. Назва каналу походить від здатності його зв'язувати рослинний алкалоїд ріанодин. Для збудливих тканин, зокрема скелетних м'язів, давно відомо, що у низьких концентраціях (<1 мкмоль/л) ріанодин стимулює вивільнення Ca²⁺ зі саркоплазматичного ретикулуму [19, 22], а у високих (> 100 мкмоль/л) – пригнічує його [11, 18]. Зв'язування ріанодину з мікросомальною фракцією, отриманою з гепатоцитів щурів, було неодноразово підтверджено [21, 29]. Показано, що ріанодин також може зв'язуватись як із високоафінними сайтами RyRs, так і з низькоафінними сайтами мікросомальної фракції ендоплазматичного ретикулуму (ЕПР) клітин печінки. Однак виявлено низку відмінностей такого зв'язування, порівняно зі скелетними м'язами. Зокрема, зв'язування ріанодину є Ca²⁺-незалежним і не пригнічується рутенієм червоним і йонами Mg²⁺ [29], але його пригнічує кофеїн і дендролен. Такий ефект дослідники пов'язують з тим, що ці речовини зв'язуються з RyRs або тісно асоційованими з ними поліпептидами [29].

Ранні молекулярні дослідження RyRs у гепатоцитах показали, що клітини печінки не експресують мРНК, що кодує серцеву чи скелетну ізоформи RyRs [29]. Було встановлено, що гепатоцити взагалі не експресують RyRs [14]. Згодом [24] показано наявність стовбурової форми RyRs типу 1. Автори не спостерігали достовірних змін базального рівня Ca²⁺ у інтактних гепатоцитах за дії ріанодину (1–100 мкмоль/л) і не виявили запуску цитозольних осциляцій Ca²⁺ [24]. Вчені констатували лише повільне вивільнення Ca²⁺ за дії ріанодину в концентраціях 1–5 мкмоль/л. Такі результати узгоджуються з даними інших авторів [17].

Отже, не викликає сумніву наявність RyRs, але залишається невивченим їхнє фізіологічне значення. Тому метою роботи було з'ясувати, яку роль відіграє ріанодин-чутливе

вивільнення Ca^{2+} у гепатоцитах за різних умов і вивчити взаємодію RyRs з іншими системами транспортування Ca^{2+} .

Матеріали та методи

Дослідження проводили на нелінійних щурах масою 0,18–0,2 кг. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Після ефірного наркозу тварин декапітували. Відпрепаровану печінку поміщали у зовнішньоклітинний розчин, який містив у ммоль/л: NaCl – 140,0; KCl – 4,7; CaCO_3 – 1,3; MgCl_2 – 1,0; HEPES – 10,0; глюкоза – 10,0; pH=7,4. Для вивчення впливу інсуліну проводили перфузування $\frac{1}{2}$ печінки зовнішньоклітинним розчином, що містив інсулін («Монодар») (0,04 МО).

Ізольовані гепатоцити отримували згідно з рекомендаціями ECVAM [5]. Для пермеабілізації клітин використовували сапонін у концентрації 0,01 мг/мл, який додавали до внутрішньоклітинного розчину такого складу (ммоль/л): NaCl – 20,0; KCl – 120,0; MgCl_2 – 1,13; HEPES – 10,0; pH=7,0. Інкубування зі сапоніном проводили впродовж 10 хв за присутності АТФ («Sigma», США) – 2,0 ммоль/л і CaCl_2 – 1,3 ммоль/л при постійному струшуванні та сталій температурі (36°C), після чого клітини відмивали внутрішньоклітинним розчином. Пермеабілізовані гепатоцити інкубували у внутрішньоклітинному розчині (контроль) та дослідних розчинах, які містили окремо інозитол -1,4,5-трифосфат (IP_3) («Sigma», США) (10 мкмоль/л), ріанодин («Sigma», США) (100 мкмоль/л). Після закінчення інкубації клітини відмивали внутрішньоклітинним розчином і фарбували 15 хв хлортетрацикліном (ХТЦ) (20 мкмоль/л) за кімнатної температури. Клітини відмивали від барвника внутрішньоклітинним розчином. Вимірювали інтенсивність флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу в окремих клітинах за допомогою цитофлуориметра ЛЮМАМ-И-1 (Росія) при збільшенні 40x7 з діаметром щілини 5 мм та інтерференційним фільтром $\lambda_{\text{max}}=541\pm 12$ нм.

