



UDC 576.34:612.34:547.93

INFLUENCE OF TAUROLITHOCHOLATE 3-SULPHATE ON CALCIUM CONTENT IN CYTOSOL AND STORE OF ISOLATED MICE HEPATOCYTES

S. V. Bychkova

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

Momohydroxylated bile acids, including taurolithocholate (TLC) and its 3-sulphate (TLC-S), have been shown to increase $[Ca^{2+}]_i$ in cytosol of rat hepatocytes [1, 2]. These bile acids mobilize Ca^{2+} from the internal pool which is sensitive to inositol trisphosphate (IP_3). However, bile-acid mediated Ca^{2+} release is independent of IP_3 production. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) is a nucleotide which can to release calcium from specific type of intracellular store defined as endo-lysosomal system or acidic store. The aim of this study was to examine influence of NED-19 (antagonist of NAADP) on TLC-S-induced change of calcium content in cytosol of and endoplasmic reticulum of isolated mice hepatocytes in order to elucidate the role of acidic store in bile-acid mediated Ca^{2+} release. Isolated hepatocytes of mice were loaded with fluo-4 (2.5 μ M). Fluorescent images were obtained using Leica SP2 MP dual two-photon confocal microscope. Isolated hepatocytes were permeabilized in suspension with saponine (0.1 mg/mL). Next the permeabilized suspension of hepatocytes was loaded with Mag-Fura-2 AM (5 μ M). Measurement of Ca^{2+} content in store of permeabilized cells was conducted using spectrofluorimetric method. We confirmed that TLC-S (50, 100 and 200 μ M) elicited cytosolic Ca^{2+} -signals, which were not inhibited by the IP_3 -receptors (IP_3 Rs) antagonist 2-APB (100 μ M). In suspensions of permeabilized murine hepatocytes TLC-S (100 μ M) mobilized 66.10 ± 8.87 % of the total stored calcium as detected by ionomycin-induced release (10 μ M). After application of TLC-S thapsigargin could release only 47.94 ± 3.05 %. Previous addition of NED-19 (100 nM) decreased fraction of calcium that is released by TLC-S and equals 33.25 ± 2.15 % of the total calcium. In this case, the following use of thapsigargin mobilized only 21.75 ± 10.68 %. Thus, previous application of NED-19 significantly ($n = 6$; $P \leq 0.01$) reduced the proportion of calcium released by TLC-S 2-fold. It was observed that the rate of TLC-S-induced decrease of calcium content in the intracellular store was 1.8 times slower than after application of NED-19 ($n = 6$; $P \leq 0.05$). Previous application of NED-19 increased the rate of thapsigargin-evoked calcium content reduction by a factor of 2.5 ($n = 6$; $P \leq 0.01$). We suggest the impact of acid store in TLC-S-elicited cytosolic Ca^{2+} -signals in mice hepatocytes. Thus, the mechanism of TLC-S-induced calcium release is also NAADP-mediated.

Keywords: hepatocytes, taurolithocholate 3-sulphate, Ca^{2+} , nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate.

INTRODUCTION

Bile salts are synthesized from cholesterol in liver and represent the main driving force of the bile flow. Bile is crucial for intestinal absorption of fats and fat-soluble vitamins, as well as the elimination of excess cholesterol and waste products from body [3]. Previous work has shown that application of bile acids can cause the increase in the levels of cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in hepatocytes [1, 4].

Specifically, bile acids activate calcium entry into the cells and cause depletion of internal calcium store [5]. Other effects, not linked to calcium signaling, have also been observed, including the increase in intracellular Na^+ concentration [6] and depolarization of inner mitochondrial membrane. [7].

In acinar pancreatic cells, it was also shown that bile acids can release calcium from both ER and acidic stores in secretory granular areas. In both stores TLC-S interacts with both the IP_3 Rs and the RyRs. TLC-S opens the RyRs through activation of NAADP [8]. In hepatocytes, it is still unclear if NAADP-sensitive acidic store is involved in TLC-S-induced Ca^{2+} -signals. Therefore, the main purpose of this study was to examine such possibility.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of hepatocytes. CD-1 male mice were humanely sacrificed in compliance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1985) and in accordance with International Convention for the Protection of Animals. The protocol for hepatocyte isolation was as described in [9]. Isolated liver was perfused with buffer I without Ca^{2+} : 140 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 10 mM HEPES; 10 mM D-glucose; 100 μ M EGTA; pH 7.4; the rate of perfusion was 5 mL/min at 37 °C. Next the liver was perfused with buffer I in the presence of 1.3 mM $CaCl_2$ and collagenase I (Worthington) for 10 min at 37 °C. Dissociated hepatocytes were centrifuged at $50 \times g$ for 1 min and then transferred into buffer I containing 1 mM $MgCl_2$ and 1.3 mM $CaCl_2$, pH 7.4.

