

ВПЛИВ РІАНОДИНУ НА АТФ-АЗНУ АКТИВНІСТЬ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ПІСЛЯ ПЕРФУЗУВАННЯ ПЕЧІНКИ ІНСУЛІНВІСНИМ РОЗЧИНОМ

Т. Чорна, С. Бичкова

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

Досліджували вплив ріанодину на АТФ-азну активність мембран гепатоцитів щурів та його дію після перфузування печінки інсулінвмісним розчином. Встановлено, що у контролі ріанодин збільшує загальну АТФ-азну активність на $(58,34 \pm 4,40)\%$ ($P < 0,001$, $n=5$) за рахунок збільшення питомих активностей Na^+ , K^+ -АТФ-ази на $(67,35 \pm 12,78)\%$ ($P \leq 0,001$, $n=5$) і базальної Mg^{2+} -АТФ-ази на $(55,25 \pm 5,45)\%$ ($P < 0,001$, $n=5$) та не впливає на питому Ca^{2+} -АТФ-азну активність мембран гепатоцитів щурів. Після перфузії печінки інсулінвмісним розчином також спостерігали зростання загальної АТФ-азної активності мембран гепатоцитів на $(53,29 \pm 7,90)\%$ ($P=0,05$, $n=7$) за рахунок зростання питомих активностей Na^+ , K^+ -АТФ-ази на $(77,92 \pm 10,25)\%$, ($P=0,05$, $n=7$) та загальної Ca^{2+} -АТФ-ази на $(54,74 \pm 12,52)\%$, ($P=0,05$, $n=6$), при цьому не змінювалася питома активність базальної Mg^{2+} -АТФ-ази. Вплив ріанодину на мембранні везикули гепатоцитів, отримані з перфузованої інсулінвмісним розчином печінки, не супроводжувався змінами АТФ-азної активності. Отже, перфузія печінки інсуліном повністю перешкоджає впливові ріанодину на АТФ-азну активність мембран, а ріанодин, у свою чергу, запобігає вираженому збільшенню загальної АТФ-азної активності мембран гепатоцитів щурів, яке спостерігається за дії інсуліну. Ми припускаємо, що ефекти ріанодину й інсуліну реалізуються через одні й ті ж самі транспортувальні системи, які локалізовані на тих самих депо, і розглядаємо можливу роль ендосомного апарату гепатоцитів у реалізації впливу цих речовин.

Ключові слова: ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали, АТФ-азна активність, гепатоцити, інсулін.

Гепатоцити є високо диференційованими і просторово поляризованими клітинами, які виконують широкий спектр функцій, включаючи проміжний метаболізм, синтез і секрецію білків, синтез, транспорт і секрецію жовчних кислот [8]. Зміна концентрації кальцію у цитозолі, ендоплазматичному ретикулумі, мітохондріях та інших внутрішньоклітинних органелах клітин здійснює необхідний вклад у регулювання цих функцій. Зокрема, кальцієвий сигнал відіграє важливу роль у контролюванні метаболізму гепатоцитів, включаючи мітохондріальний метаболізм і розпад глікогену [6, 19]. Такі гормони, як вазопресин, ангіотензин II і агоністи α -адренорецепторів мобілізують внутрішньоклітинні Ca^{2+} -депо, стимулюючи утворення вторинного посередника – інозитол-1,4,5-трифосфату (IP_3) [15]. Відомо, що інсулін підсилює ріст і регенерацію печінки, збільшує надходження глюкози до гепатоцитів, бере участь у регулюванні жовчоутворювальної функції цього органу [4, 10, 30]. Нами було попередньо показано [2], що після перфузування печінки інсулінвмісним розчином спостерігається підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію і змінюється на протилежний вплив ріанодину на вміст цього йона. З літератури відомо, що інсуліновий сигнал у гепатоцитах залежить від концентрації натрію і калію [32]. Численні функціональні докази підтверджують, що гомеостаз Ca^{2+} в клітинах також залежить від концентрації цих йонів [5, 28, 34]. Зокрема, кальцієве сигналювання модулюється через

α_2 - α_4 ізоформи Na^+ - K^+ -АТФ-ази, оскільки інгібування їхньої експресії підвищує агоніст-стимульоване вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо у гладеньких м'язах і ендотелії [5, 28] та збільшує концентрацію цитозольного кальцію у спокої та під час міогенного тонусу ізольованих брижових артеріол [34]. Однак залишається нез'ясованим, як впливає ріанодиніндуковане вивільнення Ca^{2+} у гепатоцитах на активність Na^+ - K^+ -АТФ-ази та інших АТФ-аз, а також як змінюється взаємозв'язок між цими транспортувальними системами за дії інсуліну. Тому метою роботи було дослідити дію ріанодину на АТФ-азну активність мембран гепатоцитів щурів і можливі зміни його впливу після перфузування печінки інсулінвмісним розчином.