Результати і їхнє обговорення

Ми звернули увагу на те, що у пермеабілізованих гепатоцитах автори не використовували концентрацій ріанодину, що є нижчими за 1 мкмоль/л. Тому припустили, що саме у наномолярному діапазоні може спостерігатись активування RyRs за рахунок зв'язування його з високоафінними сайтами ріанодинового рецептора. Ці припущення підтвердили наші попередні експерименти [1]. Ріанодин у концентраціях 5, 50 і 500 нмоль/л викликав статистично достовірне збільшення вмісту депонованого Ca^{2+} , що, на нашу думку, відображає активування каналу. Збільшення флуоресценції комплексу ХТЦ- Ca^{2+} можна пояснити тим, що ми інкубували клітини у номінально безкальцієвому середовищі, що не містило EGTA- Ca^{2+} -буфера. За таких умов концентрація вільного Ca^{2+} у цитозолі ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$) могла бути суттєво вищою за фізіологічний рівень у спокої. Тому Ca^{2+} , вивільнений за дії ріанодину, міг реакумулюватись іншими Ca^{2+} -депо, наприклад, мітохондріями. Такі міркування підтверджені подальшими експериментами за різної $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$, яка моделювалась за допомогою EGTA- Ca^{2+} -буферів. Виявилось, що дія ріанодину у блокуючій концентрації (100 мкмоль/л) викликає збільшення вмісту депонованого Ca^{2+} за умов, якщо $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ підтримувати у діапазоні від 100 до 300 нмоль/л (рис. 1). Якщо ж середовище інкубування пермеабілізованих гепатоцитів не містить EGTA- Ca^{2+} -буфера, тоді ріанодин (100 мкмоль/л) викликає незначне зменшення вмісту депонованого Ca^{2+} , тобто ефект є протилежним до того, що спостерігався за активуючих концентрацій (наномолярний діапазон). Таким чином, вплив ріанодину на пермеабілізовані гепатоцити виявляє його залежність від $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$.

У літературі багато даних про взаємозв'язок між вивільненням Ca^{2+} з ЕПР та поглинанням його сусідніми мітохондріями [8, 13, 26, 27, 29]. Показано, що ділянки тісного кон-

такту між цими органелами, так звані мітохондріально-споріднені мембрани (mitochondria associated membranes-MAM) містять макромолекулярні комплекси зовнішньомітохондріальної мембрани (mitochondrial outer membrane-ОММ) та ЕПР. У транспорті Ca^{2+} крізь ОММ важливу роль відіграє потенціалозалежний аніонний канал (the voltage dependent anion channel – VDAC) [26]. Ми використовували рутеній червоний з метою блокування акумулювання Ca^{2+} мітохондріями [1]. Показано, що сайти зв'язування рутенію червоного наявні на VDAC [15]. Рутеній червоний (10 нмоль/л) виражено зменшує вміст Ca^{2+} в депо на $(56,29 \pm 5,41)\%$ ($P < 0,01$, $n=6$), як у номінально безкальцієвому середовищі, і у середовищі, що містило EGTA- Ca^{2+} -буфер ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}} = 300$ нмоль/л).

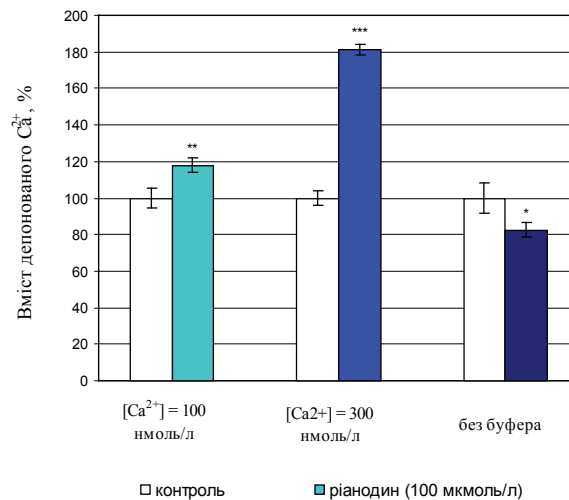


Рис. 1. Вплив ріанодину (100 мкмоль/л) на вміст депонованого Ca^{2+} за різної концентрації $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ пермеабілізованих гепатоцитів щурів (виражено в % від вмісту Ca^{2+} у контролі), * $p < 0,05$; ** $0,01 < p < 0,05$.