Fluorescent $[Ca^{2+}]$ measurement. After isolation, the cells were loaded with low affinity Ca^{2+} -sensitive dye fluo-4 (2.5 μ M) for 30-45 minutes at 36.5 °C. Cells were attached to poly-L-lysine-coated coverslips in flow chamber. All experiments were performed at room temperature.

Fluorescent images were obtained using Leica SP2 MP dual two-photon confocal microscope with a $\times 63$ 1.2 NA objective. For fluo-4 excitation and emission wavelengths were 488 nm (argon ion laser, 3 % power) and 510–590 nm, respectively. Fluorescent images were collected with frequency of 0.6–1.0 frame/second. Fluorescence signals were plotted as F/F_0 , with F as fluorescence during the experiment and F_0 as the initial level of fluorescence.

Measurement of $[Ca^{2+}]$ content in store of permeabilized cells. Suspension of permeabilized hepatocytes (2×10^6) was used to load with fluorescent dye Mag-Fura-2 AM (5 μ M). The dye was washed out before permeabilization. Isolated hepatocytes were permeabilized with saponine (0.1 mg/mL) in intracellular solution for 10 min. Cells were later washed with an intracellular solution based on K-HEPES, containing 20 mM NaCl; 127 mM KCl; 1.13 mM $MgCl_2$; 0.05 mM $CaCl_2$; 0.1 mM EGTA; 10.0 mM HEPES (KOH); 5 μ g/mL oligomycin; 1 μ g/mL rotenone; 2.0 mM ATP; pH 7.0. 2 mL of cell suspension were transferred to the spectrofluorometer cuvette. The fluorescence of Mag-Fura-2 AM was monitored using excitation wavelength 340-380 nm with emission at 500 nm.

Cellular calcium content that was mobilized by 10 μM ionomycin was accepted as 100 % and represents the total amount of Ca^{2+} within the internal pool.

Reagents used in this study include fluo-4/Mag-Fura-2 AM (Invitrogen), thapsigargin (Calbiochem), collagenase (Worthington). All the other chemicals were purchased from Sigma.

RESULTS AND DISCUSSION

TLC-S-induced Responses in the Intact Hepatocytes. We have shown that TLC-S (50, 100 and 200 μM) elicited cytosolic Ca^{2+} -signals, consistent with the previous findings described early [1, 2]. A typical trace with repeated application of different concentration of TLC-S is shown in Fig.1. *A* and *B*. TLC-S (200 μM) induced calcium elevation in the cytosol of intact hepatocytes comparably half the size of 10 μM ATP effect (Fig.1, *B*). After TLC-S-elicited Ca^{2+} -signal takes place hepatocytes can answer to ATP but this signal has smaller amplitude yet longer plateau phase (Fig.1, *B*).

The liver expresses 2 principal intracellular, calcium-release channels: the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R) (types 1 and 2) [10,11] and the ryanodine receptor type 1 (RyR), detected as a truncated but functional channel-protein [12]. Previous results of Mandi et al. [13] reported about NAADP-sensitive store in liver microsome fraction. Additionally, Zhang's group has shown that NAADP-sensitive Ca^{2+} release channel is present in the lysosome of native liver cells [14]. We have also observed NAADP-evoked Ca^{2+} -release in permeabilized hepatocytes [15].

So, we investigated whether inhibitors of these channels influence the TLC-S-elicited Ca^{2+} release. We tested 2-aminoethylidiphenyl borate (2-APB) as the inhibitor of the IP_3Rs . It was revealed that TLC-S-induced Ca^{2+} -signals were not inhibited by the IP_3Rs antagonist 2-APB (100 μM) (Fig. 1, *C*).