Дослідження проводили на нелінійних щурах обох статей масою 0,18–0,2 кг. Після ефірного наркозу тварин декапітували. Відпрепаровану печінку поміщали у чашку Петрі із зовнішньоклітинним розчином, який містив (у ммоль/л): NaCl – 140,0; KCl – 4,7; CaCO_3 – 1,3; MgCl_2 – 1,0; HEPES – 10,0; глюкозу – 10,0; $\text{pH}=7,4$. На наступному етапі проводили перфузування $\frac{1}{2}$ печінки зовнішньоклітинним розчином з інсуліном («Монодар») (0,04 МО), який шприцом нагнітали у тканину печінки впродовж 10 хв. Решту печінки (контроль) перфузували лише зовнішньоклітинним розчином. Його ж використовували для відмивання печінки від перфузії. Охолоджену тканину подрібнювали, пропускаючи через прес. До подрібненої тканини додавали буферний розчин такого складу (у ммоль/л): сахароза – 250,0; ЕДТА – 1,0; тріс/ HCl – 10,0; $\text{pH}=7,4$; $t=4^\circ\text{C}$. Його додавали у масовому співвідношенні 1:8 і розтирали в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма при швидкості 300 об/хв. Фракцію мікросом гепатоцитів отримували методом диференційного центрифугування, суть якого полягає у проведенні серії послідовних центрифугувань суміші органел і мембранних фрагментів, одержаних при гомогенізуванні тканини. Отриманий пост'ядерний і постмітохондріальний супернатант, який містив переважно плазматичні та ретикулярні мікросоми, розділяли на аліквоти й використовували в експерименті або зберігали при температурі -20°C .

На початку експерименту аліквоти мембранних везикул розморожували та переносили у стандартне середовище інкубації без АТФ, яке містило (у ммоль/л): NaCl – 50,0; KCl – 100,0; тріс- Cl – 20,0 ($\text{pH}=7,4$, $t=37^\circ\text{C}$); MgCl_2 – 3,0; CaCl_2 – 0,01. АТФ-гідролазну ферментативну реакцію ініціювали додаванням 3 ммоль/л АТФ та інкубували проби протягом 15 хв при 37°C і помірному струшуванні у водяному ультратермостаті. Перед завершенням інкубування відбирали по 0,4 мл середовища інкубування для визначення вмісту білка за методом Лоурі [24]. Після завершення інкубації реакцію зупиняли додаванням 5 мл 10% трихлороцтової кислоти (ТХО), витримували проби 10 хв і центрифугували при 1600 g протягом 10 хв. Одержаний безбілковий супернатант використовували для визначення в ньому вмісту неорганічного фосфору за методом Фіске-Суббароу [14]. Суть методу полягає у тому, що неорганічний фосфор, який вивільнився в ході АТФ-гідролазної реакції, утворює з молібдатом амонію комплекси синього забарвлення, інтенсивність якого вимірювали фотоколориметрично при 650 нм. Активність АТФ-азних систем мембран досліджуваних клітин розраховували за різницею вмісту P_i у середовищах різного складу та виражали у мкмоль P_i у перерахунку на 1 мг білка на 1 год. Сумарну АТФ-азну активність мікросом визначали у стандартному Ca^{2+} та Mg^{2+} -вмісному середовищі інкубації. Для визначення питомої Na^+ , K^+ -АТФ-азної активності від сумарної АТФ-азної активності віднімали АТФ-азну активність у присутності 1 ммоль/л оубаїну, яка відображає сумарні Ca^{2+} та Mg^{2+} -АТФ-азні активності мембран гепатоцитів щурів. Для визначення питомої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азної активності розраховували різницю між сумарною Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -АТФ-азними

активностями. Питому Mg^{2+} -АТФазну активність визначали у середовищі інкубування, що містило 1 ммоль/л ЕГТА за відсутності $CaCl_2$ та у присутності 1 ммоль/л оуабайну.

Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох експериментальних сукупностей даних визначали коефіцієнт Стьюдента, а вірогідними вважали зміни при рівні значущості $P < 0,05$. Для перевірки наявності зв'язку між змінними проводили кореляційний аналіз, використовуючи коефіцієнт кореляції Пірсона [3].