Нами було встановлено, що за сумісної дії рутенію та ріанодину (5 нмоль/л) у пермеабілізованих гепатоцитах статевозрілих щурів спостерігається збільшення вмісту депонованого Ca^{2+} на $17,41 \pm 7,38\%$ ($P < 0,05$, $n=13$). Оскільки дія самого лише ріанодину викликає такий самий ефект, то рутеній червоний не порушує його впливу. Можна припустити, що це зумовлено акумулюванням Ca^{2+} , вивільненого за дії ріанодину, у мембранах ЕПР. Такий взаємозв'язок постулюється, зокрема, для адипоцитів і клітин скелетних м'язів [9]. Для останніх відомою є локалізація RyRs і Ca^{2+} -АТФ-ази у мембранах саркоплазматичного ретикулуму. Однак це припущення було спростоване нашими подальшими експериментами [4]. Виявлено, що за дії ріанодину на мікосомальну фракцію клітин печінки щурів не спостерігається змін питомої активності Ca^{2+} -АТФ-аз [4].

Отже, залишається незрозумілою природа Ca^{2+} -вмісного депо, у якому відбувається накопичення Ca^{2+} після застосування ріанодину в гепатоцитах статевозрілих щурів. Ми припускаємо, що це так зване ацидофільне депо клітин. Ним є ендосомний апарат гепатоцитів, кислий вміст якого забезпечує робота H^+ -АТФ-ази, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -антипортер або Na^+/H^+ -обмінник, спряжений з $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінником. На користь цього припущення свідчить виявлене нами збільшення за дії ріанодину активності Na^+ , K^+ -АТФ-ази і базальної Mg^{2+} -АТФ-ази [4]. Т. Фельдман і співавт. [9] вважають, що Na^+ , K^+ -АТФ-аза є ключовим гравцем у регулюванні ендосомального рН і переміщенні ендосом у клітині, у регулюванні

клітинного об'єму, цитоплазматичного рН і рівня Ca^{2+} через Na^+/H^+ - і $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінники, відповідно [16, 23, 26]. Тому активування Na^+ , K^+ -АТФ-ази і базальної Mg^{2+} -АТФ-ази за дії ріанодину може свідчити про активування ендосомного апарату клітин.

Відомо, що у гепатоцитах ендосомний апарат містить «потужну машину» перетворення сигналу [25]. Добре вивченим є внутрішньоклітинне сигналювання від рецепторів інсуліну в ендосомальній фракції гепатоцитів [4, 17]. Деградація інсуліну відбувається в ендосомах і пов'язана з АТФ-залежним закисленням останніх [9]. Зокрема, показано, що пригнічення закислення ендосом веде до зменшення інсулінового сигналу в гепатоцитах [9] і призводить до деградації інсуліну [6]. Попередня обробка гепатоцитів бафоміцином пригнічувало вакуолярне закислення, а подальше інкубування таких клітин з інсуліном викликало аугментацію активності кінази інсулінових рецепторів, пригнічувало активність фосфатидилінозитол-3-кінази та зменшувало інсулін-індукований синтез ДНК та глікогену [7]. Отже, вакуолярне рН може функціонувати як модулятор інсулінового сигналу в ендосомах гепатоцитів.

Нами встановлено, що після перфузії печінки інсуліновмісним розчином ріанодин не викликав статистично достовірних змін АТФ-азної активності [4]. Отже, перфузія печінки інсуліном повністю перешкоджає впливові ріанодину на АТФ-азну активність мембран. Ми припустили, що ефекти ріанодину й інсуліну реалізуються через одні й ті ж транспортувальні системи, що підтверджують дані кореляційного аналізу [4]. Ймовірно, що вивільнений за дії ріанодину Ca^{2+} акумулюється в ацидофільному депо. Перфузія печінки інсуліном викликає зміни в ендосомному апараті гепатоцитів, що порушує вплив ріанодину на АТФ-азну активність мікросомальної фракції.