Monitoring of TLC-S action on the Ca^{2+} storage organelles in suspension of permeabilized hepatocytes. In suspensions of murine hepatocytes, TLC-S (100 μM) mobilizes 66.10 ± 8.87 % of the total stored calcium released by ionomycin (10 μM). In this experiment, after exposure to TLC-S thapsigargin can release 47.94 ± 13.05 % of the total stored calcium. A typical trace showing the effect of bile acid on Mag-Fura-2 (5 μM) (F/F_0) in intracellular store of hepatocytes is shown on Fig.2, *A*.

NAADP is the most potent Ca^{2+} -mobilizing agent identified to date that acts in various cell types across phyla. It was shown to selectively target the lysosome-related organelles rich in Ca^{2+} and H^+ and therefore called acidic Ca^{2+} -stores. In hepatocytes they are presented as endo-lysosomal system of the cell [16]. There are many hypotheses about the mechanisms of NAADP action. Much evidence suggests that NAADP induces small yet localized cytoplasmic Ca^{2+} -signals subsequently amplified into regenerative global Ca^{2+} -signals by recruitment of endoplasmic reticulum via calcium-induced calcium release (CICR) [17]. The actual data collected on the NAADP-receptors remain disputable. The potential NAADP-sensitive Ca^{2+} -channels candidates include TRPML1, TRPM2, TPCs and even RyRs [16, 17]. In order to investigate the effects of NAADP in the cell, there was synthesized the selective antagonist of NAADP – NED-19. This small molecule is cell-permeable and fluorescent derivative of tryptophan. NED-19 is a powerful noncompetitive inhibitor of NAADP-binding process. It is also able to label the NAADP-receptors in intact cells and effectively block the NAADP-induced Ca^{2+} -release. Thus, NED-19 is commonly used for studies of NAADP-mediated events [18]. We have found previously that NAADP triggered changes in stored Ca^{2+} were completely abolished by NED-19 as antagonist of NAADP in permeabilized rat hepatocytes [15].

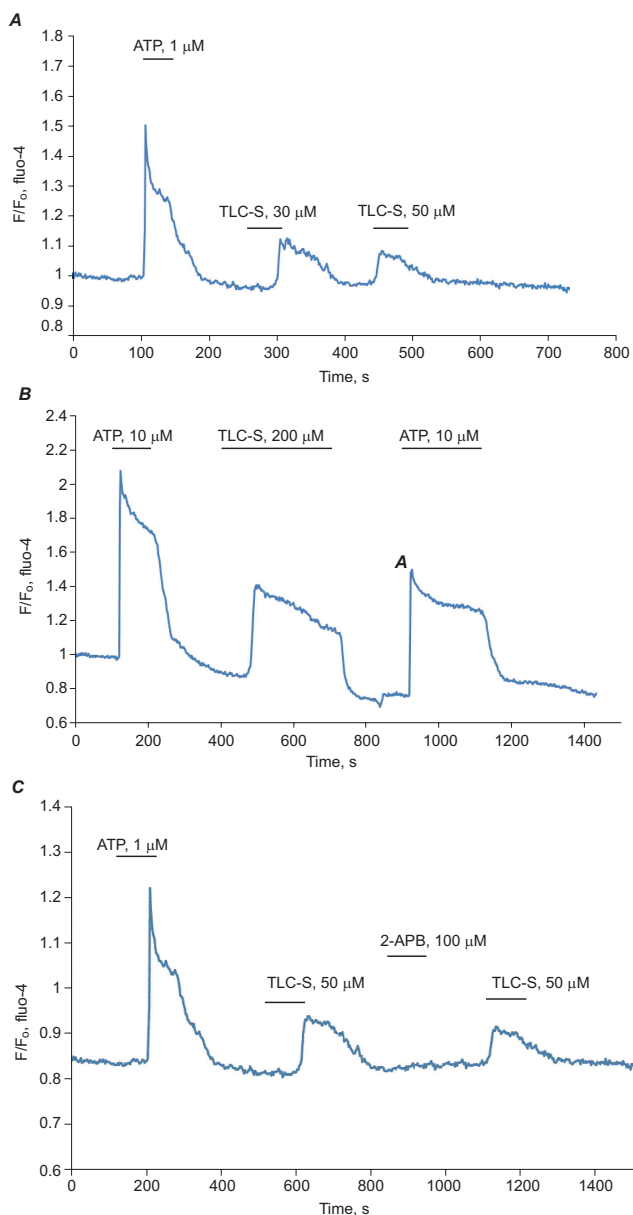


Fig. 1. TLC-S-induced increase of Ca^{2+} level in the cytosol of intact hepatocytes loaded with fluo-4: **(A)** TLC-S-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation is dependent on the concentration of TLC-S applied (30–50 μM); **(B)** TLC-S (200 μM) triggers $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise about half the size of 10 μM ATP-evoked elevation; after TLC-S-elicited Ca^{2+} -signals hepatocytes answer to ATP but this signal has smaller amplitude yet longer plateau phase; **(C)** 2-APB does not block $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation induced by TLC-S

