

**ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ МІЖ
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИМИ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТУВАЛЬНИМИ
СИСТЕМАМИ ПЕРМЕАБІЛІЗОВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ****С. Бичкова**

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

У процесі старіння може змінюватися функціонування Ca^{2+} -транспортних систем. Вивчали вікові особливості взаємозв'язку між внутрішньоклітинними Ca^{2+} -транспортними (інозитолтрифосфат-чутливими Ca^{2+} -каналами, ріанодинчутливими Ca^{2+} -каналами та Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій) в ізольованих гепатоцитах щурів. Дослідження проводили на ізольованих ферментативно-механічним методом гепатоцитах, які пермеабілізували сапоніном. Вимірювали зміни вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} у пермеабілізованих гепатоцитах щурів різних вікових груп: статевонезрілих, молодих і старих щурів. Показано, що взаємозв'язок між IP_3 -індукованим вивільненням Ca^{2+} та поглинанням його Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій не змінюється з віком. Виявлено взаємодію між ріанодинчутливим вивільненням Ca^{2+} і акумулюванням Ca^{2+} мітохондріями, яка відрізняється залежно від віку тварин: у статевонезрілих і молодих тварин такий взаємозв'язок не виражений, а у старих щурів існує залежність між цими процесами. Встановлено вікову залежність впливу інозитол-1,4,5-трифосфату та ріанодину на вміст мембранозв'язаного Ca^{2+} у пермеабілізованих гепатоцитах: спостерігається зменшення цього показника у статевонезрілих і старих щурів, а у молодих – збільшується. Отже, встановлено, що функціонування досліджуваних Ca^{2+} -транспортних систем і взаємозв'язки між ними залежать від віку тварин.

Ключові слова: старіння, гепатоцити, IP_3 -чутливі Ca^{2+} -канали, ріанодинчутливі Ca^{2+} -канали, Ca^{2+} -уніпортер, мітохондрії.

Однією із важливих причин старіння може бути порушення кальцієвого гомеостазу клітини, адже відомо, що програмована клітинна смерть – апоптоз – запускається через підвищення внутрішньоклітинного рівня кальцію. Зокрема, показано, що під час старіння організму спостерігається пригнічення Ca^{2+} -акумулювальної функції саркоплазматичного ретикулуму і мітохондрій гладеньких м'язів [7, 11, 12].

Відомо, що мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум (ЕПР) є найбільшими депо кальцію у клітині. Між Ca^{2+} -транспортними системами цих внутрішньоклітинних депо існує взаємодія, що реалізується за рахунок балансу між вивільненням Ca^{2+} із депо й акумулюванням його назад [5]. Встановлено, що мітохондрії модулюють вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму, поглинаючи цитозольний Ca^{2+} і, таким чином, пригнічують позитивний зворотний вплив його на IP_3 -рецептори (IP_3Rs) у пермеабілізованих гепатоцитах [13]. Така взаємодія можлива не лише за рахунок тісного розташування мітохондрій і ендоплазматичного ретикулуму [15], а й також за рахунок фізичного контакту, який реалізують білки [16]. Показано, що з віком у тварин суттєво знижується кальцієва ємність мітохондрій печінки, максимальна швидкість уніпорту Ca^{2+} у матрикс мітохонд-

рій і зростає спорідненість Ca^{2+} -уніпортера до Ca^{2+} [4]. На основі цього ми припустили, що взаємозв'язки між каналами вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо та Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій можуть змінюватися залежно від віку.