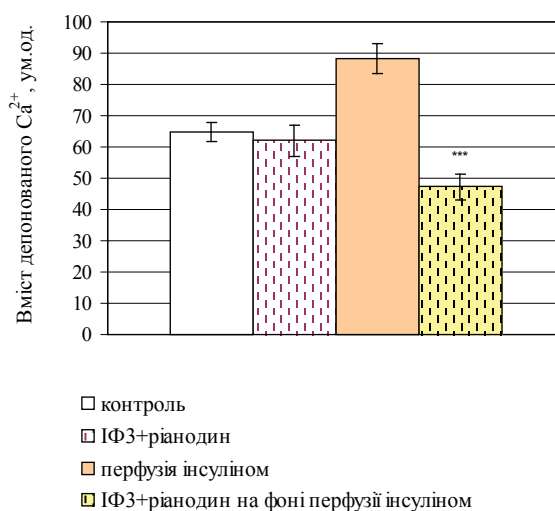


Рис. 2. Вплив сумісної дії ріанодину (5 нмоль/л) та ІФ₃ (10 мкмоль/л) на вміст депонованого кальцію у контролі та після перфузування печінки інсуліновмісним розчином, *** $p < 0,001$.

Сумісна дія ріанодину (5 нмоль/л) та ІФ₃ (10 мкмоль/л) на фоні перфузії печінки інсуліновмісним розчином викликала статистично достовірне зменшення вмісту депонованого Ca^{2+} на $(40,03 \pm 7,68)\%$ ($0,01 < P < 0,001$, $n=8$). У контролі (рис. 2) сумісне застосування ІФ₃ та ріанодину не змінювало депонований Ca^{2+} пермеабілізованих гепатоцитів, хоча окремо і ріанодин, і ІФ₃ викликає статистично достовірне збільшення його вмісту. Отже, після перфузії печінки інсуліновмісним розчином змінилися взаємозв'язки між RyRs та ІФ₃-чутливими

Ca²⁺-каналами (IP₃Rs). Очевидно, інсулін спричиняє перерозподіл Ca²⁺-транспортувальних систем у внутрішньоклітинних депо, внаслідок активування ендосомного апарату гепатоцитів і його рециркуляції. Ми припускаємо, що активування RyRs залучає якимось чином ацидофільне депо гепатоцитів. На відміну від IP₃Rs, які асоційовані з ЕПР та мають тісні зв'язки з мітохондріями [2].

Нами досліджена вікова залежність функціонування RyRs у гепатоцитах щурів [1]. Було встановлено, що додавання ріанодину (5 нмоль/л) до середовища інкубування пермеабілізованих гепатоцитів статевонезрілих і старих щурів викликає зменшення вмісту депонованого Ca²⁺, а у групі статевозрілих тварин, навпаки, – збільшення. Такі ж зміни депонованого Ca²⁺ гепатоцитів щурів різних вікових груп отримані нами й за дії ІФ₃ [1], що свідчить на користь тісного взаємозв'язку між RyRs та IP₃Rs, який не змінюється з віком. Показано [3], що з віком підвищується чутливість мітохондрій до Ca²⁺, а це може викликати перевантаження ним цих органел і спричинити клітинну смерть. Ми припускаємо, що, залежно від віку й ступеня розвитку гепатоцита, взаємозв'язок між його Ca²⁺ депо, зокрема ЕПР та мітохондріями, змінюється. Це може лежати в основі вікових змін.

Сумісна дія ріанодину (5 нмоль/л) та рутенію червоного у пермеабілізованих гепатоцитах статевонезрілих щурів викликає статистично достовірне зменшення вмісту депонованого Ca²⁺. На нашу думку, це вказує на відсутність взаємозв'язку між вивільненням Ca²⁺ під впливом ріанодину й акумулюванням його мітохондріями, оскільки сумісна дія ріанодину та рутенію є поєднанням їхніх поодиноких ефектів. Отже, у цій віковій групі вивільнений за дії ріанодину Ca²⁺ не акумулюється мітохондріями. У групі старих щурів не спостерігається статистично достовірних змін вмісту депоновано Ca²⁺ у пермеабілізованих гепатоцитах за одночасної наявності в середовищі інкубації ріанодину та рутенію червоного. Однак у цій групі окремо ріанодин, як і рутеній, зменшують вміст депонованого Ca²⁺, а отже, сумісна їхня дія мала би посилювати цей ефект, але цього не спостерігається. Тому ми припускаємо наявність взаємозв'язку між вивільненням Ca²⁺ за дії ріанодину і акумулюванням його уніпортером мітохондрій у групі старих щурів. Це може бути пов'язано із віковими змінами клітин, адже показано, що порушення взаємодії між ЕПР і мітохондріями лежить в основі апоптозу [8, 13].