Рис. 1. TLC-S-індуковане збільшення вмісту Ca^{2+} в цитозолі інтактних гепатоцитів, навантажених fluo-4: **(A)** TLC-S-зумовлене збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ залежить від концентрації TLC-S (30–50 мкмоль/л); **(B)** TLC-S (200 мкмоль/л) викликає підвищення рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ приблизно наполовину менше за його збільшення під впливом 10 мкмоль/л АТФ; після Ca^{2+} -сигналів, викликаних TLC-S, гепатоцити реагують на АТФ сигналом із меншою амплітудою, зате подовженою фазою плато; **(C)** 2-APB не пригнічує TLC-S-індукованого підвищення вмісту $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

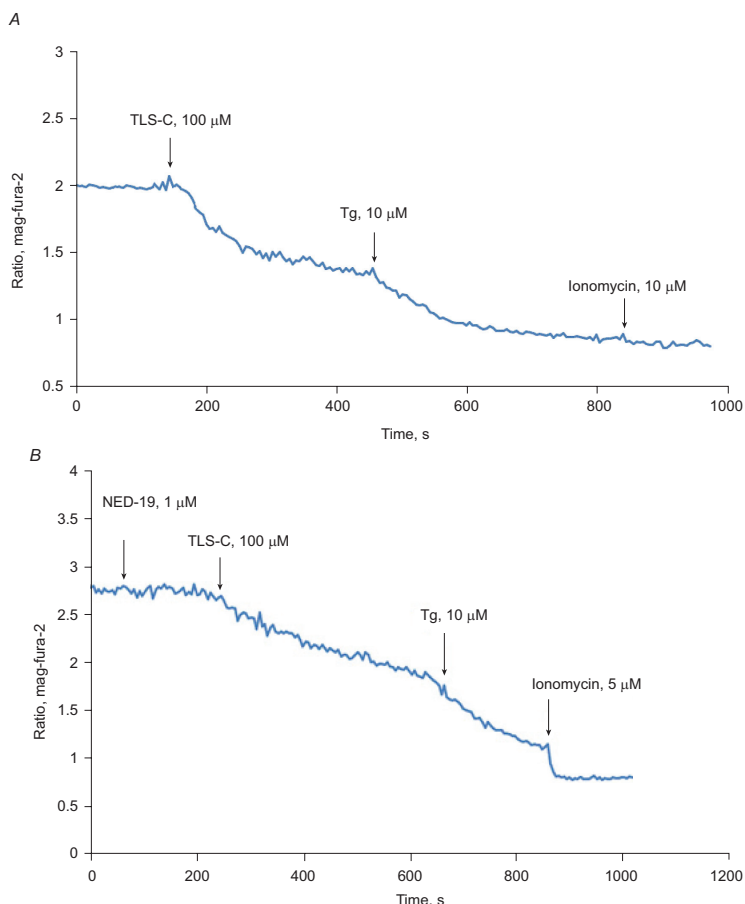


Fig. 2. The effect of TLC-S on store Ca^{2+} content in permeabilized hepatocytes loaded with mag-fura-2: **(A)** 100 μM TLC-S induce Ca^{2+} release from intracellular store, the subsequent application of thapsigargin leads to depletion of Ca^{2+} -store and the next adding of ionomycin releases residual Ca^{2+} ; **(B)** NED-19 substantially reduces TLC-S-evoked Ca^{2+} release and increases the rate of store emptying

Рис. 2. Вплив TLC-S на вміст депонованого Ca^{2+} у пермеабілізованих гепатоцитах, навантажених маг-фуро-2: **(A)** TLC-S у концентрації 100 мкмоль/л спричиняє вивільнення Ca^{2+} з депо, подальше застосування тапсигаргіну зумовлює спустошення останнього, а подальше використання іономіцину вивільняє залишковий Ca^{2+} ; **(B)** NED-19 суттєво пригнічує TLC-S-індуковане вивільнення Ca^{2+} з депо та підвищує швидкість його спустошення