Раніше нами було показано, що застосування ріанодину викликає збільшення вмісту депонованого кальцію у пермеабілізованих гепатоцитах щурів [1], що підтверджує функціонування у цих клітинах ріанодинчутливих каналів вивільнення кальцію (RyRs) і узгоджується з даними інших авторів [27]. Однак залишається нез'ясованим, у якому саме Ca^{2+} -вмісному депо реакулюється кальцій, вивільнений за дії ріанодину. Ми припустили, що активування RyRs у гепатоцитах, створюючи локальні ділянки з підвищеною концентрацією кальцію поблизу мембран, може впливати на роботу систем активного транспортування йонів, у першу чергу Ca^{2+} -транспортувальних. Для того щоб виявити таку залежність між RyRs та системами активного транспорту йонів, ми вивчали вплив ріанодину на зміни АТФ-азної активності гепатоцитів щурів. Нами показано (рис.1), що ріанодин збільшує загальну АТФ-азну активність на $(58,34 \pm 4,40)\%$ ($P < 0,001$, $n=5$). Аналіз питомого внеску різних АТФаз у сумарну АТФ-азну активність показав, що вона зростає за рахунок збільшення питомих активностей Na^+ , K^+ -АТФ-ази на $(67,35 \pm 12,78)\%$ ($P \leq 0,001$, $n=5$) і базальної Mg^{2+} -АТФ-ази на $(55,25 \pm 5,45)\%$ ($P < 0,001$, $n=5$). Однак не спостерігається змін питомої активності Ca^{2+} -АТФ-ази мембран гепатоцитів щурів за дії на них ріанодину. На основі цього можна припускати, що раніше виявлене нами збільшення вмісту депонованого кальцію

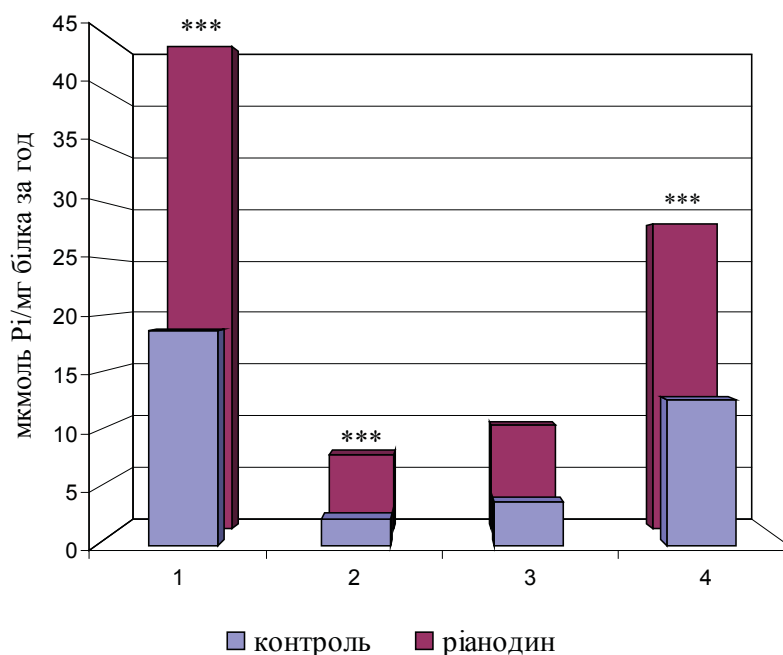


Рис. 1. Вплив ріанодину на зміни АТФ-азної активності мембран гепатоцитів щурів: 1 – загальна АТФ-азна активність; 2 – питома Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність; 3 – питома загальна Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азна активність; 4 – питома базальна Mg^{2+} -АТФ-азна активність; *** – $P \leq 0,001$ щодо контролю.