Дослідження проводили на 36 нелінійних щурах-самцях трьох вікових груп: 1) статевонезрілі (11 щурів) – віком до 6 тижнів, масою тіла 0,05–0,06 кг; 2) молоді (12 щурів) – віком 4–6 місяців, масою 0,18–0,2 кг; 3) старі щурі (13 щурів) – віком 18–24 місяці, масою 0,45–0,50 кг. Після ефірного наркозу тварин декапітували. Для отримання ізольованих гепатоцитів відпрепаровану печінку поміщали у чашку Петрі з зовнішньоклітинним розчином, який містив (ммоль/л): NaCl – 140,0; KCl – 4,7; CaCO_3 – 1,3; MgCl_2 – 1,0; HEPES – 10,0; глюкоза – 10,0; $\text{pH} = 7,4$. На наступному етапі проводили ферментативне ізолювання гепатоцитів. Як диспергуючий агент використовували лідазу (16 ум. од.), яку додавали до зовнішньоклітинного розчину і шприцом нагнітали у тканину печінки. У подальшому печінку інкубували у цьому ж розчині протягом 15 хв при 36°C та постійному струшуванні (120 коливань/хв). Для підтримання температури використовували водяний термостат. Після інкубування з лідазою розпушену печінку відмивали зовнішньоклітинним розчином і механічно диспергували шляхом втягування у піпетки, діаметр кінчика яких послідовно зменшувався (2,0; 1,45 і 1,0 мм). 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; $\text{pH}=7,0$. 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 протягом 10 хв при 36°C та постійному струшуванні (120 коливань/хв) у водяному термостаті в контрольному (внутрішньоклітинний розчин, що не містив АТФ і Ca^{2+}) та дослідних розчинах, які містили окремо інозитол -1,4,5-трифосфат ($\text{I}\Phi_3$) («Sigma», США) (10 мкмоль/л), ріанодин («Sigma», США) (5 нмоль/л), рутеній червоний (10^{-5} моль/л), а також комбінацію $\text{I}\Phi_3$ + рутеній червоний та ріанодин + рутеній червоний. 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^{2+} -ХТЦ-комплексу в окремих клітинах (30 клітин з кожної проби). Вимірювання проводили за допомогою цитофлуориметра ЛЮМАМ-И-1 (Росія) при збільшенні $40\times$ з діаметром щілини 5 мм й інтерференційним фільтром $\lambda_{\text{max}}=541\pm 12$ нм.

Щоби встановити вікові особливості взаємозв'язку між Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій та $\text{I}\Phi_3$ -індукованим вивільненням Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулу гепатоцитів, ми дослідили зміни мембранозв'язаного Ca^{2+} у щурів різних вікових груп за дії рутенію червоного – блокатора Ca^{2+} -уніпортера мітохондрій [10], та інозитол-1,4,5-трифосфату ($\text{I}\Phi_3$), який стимулює вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо.

Нами встановлено (рис. 1), що у групі статевонезрілих щурів $\text{I}\Phi_3$ викликає статистично достовірне зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} на $27,72\pm 9,20$ % ($P<0,05$, $n=9$). Таке зменшення зумовлене або акумулюванням Ca^{2+} у мітохондріях, або потраплянням Ca^{2+} назовні, оскільки клітини є пермеабілізованими і позаклітинний розчин номінально безкальцієвий. Зрозуміло, що акумулювання Ca^{2+} у мембранах ЕПР викликало би збільшення флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу, тому цей процес, очевидно, якщо й відбувається, то з меншою інтенсивністю.

Під впливом рутенію червоного також спостерігалася тенденція до зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} . Однак за одночасної наявності цих речовин у середовищі

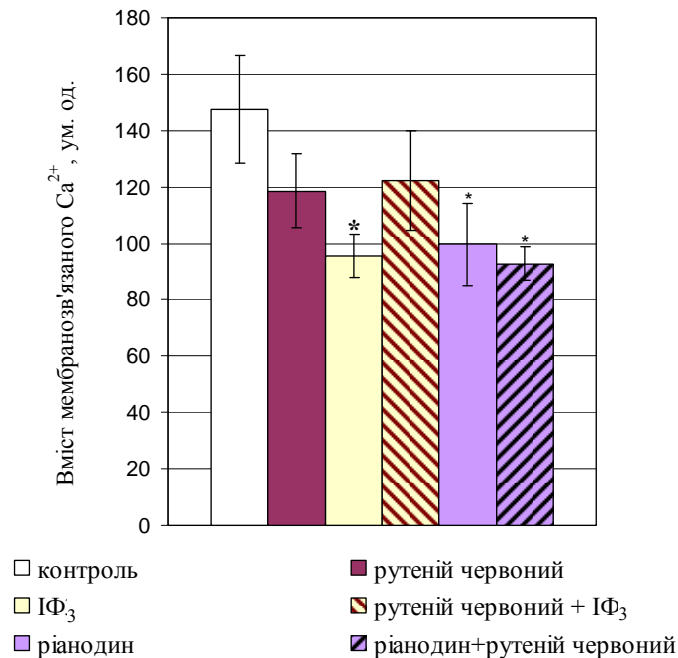


Рис. 1. Зміни вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ за дії ріанодину, рутенію червоного та ІФ₃ у пермеабілізованих гепатоцитах статевонезрілих щурів. * – P<0,05 відносно контролю.

