

## ІНГІБІТОР ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ $\text{Ca}^{2+}$ -АТФАЗ ЕОЗИН У НЕ ВПЛИВАЄ НА ДИХАННЯ І ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ У ПЕЧІНЦІ ЩУРА

Н. Купиняк, О. Іккерт, В. Манько

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

Відомо, що катіони  $\text{Ca}^{2+}$  задіяні до регуляції енергетичних процесів у мітохондріях багатьох тканин. Важливу роль у підтриманні цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  відіграють  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму. Тому досліджено вплив інгібітора  $\text{Ca}^{2+}$ -помп еозину Y на процеси дихання й окисного фосфорилювання у печінці щурів. Швидкість поглинання кисню визначали полярографічним методом з використанням електрода Кларка. З'ясувалося, що після перфузії печінки щура еозин Y-вмісним розчином (20 мкмоль/л) швидкість поглинання кисню у досліджуваних метаболічних станах ( $S_4$ ,  $S_3$ , і  $S_4^{\text{ATP}}$ ) за Чансом і Вільямсом, дихальний контроль (ДК, відношення швидкості дихання у стані  $S_3$  до швидкості дихання у стані  $S_4^{\text{ATP}}$ ) та показники окисного фосфорилювання (АДФ/О,  $T_p$ ,  $V_f$ ) суспензії ізольованих мітохондрій не змінювались ні за окиснення НАД- (піруват,  $\alpha$ -кетоглутарат), ні ФАД-залежних субстратів (сукцинат). Це не зумовлено наявністю гематогапатичного бар'єру, оскільки після інкубації з еозином Y гомогенату печінки щурів (де, крім мітохондрій, наявні везикули ендоплазматичного ретикулуму) показники його дихання та окисного фосфорилювання не змінювались. Додавання еозину Y безпосередньо у полярографічну комірку теж не впливало на процеси дихання та окисного фосфорилювання гомогенату печінки. Це дає підстави зробити висновок, що за умов досліді інгібування еозином Y  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулуму гепатоцитів суттєво не впливає на енергетичні процеси у мітохондріях.

*Ключові слова:* печінка, еозин Y, мітохондріальне дихання, субстрати окиснення.

Мітохондрії – це клітинні органели, які забезпечують синтез АТФ у клітині, але вони відіграють важливу роль у  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналізації. Зокрема, виконують функції внутрішньоклітинного депо  $\text{Ca}^{2+}$  і здатні впливати на характер та поширення  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу в цитозолі [21]. Акумуляція  $\text{Ca}^{2+}$  у матриксі мітохондрій забезпечується електрофоретичним уніпортером внутрішньої мітохондріальної мембрани. Цей процес модулює  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні клітинні процеси. Прикладом цього є те, що пригнічення акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях перетворює  $\text{I}\Phi_3$ -індуковані локальні  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнали на глобальне збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]$  у цитозолі клітин підшлункової залози [22]. Крім того, мітохондрії сприяють більшому спустошенню клітинних депо  $\text{Ca}^{2+}$  і, тим самим, – активації за фізіологічних умов депокерованих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів плазматичної мембрани [20]. І, нарешті, вони підтримують усі АТФ-залежні процеси, у тому числі й роботу  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани й ендоплазматичного ретикулуму.

Усі процеси транспортування  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондрії або з них тісно пов'язані з їхнім енергетичним станом [7, 17]. Перш за все, робота  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера визначається мітохондріальним мембранним потенціалом і концентраційним градієнтом катіонів  $\text{Ca}^{2+}$  [11]. Мітохондріальний мембранний потенціал генерується внаслідок активності електрон-транспортного ланцюга внутрішньої мембрани мітохондрій.

Між інтенсивністю окисних процесів у мітохондріях і величиною мітохондріального мембранного потенціалу наявні зворотні негативні зв'язки. Тому зменшення мембранного потенціалу в ході електрофоретичної акумуляції  $\text{Ca}^{2+}$  спричиняє інтенсифікацію дихання мітохондрій [3]. Крім того, іони  $\text{Ca}^{2+}$  активують  $\text{Ca}^{2+}$ -залежні ферменти матриксу мітохондрій – піруватдегідрогеназний і  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекси та НАД-ізоцитратдегідрогеназу [18]. Ці три ферменти каталізують реакції окиснення субстратів зі спряженим відновленням їхнього коферменту НАД.