Встановлено, що дія ріанодину залежить від [Ca²⁺]_{цит.}. Показано, що ріанодин (5, 50, 500 нмоль/л) активує RyRs гепатоцитів щурів, а у концентрації 100 мкмоль/л блокує його. Виявлено тісний взаємозв'язок між RyRs та IP₃Rs, який не змінюється з віком, але порушується після перфузування печінки інсуліном. Показано, що активування RyRs залежить від віку тварин. Встановлено, що залежність між RyRs і уніпортером мітохондрій наявна лише у групі старих тварин. Ми не виявили взаємозв'язку між RyRs та Ca²⁺-помпою мембран гепатоцитів, але встановили збільшення активності Na⁺, K⁺- та базальної Mg²⁺-АТФ-аз за дії ріанодину. Перфузування печінки інсуліном повністю перешкоджає впливові ріанодину на АТФ-азну активність мембран і порушує взаємодію між IP₃Rs та RyRs.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бичкова С. В. Вікові особливості взаємодії між внутрішньоклітинними Ca²⁺-транспортувальними системами пермеабілізованих гепатоцитів щурів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 48. С. 146–152.
2. Бичкова С. В., Чорна Т. І. Вплив ІФ₃ на АТФ-азну активність мембранних везикул гепатоцитів щурів після перфузування печінки інсуліновмісним розчином // Біологічні Студії / Studia Biologica. 2012. Т. 6. № 1. С. 47–54.

3. *Дубицький Л., Наливайко Н., Кравенська С.* Залежність Ca^{2+} акумульованої функції мітохондрій печінки від віку тварин // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 46. С. 153–158.
4. *Чорна Т., Бичкова С.* Вплив ріанодину на АТФ-азну активність мембран гепатоцитів щурів після перфузування печінки інсулінвмісним розчином // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2011. Вип. 55. С. 170–178.
5. *Blaauboer B. J., Boobis A. R., Castell J. V.* et al. The practical applicability of hepatocyte cultures in routine testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 1. ATLA 1994. Vol. 22. P. 231–241.
6. *Balbis A., Baquiran G., Dumas V., Posner B. I.* Effect of inhibiting vacuolar acidification on insulin signaling in hepatocytes // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. N 13. P. 12777–12785.
7. *Bevan A. P., Burgess J. W., Drake P. G.* et al. Selective activation of the rat hepatic endosomal insulin receptor kinase. Role for the endosome in insulin signaling // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. N 18. P. 10784–10791.
8. *Colins O. E., Eckenrode E. F., Olberding K. E.* et al. Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-x_L in apoptosis resistance and Ca^{2+} homeostasis // Mol. Biol. Cell. 2012. Vol. 23. N 13. P. 2605–2618.
9. *Desbuquois B., Janicot M., Dupuis A.* Degradation of insulin in isolated liver endosomes is functionally linked to ATP-dependent endosomal acidification // Eur. J. Biochem. 1990. Vol. 193. N 2. P. 501–512.
10. *Feldmann T., Glukmann V., Medvenev E.* et al. Role of endosomal Na^{+} - K^{+} -ATPase and cardiac steroids in the regulation of endocytosis // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2007. Vol. 293. N 3. P. 885–896.
11. *Fleischer S., Inui M.* Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling // Annu. Rev. Biophys. Chem. 1989. Vol. 18. P. 333–364.
12. *Gilchrist J. S., Palahniuk C., Abrenica B.* et al. RyR1/SERCA1 cross-talk regulation of calcium transport in heavy sarcoplasmic reticulum vesicles // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2003. Vol. 81. N 3. P. 220–233.
13. *Giorgi C., De Stefani D., Bononi A.* et al. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum // J. Biochem. Cell Biol. 2009. Vol. 41. N 10. P. 1817–1827.
14. *Hirata K., Puhl T., O'Neill A. F.* et al. The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger Ca^{2+} waves in rat hepatocytes // Gastroenterol. 2002. Vol. 122. P. 1088–1100.
15. *Israelson A., Zaid H., Abu-Hamad S.* et al. Mapping the ruthenium red-binding site of the voltage-dependent anion channel-1 // Cell Calcium. 2008. Vol. 43. N 2. P. 196–204.
16. *Kaplan J. H.* Biochemistry of Na^{+} , K^{+} -ATPase // Annu. Rev. Biochem. 2002. Vol. 71. P. 511–535.
17. *Khan M. N., Savoie S., Bergeron J. J.* Characterization of rat liver endosomal fractions. In vivo activation of insulin-stimulable receptor kinase in these structures // Biol. Chem. 1986. Vol. 261. N 18. P. 8462–8472.
18. *Lai F. A., Meissner G. J.* The muscle ryanodine receptor and its intrinsic Ca^{2+} channel activity // Bioenerg. Biomembr. 1989. Vol. 21. P. 227–245.
19. *Lattanzio F. A., Schlatterer R. G., Nicar M.* et al. The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 2711–2718.
20. *Lilly L. B., Gollan J. L.* Ryanodine-induced calcium release from hepatic microsomes and permeabilized hepatocytes // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1995. Vol. 268. P. G1017–G1024.

