

УДК 612.014.42:612.31

**ВПЛИВ ІНСУЛІНУ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ  
Ca<sup>2+</sup>-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ ПЕРМЕАБІЛІЗОВАНИХ  
ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ****С. Бичкова**

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

Досліджували вплив інсуліну на інозитолтрифосфатчутливі та ріанодинчутливі Ca<sup>2+</sup>-канали у пермеабілізованих гепатоцитах щурів. Встановлено, що перфузія печінки інсулінвмісним розчином викликає суттєве статистично достовірне збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> у пермеабілізованих гепатоцитах щурів на 33,57% (n=29, P>0,001), а за дії інсуліну *in vitro* вміст мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> у них незначно, але статистично достовірно, зменшується на 11,09% (n=7, P<0,05). Виявлено, що після попередньої перфузії печінки інсулінвмісним розчином спостерігалися зміни процесів вивільнення Ca<sup>2+</sup> із внутрішньоклітинних депо за дії ІФ<sub>3</sub> (10 мкмоль/л) та ріанодину (5, 50, 500 нмоль/л) у пермеабілізованих гепатоцитах щурів порівняно із впливом цих речовин у контролі, коли перфузування печінки здійснювали зовнішньоклітинним розчином, що не містив інсуліну. Зокрема показано, що ІФ<sub>3</sub> зменшував вміст мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> на 32,00% (n=9, P<0,05), а у контролі спостерігалось збільшення цього показника під дією ІФ<sub>3</sub> на 43,95% (n=10, p=0,038). Крім того, виявлено, що після перфузування печінки інсулінвмісним розчином ріанодин у концентраціях 5 і 500 нмоль/л викликав зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> на 18,17% (n=7, p=0,05), 32,06% (n=4, p=0,03), відповідно, а у концентрації 50 нмоль/л статистично достовірних змін не виявили. У контролі дія ріанодину в концентраціях 5, 50 і 500 нмоль/л викликала статистично достовірне збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> на 26,73% (n=7, P<0,05), 50,10% (n=9, P<0,05), 25,51% (n=6, P<0,05), відповідно. Отже, перфузія печінки інсулінвмісним розчином запобігає впливові ріанодину (50 нмоль/л) на вміст мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> у пермеабілізованих гепатоцитах щурів. Зроблено висновки, що інсулін впливає на рівень мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup>, а це відображається на процесах вивільнення Ca<sup>2+</sup> з внутрішньоклітинних депо у пермеабілізованих гепатоцитах щурів.

*Ключові слова:* інсулін, ІФ<sub>3</sub>-чутливі Ca<sup>2+</sup>-канали, ріанодинчутливі Ca<sup>2+</sup>-канали, пермеабілізовані гепатоцити.

Добре відомо, що гормон підшлункової залози інсулін викликає в організмі людини і тварин гіпоглікемічний ефект, завдяки посиленню транспортування глюкози всередину інсуліночутливих тканин. До таких належать, зокрема, м'язи, жирова тканина та печінка. Інсулін збільшує надходження глюкози в клітини печінки, однак не шляхом збільшення кількості переносників глюкози у клітинній мембрані, як, наприклад, у м'язах, а шляхом збільшення синтезу глікогену, стимулюючи глікогенсинтазу [9], та шляхом індукування глікокінази. В останньому випадку збільшується фосфорилування глюкози, тому внутрішньоклітинна концентрація глюкози знижується, що сприяє її додатковому надходженню в клітину. Показано, що інсулін бере участь у регулюванні жовчоутворювальної функції печінки, підвищуючи рівень холерезу і збільшуючи вміст

інгредієнтів у жовчі [2]. Крім того, відомо, що інсулін підсилює ріст і регенерацію печінки [7, 12]. Зокрема показано, що інсулін стимулює активність мітоген-активованої протеїнкінази (mitogen-activated protein kinase – MAPK), індукуючи дозозалежне підвищення внутрішньоклітинного кальцію у гепатоцитах [7]. При цьому, як відзначають автори, спостерігається надходження  $\text{Ca}^{2+}$  крізь плазматичну мембрану ззовні [7]. Однак щодо впливу інсуліну на рівень внутрішньоклітинного кальцію в гепатоцитах у літературі наявні цілком протилежні дані: у ранніх дослідженнях постулювали як відсутність його дії [17], так і збільшення концентрації внутрішньоклітинного кальцію під впливом інсуліну [14]. При цьому вказують на те, що мітохондрії виступають головною системою, яка акумулює кальцій, а переміщення його крізь плазматичну мембрану під впливом інсуліну не спостерігалось [13].