інкубації виявлено статистично недостовірні зміни вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺. Отже, вивільнений під впливом ІФ₃ кальцій справді акумулюється у мітохондріях, і це приводить до зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺, а рутеній червоний пригнічує таке акумулювання, тому сумісна дія ІФ₃ з рутенієм червоним не викликає статистично достовірних змін. Отримана залежність вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ за дії вищеписаних речовин цілком відображає зміни сумарного кальцію, виміряного за допомогою арсеназо III у секреторних клітинах слинних залоз личинки комара-дергуна [2].

У групі молодих щурів отримано інші результати. Під впливом ІФ₃ (рис. 2) у пермеабілізованих гепатоцитах спостерігається збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ на 15,99±5,29% (P=0,05, n=10). Дослідженнями Najnóczky та співавт., проведеними на пермеабілізованих гепатоцитах щурів, також було показано збільшення мембранозв'язаного Ca²⁺ за дії ІФ₃ [13]. Таке збільшення можна пояснити, на нашу думку, зв'язуванням вивільненого кальцію у мембранах ендоплазматичного ретикулуму Ca²⁺-зв'язуючими ділянками. Це можуть бути сайти у молекулах Ca²⁺-транспортувальних систем внутрішньоклітинних депо, зокрема Ca²⁺-помпи ЕПР. Однак, очевидно, паралельно відбувається і поглинання Ca²⁺ мітохондріями, і цей процес пригнічує рутеній червоний, а тому сумісна дія рутенію червоного та ІФ₃ не викликає статистично достовірних змін.

Рутеній червоний статистично достовірно зменшує вміст мембранозв'язаного Ca²⁺ на 22,09±7,58 % (P=0,05, n=7) у пермеабілізованих гепатоцитах молодих щурів, мабуть, головним чином витісняючи його із Ca²⁺-зв'язуючих сайтів мембран ЕПР і мітохондрій, пригнічуючи функціонування Ca²⁺-уніпортера мітохондрій та помпи ЕПР [17]. Дія рутенію червоного сильніше виражена у пермеабілізованих гепатоцитах молодих, ніж статевонезрілих щурів, що свідчить про збільшення з віком розмірів ЕПР, кількості Ca²⁺-транспортувальних систем у його мембранах, а, отже, і Ca²⁺-зв'язуючих сайтів.

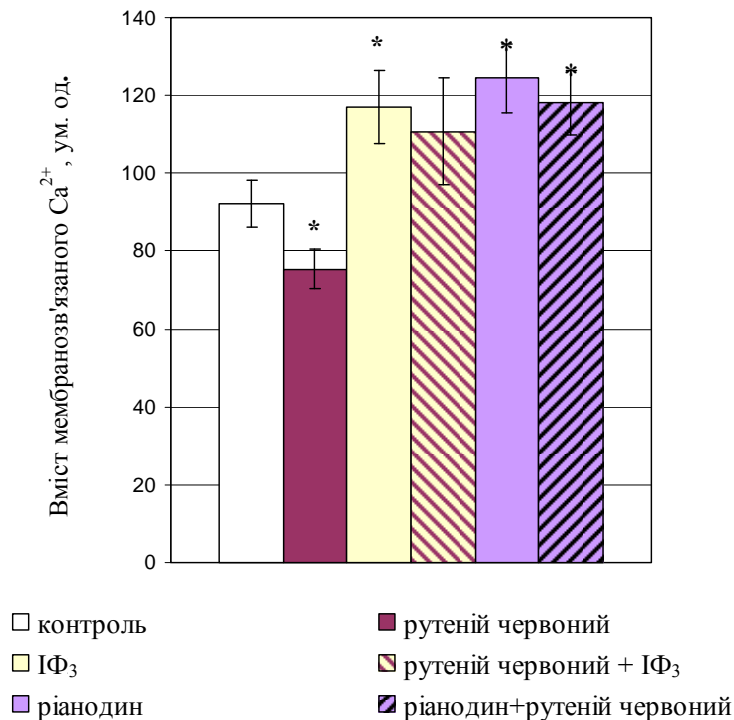


Рис. 2. Зміни вмісту мембранозв'язаного кальцію у пермеабілізованих гепатоцитах молодих щурів за дії ріанодину, ІФ₃ та рутенію червоного. * – P < 0,05 відносно контролю.