[1] під впливом ріанодину не залучає, очевидно, реакумулювання цього йона в ендоплазматичному ретикулумі за участю Ca^{2+} -помпи. Це, певним чином, може свідчити, що RyRs і Ca^{2+} -АТФ-ази у гепатоцитах не є спільно локалізованими на мембранах одних і тих самих депо. Такий взаємозв'язок постулюється, зокрема, для адипоцитів і клітин скелетних м'язів [18], а для останніх відомою є локалізація RyRs і Ca^{2+} -АТФ-ази у мембранах саркоплазматичного ретикулуму. Нами також було попередньо показано, що вплив ріанодину на вміст депонованого кальцію не залежить від наявності у середовищі інкубування рутенію червоного [1] – блокатора Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій – а тому можна припускати, що вивільнений за дії ріанодину кальцій [1] не акумулюється сусідніми мітохондріями. Отже, залишається незрозумілою природа Ca^{2+} -вмісного депо, у якому відбувається накопичення кальцію після застосування ріанодину. Можна припускати, що це так зване ацидофільне депо клітин. Ним є ендосомний апарат гепатоцитів, кислий вміст якого забезпечує робота H^+ -АТФ-ази. Зокрема, дані Ю.Герасименко та співавт. [16, 17] виявили функціонування RyRs у ацидофільному депо ацинарних клітин підшлункової залози, однак відомості про будь-який взаємозв'язок між RyRs та ендосомами гепатоцитів відсутні.

Звертає на себе увагу виявлене нами збільшення питомої активності базальної Mg^{2+} -АТФази за дії ріанодину. Функціонування цієї транспортальної системи було встановлено у гепатоцитах ще у 1993 р. [35], однак і досі залишається не з'ясованою її фізіологічна роль. Для клітин меланоми та мембран клітин гладеньких м'язів трахеї виявлено асоціацію Mg^{2+} -АТФ-ази з протонною помпою [9]. Тому можна припускати, що її функціонування також певним чином пов'язане з ацидофільним депо гепатоцитів.

Виявлений нами вплив ріанодин-індукованого вивільнення кальцію на зміни концентрації натрію і калію у гепатоцитах узгоджується з даними літератури для інших тканин [31, 33]. Так, у кардіоміоцитах Na^+ , K^+ -АТФ-аза регулюється концентрацією кальцію у цитозолі, як вважають, не прямо, а опосередковано через участь $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінника, крім того, зміни концентрації цього йона впливають на Na^+/H^+ -обмінник [31]. Відомо, що RyRs відповідають за вивільнення кальцію зі саркоплазматичного ретикулуму кардіоміоцитів [33]. Отже, у кардіоміоцитах існує взаємодія між вивільненим із RyRs кальцієм і активуванням систем активного транспорту натрію. Ми ж уперше показали взаємозв'язок між активуванням RyRs та активністю Na^+ , K^+ -АТФ-ази у гепатоцитах щурів.

Треба сказати, що в останні роки суттєво розширились уявлення про роль Na^+ , K^+ -АТФ-ази у фізіології клітини [20]. Показано, що цей ензим, окрім створення електрохімічного градієнта мембран, має також важливе значення у регулюванні клітинного об'єму, цитоплазматичного рН і рівня Ca^{2+} через Na^+/H^+ - і $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінники, відповідно [26, 20]. Зокрема, Т. Фельдман і співавт. [13] вважають, що саме Na^+ , K^+ -АТФ-аза є ключовим гравцем у регулюванні ендосомального рН та переміщенні ендосом у клітині [13]. Відомо, що у гепатоцитах ендосомний апарат містить потужну «машину» перетворення сигналу [29]. Це пов'язано з тим, що ендосоми утворюються шляхом інтерналізації плазматичної мембрани і мембранозв'язаних білків, які потім можуть повертатися назад до плазматичної мембрани, транспортуватися до інших мембран або перетворюватися у лізосоми чи протосоми для деградації. Добре вивченим є внутрішньоклітинне сигналювання від рецепторів інсуліну в ендосомальній фракції гепатоцитів [11, 21].

Відомо, що деградація інсуліну відбувається саме в ендосомах гепатоцитів і пов'язана з АТФ-залежним закисненням останніх [12]. Зокрема показано, що пригнічення закиснення ендосом веде до зменшення інсулінового сигналу в гепатоцитах [12]. Таким чином, і вплив ріанодину, і дія інсуліну в гепатоцитах певним чином залучають ацидофільне депо цих клітин.

Тому ми ставили за мету дослідити, як впливає перфузування печінки інсуліном на взаємозв'язок між активуванням RyRs та зміною АТФ-азної активності мембран гепатоцитів. Як контроль спочатку ми вивчали вплив інсуліну на АТФ-азну активність без зміни ріанодиніндукованого вивільнення кальцію.