Є дані, що катіони  $\text{Ca}^{2+}$  активують  $F_1$ - і  $F_0$ -комплекси АТФ-синтази [23]. Можливо, така активація АТФ-синтази здійснюється за участю  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого білка, який зв'язується з  $F_1$ - чи  $F_0$ -субодиницями синтази, що веде до посилення синтезу АТФ [8]. Синтез АТФ зростає вже при незначних підвищеннях внутрішньомітохондріальної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [13].

Отже, у клітині існує взаємозалежність між  $\text{Ca}^{2+}$ -осциляціями й енергетичними процесами. Однак на сьогодні не до кінця досліджений внесок різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем у регуляцію енергетичних процесів у клітині. Тому метою нашої роботи було оцінити роль  $\text{Ca}^{2+}$ -помп плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулу, використовуючи їхній інгібітор еозин Y, у регуляції енергетичного забезпечення клітин.

#### Матеріали та методи

Досліди виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію при постійній температурі на основному раціоні. Тварин наркотизували хлороформом, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини і швидко відділяли 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, і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Мітохондрії печінки щурів виділяли методом диференційного центрифугування [14], який дає змогу зберегти нативність ізольованих органел. Для цього печінку після виділення зважували та перфузували розчином такого складу (ммоль/л):  $\text{NaCl}$  – 140,  $\text{KCl}$  – 4,7,  $\text{CaCl}_2$  – 1,  $\text{MgCl}_2$  – 1, глюкоза – 5,  $\text{HEPES}$  – 10; рН 7,4. Охолоджену і відперфузовану печінку подрібнювали через прес і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма зі швидкістю 800 об/хв за 3 вертикальних ходи товкачика у співвідношенні 1 г тканини до 8 мл середовища гомогенізації. Середовище гомогенізації містило (ммоль/л): сахарозу – 250,  $\text{EGTA}$  – 1,  $\text{HEPES}$  – 10; рН 7,2. Гомогенат центрифугували 3 хв при 150 г та 5 хв при 300 г без зупинки центрифуги для осадження уламків клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували з надосадової рідини центрифугуванням супернатанту протягом 15 хв при 4500 г при температурі 0–2°C. 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 [15].

Швидкість поглинання кисню реєстрували полярографічним методом за температури 26°C. 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 містило (ммоль/л): сахарози – 250,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,  $\text{EGTA}$  – 0,1,  $\text{CaCl}_2$  – 1,  $\text{HEPES}$  – 10; рН 7,2. Як субстрати окислення використовували піруват (5 ммоль/л),  $\alpha$ -кетоглутарат (5 ммоль/л), сукцинат (5 ммоль/л). Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л). Внесенням у комірку інгібітора першого пункту спряження ротенону (10 мкмоль/л) за окиснення сукци-

нату усували надходження ендогенних НАД-залежних субстратів, а внесенням інгібітора другого пункту спряження ТТФА (10 мкмоль/л) за окиснення пірувату й  $\alpha$ -кетоглутарату – використання ФАД-залежних субстратів (ендогенного сукцинату).

За полярограмами визначали швидкість дихання у станах  $S_4$ ,  $S_3$  і  $S_4^{ATФ}$  за Чансом та Вільямсом [9], розраховували дихальний контроль (ДК, відношення швидкості дихання у стані  $S_3$  до швидкості дихання у стані  $S_4^{ATФ}$ ), ефективність (АДФ/О), час ( $T_p$ ) і швидкість ( $V_p$ ) окисного фосфорилування.

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  $P < 0,05$  [2].

### Результати і їхнє обговорення

Відомо, що флуоресцентний індикатор еозин Y (2,4,5,7-тетра-бромфлуоресцеїн) інгібує  $Ca^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани і ендоплазматичного ретикулулу [6]. Тому з метою оцінки ролі  $Ca^{2+}$ -помп у регуляції процесів енергетичного забезпечення клітини на першому етапі дослідження ми здійснювали перфузію печінки позаклітинним розчином, який містив еозин Y (20 мкмоль/л).