У групі старих щурів ми отримали результати, схожі до виявлених у групі статевонезрілих щурів (рис. 3). Додавання ІФ₃ до середовища інкубації пермеабілізованих гепатоцитів викликало статистично достовірне зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ на 20,47±8,23% (P<0,05, n=13). Застосування окремо рутенію червоного та в поєднанні його з ІФ₃ не викликає статистично достовірних змін вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺.

Отже, за одночасної дії рутенію та ІФ₃ у трьох досліджуваних групах щурів статистично достовірних змін вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ відносно контролю не виявлено. Ми вважаємо, що це вказує на існування взаємозв'язку між вивільненням Ca²⁺ з ендоплазматичного ретикулуму під впливом ІФ₃ і акумулюванням його Ca²⁺-уніпортером мітохондрій, причому цей зв'язок не залежить від віку. Відмінності встановлено лише за дії ІФ₃, що може свідчити або про неоднакову кількість функціонуючих IP₃Rs, або ж про зміни чутливості цих каналів до ІФ₃ на різних етапах онтогенезу. Зміну чутливості можна пояснити тим, що у кожній групі щурів набір ізоформ IP₃Rs відрізняється і зазнає вікових змін, а відомо, що чутливість різних ізоформ IP₃Rs до Ca²⁺ та ІФ₃ виявляє суттєві відмінності (див. огляд [3]).

У тісній взаємодії з IP₃Rs перебувають RyRs, як це показано для ацинусів підшлункової залози [8] та клітин слинних залоз мотиля [1]. Припускають [8], що ці канали можуть складати єдину осциляторну одиницю або разом із Ca²⁺-помпою ЕПР входити до складу функціональної одиниці [5]. Отже, вікові зміни взаємозв'язку між IP₃Rs і Ca²⁺-уніпортером мітохондрій можуть впливати і на функціонування RyRs. Для гепатоцитів залишається невивченим, чи залучені до взаємодії між IP₃Rs та Ca²⁺-уніпортером міто-

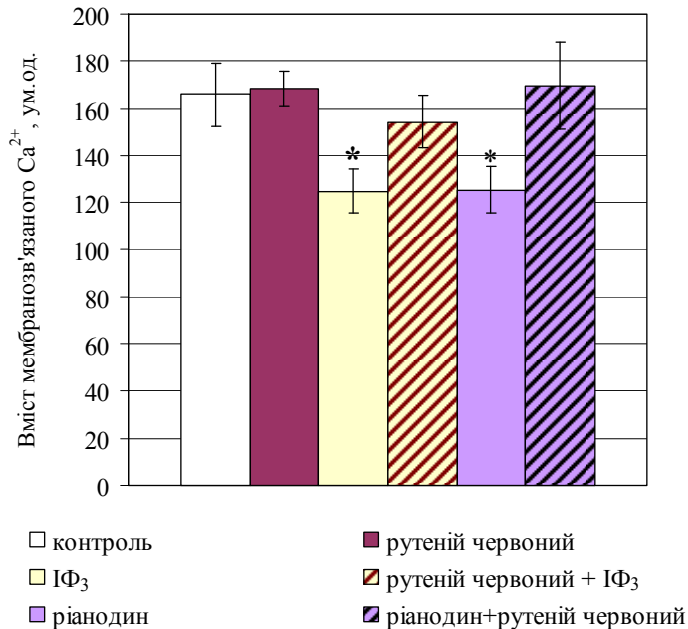


Рис. 3. Зміни вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ за дії ріанодину, рутенію червоного та ІФ₃ у пермеабілізованих гепатоцитах старих щурів. * – P < 0,05 відносно контролю.

хондрій ще й інші Ca²⁺-транспортувальні системи, наприклад, ріанодинчутливі Ca²⁺-канали (RyRs), функціонування яких було нещодавно підтверджене у гепатоцитах [14].

Тому ми також досліджували й вікову залежність функціонування RyRs у гепатоцитах щурів і їх взаємозв'язок із мітохондріями. Відомо, що ріанодин зв'язується зі своїм RyRs у двох чи більше сайтах, які мають високу (у наномольному діапазоні концентрацій) та низьку (у мікромольному) спорідненість до нього [9]. Для пермеабілізованих гепатоцитів щурів було показано, що діапазон концентрацій ріанодину від 4-9 нмоль/л чинить активуючу дію на RyRs [14]. Нами встановлено (рис. 1–3), що додавання ріанодину (5 нмоль/л) до середовища інкубування пермеабілізованих гепатоцитів статевонезрілих щурів викликає статистично достовірне зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ на 28,16±5,54% (P=0,05, n=10), у пермеабілізованих гепатоцитах старих щурів – на 17,95±8,66% (P<0,05, n=13), а у групі молодих щурів навпаки – збільшення вмісту Ca²⁺ на 29,94±7,49% (P<0,05, n=8).