After application of NED-19 (100 nM) fraction of calcium that was released by TLC-S decreases and made up only $33.25 \pm 2.15\%$ of the total calcium released by ionomycin. In this case, the following use of thapsigargin mobilizes only $21.75 \pm 10.68\%$ of the stored calcium in suspension of mice hepatocytes (Fig. 2, B). Thus, the previous application NED-19 significantly ($n = 6$; $P \leq 0.01$) reduced the proportion of calcium released by TLC-S 2-fold. We also calculated the velocity of calcium store emptying by TLC-S and thapsigargin in control and after previous application of NED-19. It was established that the rate of TLC-S-induced reduction of calcium level in the intracellular stores was 2-fold slower than after application of NED-19 ($n = 6$; $P \leq 0.05$). The same results were observed on thapsigargin-elicited calcium content decrease in endoplasmic reticulum – previous

application of NED-19 increased its rate by 2.5 fold ($n = 6$; $P \leq 0.01$). We speculate that the rise in velocity of TLC-S- and thapsigargin-induced calcium release from endoplasmic reticulum after previous application of NED-19 is caused by destruction of the contact sites between NAADP-sensitive acidic stores and endoplasmic reticulum. We assume that the acidic Ca^{2+} -store is important for refilling endoplasmic reticulum with calcium.

CONCLUSION

We suggest that acidic Ca^{2+} -stores are involved in TLC-S-induced cytosolic Ca^{2+} -signals due to reduction of calcium level in the endoplasmic reticulum of mice hepatocytes. Thus, the mechanism of TLC-S-induced Ca^{2+} -release is also NAADP-mediated.

1. Combettes L., Dumont M., Berthon B. et al. Release of calcium from the endoplasmic reticulum by bile acids in rat liver cells. **J. Biol. Chem.**, 1988; 263(5): 2299–2303.
2. Combettes L., Berthon B., Doucet E. et al. Characteristics of bile acid-mediated Ca^{2+} release from permeabilized liver cells and liver microsomes. **J. Biol. Chem.**, 1989; 264(1): 157–167.
3. Rembacz K. P., Woudenberg J., Hoekstra M. et al. Unconjugated bile salts shuttle through hepatocyte peroxisomes for taurine conjugation. **Hepatology**, 2010; 52(6): 2167–2176.
4. Bouscarel B., Fromm H., Nussbaum R. Ursodeoxycholate mobilizes intracellular Ca^{2+} and activates phosphorylase a in isolated hepatocytes. **Am. J. Physiol.**, 1993; 264(2 Pt 1): G243–51.
5. Lau B.W., Colella M., Ruder W.C., Ranieri M., Curci S., Hofer A.M. Deoxycholic acid activates protein kinase C and phospholipase C via increased Ca^{2+} entry at plasma membrane. **Gastroenterology**. 2005. 128(3): 695–707.
6. Voronina S.G., Gryshchenko O.V., Gerasimenko O.V. et al. Bile acids induce a cationic current, depolarizing pancreatic acinar cells and increasing the intracellular Na^+ concentration. **J. Biol. Chem.**, 2005; 280(3): 1764–1770.
7. Voronina S.G., Barrow S.L., Gerasimenko O.V. et al. Effects of Secretagogues and Bile Acids on Mitochondrial Membrane Potential of Pancreatic Acinar Cells COMPARISON OF DIFFERENT MODES OF EVALUATING $\Delta\psi_m$. **J. Biol. Chem.**, 2004; 279(26): 27327–27338.
8. 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; 281(52): 40154–40163.
9. Li W.-C., Ralphs K.L., Tosh D. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes. **Methods Mol. Biol.**, 2010; 633: 185–196.
10. Hirata K., Pust T., O'Neill A.F. et al. The type II Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor can trigger Ca^{2+} waves in rat hepatocytes. **Gastroenterol.**, 2002; 122: 1088–1100
11. Nagata J., Guerra M.T., Shugrue C.A. et al. Lipid rafts establish calcium waves in hepatocytes. **Gastroenterology**, 2007; 133: 256–267.
12. Pierobon N., Renard-Rooney D.C., Gaspers L.D., Thomas A.P. Ryanodine receptor in the liver. **J. Biol. Chem.**, 2006;10: 34086–34095.
13. Mandi M., Toth B., Timar G., Bak J. Ca^{2+} releasetriggered by NAADP in hepatocyte microsomes. **Biochem. J.** 2006; 395(2): 233-238.
14. Zhang F., Li P. L. Reconstitution and characterization of a nicotinic acid adeninedinucleotide phosphate (NAADP)-sensitive Ca^{2+} release channel from liver lysosomes of rats. **J. Biol. Chem.**, 2007; 282(35): 25259–25269.
15. Bychkova S.V., Chorna T.I. NAADP-sensitive Ca^{2+} stores in permeabilized rat hepatocytes **Ukr. Biochem. J.** 2014; 86(5): 65–73.
16. Patel S., Ramakrishnan L., Rahman T. et al. The endo-lysosomal system as an NAADP-sensitive acidic Ca^{2+} store: role for the two-pore channels. **Cell Calcium**, 2011; 50(2): 157–167.
17. Morgan A.J., Platt F.M., Lloyd-Evans E. et al. Molecular mechanisms of endolysosomal Ca^{2+} signalling in health and disease. **Biochem. J.** 2011; 439(3): 349–374.
18. Naylor E., Arredouani A., Vasudevan S.R. et al. Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. **Nature Chemical Biology**, 2009; 5(4): 220-226.