Показано (рис. 2), що після перфузування печінки інсуліном зростає АТФ-азна активність мембран гепатоцитів на $(53,29 \pm 7,90)\%$, ($P < 0,05$, $n=7$) за рахунок зростання питомих активностей Na^+ , K^+ -АТФ-ази на $(77,92 \pm 10,25)\%$, ($P < 0,05$, $n=7$) та загальної Ca^{2+} -АТФ-азної активності на $(54,74 \pm 12,52)\%$, ($P < 0,05$, $n=6$). Виявлений нами вплив інсуліну на функціонування Na^+ , K^+ -АТФ-ази, що проявляється у підвищенні її активності, неодноразово підтверджений і для інших тканин, наприклад, скелетних м'язів [25, 32]. Показано, зокрема, що за дії інсуліну збільшується кількість α -субодиниць Na^+ , K^+ -АТФ-ази у мембранах скелетних м'язів [25]. Також виявлено, що інсулін викликає набухання гепатоцитів, яке є необхідним для синтезу глікогену і білків, індуюючи акумулювання K^+ і Na^+ всередині клітин [32]. Такий ефект є результатом спільного активування Na^+/H^+ -обмінника, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -симпорту і Na^+ , K^+ -АТФ-ази [32]. Отже, вплив інсуліну, як і ріанодину, пов'язаний із підсиленням транспортування K^+ і Na^+ у гепатоцитах.

Цікавим є виявлене нами збільшення загальної активності Ca^{2+} -АТФ-ази за дії на печінку інсулінвмісного розчину. Дані літератури про дію інсуліну на Ca^{2+} -помпи гепатоцитів не є численними, а окремі повідомлення констатують відсутність впливу цього гормону на активність Ca^{2+} -АТФ-ази ізольованих гепатоцитів [22], тоді як не вивчалось, який ефект чинить перфузування печінки інсуліном. Окрім того, відомо, що Ca^{2+} -мобілізувальні гормони (такі, як вазопресин і глюкагон) пригнічують роботу помпи [23]. Логічно припустити, що інсулін, на противагу їм, стимулює цю Ca^{2+} -транспортувальну

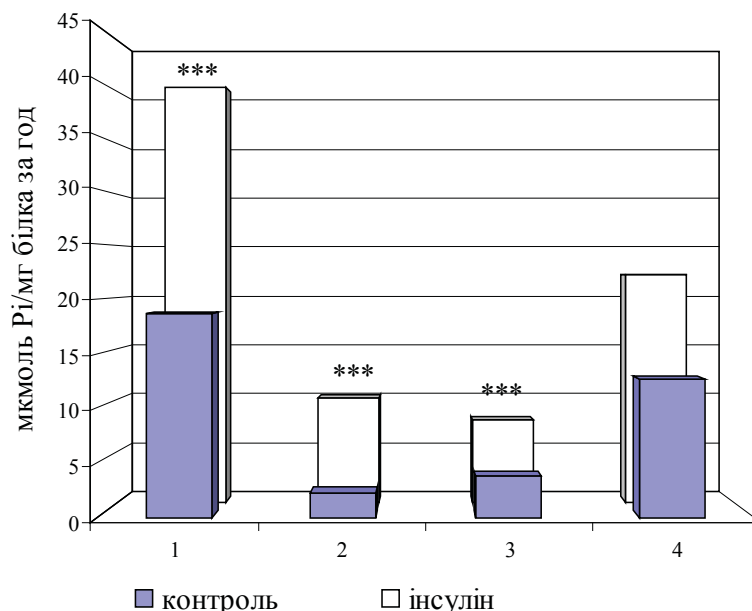


Рис. 2. Вплив перфузії печінки інсулінвмісним розчином на зміни АТФ-азної активності мембран гепатоцитів щурів: 1 – загальна АТФ-азна активність; 2 – питома Na^+ , K^+ -АТФ-азна активність; 3 – питома загальна Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ-азна активність; 4 – питома базальна Mg^{2+} -АТФ-азна активність; *** – $P < 0,001$ щодо контролю.

систему до закачування кальцію у депо. Власне, підвищенням активності Ca^{2+} -АТФ-аз за дії інсуліну можна пояснити виявлене нами раніше [2] збільшення вмісту депонованого кальцію у пермеабілізованих гепатоцитах, яке спостерігалось після перфузії печінки інсулінвмісним розчином. Отже, вплив інсуліну на кальцієвий гомеостаз гепатоцитів полягає в акумуляванні цього йона всередині ендоплазматичного ретикулулу шляхом стимулювання Ca^{2+} -АТФ-аз до закачування кальцію у це внутрішньоклітинне депо. Цим дія інсуліну на клітини печінки відрізняється від ріанодину, який, як ми описали вище, не впливав на активність цієї Ca^{2+} -транспортувальної системи.