Відомо, що вплив інсуліну на клітини здійснюється через інсулінові рецептори, які володіють тирозинкіназною активністю [12]. Оскільки рецептори локалізовані у плазматичній мембрані, тому й вважали, що інсуліновий сигнал також опосередкований плазматичною мембраною. Однак нові дослідження [12] показали, що інсулін-індукований кальцієвий сигнал відбувається у ядрі і поєднується в часі з вибіркоким вивільненням фосфатидилінозитол-біфосфату та перенесенням інсулінових рецепторів у ядро. Ці результати демонструють, що інсулінові рецептори переносяться в ядро для ініціювання ядерного  $\text{I}\Phi_3$ -опосередкованого  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналу у гепатоцитах щурів. Як вважають автори [12], цей новий механізм може лежати в основі впливу інсуліну на ріст і регенерацію печінки.

Отже, дані про вплив інсуліну на рівень внутрішньоклітинного кальцію у гепатоцитах є суперечливими, а питання про його дію на внутрішньоклітинні канали вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  залишається взагалі невивченим. Тому метою наших досліджень було дослідити вплив інсуліну на інозитолтрифосфатчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) та ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ( $\text{RyRs}$ ) ізольованих гепатоцитів щурів. Для цього ми вимірювали зміни вмісту мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  у гепатоцитах після попередньої перфузії печінки інсуліном. Для того, щоб внутрішньоклітинні депо були доступними для дії  $\text{I}\Phi_3$ , який стимулює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у гепатоцитах, котрий, як відомо, не проникає крізь плазматичну мембрану, ми використовували пермеабілізовані клітини.

Дослідження проводили на нелінійних щурах обох статей масою 0,18–0,2 кг. Після ефірного наркозу тварину декапітували. Відпрепаровану печінку поміщали у чашку Петрі із зовнішньоклітинним розчином, який містив у ммоль/л:  $\text{NaCl}$  – 140,0;  $\text{KCl}$  – 4,7;  $\text{CaCO}_3$  – 1,3;  $\text{MgCl}_2$  – 1,0;  $\text{HEPES}$  – 10,0; глюкоза – 10,0;  $\text{pH}=7,4$ . Ми використовували чотири частки печінки щурів – легеневу бокову, праву бокову, праву внутрішню і ліву внутрішню, а хвостату і додаткову частки не використовували. На наступному етапі проводили перфузування двох часток печінки зовнішньоклітинним розчином, що містив інсулін («Монодар», 0,04 МО), який додавали до зовнішньоклітинного розчину і шприцом нагнітали у тканину печінки впродовж 10 хв. Решту (дві частки) печінки перфузували лише зовнішньоклітинним розчином (контроль). Його ж використовували для відмивання печінки від перфузії. Для отримання ізольованих гепатоцитів як диспергуючий агент використовували лідазу (16 ум. од.), яку додавали до зовнішньоклітинного розчину, й інкубували протягом 15 хв при температурі  $36^\circ\text{C}$  та постійному струшуванні (120 коливань/хв). Препарат лідаза („Біофарма”, Україна) – містить фермент гіалуронідазу, що гідролізує  $\beta$ -N-ацетилгексозамінні зв'язки гіалуронової кислоти і деполімеризує її. Гіалуронідазу використовують як один із ферментів для ізолювання гепатоцитів

також інші автори [5, 6, 10]. Для підтримання температури використовували водяний термостат. Після інкубування з лідазою розпушену печінку відмивали зовнішньоклітинним розчином і механічно диспергували шляхом послідовного втягування у піпетки, діаметр кінчика яких послідовно зменшувався (2,0, 1,45 і 1,0 мм).