З'ясувалося, що за таких умов досліду еозин Y не впливав на процеси дихання та окисного фосфорилування мітохондрій за окиснення як ФАД-, так і НАД-залежних субстратів. Зокрема, швидкість поглинання кисню у стані  $S_3$  за окиснення сукцинату в контролі становила  $66,07 \pm 12,63$  нг-ат. О / (мг білка  $\times$  хв), а в досліді –  $58,18 \pm 9,19$  нг-ат. О / (мг білка  $\times$  хв);  $P > 0,05$ ,  $n=6$ . За окиснення НАД-залежних субстратів (пірувату й  $\alpha$ -кетоглутарату) статистично достовірних змін також не зареєстровано (рис. 1). Однак чітко простежується залежність швидкості поглинання кисню від субстрату окиснення. Зокрема, найвищою швидкість була за окиснення сукцинату, що узгоджується з даними інших авторів [4].

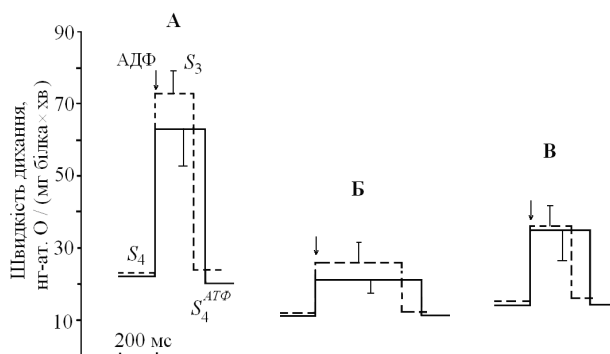


Рис. 1. Дихання мітохондрій після перфузії печінки еозин Y-вмісним розчином за окиснення сукцинату (А), пірувату (Б) й  $\alpha$ -кетоглутарату (В): штрихова лінія – контроль; суцільна лінія – дослід (печінку перфузували еозин Y-вмісним розчином у концентрації 20 мкмоль/л); стан  $S_4$  – у комірку з екзогенними субстратами вносили 100 мкл суспензії мітохондрій; стан  $S_3$  – для стимуляції окисного фосфорилування додавали екзогенний АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATФ}$ ; блокатори І (ротенон, 10 мкмоль/л) та ІІ (ТТФА, 10 мкмоль/л) пунктів спряження вносили в комірку одночасно зі субстратом окиснення.

За перфузії печінки розчином еозину Y були відсутні й зміни у процесах окисного фосфорилування (табл. 1). Проте значення показників окисного фосфорилування, як і показників дихання, залежали від субстрату окиснення. Найменш інтенсивним для клі-

тини виявилось використання пірувату, оскільки за цих умов швидкість і ефективність фосфорилування були найнижчими і, відповідно, тривалість цього процесу – найбільшою (табл. 1). Порівнюючи результати, отримані при окисненні сукцинату й  $\alpha$ -кетоглутарату, можна зробити висновок, що ефективність фосфорилування була вищою за використання  $\alpha$ -кетоглутарату, але решта показників дихання й окисного фосфорилування не відрізнялись. Це зумовлено різною кількістю пунктів спряження, задіяних у синтез АТФ при окисненні ФАД- та НАД-залежних субстратів, і узгоджується з теорією гормонально-субстратно-нуклеотидних систем регулювання енергетичних процесів [1].

Таблиця 1

Показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів після її перфузії еозин Y-вмісним розчином ( $M \pm m$ ;  $n=6$ )

Субстрати	АДФ/О, нмоль АДФ / нг ат. О		ДК, $S_3/S_4^{ATP}$		$V_p$ нмоль АДФ / (мг білка $\times$ с)		$T_p$ мг білка $\times$ с	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
Сукцинат	1,53 $\pm$ 0,25	1,52 $\pm$ 0,12	2,93 $\pm$ 0,36	3,16 $\pm$ 0,45	104 $\pm$ 23,7	90,8 $\pm$ 18,2	277 $\pm$ 72,9	296 $\pm$ 104
Піруват	1,96 $\pm$ 0,38	1,52 $\pm$ 0,09	1,85 $\pm$ 0,18	1,78 $\pm$ 0,18	52,0 $\pm$ 14,6	33,0 $\pm$ 3,64	486 $\pm$ 94,3	606 $\pm$ 65,7
$\alpha$ -кетоглутарат	3,02 $\pm$ 0,27	2,4 $\pm$ 0,28	2,04 $\pm$ 0,47	2,35 $\pm$ 0,51	110 $\pm$ 28,7	89,6 $\pm$ 26,9	257 $\pm$ 70,2	343 $\pm$ 78,6

Отже, перфузія печінки щурів розчином еозину Y не впливає на процеси енергетичного забезпечення ізольованих мітохондрій печінки. Ми припустили, що це може бути зумовлено наявністю гематогепатичного бар'єру – як чинника, що регулює надходження екзогенних речовин у печінку [16], або швидкоплинності змін внутрішньомітохондріального рівня  $Ca^{2+}$ . Тому на наступному етапі досліджень, з метою перевірки цих версій, як модельний об'єкт ми використали гомогенат печінки, в якому крім мітохондрій наявні везикули ендоплазматичного ретикулуму.