21. McNulty T. J., Taylor C. W. Caffeine-stimulated Ca^{2+} release from the intracellular stores of hepatocytes is not mediated by ryanodine receptors // *Biochem J.* 1993. Vol. 291 (Pt 3). P. 799–801.
22. Meissner G. Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 6300–6306.
23. Mobasher A., Avila J., Cozar-Castellano I. et al. Na^+ , K^+ -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions // *Biosci. Rep.* 2000. Vol. 20. P. 51–91.
24. Pierebon N., Renard-Rooney D. C., Gaspers L. D. Ryanodine receptors in liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 45. P. 34090.
25. Pol A., Calvo M., Enrich C. Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 441. N 1. P. 34–38.
26. Rizzuto R., Duchen M.R., Pozzan T. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca^{2+} liaison // *Sci STKE.* 2004. Vol. 215. № re 1.
27. Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences // *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86. P. 369–408.
28. Shoshan-Barmatz V., Israelson A., Brdiczka D., Sheu S. S. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death // *Curr Pharm Des.* 2006. Vol. 12. N 18. P. 2249–2270.
29. Shoshan-Barmatz V., Pressley T.A., Higham S., Kraus-Friedmann N. Characterization of high-affinity ryanodine-binding sites of rat liver endoplasmic reticulum Differences between liver and skeletal muscle // *Biochem. J.* 1991. Vol. 276. P. 41–46.
30. Szabadkai G., Bianchi K., Várnai P. et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels // *J.C.B.* 2006. Vol. 175. N 6. P. 901–911.

Стаття: надійшла до редакції 19.02.13

прийнята до друку 16.05.13

FEATURES OF FUNCTIONING RYANODINE-SENSITIVE Ca^{2+} -STORES OF RAT HEPATOCYTES

S. Bychkova

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: s.bychkova@gmail.com*

The article is observed the features of ryanodine-sensitive Ca^{2+} -store in hepatocytes and change of their functioning in different conditions (age-related changes, the effect of insulin). It was analyzed the concentration in which ryanodine can activate, and in which can inhibit the release of Ca^{2+} . We discuss the relationship between ryanodine-sensitive Ca^{2+} -store and mitochondria. It was established that simultaneous activation RyRs and IP_3 Rs does not cause statistically significant changes of stored Ca^{2+} , but perfusion of liver by insulin-content solution decreases the Ca^{2+} -content. It was discussed specialties of ryanodine influence on ATPase activity of hepatocytes and its changes after perfusion of liver by insulin-content solution.

Keywords: ryanodine-sensitive Ca^{2+} -channels, IP_3 Rs, mitochondria, hepatocytes.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РИАНОДИНЧУВСТВИТЕЛЬНОГО Ca²⁺-ДЕПО ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

С. Бичкова

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: s.bychkova@gmail.com*

В статье освещены особенности рианодинчувствительного Ca²⁺-депо гепатоцитов и изменения их функционирования в разных условиях (возрастные изменения, влияние инсулина). Проанализированы концентрации, при которых рианодин активирует и при которых блокирует освобождение Ca²⁺. Обсуждается взаимосвязь между рианодинчувствительным депо и митохондриями. Установлено, что одновременное активирование рианодин- и ИФ₃-чувствительных Ca²⁺-каналов не вызывает статистически вероятных изменений депонированного Ca²⁺, но после перфузирования печени инсулинсодержащим раствором наблюдалось уменьшение флуоресценции Ca²⁺-хлортетрациклинового комплекса. Обсуждены особенности влияния рианодина на АТФ-азные системы гепатоцитов и его изменения после перфузирования печени инсулинсодержащим раствором.

Ключевые слова: рианодин-чувствительные Ca²⁺-каналы, ИФ₃-чувствительные Ca²⁺-каналы, митохондрии, гепатоциты.