На наступному етапі ми вивчали, як ріанодин впливає на АТФ-азну активність мембран гепатоцитів після перфузування печінки інсулінвмісним розчином. Виявилось, що вплив ріанодину на везикули, що отримані з перфузованої інсулінвмісним розчином печінки, не викликав жодних статистично достовірних змін загальної АТФ-азної активності мембран, при цьому не змінювалися статистично достовірно питомі активності ані Na^+ , K^+ -АТФ-ази, ані загальної Ca^{2+} -АТФ-ази, ані базальної Mg^{2+} -АТФ-ази. Слід відзначити, що ріанодин запобігає збільшенню питомої активності Ca^{2+} -АТФ-аз, яке спостерігалось після перфузії печінки інсуліном. У свою чергу, інсулін перешкоджає впливові ріанодину на питому активність базальної Mg^{2+} -АТФ-ази. Слід звернути увагу, що активність Na^+ , K^+ -АТФ-ази зазнає дії як ріанодину, так і інсуліну, тому вони запобігають впливові один одного.

Отже, перфузія печінки інсуліном повністю перешкоджає впливові ріанодину на АТФ-азну активність мембран, а ріанодин, у свою чергу, запобігає вираженому збільшенню загальної АТФ-азної активності мембран гепатоцитів щурів, яке спостерігається за дії інсуліну. На нашу думку, такий вплив можна пояснити тим, що ефекти ріанодину й інсуліну реалізуються через одні й ті ж транспортувальні системи. Наші міркування підтверджує кореляційний аналіз зв'язку між впливом ріанодину й інсуліну на загальну АТФ-азну активність мембран гепатоцитів щурів ($r > 0,7$). Високе значення коефіцієнта кореляції вказує на подібний ефект дії цих речовин.

Таким чином, підтвердилося наше припущення про те, що активування RyRs впливає на системи активного транспорту йонів у гепатоцитах. Це стосується, зокрема, Na^+ , K^+ -АТФ-ази, а також базальної Mg^{2+} -АТФ-ази. Спільним для дії ріанодину й інсуліну виявився їхній вплив на транспорт натрію і калію. Тобто Na^+ , K^+ -АТФ-аза є насамперед «точкою прикладання» цих речовин. Щодо транспортування кальцію, то з'ясувалося, що хоча і ріанодин та інсулін викликають збільшення його вмісту у пермеабілізованих гепатоцитах щурів [1; 2], однак при цьому залучають, як виявилось, різні Ca^{2+} -депонувальні органіди. За умов впливу перфузії печінки інсуліном спостерігається збільшення активності Ca^{2+} -АТФ-аз, що свідчить насамперед про акумулявання кальцію в ендоплазматичному ретикулумі за дії інсуліну. У разі дії ріанодину на мембрани гепатоцитів щурів не спостерігається змін питомої активності Ca^{2+} -помп, отже, дія ріанодину не супроводжується активним закачуванням кальцію в ендоплазматичний ретикулум. Ми припускаємо, що активування RyRs може бути пов'язане зі збільшенням вмісту кальцію в ацидофільному депо гепатоцитів. Це певною мірою підтверджує підвищення базальної активності Mg^{2+} -АТФ-ази і Na^+ , K^+ -АТФ-ази мембран гепатоцитів за дії ріанодину. Отже, перфузія печінки інсуліном спричиняє зміни активності транспортувальних систем мембран саме ендосомного апарату гепатоцитів, які насамперед стосуються транспорту калію і натрію.

1. Бичкова С. В. Вікові особливості взаємодії між внутрішньоклітинними Ca^{2+} -транспортувальними системами пермеабілізованих гепатоцитів щурів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 48. С. 146–152.