З'ясувалося, що після попередньої інкубації гомогенату печінки щурів з еозином Y (20 мкмоль/л) швидкість поглинання кисню при використанні ФАД- та НАД-залежних субстратів теж не змінювалася статистично достовірно (рис. 2).

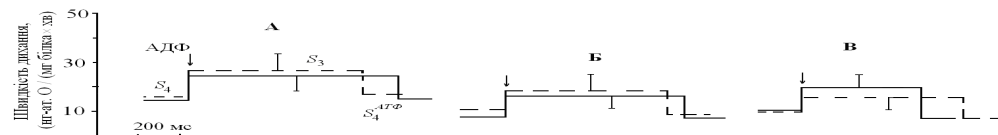


Рис. 2. Поглинання кисню гомогенатом печінки щурів після попередньої інкубації з розчином еозину Y за окислення сукцинату (А), пірувату (Б) та  $\alpha$ -кетоглутарату (В): штрихова лінія – контроль, суцільна лінія – дослід (гомогенат, попередньо проінкубований 5 хв з еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л); стан  $S_4$  – у комірку з екзогенними субстратами вносили 100 мкл гомогенату; після додавання екзогенного АДФ встановлюється стан  $S_3$ ; вичерпування екзогенного АДФ спричиняє перехід системи у рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; [ротенон]=10 мкмоль/л, [ТТФА]=10 мкмоль/л.

Статистично достовірних змін показників окисного фосфорилування попередньої інкубації гомогенату з еозином не виявлено. Отже, відсутність змін у процесах мітохондріального дихання за перфузії печінки еозином Y не зумовлена непроникністю цього інгібітора через гематогепатичний бар'єр.

Таблиця 2

Показники окисного фосфорилування у печінки щурів при додаванні до гомогенату печінки еозину Y (20 мкмоль/л) ( $M \pm m$ ;  $n=3$ )

Субстрати	АДФ/О, нмоль АДФ / нг ат. О		ДК, $S_3/S_4^{ATP}$		$V_p$ нмоль АДФ / (мг білка $\times$ с)		$T_p$ мг білка $\times$ с	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
Сукцинат	1,32 $\pm$ 0,20	0,99 $\pm$ 0,22	1,63 $\pm$ 0,03	1,79 $\pm$ 0,28	35,4 $\pm$ 12,9	22,0 $\pm$ 3,13	730 $\pm$ 225	961 $\pm$ 125
Піруват	2,22 $\pm$ 0,14	2,35 $\pm$ 0,54	2,31 $\pm$ 0,39	2,02 $\pm$ 0,15	39,3 $\pm$ 10,0	42,9 $\pm$ 22,0	619 $\pm$ 215	677 $\pm$ 221
$\alpha$ -кето- глутарат	2,08 $\pm$ 0,03	2,38 $\pm$ 0,14	2,89 $\pm$ 1,21	2,87 $\pm$ 0,92	32,9 $\pm$ 7,18	49,7 $\pm$ 15,8	763 $\pm$ 189	505 $\pm$ 191

У наступній серії ми перевірили припущення, чи не спричинена відсутність змін у диханні мітохондрій за перфузії печінки (чи попередньої інкубації гомогенату) еозин Y-вмістним розчином швидкоплинністю змін внутрішньомітохондріального рівня  $Ca^{2+}$ . Для цього еозин Y (20 мкмоль/л) додавали безпосередньо до розчину у полярографічній комірці. Однак у цій серії, як і у попередніх, за окиснення сукцинату, пірувату чи  $\alpha$ -кетоглутарату статистично достовірних змін дихання та окисного фосфорилування нами не встановлено (рис. 3).