З метою 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<sub>2</sub> – 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<sub>2</sub> – 1,3 ммоль/л при постійному струшуванні та сталій температурі (36°C), після чого клітини відмивали внутрішньоклітинним розчином. Пермеабілізовані гепатоцити інкубували протягом 10 хв при температурі 36°C та постійному струшуванні (120 коливань/хв) у водяному термостаті у контрольному (внутрішньоклітинний розчин, що не містив АТФ і Ca<sup>2+</sup>) та дослідних розчинах, які містили окремо інозитол -1,4,5-трифосфат (ІФ<sub>3</sub>) («Sigma», США) (10мкмоль/л), ріанодин («Sigma», США) (5, 50 і 500 нмоль/л). Після закінчення інкубації клітини відмивали внутрішньоклітинним розчином. Потім 15 хв фарбували хлортетрацикліном (ХТЦ, 20 мкмоль/л). Клітини відмивали від барвника внутрішньоклітинним розчином. Після цього вимірювали інтенсивність флуоресценції Ca<sup>2+</sup>-ХТЦ-комплексу в окремих клітинах (30 клітин із кожної дослідної та контрольної проб). Вимірювання проводили за допомогою цитофлуориметра ЛЮМАМ-И-1 (Росія) при збільшенні 40x7 з діаметром щілини 5 мм й інтерференційним фільтром λ<sub>max</sub>=541±12 нм.

За умов інкубування пермеабілізованих гепатоцитів щурів з інсуліном *in vitro* (рис. 1) вміст мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> у них незначно, але статистично достовірно, зменшується на 11,09% (n=7, P<0,05). Однак перфузія печінки інсулінвмісним розчином статистично достовірно збільшує рівень мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> у пермеабілізованих гепатоцитах (рис. 2) на 33,57% (n=29, P>0,001). Той факт, що перфузія печінки інсулінвмісним розчином чинить цілком протилежний вплив на вміст мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> у пермеабілізованих гепатоцитах, на нашу думку, можна пояснити часовим фактором: після перфузії печінки інсулінвмісним розчином ми маємо справу із віддаленим у часі його впливом, а у випадку дії інсуліну *in vitro* спостерігаємо безпосередній ефект.

Єдиним спільним висновком для обох серій досліджень може бути те, що інсулін таки впливає на внутрішньоклітинні Ca<sup>2+</sup>-транспортувальні системи і ступінь наповнення внутрішньоклітинних Ca<sup>2+</sup>-депо. Виникає запитання, яким чином може здійс-

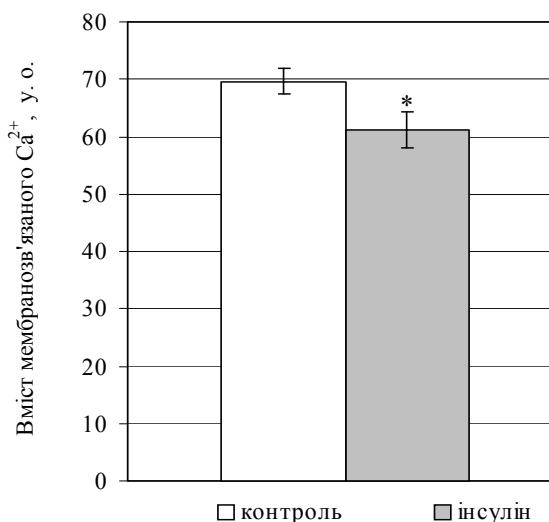


Рис. 1. Вплив інсуліну *in vitro* на рівень мембранозв'язаного Ca<sup>2+</sup> у пермеабілізованих гепатоцитах щурів: \* – P<0,05, відносно контролю.

нюватися цей вплив, якщо рецептори інсуліну локалізовані у плазматичній мембрані, а вона, за умов даного експерименту, є пермеабілізованою – проникною для малих молекул, тобто градієнт йонів по обидва боки мембрани відсутній. Очевидно, отримане збільшення вмісту мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  відображає процеси перерозподілу  $\text{Ca}^{2+}$  між головними його внутрішньоклітинними депо у гепатоцитах – ендоплазматичним ретикулумом (ЕПР), мітохондріями і ядром. Оскільки головними каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ЕПР є інозитолтрифосфатчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) [15, 8] та ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали ( $\text{RyRs}$ ) [10], тому ми вважали за потрібне дослідити вплив інсуліну на функціонування цих каналів.

Нами встановлено (рис. 2), що у контролі  $\text{I}\Phi_3$  викликає статистично достовірне збільшення вмісту мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  на 43,95% ( $n=10$ ,  $p=0,038$ ).