ВПЛИВ 3-СУЛЬФО-ТАУРОЛІТОХОЛЕВОЇ КИСЛОТИ НА ВМІСТ ЦИТОЗОЛЬНОГО ТА ДЕПОНОВАНОГО КАЛЬЦІЮ В ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТАХ МИШЕЙ**С. В. Бичкова**

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

Моногідроксильовані жовчні кислоти, такі як тауролітохолева кислота (TLC) і її трисульфат (TLC-S), підвищують цитозольний кальцій у суспензії гепатоцитів [1, 2]. Вважають, що таке вивільнення відбувається за рахунок IP_3 -чутливого депо, але без утворення IP_3 . Нікотинацидаденіндинуклеотидфосфат (НААДФ) здатний вивільнювати Ca^{2+} із органодів ендолізосомальної системи, яку зараховують до кислотного депо клітин через кислий вміст. Метою роботи було дослідити вплив NED-19 (антагоніста НААДФ) на TLC-S-індуковані зміни вмісту Ca^{2+} в ізольованих гепатоцитах мишей для того, щоб з'ясувати роль кислотного депо у TLC-S-індукованому вивільненні Ca^{2+} . Ізольовані гепатоцити мишей навантажували 2,5 мкмоль/л fluo-4. Зміни рівня концентрації кальцію в цитозолі реєстрували за допомогою скануючого двофотонного мікроскопа Leica SP2 MP. З метою пермеабілізації гепатоцитів клітини обробляли сапоніном (0,1 мг/мл) у суспензії та навантажували табуфі-2. Зміни депонованого кальцію реєстрували спектрофлуориметричним методом. Нами встановлено, що TLC-S у діапазоні концентрацій 50, 100 і 200 мкмоль/л здатний викликати короткочасне підвищення кальцію в цитозолі ізольованих гепатоцитів мишей. Попередня аплікація 2-APB (100 мкмоль/л) не запобігала TLC-S-індукованим Ca^{2+} -сигналам. У суспензії ізольованих гепатоцитів мишей TLC-S вивільнює $66,10 \pm 8,87$ % депонованого кальцію від усієї його кількості, яку здатний вивільнити іономіцин. У цьому експерименті після дії TLC-S, тапсигаргін ще може вивільнити $47,94 \pm 13,05$ % депонованого кальцію. Після застосування NED-19 (100 нмоль/л) частка кальцію, що вивільнюється TLC-S зменшується і становить лише $33,25 \pm 2,15$ %. При цьому подальше застосування тапсигаргіну мобілізує тільки $21,75 \pm 10,68$ % депонованого кальцію суспензії гепатоцитів мишей. Отже, попередня аплікація NED-19 статистично достовірно ($n = 6$; $P \leq 0,01$) зменшує частку депонованого кальцію після подальшого додавання TLC-S у 2 рази. Встановлено, що швидкість TLC-S-вивільнення кальцію з депо збільшується у 2 рази після попереднього застосування NED-19 ($n = 6$; $P \leq 0,05$). Також і швидкість тапсигаргін-індукованого вивільнення кальцію з депо зростає у 2,5 разу після преінкубації клітин з NED-19 ($n = 6$; $P \leq 0,01$). Ми припускаємо, що у реалізації впливу TLC-S на вміст кальцію в гепатоцитах мишей, окрім тапсигаргін-чутливого, залучене ще й кислотне депо, яке представлене ендолізосомами. Отже, механізм дії TLC-S-індуковані Ca^{2+} -сигнали досліджуваних клітин є НААДФ-опосередкованим.