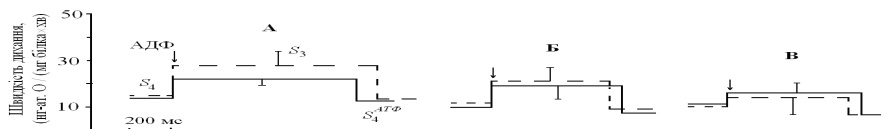


Рис. 3. Вплив додавання еозину Y до розчину в полярографічній комірці на поглинання кисню гомогенатом печінки щурів за окислення сукцинату (А), пірувату (Б) та  $\alpha$ -кетоглутарату (В): штрихова лінія – контроль, суцільна лінія – дослід (у комірку одночасно з гомогенатом вносили розчин еозину Y в концентрації 20 мкмоль/л); стан  $S_4$  – у комірку з екзогенними субстратами вносили 100 мкл гомогенату; стан  $S_3$  встановлюється після додавання екзогенного АДФ; після вичерпування екзогенного АДФ встановлювався рівноважний стан  $S_4^{ATP}$ ; [ротенон]=10 мкмоль/л, [ТТФА]=10 мкмоль/л.

Аналізуючи отримані результати, ми зробили висновок, що інгібування  $Ca^{2+}$ -помп ендоплазматичного ретикулуму та плазматичної мембрани еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л не впливає на енергетичні процеси у печінці щурів за активації ФАД- та НАД-залежних шляхів окиснення субстратів.

Таблиця 3

Показники окисного фосфорилування мітохондрій печінки щурів при додаванні еозину Y в полярографічну комірку ( $M \pm m$ ;  $n=3$ )

Субстрати	АДФ/О, нмоль АДФ / нг ат. О		ДК, $S_3/S_4^{ATP}$		$V_p$ нмоль АДФ / (мг білка $\times$ с)		$T_p$ мг білка $\times$ с	
	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід	контроль	дослід
Сукцинат	1,08 $\pm$ 1,58	1,28 $\pm$ 0,20	2,01 $\pm$ 0,30	1,92 $\pm$ 0,20	30,0 $\pm$ 6,86	29,8 $\pm$ 6,57	861 $\pm$ 291	745 $\pm$ 137
Піруват	1,77 $\pm$ 0,04	2 $\pm$ 0,16	2,27 $\pm$ 0,28	2,27 $\pm$ 0,11	38,6 $\pm$ 6,43	38,4 $\pm$ 7,58	499 $\pm$ 85,0	551 $\pm$ 149
$\alpha$ -кето- глутарат	2,84 $\pm$ 0,59	1,98 $\pm$ 0,22	2,01 $\pm$ 0,10	2,39 $\pm$ 0,16	36,7 $\pm$ 21,1	33,3 $\pm$ 4,46	541 $\pm$ 182	592 $\pm$ 61,9

Механізми взаємозв'язку між ендоплазматичним ретикуломом і мітохондріями до сьогодення залишаються дискусійними. Проте ні у кого не викликає сумнівів, що такий зв'язок наявний. Мітохондрії є близько розташованими до місць вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із ендоплазматичного ретикулу, тому можуть конкурувати з  $\text{Ca}^{2+}$ -помпами ендоплазматичного ретикулу у зменшенні цитозольної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [19]. Це, властиво, і лежить в основі функціонального (фізіологічного) зв'язку між цими двома органелами.

Не з'ясованим залишається і питання стосовно ролі різних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем ендоплазматичного ретикулу в реалізації ендоплазматично-мітохондріального зв'язку. Слід взяти до уваги те, що лише частина мітохондріальної поверхні перебуває в тісному контакті (є ко-локалізованою) з ендоплазматичним ретикуломом [24]. Не відомо також, які  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи наявні у колокалізованих мембранах цих органел, зокрема у мембрані ендоплазматичного ретикулу –  $\text{I}\Phi_3$ -чутливі чи ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали чи, можливо,  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи. На жаль, прямих методів, які б дали змогу встановити це, поки що не існує.

Крім цього, зростання  $[\text{Ca}^{2+}]$  у місцях контакту мітохондрій з ендоплазматичним ретикуломом має бути достатньою для активації уніпортера мітохондрій і мітохондріальних  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ, які активуються  $\text{Ca}^{2+}$  у мікромольних концентраціях [10]. Цілком можливо, що інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулу, навіть якщо вона наявна у колокалізованих із мітохондріями мембранах, є недостатньою, щоб активувати ці процеси.