Після перфузії печінки інсуліном спостерігалися протилежні зміни (рис. 2), а саме:  $\text{I}\Phi_3$  зменшував вміст мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  у пермеабілізованих гепатоцитах щурів на 32,00% ( $n=9$ ,  $P<0,05$ ). Спостерігалася також статистично достовірна різниця між дією  $\text{I}\Phi_3$  у перфузованій зовнішньоклітинним розчином печінці та впливом  $\text{I}\Phi_3$  у перфузованій інсуліном печінці. Це означає, що перфузія інсуліном не перешкоджає впливу  $\text{I}\Phi_3$ , але, однак, змінює на протилежний напрям його дії. Останнє, можливо, зумовлене впливом інсуліну на рівень мембранозв'язаного кальцію або ж, власне, підтверджує можливість того, що  $\text{I}\Phi_3$ -індуковані зміни мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  можуть мати місце у ядрі, як виявили Родрігес і співавтори [12]. Адже відомо, що в ядерних мембранах наявні канали вивільнення кальцію, як це показано для різних секреторних клітин, зок-

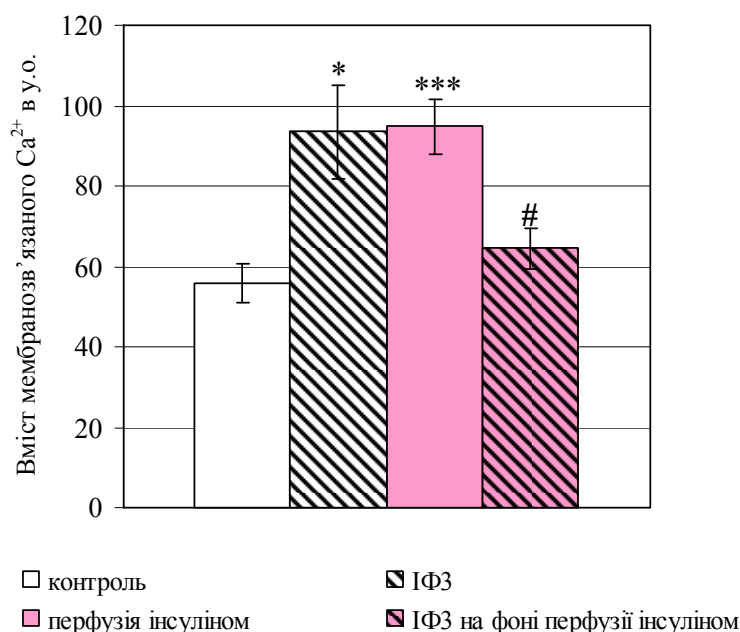


Рис. 2. Вплив перфузії печінки інсулінвмісним розчином на рівень мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  за умов дії  $\text{I}\Phi_3$ : \*\*\* –  $P<0,001$ , відносно контролю; \* –  $P<0,05$ , відносно контролю; # –  $P<0,01$ , відносно середовища після перфузії інсуліном.

рема для підшлункової залози та клітин протоки слинної залози [4]. Вважають, що зовнішньоядерна мембрана є продовженням мембрани гранулярного ЕПР, а перинуклеарний простір є продовженням люмену ЕПР і, таким чином, виконує роль внутрішньоклітинного депо  $\text{Ca}^{2+}$ . Більше того, ядро здатне індукувати власні кальцієві сигнали [13]. Якщо припустити, що після перфузії інсуліном справді має місце  $\text{I}\Phi_3$ -індуковане вивільнення кальцію у ядрі, тоді рівень мембранозв'язаного кальцію зменшувався б, що ми і спостерігали. Однак такі висновки є опосередкованими і потребують подальших досліджень для однозначного їхнього підтвердження чи спростування.

Крім того, нами виявлено, що перфузія печінки інсулінвмісним розчином змінює вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  також із ріанодинчутливого депо. У контролі дія ріанодину в концентраціях 5, 50 і 500 нмоль/л викликала статистично достовірне збільшення вмісту мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  на 26,73% ( $n=7$ ,  $P<0,05$ ), 50,10% ( $n=9$ ,  $P<0,05$ ), 25,51% ( $n=6$ ,  $P<0,05$ ), відповідно. Після перфузування печінки інсулінвмісним розчином ріанодин у концентраціях 5 і 500 нмоль/л викликав зменшення вмісту мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  на 18,17% ( $n=7$ ,  $p=0,05$ ), 32,06% ( $n=4$ ,  $p=0,03$ ), відповідно, а у концентрації 50 нмоль/л статистично достовірних змін не виявили. Причому не спостерігалось статистично достовірних змін між впливом різних концентрацій ріанодину у перфузованій інсулінвмісним розчином печінці та у перфузованій зовнішньоклітинним розчином, як це, наприклад, ми виявили за дії  $\text{I}\Phi_3$ . Якщо проаналізувати в цілому концентраційну залежність (рис. 3) впливу ріанодину у контролі та за умов перфузії інсулінвмісним розчином, то форма кривої не зазнає суттєвих змін.