2. Бичкова С. В. Вплив інсуліну на функціонування внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортувальних систем пермеабілізованих гепатоцитів щурів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2009. Вип. 49. С. 174–181.
3. Лапач С. Н., Губенко А. В., Бабиц П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион, 2000. 320 с.
4. Лук'яненко І. В. Вплив інсуліну і глюкагону на секреторну функцію печінки: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2001. 17 с.
5. Arnon A., Hamlyn J. M., Blaustein M. P. Ouabain augments Ca^{2+} transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na^+ // Am. J. Physiol. Heart. Circ Physiol. 2000. Vol. 279. P. H679–H691.
6. Assimacopoulos-Jeannet F. D., Blackmore P. F., Exton J. H. Studies on alpha-adrenergic activation of hepatic glucose output. Studies on role of calcium in alpha-adrenergic activation of phosphorylase // J. Biol. Chem. 1977. Vol. 252. P. 2662–2669.
7. Balbis A., Baquiran G., Dumas V., Posner B. I. Effect of Inhibiting Vacuolar Acidification on Insulin Signaling in Hepatocytes // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 279. Iss. 13. P. 12777–12785.
8. Barritt G. J., Chen J., Rychkov G. Y. Ca^{2+} -permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology // Biochimica et Biophysica Acta. 2008. P. 651–672.
9. Bhatnagar V., Ramalah A. Characterization of Mg^{2+} -ATPase activity in isolated B16 murine melanoma melanosomes // Mol. Cell Biochem. 1998. Vol. 189. P. 99–106.
10. Benzeroual K., van de Werve G., Meloche S. et al. Insulin induces Ca^{2+} influx into isolated rat hepatocyte couplets // Am. J. Physiol. 1997. Vol. 6. Pt 1/. P. G1425–32.
11. 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. P. 10784–10791.
12. Desbuquois B., Janicot M., Dupuis A. Degradation of insulin in isolated liver endosomes is functionally linked to ATP-dependent endosomal acidification // FEBS. 2004. Vol. 193. Iss. 2. P. 501–512.
13. 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. C885–896.
14. Fiske C. H., SubbaRow Y. The colometric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. 1925. N 66. P. 375–400.
15. Gaspers L. D., Thomas A. P. Calcium signaling in liver // Cell Calcium. 2005. Vol. 38. P. 329–342.
16. Gerasimenko J. V., Flowerdew S. E., Voronina S. G. et al. Bile acids induce Ca^{2+} release from both the endoplasmic reticulum and acidic intracellular calcium stores through activation of inositol trisphosphate receptors and ryanodine receptors // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. N 52. P. 40154–40163.
17. Gerasimenko J. V., Sherwood M., Tepikin A. V. et al. NAADP, cADPR and IP_3 all release Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum and an acidic store in the secretory granule area // J. Cell Sci. 2006. Vol. 119. P. 226–238.
18. 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. 83. P. 220–233.
19. Hajnoczky G., Robb-Gaspers L. D., Seitz M. B., Thomas A. P. Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria // Cell. 1995. Vol. 82. P. 415–424

20. Kaplan J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase // *Annu. Rev. Biochem.* 2002. Vol. 71. P. 511–535.
21. Khan M. N., Savoie S., Bergeron J. J., Posner B. I. Characterization of rat liver endosomal fractions. In vivo activation of insulin-stimulable receptor kinase in these structures // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261. P. 8462–8472.
22. Lin S., Wallace M. A., Fain J. N. Regulation of Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activity in hepatocyte plasma membranes by vasopressin and phenylephrine // *Endocrinology.* 1983. Vol. 113. P. 2268–2275.
23. Lotersztajn S., Epand R., Mallat A. et al. The liver plasma membrane Ca²⁺ pump: hormonal sensitivity // *Biochimie.* 1985. Vol. 67. P. 1169–1176.
24. Lowry J. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. J. Protein measurements with the folic phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. N 193. P. C265–C275.
25. Marette A., Krischer J., Lavoie L. et al. Insulin increases the Na⁺-K⁺-ATPase α 2-subunit in the surface of rat skeletal muscle: morphological evidence // *AJP – Cell Physiol.* 1993. Vol. 265. Iss. 6 P. C1716–C1722.
26. 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.
27. Pierebon N., Renard-Rooney D. C., Gaspers L. D., Thomas A. P. Ryanodine Receptors in liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. P. 34090.
28. Pittner J., Rhinehart K., Pallone T. L. Ouabain modulation of endothelial calcium signaling in descending vasa recta // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2006. Vol. 291. P. F761–F769.
29. 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.
30. Rodrigues M. A., Gomes D. A., Andrade V. A. et al. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes // *Hepatology.* 2008. Vol. 47. Iss. 999A. P. NA.
31. Saini H. K., Dhalla N. S. Modification of intracellular calcium concentration in cardiomyocytes by inhibition of sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger // *Am. J. Physiol. Heart. Circ Physiol.* 2006. Vol. 291. P. H2790–H280.
32. Schliess F., Häussinger D. Cell volume and insulin signaling // *Int. Rev. Cytol.* 2003. Vol. 225. P. 187–228.
33. Woodcock E. A., Matkovich S. J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005. Vol. 37. P. 1746–1751.
34. Zhang J., Lee M. Y., Cavalli M. et al. Sodium pump α 2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice // *J. Physiol.* 2005. Vol. 569. P. 243–256.
35. Van de Put F.H., Visser G. J., Donkers E. A. et al. Basal Mg²⁺-dependent ATPase activity of rat liver microsomes is not influenced by ambient free Ca²⁺ // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 218. P. 959–962.