Для з'ясування цього припущення потрібно провести дослідження, використовуючи інші специфічні модулятори  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем ендоплазматичного ретикулу та мітохондрій. Оскільки існує припущення, що еозин Y може пригнічувати активність і  $\text{Ca}^{2+}$ -уніпортера мітохондрій гладеньком'язових клітин матки [5].

Отже, інгібування  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи еозином Y у концентрації 20 мкмоль/л не зумовлює змін енергетичних процесів у печінці щурів за активації як ФАД-, так і НАД-залежних шляхів окиснення субстратів. Очевидно, таке інгібування не збільшує рівня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  до величин, необхідних для активації  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ у матриксі мітохондрій, або у місцях контакту зовнішньої мембрани мітохондрій з мембраною ендоплазматичного ретикулу відсутня  $\text{Ca}^{2+}$ -помпа ендоплазматичного ретикулу, як це було показано на фібробластих щурів [12].

#### Список використаної літератури

1. Гордій С., Шостаковська І., Доліба М. та ін. Адренергічні та холінергічні механізми регуляції ефективності дихання секреторних клітин // Фізіол. журн. 1994. Т. 40. № 2. С. 46–56.
2. Деркач М., Гумецький Р., Чабан М. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 206 с.
3. Доліба М. Холінергічна регуляція транспорту кальцію, окисного фосфорильовання в мітохондріях печінки і підшлункової залози: автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.13. Л., 1988. 19 с.
4. Кондрашова М. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. 1991. Т. 56. №3. С. 388-405.
5. Костерин С., Браткова Н., Бабич Л. и др. Влияние ингибиторов энергозависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем на кальциевые насосы гладкомышечной клетки // Укр. біохім. журн. 1996. Т. 68. № 6. С. 50–61.



6. Слинченко Н., Браткова Н., Костерин С. и др. Влияние эозина Y на каталитическую и функциональную активность  $Mg^{2+}$ , АТФ-зависимого кальциевого насоса плазматической мембраны гладкомышечных клеток // Биохимия. 1998. Т. 63. № 6. С. 812–819.
7. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79 (4). P. 1127–1155.
8. Boerries M., Most P., Gledhill J.  $Ca^{2+}$ -dependent interaction of S100A1 with  $F_1F_0$ -ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes // *Mol. Cell. Biol.* 2007. Vol. 27. P. 4365–4373.
9. Chance B., Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state // *J. Biol. Chem.* 1955. Vol. 217. P. 409–427.
10. Denton R., Richards D., Chin J. Calcium ions and the regulation of  $NAD^+$ -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues // *Biochem. J.* 1978. Vol. 176. P. 899–906.
11. Csordás G., Várnai P., Golenár T. et al. Calcium transport across the inner mitochondrial membrane: molecular mechanisms and pharmacology // *Mol. Cell Endocrinol.* 2012. Vol. 353 (1–2). P. 109–113.
12. García-Pérez C., Schneider T., Hajnóczky G. et al. Alignment of sarcoplasmic reticulum-mitochondrial junctions with mitochondrial contact points // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2011. Vol. 301 (5). P. 1907–1915.
13. Jouaville L., Pinton P., Bastianutto C. et al. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96(24). P. 13807–13812.
14. Jonson D., Lardy H. In *Methods in enzymology*. New York. 1967. Vol. 10. P. 94–102.
15. Lowry O., Rosebrough N., Farr A. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
16. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease // *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 2001. Vol. 161 (III–XIII). P. 1–151.
17. Mallilankaraman K., Cárdenas C., Doonan P. et al. MCUR1 is an essential component of mitochondrial  $Ca^{2+}$  uptake that regulates cellular metabolism // *Nat. Cell Biol.* 2012. Vol. 14 (12). P. 1336–1343.
18. McCormack J., Denton R. Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the  $Ca^{2+}$ -sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat // *Biochem. J.* 1980. Vol. 190. P. 95–105.
19. Montero M., Brini M., Marsault R. et al. Monitoring dynamic changes in free  $Ca^{2+}$  concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells // *EMBO J.* 1995. Vol. 14 (22). P. 5467–5475.
20. Parekh A. Store-operated  $Ca^{2+}$  entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane // *J. Physiol.* 2003. Vol. 547. P. 333–348.
21. Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular  $Ca^{2+}$ : molecular determinants and functional consequences // *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86. P. 369–408.
22. Tinel H., Cancela J., Mogami H. et al. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic  $Ca^{2+}$ -signals // *EMBO J.* 1999. Vol. 15 (18). P. 4999–5008.
23. Territo P., French S., Balaban R. Simulation of cardiac work transitions, in vitro: effects of simultaneous  $Ca^{2+}$  and ATPase additions on isolated porcine heart mitochondria // *Cell Calcium.* 2001. Vol. 30 (1) P. 19–27.
24. Walter L., Hajnóczky G. Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2005. Vol. 37 (3). P. 191–206.