Ключові слова: гепатоцити, 3-сульфо-тауролітохолева кислота, Ca^{2+} , нікотинацидаденіндинуклеотидфосфат.

ВЛИЯНИЕ 3-СУЛЬФО-ТАУРОЛИТОХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОЗОЛЬНОГО И ДЕПОНИРОВАННОГО КАЛЬЦИЯ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ МЫШЕЙ

С. В. Бычкова

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

Моногидроксилированные желчные кислоты, такие как тауролитохолевая кислота (TLC) и ее трисульфат (TLC-S), повышают цитозольный кальций в суспензии гепатоцитов [1, 2]. Полагают, что такое высвобождение происходит за счет ИФ₃-чувствительного депо, но без образования ИФ₃. Никотинацидадениндинуклеотидфосфат (НААДФ) способен высвобождать Ca²⁺ из органоидов эндолизосомальной системы, которую причисляют к кислотному депо клеток из-за кислого содержимого. Целью работы было исследовать влияние NED-19 (антагониста НААДФ) на TLC-S-индуцированные изменения кальция в изолированных гепатоцитах мышей для того, чтобы выяснить роль кислотного депо в TLC-S-индуцированном высвобождении Ca²⁺. Изолированные гепатоциты мышей нагружали 2,5 мкмоль/л fluo-4. Регистрировали изменения концентрации кальция в цитозоле с использованием сканирующего двухфотонного микроскопа Leica SP2 MP. С целью пермеабиллизации гепатоцитов клетки обрабатывали сапонином (0,1 мг/мл) в суспензии и нагружали mag-fura-2. Изменения депонированного кальция регистрировали спектрофлуориметрическим методом. Нами установлено, что TLC-S в диапазоне концентраций 50, 100 и 200 мкмоль/л способен вызвать кратковременное повышение кальция в цитозоле изолированных гепатоцитов мышей. Предыдущая аппликация 2-APB (100 мкмоль/л) не предотвратила TLC-S-индуцированного Ca²⁺-сигнала. В суспензии изолированных гепатоцитов мышей TLC-S высвобождает 66,10 ± 8,87% депонированного кальция от всего, что способен высвободить иономицин. В этом эксперименте, после воздействия TLC-S, тапсигаргин еще способен высвободить 47,94 ± 13,05% депонированного кальция. После применения NED-19 (100 нмоль/л) доля кальция, высвобождаемая TLC-S уменьшается и составляет лишь 33,25 ± 2,15 %. При этом последующее применение тапсигаргина мобилизует только 21,75 ± 10,68 % депонированного кальция в суспензии гепатоцитов мышей. Итак, предыдущая аппликация NED-19 статистически достоверно (n = 6; P ≤ 0,01) уменьшает долю депонированного кальция после следующего добавления TLC-S в 2 раза. Установлено, что скорость TLC-S-вызванного освобождения кальция с депо увеличивается в 2 раза после предыдущей инкубации с NED-19 (n = 6; P ≤ 0,05). Также скорость тапсигаргин-индуцированного освобождения кальция с депо возрастает в 2,5 раза (n = 6; P ≤ 0,01). Мы предполагаем, что в реализации влияния TLC-S на содержание кальция в гепатоцитах мышей, кроме тапсигаргин-чувствительного, привлечено еще и кислотное депо, которое представлено эндолизосомами. Итак, механизм действия TLC-S на кальциевый гомеостаз исследуемых клеток является НААДФ-опосредованным.

Ключевые слова: гепатоциты, 3-сульфо-тауролитохолевая кислота, Ca²⁺, никотинацидадениндинуклеотидфосфат.

Одержано: 15.10.2014