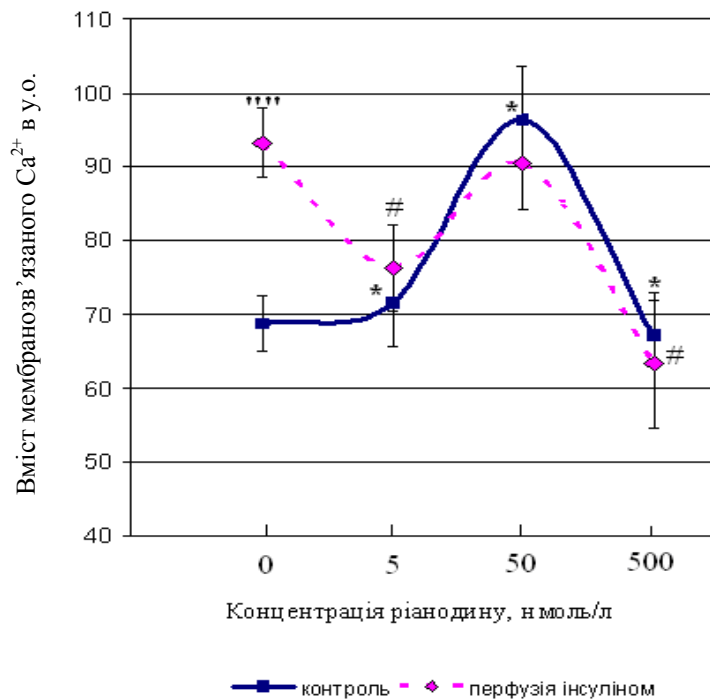


Рис. 3. Вплив ріанодину у різних концентраціях на рівень мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$  за умов перфузії печінки інсуліном та у контролі: \* –  $P<0,05$ , відносно контролю, # –  $P<0,05$ , відносно середовища після перфузії інсулінвмісним розчином, \*\*\*\* –  $P<0,001$ , відносно контролю.

Хоча спрямованість дії ріанодину в концентрації 5 і 500 нмоль/л змінюється після перфузії на протилежну, однак це, мабуть, зумовлене в першу чергу збільшенням рівня мембранозв'язаного кальцію, яке спостерігається після перфузії печінки інсулін-вмісним розчином.

Аналізуючи отримані дані, слід відзначити, що у концентрації 50 нмоль/л дія ріанодину цілковито відсутня після перфузії печінки інсуліном. Отже, перфузія інсулінвмісним розчином запобігає впливові ріанодину (50 нмоль/л). Очевидно, це пов'язане з тим, що ріанодинчутливі депо кальцію після перфузії інсуліном спустошуються, а тому не піддаються впливові ріанодину. Такий ефект може відбуватись опосередковано за рахунок вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із ІФ-чутливого депо. Адже не можна забувати про те, що як  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , так і  $\text{RyRs}$  регулюються йонами кальцію у біфазний спосіб [3, 16], а це передбачає функціональний взаємозв'язок між ними [1]. Тому кальцій, що вивільнюється з ІФ<sub>3</sub>-чутливого депо після перфузії інсуліном, як ми припускали вище, може пригнічувати вивільнення кальцію з  $\text{RyRs}$ , які є одночасно і  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованими каналами вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ . Якщо дотримуватися припущення про те, що після перфузії інсуліном справді має місце ІФ<sub>3</sub>-індуковане вивільнення кальцію в ядрі, тоді й пригнічення вивільненням кальцієм ріанодинчутливого депо теж мало б відбуватись у ядрі. Знову ж таки, для підтвердження висловлених припущень необхідні додаткові дослідження.

Отже, інсулін чинить вплив на рівень мембранозв'язаного  $\text{Ca}^{2+}$ , що змінює ступінь наповнення внутрішньоклітинних кальцієвих депо і, таким чином, впливає на процеси вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  під впливом ІФ<sub>3</sub> та ріанодину. Залишається невивченим, які механізми можуть опосередковувати виявлений ефект інсуліну на внутрішньоклітинні  $\text{Ca}^{2+}$ -депо.