## THE INHIBITOR OF $\text{Ca}^{2+}$ -ATPASE EOSIN Y DOESN'T INFLUENCE ON RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN THE RATS LIVER

N. Kupynyak, O. Ikkert, V. Manko

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

It is known that  $\text{Ca}^{2+}$  cations are engaged in regulation of energy processes in mitochondria of many tissues. PMCA and SERCA play an important role in support of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Therefore, the effect of eosin Y – inhibitor of PMCA and SERCA on the mitochondrial respiratory function and oxidative phosphorylation in rat liver were investigated. Mitochondrial respiratory function was measured with polarography (Clark electrode) using pyruvate,  $\alpha$ -ketoglutarate and succinate as substrates. It was shown that after perfusion of rat liver with eosin Y-containing solution (20 microM) oxygen consumption (state  $S_4$ , state  $S_3$ , state  $S_4^{\text{ATP}}$ ), respiratory control index (the ratio state  $S_3$ : state  $S_4^{\text{ATP}}$ ) and oxidative phosphorylation (ADP/O ratio,  $T_r$  and  $V_p$ ) indexes of isolated mitochondria did not change either in oxidation of NAD- or FAD-dependent substrates. It was not due to the existence of hematohepatic barrier, because after incubation of rat liver homogenate with eosin Y, (where except mitochondria are endoplasmic reticulum vesicles) oxygen consumption and oxidative phosphorylation indexes did not change. Finally, the addition of eosin Y directly in the polarographic chamber also had no effect on the processes of respiration and oxidative phosphorylation of rat liver homogenate. This suggests that under the experimental conditions inhibition of PMCA and SERCA of hepatocytes by eosin Y did not significantly reflected on the energy processes in the mitochondria.

*Keywords:* liver, eosin Y, mitochondrial respiration, substrate oxidation.

## ИНГИБИТОР ТРАНСПОРТНЫХ $\text{Ca}^{2+}$ -АТФАЗ ЭОЗИН Y НЕ ВЛИЯЕТ НА ДЫХАНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В ПЕЧЕНИ КРЫС

Н. Купиняк, О. Иккерт, В. Манько

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

Известно, что катионы  $\text{Ca}^{2+}$  задействованы в регуляции энергетических процессов в митохондриях многих тканей. Важную роль в поддержании цитозольной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  играют  $\text{Ca}^{2+}$ -насосы плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума. Поэтому исследовано влияние ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -насосов эозина Y на процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в печени крыс. Скорость поглощения кислорода определяли полярографическим методом с использованием электрода Кларка. Показано, что после перфузии печени крысы



раствором, содержащим эозин Y (20 мкмоль/л), скорость поглощения кислорода в метаболических состояниях ( $S_4$ ,  $S_3$  и  $S_4^{ATФ}$ ) по Чансу и Вильямсу, дыхательный контроль (отношение скорости поглощения кислорода в состоянии  $S_3$  скорости поглощения кислорода в состоянии  $S_4^{ATФ}$ ), а также показатели окислительного фосфорилирования ( $ADP/O$ ,  $T_F$ ,  $V_F$ ) суспензии изолированных митохондрий не менялись ни при окислении НАД- (пируват,  $\alpha$ -кетоглутарат), ни ФАД-зависимых субстратов (сукцинат). Это не обусловлено наличием гематогепатического барьера, так как после инкубации гомогената печени крыс (где, кроме митохондрий, есть везикулы эндоплазматического ретикулума) с эозином Y, показатели дыхания и окислительного фосфорилирования не изменялись. И, наконец, добавление эозина Y непосредственно в полярографическую ячейку также не влияло на процессы дыхания и окислительного фосфорилирования гомогената печени. Это позволяет сделать вывод, что в условиях эксперимента ингибирование эозином Y  $Ca^{2+}$ -насосов плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума гепатоцитов существенно не влияет на энергетические процессы в митохондриях.

*Ключевые слова:* печень, эозин Y, митохондриальное дыхание, субстраты окисления.