Таким чином, зміни вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ за дії ріанодину цілком відтворюють такі за дії ІФ₃ у віковому аспекті, що ще раз свідчить на користь тісного взаємозв'язку між ними. Однак сумісна дія ріанодину та рутенію червоного викликає статистично достовірне зменшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ на 25,52±11,03% (P<0,05, n=10) у пермеабілізованих гепатоцитах статевонезрілих щурів. На нашу думку, це вказує на відсутність взаємозв'язку між вивільненням Ca²⁺ під впливом ріанодину й акумулюванням його уніпортером, оскільки сумісна дія ріанодину та рутенію є поєднанням їх поодиноких ефектів. Тому, очевидно, слід вважати, що вивільнений під дією ріанодину Ca²⁺ суттєво не акумулюється мітохондріями за умов нашого дослідження, а головним чином потрапляє у зовнішньоклітинний розчин.

У пермеабілізованих гепатоцитах молодих щурів (рис. 2) спостерігається збільшення вмісту мембранозв'язаного Ca²⁺ за сумісної дії рутенію та ріанодину на 17,41±7,38% (P<0,05,

n=13). Оскільки дія самого лише ріанодину також викликає подібний ефект, то можна стверджувати, що рутеній червоний не порушує його впливу. Мабуть, це зумовлено акумулюванням Ca^{2+} , вивільненого під дією ріанодину, у мембранах ЕПР. Транспортування Ca^{2+} може здійснювати Ca^{2+} -помпа ЕПР і, очевидно, її значення на цьому етапі розвитку є суттєвим.

Лише у групі старих щурів не спостерігається статистично достовірних змін вмісту мембранозв'язаного Ca^{2+} у пермеабілізованих гепатоцитах за одночасної наявності у середовищі інкубації ріанодину та рутенію червоного (рис. 3). Однак варто сказати, що у цій групі окремо ріанодин, як і рутеній, зменшує вміст мембранозв'язаного Ca^{2+} у пермеабілізованих гепатоцитах щурів, а, отже, сумісна їхня дія мала б посилювати цей ефект, але цього не спостерігається. Тому можна припустити наявність взаємозв'язку між вивільненням Ca^{2+} під впливом ріанодину й акумулюванням його уніпортером мітохондрій у групі старих щурів. Мабуть, це зумовлено зростанням ролі мітохондрій у Ca^{2+} -гомеостазі клітини у старих тварин. На користь цього припущення свідчить той факт, що з віком підвищується чутливість мітохондрій до Ca^{2+} [4], це може викликати переваження цих органел кальцієм і спричинити клітинну смерть.

Отже, ми встановили, що на всіх етапах онтогенезу спостерігається взаємодія між $\text{I}\Phi_3$ -чутливим депо та Ca^{2+} -уніпортером мітохондрій, і цей взаємозв'язок не залежить від віку тварин. Однак взаємодія між ріанодинчутливим депо Ca^{2+} і акумулюванням Ca^{2+} у мітохондрії виявлена лише у старих тварин. Це свідчить про підсилення ролі мітохондрій у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу клітин у старих тварин. Крім того, ми виявили, що дія ріанодину та $\text{I}\Phi_3$ залежить від віку тварин, а не від типу каналу. Це свідчить на користь існування тісної функціональної взаємодії між цими каналами, яка не змінюється з віком. Зазнають вікових змін, очевидно, лише кількість каналів вивільнення Ca^{2+} , що може бути пов'язано із неоднаковим розвитком ЕПР у різних вікових групах. Ми припускаємо, що з віком спостерігаються зміни у балансі між такими внутрішньоклітинними Ca^{2+} -депо, як ЕПР і мітохондрії: якщо у статевонезрілих тварин вони перебувають у рівновазі, то у молодих перевага зміщується на користь ЕПР, а у старих – на користь мітохондрій. Очевидно, домінуюче значення ЕПР у підтриманні Ca^{2+} -гомеостазу відбувається у молодих щурів, що корелює із максимальною інтенсивністю енергетичних процесів [6].