1. Бичкова С. В. Регуляція внутрішньоклітинних  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальних систем малоклітинних травних залоз: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Львів, 2004. 20 с.
2. Лук'яненко І. В. Вплив інсуліну і глюкагону на секреторну функцію печінки: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2001. 17 с.
3. Adkins C. E., Taylor C. W. Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  // *Curr. Biol.* 1999. Vol. 9. P. 1115–1118.
4. Ashbi M. C., Petersen O. H., Tepikin A. V. Spatial characterisation of ryanodine-induced calcium release in mouse pancreatic acinar cells // *Biol. J.* 2003. Vol. 369. P. 441–445.
5. Berry M. N., Friend D. S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells // *J. Cell Biol.* 1969. Vol. 43. P. 506–520.
6. Gerschenson L., Berliner J., Davidson M. The Isolation and Culture of Liver Cells // *Methods Enzymol.* 1974. Vol. 32. P. 733.
7. Benzeroual K., van de Werve G., Meloche S. et al. Insulin induces  $\text{Ca}^{2+}$  influx into isolated rat hepatocyte couplets // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 6. Pt. 1. P. G1425–1432.
8. Hirata K., Pust T., O'Neill A. F. et al. The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger  $\text{Ca}^{2+}$  waves in rat hepatocytes // *Gastroenterol.* 2002. Vol. 122. P. 1088–1100.
9. Lavoie L., Band Ch. J., Kong M. et al. Regulation of Glycogen Synthase in Rat Hepatocytes // *Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. Is. 40. P. 28279–28285.
10. Lipson L. G., Capuzzi D. M., Margolis S. Effect of method of cell isolation on the metabolic activity of isolated rat liver cells // *J. Cell Sci.* 1972. Vol. 167. N 10. P. 167–179.
11. Piorebon N., Renard-Rooney D. C., Gaspers L. D., Thomas A. P. Ryanodine Receptors in liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 45. P. 34090.

12. *Rodrigues M. A., Gomes D. A., Andrade V. A.* et al. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes // *Hepatology*. 2008. Vol. 9999. Is. 999A. P. NA.
13. *Rogue P. J., Malviya A. N.* Calcium signals in the cell nucleus // *EMBO J*. 1999. Vol. 18. P. 5147–5152.
14. *Strunecka A.* Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> level in isolated hepatocytes: the effect of insulin // *Gen Physiol. Biophys.* 1985. Vol. 4. N 5. P. 505–516.
15. *Taylor C. W., Genezzani A. A., Morris S. A.* Expression of inositol trisphosphate receptors // *Cell Calcium*. 1999. Vol. 26. P. 237–251.
16. *Taylor C. W., Laude A. J.* IP<sub>3</sub> receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca<sup>2+</sup> // *Cell Calcium*. 2002. Vol. 32. P. 321–334.
17. *Thomas A. P., Martin-Requero A., Williamson J. R.* Interactions between insulin and alpha 1-adrenergic agents in the regulation of glycogen metabolism in isolated hepatocytes // *Biol. Chem.* 1985. Vol. 260. Is. 10. P. 5963–5973.