Стаття: надійшла до редакції 28.09.10

прийнята до друку 26.10.10

INFLUENCE OF RYANODINE ON ATPASE ACTIVITY OF RAT HEPATOCYTES MEMBRANE AFTER PERFUSION OF LIVER BY INSULIN-CONTENT SOLUTION**T. Chorna, S. Bychkova***Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: s.bychkova@gmail.com*

It was estimated the influence of ryanodine on rat hepatocytes membrane ATPase activity and their changing after perfusion of liver by insulin-content solution. It was established that in control ryanodine increased common ATPase activity by (58,34±4,40)% ($P<0,001$, $n=5$) due to increasing of specific activity of Na^+ , K^+ -ATPase by (67,35±12,78)% ($P<0,001$, $n=5$) and basal Mg^{2+} -ATPase by (55,25±5,45)% ($P<0,001$, $n=5$) and doesn't change common Ca^{2+} -ATPase activity of hepatocytes membrane of rats. After perfusion of liver by insulin-content solution we also found increasing of common ATPase activity by (53,29±7,90)% ($P=0,05$, $n=7$) due to increasing of specific activity of Na^+ , K^+ -ATPase by (77,92±10,25)% ($P=0,05$, $n=7$) and common Ca^{2+} -ATPase by (54,74±12,52)% ($P=0,05$, $n=6$), but at the same condition the specific activity of basal Mg^{2+} -ATPase doesn't change. Also ryanodine doesn't cause the changes of ATPase activity of hepatocytes membrane vesicles after perfusion of liver by insulin-content solution. Thus perfusion of liver by insuline completely prevented ryanodine's action and ryanodine also prevented increasing of ATPase activity of hepatocytes membrane after insuline action. We suppose that effect of ryanodine and insuline realized through the same transported systems, which are localized on the same stores, which may be endosome apparatus of hepatocytes.

Key words: RyRs, ATPase activity, hepatocytes, insulin.

ВЛИЯНИЕ РИАНОДИНА НА АТФ-АЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕМБРАН ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС ПОСЛЕ ПЕРФУЗИРОВАНИЯ ПЕЧЕНИ ИНСУЛИНСОДЕРЖАЩИМ РАСТВОРОМ**Т. Чорна, С. Бычкова***Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: s.bychkova@gmail.com*

Исследовали влияние рианоидина на АТФ-азную активность мембран гепатоцитов крыс и изменения его действия после перфузирования печени инсулинсодержащим раствором. Установлено, что в контроле рианоидин увеличивает общую АТФ-азную активность на (58,34±4,40)% ($P<0,001$, $n=5$) за счет увеличения удельных активностей Na^+ , K^+ -АТФ-азы на (67,35±12,78)% ($P<0,001$, $n=5$) и базальной Mg^{2+} -АТФ-азы на (55,25±5,45)% ($P<0,001$, $n=5$) и не влияет на общую Ca^{2+} -АТФ-азную активность мембран гепатоцитов крыс. После перфузирования печени инсулинсодержащим раствором также наблюдали увеличение АТФ-азной активности мембран гепатоцитов на (53,29±7,90)% ($P=0,05$, $n=7$) за счет увеличения удельных активностей Na^+ , K^+ -АТФ-азы на (77,92±10,25)% ($P=0,05$, $n=7$) и общей Ca^{2+} -АТФ-азы на (54,74±12,52)% ($P=0,05$, $n=6$), при этом не изменялась удельная активность базальной Mg^{2+} -АТФ-азы. Влияние рианоидина на мембранные везикулы гепатоцитов, которые были получены из перфузированной инсулинсодержащим раствором печени, не сопровождалось изменениями АТФ-азной активности. Таким образом, перфузия печени инсулином полностью препятствует влиянию рианоидина, а рианоидин, в свою очередь, предотвращает выраженное увеличение общей АТФ-азной активности мембран гепатоцитов крыс, которое наблюдалось в результате действия инсулина. Мы предполагаем, что эффекты рианоидина и инсулина реализуются через одни и те же транспортные системы, которые локализованы на тех же депо, и рассматриваем вероятную роль эндосомного аппарата гепатоцитов в реализации воздействия этих веществ.

Ключевые слова: рианодинчувствительные Ca^{2+} -каналы, АТФ-азная активность, гепатоциты, инсулин.