1. Бичкова С. В. Регуляція внутрішньоклітинних Ca^{2+} -транспортувальних систем малоклітинних травних залоз: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Львів, 2004. 20 с.
2. Бичкова С. В., Манько В. В., Клевець М. Ю., Кулачковський О. Р. Роль мітохондрій у Ca^{2+} -сигналізації секреторних клітин травних залоз // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 44. С. 3–14.
3. Бичкова С. Роль $\text{I}\Phi_3$ -чутливих Ca^{2+} -каналів у кальцієвій сигналізації секреторних клітин // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 45. С. 29–44.
4. Дубицький Л., Наливайко Н., Кравенська Є. Залежність Ca^{2+} акумульованої функції мітохондрій печінки від віку тварин // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 46. С. 153–158.
5. Манько В. В. Системи трансмембранного транспортування кальцію у секреторних клітинах слинних залоз личинки *Chironomus plumosus* Linnaeus: Автореф. дис. ... д-ра. біол. наук. К., 2008. 43 с.
6. Мурашук К., Іккерт О. Роль системи L-аргінін-оксид азоту у процесах енергозабезпечення щурів різних вікових груп // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 44. С. 121–127.
7. Barja G. Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 225–238.
8. Cancela J. M., Gerasimenko O. V., Gerasimenko J. V. et al. Two different but converging messenger pathways to intracellular Ca^{2+} release: the roles of nicotinic acid adenine

- dinukleotide phosphate, cyclig ADP-ribose and inositol trisphosphate // *The EMBO J.* 2000. Vol. 19. N. 11 P. 2549–2557.
9. *Coronado R., Morrisette J., Sukhareva M., Vaughan D. M.* Structure and function of ryanodine receptors // *Am. J. Physiol.* 1994. Vol. 266. P. C1485–C1504.
 10. *Griffiths E. J.* Use of ruthenium red as an inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} uptake in single rat cardiomyocytes // *FEBS Lett.* 2000. Vol. 486. N 3. P. 257–260.
 11. *Lopes G. S., Ferreira A. T., Etsuko Oshiro M.* et al. Aging-related changes of intracellular Ca^{2+} stores and contractile response of intestinal smooth muscle // *Experimental Gerontology.* 2006. Vol. 41. P. 55–62.
 12. *Lopes G. S., Mora O., Cerri P.* et al. Mitochondrial alterations and apoptosis in smooth muscle from aged rats // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. Vol. 1658. N 3. P. 187–194.
 13. *Hajnóczky G., Hager R., Thomas A. P.* Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4,5- trisphosphate receptors by Ca^{2+} // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 14157–14162.
 14. *Pierebon N., Renard-Rooney D. C., Gaspers L. D., Thomas A. P.* Ryanodine Receptors in liver // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 45. P. 34090.
 15. *Rizzuto R., Pozzan T.* Microdomains of intracellular Ca^{2+} : molecular determinants and functional consequences // *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86. P. 369–408.
 16. *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.
 17. *Rupp H., Vetter R.* Sarcoplasmic reticulum function and carnitine palmitoyltransferase-1 inhibition during progressing of heart failure // *Br. J. Pharmacol.* 2000. Vol. 131. N 8. P. 1748–1756.

AGE SPECIALTIES OF INTERACTION BETWEEN INTRACELLULAR Ca^{2+} -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*

Function of Ca^{2+} -transporting systems could depend on animals' age. The age related features of interaction between Ca^{2+} -transporting systems (IP_3Rs , RyRs and mitochondrial Ca^{2+} -uniporter) were investigated in rat hepatocytes. Experiments were performed using isolated hepatocytes by lidase digestion. Isolated hepatocytes were incubated with saponin for permeabilisation. Concentrations of membrane-bound Ca^{2+} were measured using chlortetracycline. All rats were divided on 3 different groups: young (age < 6 weeks, weight 0,05–0,06 kg), adult (6 months, weight 0,18–0,2 kg) and old rats (18–24 months, weight 0,45–0,50 kg). We observed that both IP_3 and ryanodine evoke age-dependent changes of membrane-bound Ca^{2+} content, which have similar character. Thus, we conclude that there is an age-dependent interaction between Ca^{2+} uniporter and RyRs of hepatocytes, but the interaction between Ca^{2+} uniporter and IP_3Rs is not age-dependent.

Key words: aging, hepatocytes, IP_3Rs , RyRs , mitochondrial Ca^{2+} -uniporter.

Стаття надійшла до редколегії 11.07.08

Прийнята до друку 02.10.08