#### INFLUENCE OF INSULIN ON INTRACELLULAR Ca<sup>2+</sup>-TRANSPORTED SYSTEMS OF PERMEABILIZED RAT HEPATOCYTES

S. Bychkova

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

We studied influence of insulin on such Ca<sup>2+</sup>-transported systems as: IP<sub>3</sub>Rs and RyRs in rat permeabilized hepatocytes. Experiments were performed using isolated hepatocytes by lidase digestion. Isolated hepatocytes were incubated with saponin for permeabilisation. Concentration of membrane-bound Ca<sup>2+</sup> was measured using chlortetracycline. We showed that perfusion of liver by insulin-content solution leads to statistically authentic increasing concentration of membrane-bound Ca<sup>2+</sup> in permeabilized hepatocytes by 33,57% (n=29, P>0,001), but incubation of permeabilized hepatocytes *in vitro* with insulin caused decreasing of membrane-bound Ca<sup>2+</sup> by 11,09% (n=7, P<0,05). It was also shown that action of IP<sub>3</sub> and ryanodine was changed after perfusion of liver by insulin-content solution. We found that IP<sub>3</sub> decreased membrane-bound Ca<sup>2+</sup> by 32,00% (n=9, P<0,05) after perfusion of liver by insulin-content solution. IP<sub>3</sub> caused increasing of membrane-bound Ca<sup>2+</sup> content in permeabilized hepatocytes in control solution. Besides ryanodine (5 and 500 nM) decreased concentration of membrane-bound Ca<sup>2+</sup> by 18,17% (n=7, p=0,05), 32,06% (n=4, p=0,03), respectively, but ryanodine (50 nM) did not elicit significant changes in the membrane-bound Ca<sup>2+</sup> content in permeabilized hepatocytes after perfusion of liver by insulin-content solution. The perfusion of liver was made by external solution without insulin in control, after that ryanodine (5, 50 i 500 nM) caused statistically authentic increasing of membrane-bound Ca<sup>2+</sup> content in permeabilized hepatocytes by 26,73% (n=7, P<0,05), 50,10% (n=9, P<0,05), 25,51% (n=6, P<0,05), respectively. So perfusion of liver by insulin-content solution prevented ryanodine's (50 nM) action. We also made conclusion that insulin changed concentration of membrane-bound Ca<sup>2+</sup> and content of Ca<sup>2+</sup>-stores, that is why releasing of Ca<sup>2+</sup> have changed after perfusion of liver by insulin-content solution.

*Key words:* insulin, IP<sub>3</sub>Rs, RyRs, permeabilized hepatocytes.

## ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ $\text{Ca}^{2+}$ -ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ ПЕРМЕАБИЛИЗИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ

С. Бичкова

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

Исследовали влияние инсулина на инозитолтрифосфатчувствительные и рианодинчувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы в пермеабиллизированных гепатоцитах крыс. Установлено, что перфузия печени крыс инсулинсодержащим раствором вызывает существенное и достоверное увеличение содержания мембраносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$  в пермеабиллизированных гепатоцитах на 33,57% ( $n=29$ ,  $P>0,001$ ), а при действии инсулина *in vitro* содержание мембраносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$  в них не существенно, но статистически достоверно уменьшается на 11,09% ( $n=7$ ,  $P<0,05$ ). Показано, что после предварительной перфузии печени инсулинсодержащим раствором наблюдали изменения процессов высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо под действием инозитолтрифосфата (ИФ<sub>3</sub>) (10 мкмоль/л) и рианоцина (5, 50, 500 нмоль/л) в пермеабиллизированных гепатоцитах крыс по сравнению с действием этих веществ в контроле, когда перфузирование печени осуществляли внеклеточным раствором, в котором отсутствует инсулин. В частности показано, что ИФ<sub>3</sub> (10 мкмоль/л) уменьшал содержание мембраносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$  на 32,00% ( $n=9$ ,  $P<0,05$ ), а в контроле наблюдалось увеличение этого показателя под действием ИФ<sub>3</sub> на 43,95% ( $n=10$ ,  $p=0,038$ ). Кроме того установлено, что после перфузирования печени крыс инсулинсодержащим раствором рианоцин в концентрациях 5 и 500 нмоль/л вызывал уменьшение содержания мембраносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$  на 18,17% ( $n=7$ ,  $p=0,05$ ), 32,06% ( $n=4$ ,  $p=0,03$ ), соответственно, а в концентрации 50 нмоль/л статистически достоверных изменений не наблюдали. В контроле действие рианоцина в концентрациях 5, 50 и 500 нмоль/л вызывало статистически достоверное увеличение содержания мембраносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$  на 26,73% ( $n=7$ ,  $P<0,05$ ), 50,10% ( $n=9$ ,  $P<0,05$ ), 25,51% ( $n=6$ ,  $P<0,05$ ), соответственно. Таким образом перфузия печени инсулинсодержащим раствором предотвращает влиянию рианоцина (50 нмоль/л) на содержание мембраносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$  в пермеабиллизированных гепатоцитах крыс. Сделаны выводы, что инсулин влияет на уровень мембраносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$ , что, в свою очередь отражается на процессах высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо в пермеабиллизированных гепатоцитах крыс.

**Ключевые слова:** инсулин, инозитолтрифосфатчувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, рианодинчувствительные  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы, пермеабиллизированные гепатоциты.

Стаття надійшла до редколегії 12.01.09

Прийнята до друку 23.01.09